



Étude des interactions entre l'epigallo-catéchine-3-gallate et la B-lactoglobuline et de leurs effets sur les propriétés fonctionnelles et biologiques du système

Mémoire

Raquel Zorrilla Tejada

Maîtrise en sciences des aliments - avec mémoire
Maître ès sciences (M. Sc.)

Québec, Canada

© Raquel Zorrilla Tejada, 2019

Étude des interactions entre l'épigallo-catéchine-3-gallate et la β -lactoglobuline et de leurs effets sur les propriétés fonctionnelles et biologiques du système

Mémoire

Raquel Zorrilla Tejada

Sous la direction de :

Muriel Subirade

Résumé

Plusieurs aliments fonctionnels sont et seront développés à partir de molécules aux propriétés nutraceutiques. Parmi ces molécules, l'épigallocatechine-3-gallate (EGCG), principal antioxydant du thé vert, présente un grand intérêt en raison de ses propriétés antioxydantes qui pourraient jouer un rôle préventif vis-à-vis de certaines pathologies. Cependant, sa biodisponibilité est faible à cause de son instabilité en milieu intestinal. De son côté, la β -Lactoglobuline (β -Lg) est connue pour sa capacité à lier des molécules bioactives les protégeant de l'oxydation. L'objectif général de ce projet de recherche vise à étudier les interactions entre l'EGCG et la β -Lg et l'impact de ces interactions sur les propriétés fonctionnelles du système formé.

La caractérisation moléculaire des interactions entre l'EGCG et la β -Lg, à l'état natif et dénaturé thermiquement, a été réalisée par des méthodes spectroscopiques. Les résultats montrent que l'EGCG interagit avec la β -Lg au niveau moléculaire en formant un complexe 1:1 induisant un changement de la structure moléculaire de la β -Lg. L'interaction provoque une diminution de l'activité antioxydante de l'EGCG dans toutes les conditions étudiées. Cependant, on observe que la β -Lg assure une protection limitée à l'EGCG contre la dégradation dans le temps : la forme dénaturée de la protéine à pH 7 étant légèrement plus efficace.

L'impact de l'EGCG sur le comportement thermique de la β -Lg et sur la microstructure des gels obtenus a été étudié par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) et par microscopie électronique. La présence d'EGCG change le profil d'agrégation de la protéine. Cependant, ces interactions n'entraînent pas de changements majeurs dans la microstructure des gels formés, qu'il s'agisse des gels filamenteux ou particuliers.

Cette étude démontre que la β -Lg peut lier l'EGCG et maintenir une activité antioxydante non négligeable dans les deux types des gels formés par la protéine.

Abstract

Molecules with nutraceutical properties can be used to develop functional foods. The major antioxidant in green tea, epigallocatechin-3-gallate (EGCG), could be valuable for preventing certain pathologies. However, its bioavailability in the intestine needs to be improved. The milk protein β -lactoglobulin is known for its ability to protect bioactive molecules from oxidation. The general aim of this research was to study EGCG– β -lactoglobulin interactions and their effects on nutraceutical functionality using spectroscopic methods. The results show that EGCG forms complexes with β -lactoglobulin in a 1:1 ratio and induces changes in the molecular structure of the protein. This interaction causes a decrease in the antioxidant activity of EGCG. However, EGCG degradation is slowed, more in the case of thermally denatured β -lactoglobulin. Using Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and electron microscopy to study β -lactoglobulin thermal behaviour and gel microstructure, it was determined that binding EGCG changes the protein aggregation pattern but has little effect on the microstructure of filamentous gels or particulate gels. This study shows that both types of β -lactoglobulin gel can bind EGCG and maintain its antioxidant activity.

Table des matières

Résumé	ii
Abstract.....	iii
Table des matières	iv
Liste des figures.....	vii
Liste des unités.....	ix
Liste des acronymes.....	x
Remerciements.....	xii
Avant-propos	xiii
Introduction	1
1. Revue de littérature.....	4
2.1 Aliments fonctionnels et nutraceutiques.....	4
2.2 Phytoantioxydants.....	5
2.3 Flavonoïdes.....	7
2.4 Les catéchines	8
2.4.1 Structure et caractéristiques chimiques.....	8
2.4.2 Stabilité thermique et pH.....	10
2.4.3 Sources alimentaires.....	11
2.4.4 Activité biologique des catéchines	11
2.4.5 Activité antioxydante	11
2.4.6 Métabolisme des catéchines.....	14
2.4.7 Biodisponibilité et bioaccessibilité.....	15
2.4.8 Impact des interactions des catéchines sur les propriétés fonctionnelles des protéines	16
2.5 Les protéines laitières : le cas de la β -lactoglobuline bovine.....	16
2.5.1 Caractéristiques structurales.....	17
2.5.2 Influence du milieu sur la structure	18
2.5.3 Capacité de liaison de la β -Lactoglobuline.....	20
2.5.4 Propriétés fonctionnelles de la β -Lactoglobuline.....	20
2.5.5 Propriétés gélifiantes.....	20
2.6 Hypothèse	22
2.7 Objectifs	22
2. Chapitre : Interaction of epigallocatechin-3-gallate with beta-Lactoglobulin: molecular characterization and biological implication.....	23

2.1.	Résumé	23
2.2.	Abstract	24
2.3.	Introduction.....	24
2.4.	Materials and Methods	27
3.4.1	Materials	27
3.4.2	FTIR spectroscopic measurements	27
3.4.3	Fluorescence Spectroscopy.....	28
3.4.4	FRAP assay	28
2.5.	Results and Discussion	28
3.5.1	The β -Lg/EGCG interaction studied by fluorescence quenching	28
3.5.2	FTIR analysis of the influence of EGCG binding on β -Lg and h- β -Lg structure	33
3.5.3	Effect of complex formation on the antioxidant capacity of EGCG.....	37
2.6.	Conclusions.....	41
3.	Chapitre : Molecular structure of β -lactoglobulin heat-set gels interacting with epigallocatechin-3-gallate	42
3.1.	Résumé	42
3.2.	Abstract	42
3.3.	Introduction.....	43
3.4.	Materials and Methods	45
4.1.1	Materials	45
4.1.2	FT-IR spectroscopic Measurements	45
4.1.3	Destabilizing agents test	46
4.1.4	Electron Microscopy.....	46
4.1.5	Macroscopic gel observations.....	47
4.1.6	Color measurements.....	47
3.5.	Results	47
4.5.1	FTIR data	47
4.5.2	Destabilizing agents test	51
4.5.3	Microscopic studies.....	52
4.5.4	Macroscopic studies.....	54
3.6.	Discussion	55
4.6.1	Differences in gel formation and structure due to EGCG	55
4.6.2	EGCG-induced microscopic and visible differences in β -Lg gel structure.....	56

3.7. Conclusions.....	57
Conclusion.....	59
Bibliographie.....	61

Liste des figures

Figure 1-1. Classification des composés phytochimiques (Liu, 2004).	6
Figure 1-2. Structure de base des flavonoïdes (Balasundram et Coll., 2006).....	7
Figure 1-3. Structures génériques des principaux flavonoïdes (Balasundram et coll., 2006).	8
Figure 1-4. Structures des quatre plus importantes catéchines du thé vert. EC : épicatechine, EGC : épigallocatechine, ECG : épicatechine-gallate, EGCG : épigallocatechine-gallate, (Sonoda et coll., 2015).....	9
Figure 1-5. Forme oxydée de l'épicatechine. Caractéristiques structurales de l'activité antioxydante (Rice- Evans, 2001).....	12
Figure 1-6. Structure chimique de l'EGCG.(Mereles et coll., 2010)	13
Figure 1-7. Formation d'EGCG-o-quinone réactive (Lambert et coll., 2007).....	14
Figure 1-8. Représentation schématique des possibles mécanismes de l'absorption et du métabolisme des catéchines (Donovan et coll., 2001).....	15
Figure 1-9. Représentation schématique de la structure secondaire de la β -Lg variant B la localisation des feuilletts β (VVV) des hélices α (lllll), des prolines (Δ) et de résidus substitués (*) dans les variantes génétiques, est illustré. (Creamer et coll., 1983).....	17
Figure 1-10. Structure tertiaire de la β -Lg. (Brownlow et coll., 1997).....	18
Figure 1-11. Représentation schématique du comportement thermique proposé de la β -Lg à pH >6,8 entre 20 et 150 °C (de Wit, 2009).....	19
Figure 2-1. Chemical structure of EGCG	25
Figure 2-2. Representation of β -Lg secondary structure. The β strands and joining loops are labelled. (Brownlow et al.1997)	26
Figure 2-3. Fluorescence emission spectra (λ_{ex} =295 nm) of β -lactoglobulin at pH 7.0 in the presence of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) at different protein/antioxidant molar ratios: A native protein; B heat- denatured protein; a β -Lactoglobulin alone (40 $\mu\text{mol.L}^{-1}$); b 1:1; c 1:2; d 1:10; e epigallocatechin-3-gallate alone (40 $\mu\text{mol.L}^{-1}$). Insets Plot of $\log [(F_0-F)/F]$ as a function of $\log [\text{EGCG}]$ as per Eq. 1	30
Figure 2-4. Fluorescence emission spectra (λ_{ex} =295 nm) of β -lactoglobulin at pH 4.0 in the presence of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) at different protein/antioxidant molar ratios: A native protein; B heat- denatured protein; a β -Lactoglobulin alone (40 $\mu\text{mol.L}^{-1}$); b 1:1; c 1:2; d 1:10; e epigallocatechin-3-gallate alone (40 $\mu\text{mol.L}^{-1}$). Insets Plot of $\log [(F_0-F)/F]$ as a function of $\log [\text{EGCG}]$ as per Eq. 1	32
Figure 2-5. Amide I' region of the de-convoluted FTIR spectra of β -Lg in the presence of EGCG at different protein/antioxidant molar ratios (A) native protein and (B) heat-denatured protein; (a) β -Lg alone; (b) 1:1; (c) 1:2 (d) 1:10. All samples were at pD 7.4 in D_2O . Spectra were recorded at 24°C.....	34
Figure 2-6. Amide I' region of the de-convoluted FTIR spectra of β -Lg in the presence of EGCG at different protein/antioxidant molar ratios (A) native protein and (B) heat-denatured protein; (a) β -Lg alone; (b) 1:1; (c) 1:2 (d) 1:10. All samples were at pD 4.4 in D_2O . Spectra were recorded at 24°C.....	36
Figure 2-7. Antioxidant activity (FRAP) of 20, 40 and 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ EGCG measured at pH 7.0 (A) and pH 4.0 (B); alone (\blacksquare), with 20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ β -Lg (\blacksquare) or with 20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ h- β -Lg (\blacksquare)	38
Figure 2-8. Antioxidant activity (FRAP) of (\blacklozenge) pure EGCG, (\blacksquare) β -Lg and EGCG 1:1, (\blacktriangle) h- β -Lg and EGCG 1:1 measured over time at pH 7.0 (A) and pH 4.0 (B).....	40
Figure 3-1. Representation of bovine β -Lg unliganded form. Eight antiparallel β -strands (A-H) form central calyx surrounded by flexible loops: AB, CD, EF and GH (Loch et., al 2011)	44

Figure 3-2. Chemical structure of EGCG (Mereles et al., 2010)	45
Figure 3-3. Deconvoluted spectra of β -Lg in D ₂ O at pH7.0 in the absence (A) and in the presence (B) of EGCG as a function of temperature during heating up to 85°C and subsequent cooling.....	49
Figure 3-4. Deconvoluted spectra of β -Lg in D ₂ O at pH 4.0 in the absence (A) and in the presence (B) of EGCG as a function of temperature during heating up to 85°C and subsequent cooling.	50
Figure 3-5. Dissolved protein concentration vs. time for protein gels: (◆) fine-stranded; (■) fine-stranded-EGCG; (▲) particulate and (■) particulate-EGCG in (A) water; (B) 1%SDS; (C) 2M Urea and (D) 0.2 M 2-mercaptoethanol	52
Figure 3-6. Transmission electron micrographs of heat gels of β -Lg : at pH 7.0 in the absence (A) and in the presence (B) of EGCG and at pH 4.0 in the absence (C) and in the presence (D) of EGCG.....	53
Figure 3-7. Scanning electron micrographs of heat gels of β -Lg : at pH 7.0 in the absence (A) and in the presence (B) of EGCG and at pH 4.0 in the absence (C) and in the presence (D) of EGCG.....	53
Figure 3-8. Photographs of β -Lg gels: at pH 7.0 in the absence (A) and in the presence (B) of EGCG and at pH 4.0 in the absence (C) and in the presence (D) of EGCG.....	54

Liste des unités

a.u. Arbitrary unit (unité arbitraire)

β -Lg β -Lactoglobuline

g/l Grammes/litre

mg/kg miligrammes/kilogramme

mmol.L⁻¹ Millimole par litre

μ mol.L⁻¹ Micromole par litre

Liste des acronymes

EGCG	Épigallocatechine-3-gallate
FRAP	Ferric reducing antioxidant power (FRAP) (Pouvoir antioxydant réducteur ferrique)
FTIR	Infrarouge à transformée de Fourier
H/D	Hydrogène / deutérium
pD	Potentiel deutérium
pH	Potentiel hydrogène
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SEM	Scanning electron microscopy (microscopie électronique de balayage)
TEM	Transmission electron microscopy (microscopie électronique de transmission)
TPTZ	2,4,6-tripyridil-s-triazine

À ma mère, pour être ma guide, que Dieu te garde dans sa gloire éternelle.

À mes enfants, Ricardo et Isaac, il n'y a pas d'amour plus pur que le vôtre.

À mon mari, Ricardo, pour toujours m'encourager à donner le meilleur de moi.

Remerciements

À Dieu pour me donner la vie et la santé pour compléter cette étape de ma vie.

J'aimerais remercier infiniment :

À ma directrice de recherche, Muriel Subirade, de m'avoir donné l'opportunité de travailler dans son équipe de recherche, et surtout de m'aider à compléter ce projet de recherche;

À Gabriel Remondetto, de m'avoir donné ses conseils tout au long du projet;

À ma chère amie, Li Liang pour m'aider à éclairer plusieurs résultats du projet. It's clear that language is not a barrier for science! Thank you very much my dear friend !!

À Diane Gagnon, pour toujours m'aider à résoudre des problèmes techniques au labo, toujours avec un sourire !

Pendant toutes les années passées dans l'élaboration de ce projet, il y a eu plusieurs personnes que j'ai eu le bonheur de côtoyer et de qui je garde de beaux souvenirs de mon temps passé à la faculté : Diane Gagnon, Fatou Diarrassouba, Li Liang, Alexandra Reid, Sandra Laneuville, Hajer Jedidi, Rajaa Benabbou, Samira Nabil, Romain Caillard, Ghislain Garrait, Nafissatou Ndiaye, Halimatou Sou, Monica Araya.

Je remercie mes collègues de travail qui m'ont donné des encouragements pendant ce dernier sprint ! Emily, Laurie, Lynda, Marie-Christine et Véronique, merci mes chères amies!

Je remercie ma famille au Mexique, mon père, mes frères, et sœurs pour être toujours présent pour moi, Papá, Carolina, Francisco Quintín, Ruth, Carlos Gabriel, los amo con todo mi corazón!

J'aimerais surtout remercier ma famille, Ricardo mon mari et mes deux enfants, Ricardo et Isaac, pour l'appui et l'amour constants, sans lesquels, je n'aurais pu faire ce projet. Vous êtes mon moteur de vie !

Avant-propos

Les travaux de ce mémoire ont été réalisés dans le cadre d'un projet de recherche financé par le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG) au département des sciences des aliments de l'Université Laval sous la direction de Muriel Subirade et la codirection de Gabriel Remondetto.

Ce mémoire contient une introduction générale du projet de recherche. Ensuite, la revue de littérature présente le contexte de la problématique; l'hypothèse et les objectifs de la recherche. Les résultats ainsi que leur discussion sont présentés sous forme de deux articles scientifiques rédigés en anglais.

Le premier article s'intitule *Interaction of epigallocatechin-3-gallate with beta-Lactoglobulin: molecular characterization and biological implication*. Il a été publié dans *Dairy Science & Technology*, 2011, 91 (5), 629-644. J'ai réalisé l'ensemble des expérimentations et je suis l'auteure principale. Pour cet article, j'ai compté sur la collaboration, le soutien scientifique et les révisions de Muriel Subirade, Li Liang et Gabriel Remondetto.

Le deuxième article s'intitule *Molecular changes in the formation and structure of EGCG-β-Lactoglobulin heat-set gels*. J'ai réalisé l'ensemble des expérimentations et je suis l'auteure principale. Pour cet article, j'ai compté sur la collaboration, le soutien scientifique et les révisions de Muriel Subirade, Li Liang et Gabriel Remondetto.

Finalement la conclusion générale mentionne les perspectives d'avenir. La bibliographie regroupe la liste des références utilisées pour l'ensemble du projet de recherche.

Introduction

Le domaine alimentaire connaît un important virage où les vertus bénéfiques des aliments, et de leurs constituants sur la santé humaine sont mises en avant bien au-delà de leur simple valeur nutritive.

Plusieurs nouveaux aliments, qualifiés d'aliments fonctionnels, sont et seront développés à partir de molécules aux propriétés nutraceutiques. Ces dernières années, la niche des aliments fonctionnels s'est significativement répandue et les molécules ajoutées peuvent être des vitamines et minéraux (Rosenberg et coll., 1993; Sacco et Tarasuk, 2009, de Vos, P. et coll., 2010), des acides gras (Frewer et coll., 2003), des peptides bioactifs (Korhonen et Pihlanto, 2006), de fibres solubles (Prosky, 2000; Peressini et Sensidoni, 2009), des bactéries probiotiques (Champagne et Fustier, 2007) et des antioxydants. Parmi ces derniers, les phytoantioxydants présentent un grand intérêt en raison de leurs propriétés antioxydantes et anti radicaux libres. Elles pourraient jouer un rôle préventif vis-à-vis de certaines pathologies, notamment contre les effets délétères des radicaux libres et espèces oxygénées réactives impliquées dans différentes étapes de la cancérogenèse ou de certaines maladies neurodégénératives, telles que la maladie d'Alzheimer ou la maladie de Parkinson.

Parmi les phytoantioxydants, les catéchines qui appartiennent à la famille des flavonoïdes et sont présentes en grande quantité dans le thé vert, sont des antioxydants très puissants. Elles ont une activité contre le radical peroxy ($\text{ROO}\cdot$), dix fois plus importante que le L-ascorbate et le β -carotène (Nakao et coll., 1998). Cependant, les catéchines sont faiblement solubles et très sensibles à plusieurs facteurs environnementaux incluant les conditions gastro-intestinales ce qui limite leur éventuelle application. En plus de leur activité antioxydante, les catéchines constituent l'une des classes d'agents anti-agrégation et peuvent être utilisées pour la prévention et le traitement des maladies impliquant la formation de fibrilles amyloïdes associées à des problèmes de repliements de protéines comme les maladies neurodégénératives (Ferreira et coll., 2012; Bastianetto et coll, 2011).

D'autre part, la β -lactoglobuline (β -Lg), protéine majeure du lactosérum, est une protéine hautement nutritive puisqu'elle contient tous les acides aminés essentiels. Elle est largement utilisée industriellement en raison de ses propriétés nutritionnelles et fonctionnelles. Elle a fait l'objet de nombreux travaux tant sur le plan structural que fonctionnel. Il s'agit d'une petite protéine globulaire (18 KDa) dont la structure tertiaire forme une cavité hydrophobe. Cette structure dite en « tonneau β » est commune à une famille de protéines nommée lipocalines. La fonction biologique de la β -Lg n'est pas entièrement connue, mais il a été montré qu'elle se liait au rétinol et au β -carotène (Dufour et Haertlé, 1991), aux acides gras (Frapin et coll., 1993), aux phospholipides (Lefèvre et Subirade, 2001) et aux composants polyphénoliques (Liang et coll., 2008, Rawel et

coll., 2001), laissant supposer qu'elle pourrait jouer, dans l'organisme, un rôle de transporteur de petits ligands, caractère commun aux lipocalines. Des données de cristallographie ont montré que le rétinol et l'acide rétinoïque s'inséraient dans la poche hydrophobe de la β -Lg, ce qui semble indispensable à la formation de complexes. L'insertion serait due à une certaine flexibilité de la boucle qui se trouve à l'entrée de la cavité. Gasymov et collaborateurs (2004) ont démontré que la rifampine, un antibiotique puissant, pouvait, malgré sa taille, se lier à la cavité hydrophobe de la *tear lipocalin*, de structure analogue à celle de la β -Lg, induisant ainsi une protection contre l'oxydation. Également, des études ont démontré que certaines molécules telles que la vitamine D peuvent se lier à la β -Lg dans un deuxième site (Yang et coll. 2007) en formant aussi un complexe.

En raison de leur aptitude à lier des molécules, il a été suggéré d'utiliser les *Ligand-Binding Proteins*, telles que la β -Lg, comme transporteurs de molécules d'intérêt alimentaire ou pharmaceutique. Ce concept présente un grand intérêt dans le contexte des aliments fonctionnels, car l'utilisation des molécules nutraceutiques est souvent limitée par leur perte d'activité due à leur sensibilité aux conditions environnementales comme mentionnée auparavant. Des études *in vitro* et *in vivo* ont démontré que la β -Lg n'est pas digérée dans l'estomac, mais plutôt dans l'intestin (Kitabatake et Kinekawa 1998), ce qui lui confère une résistance aux conditions gastriques.

De plus, grâce à ses propriétés fonctionnelles, la β -Lg est souvent utilisée comme un agent émulsifiant et gélifiant, ce qui en fait un substrat de choix pour la formation des systèmes de protection/libération de molécules bioactives (Beaulieu et coll., 2002, Chen et coll., 2006).

Les interactions entre les composés phénoliques et les protéines peuvent provoquer la détérioration des aliments pendant la transformation et l'entreposage menant à une perte de la qualité nutritionnelle (Friedman, 1996). Cependant, les études soulignent l'utilisation potentielle de ces interactions comme de nouvelles techniques émergentes qui pourraient jouer un rôle important dans le procédé de transformation des divers produits alimentaires. Par exemple, l'impact positif sur les propriétés sensorielles a été démontré dans des émulsions faites à base d'huile d'olive (Pripp et coll., 2005). De plus, des études ont démontré que les composés phénoliques se comportent comme agents de réticulation et permettent d'augmenter la force dans le réseau des gels élaborés à base de protéines alimentaires (Wu et coll., 2007; Nuthong et coll., 2009; Balange et Benjakul, 2009).

D'autres auteurs ont montré que les protéines du lactosérum permettaient non seulement de maintenir l'activité antioxydante de phytoantioxydants, mais induisaient une augmentation de cette activité (Almajano et coll., 2007a et 2007b).

Ce projet de recherche vise à étudier les interactions impliquées dans la formation d'un complexe β -Lg-catéchine, leurs effets sur l'activité antioxydante de la catéchine et sur les propriétés fonctionnelles de la protéine.

1. Revue de littérature

2.1 Aliments fonctionnels et nutraceutiques

Les maladies chroniques comprenant le cancer et les maladies cardiovasculaires sont les principales causes de la mortalité dans la population occidentale. Le dernier rapport statistique sur le cancer au Canada (Comité consultatif des statistiques canadiennes sur le cancer : Statistiques canadiennes sur le cancer 2018) mentionne qu'environ un canadien sur quatre développera un cancer au cours de sa vie et que près d'un canadien sur quatre mourra du cancer. Des facteurs génétiques, l'âge, le style de vie et l'alimentation sont considérés comme des facteurs de risque importants pour le développement de ces maladies (Simopoulos, 2006; Rao et Rao, 2007; Danaei et coll., 2009). À cause de tous ces facteurs les consommateurs sont de plus en plus intéressés aux bénéfices potentiels que les aliments peuvent leur apporter que cela soit pour la prévention de maladies ou pour empêcher le vieillissement prématuré (Wellman, 2007; Ferrari, 2004). Les avancées en technologie des aliments, associées à une meilleure compréhension des propriétés nutritives spécifiques, ont stimulé le développement de nombreux nouveaux produits alimentaires appelés aliments fonctionnels qui, au-delà des fonctions nutritives, ont un effet sur la santé. Il s'agit d'aliments conventionnels dans lesquels des composés actifs ayant une activité biologique démontrée, sont inhérents ou ont été ajoutés à l'aliment (Bech-Larsen et Grunert, 2003, Granato et coll., 2017).

D'autre part, les nutraceutiques tels que définis par Zeisel (1999), sont des compléments alimentaires qui offrent une forme concentrée d'un agent démontré bioactif provenant d'un aliment, présenté sous une matrice non alimentaire et utilisé dans le but d'améliorer la santé à des doses qui dépassent celles qui pourraient être obtenues par notre alimentation normale. Actuellement, la définition de composants nutraceutiques est encore en évolution et il n'y a pas un consensus général au niveau mondial (Santini et coll., 2018). En fait, le terme nutraceutique est une combinaison des mots nutrition et pharmaceutique qui a été inventé par Stephen De Felice en 1989 (De Felice 2002).

D'après Santé Canada (2004) les nutraceutiques sont présentés sous forme médicinale - capsules, pilules, comprimés, etc.,- alors que les aliments fonctionnels sont semblables aux aliments traditionnels. Ainsi, quand une substance active est incluse dans une formulation alimentaire, il s'agit d'un aliment fonctionnel alors que si la même substance active est incluse dans une pilule, elle constituera un nutraceutique.

Parmi les molécules bioactives, celles qui possèdent des propriétés antioxydantes et anti radicaux libres ont fait l'objet de nombreux travaux en raison du rôle préventif qu'elles pourraient jouer vis-à-vis de certaines pathologies, notamment contre les effets délétères des radicaux libres et espèces oxygénées réactives impliquées dans différentes étapes de la cancérogenèse ou de certaines maladies neurodégénératives (Visioli

et coll., 2011; Tomás-Barberán et Andrés-Lacueva, 2012). Des effets thérapeutiques et prophylactiques ont ainsi été associés aux antioxydants d'origine naturelle, tels les composés phytochimiques ou phytoantioxydants qui depuis ont vu leur popularité augmenter de façon considérable.

2.2 Phytoantioxydants

Les composés phytoantioxydants sont des substances bioactives non nutritives qui se trouvent dans plusieurs aliments d'origine végétale (Cheynier, 2005).

Les directives nutritionnelles pour la prévention des maladies chroniques, identifiant l'importance des antioxydants, recommandent une augmentation de la consommation des fruits et des légumes qui sont de bonnes sources d'antioxydants naturels. En plus des antioxydants traditionnels, tels que les vitamines A, E, et C, les fruits et les légumes contiennent également des phytoantioxydants.

Produits par les plantes, les phytoantioxydants ne sont pas essentiels pour les humains, mais ils peuvent les protéger contre diverses pathologies dégénératives comme les maladies cardiovasculaires et les cancers (Manach et coll., 2005; Scalbert et coll., 2005b; Wilson et coll., 2017). Les composés phytoantioxydants sont générés à partir du métabolisme secondaire des plantes (Parr et Bolwell, 2000). Chez les plantes, ils jouent différents rôles dans de nombreux processus, tels que proportionner la couleur aux feuilles et fruits, aider à la croissance des plantes et protéger celles-ci contre les attaques des agents pathogènes (Bravo, 1998). Ils constituent l'un des plus nombreux groupes de produits naturels dans le règne végétal. Plus de 8000 composés phytochimiques sont actuellement connus et parmi eux, plus de 4000 flavonoïdes ont été identifiés (Harborne et Williams, 2000; Cheynier, 2005). La Figure 1-1 montre la classification des composés phytochimiques.

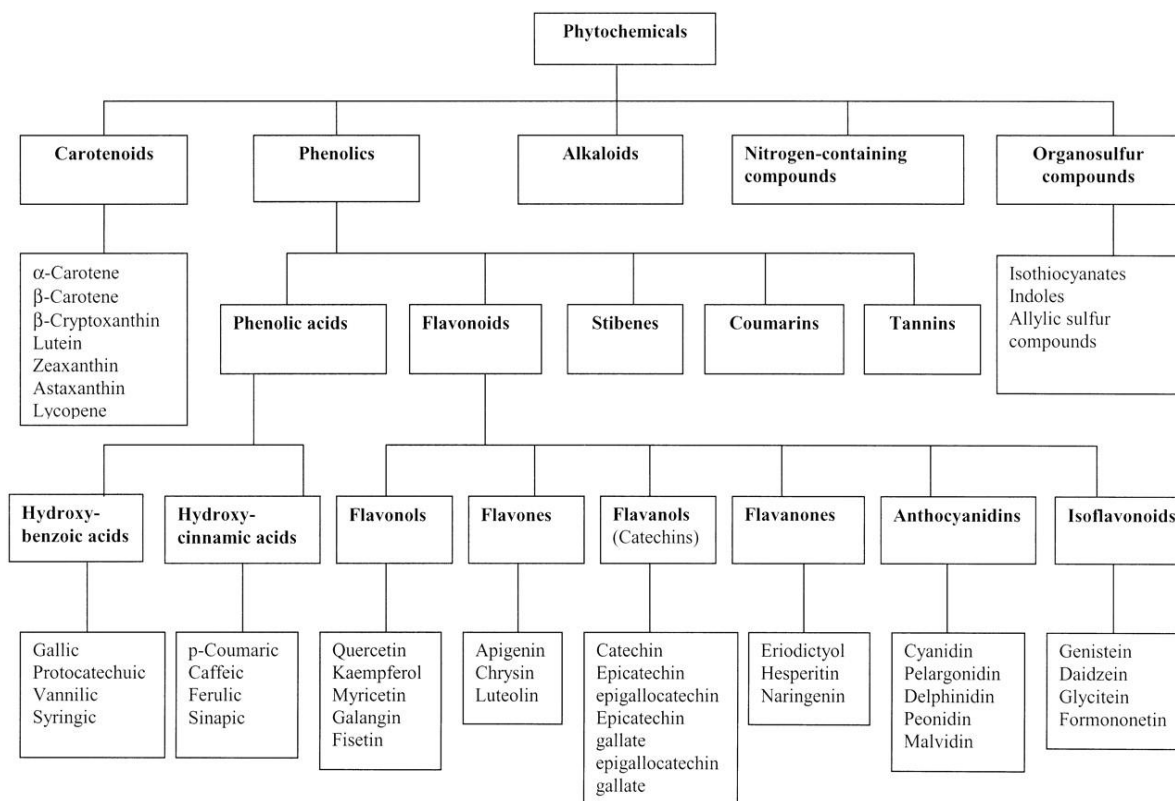


Figure 1-1. Classification des composés phytochimiques (Liu, 2004).

Les polyphénols sont les antioxydants les plus abondants dans l'alimentation. Leur apport alimentaire total pourrait être aussi élevé que 1 gramme par jour, ce qui est beaucoup plus élevé que celui de toutes les autres catégories de composés phytochimiques et antioxydants alimentaires connus (Scalbert et coll., 2005a). Les polyphénols se trouvent dans une grande variété d'aliments tels que les légumes, les fruits, le vin, le café et le thé (Manach et coll., 2005a).

Les polyphénols aussi connus comme composés phénoliques, se trouvent sous forme conjuguée avec des molécules de mono et polysaccharides liées à un ou plusieurs groupes phénoliques (Rice-Evans et coll., 1996). Ils peuvent aussi, être classés en différents groupes en fonction du nombre des anneaux aromatiques qu'ils contiennent, et des éléments structuraux qui lient ces anneaux les uns aux autres et vont de simples molécules phénoliques à des composés hautement polymérisés (Bravo, 1998; Guo et coll., 2009). Ils peuvent être classés en plusieurs catégories, parmi lesquelles les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tannins considérés comme les principaux composés phénoliques alimentaires. (King et Young, 1999).

2.3 Flavonoïdes

Dans la nature, les flavonoïdes se présentent fréquemment sous la forme glycosylée, c'est-à-dire avec une molécule de polysaccharide unie à leur structure, à l'exception des catéchines et pro anthocyanidines qui se trouvent sous forme libre (aglycones). Les flavonoïdes ont la structure générale C6-C3-C6 (Figure 1-2) dans laquelle les deux unités C6 (anneaux A et B) sont de nature phénolique et sont attachés par un anneau (C) de pyranne (Harborne et Williams, 2000; Cao et coll., 1997).

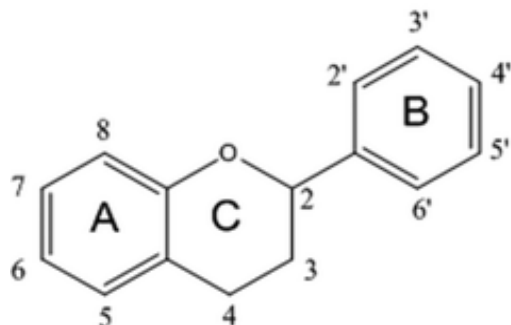


Figure 1-2. Structure de base des flavonoïdes (Balasundram et Coll., 2006)

Les flavonoïdes sont eux-mêmes divisés en six sous-groupes principaux, les flavones, les flavonols, les flavanols, les flavanones, les isoflavones, et les anthocyanidines (Nichenametla et coll., 2006; Scalbert et coll., 2005) (Figure 1-3). Les flavonoïdes qu'on retrouve couramment dans différents aliments sont la quercétine, l'héspéridine, la cyanidine, la diadzéine, les proanthocyanidines, et finalement les catéchines, qui appartiennent aux groupes de flavanols, et sont présentes dans plusieurs fruits, principalement dans le thé vert (Scalbert et coll., 2005).

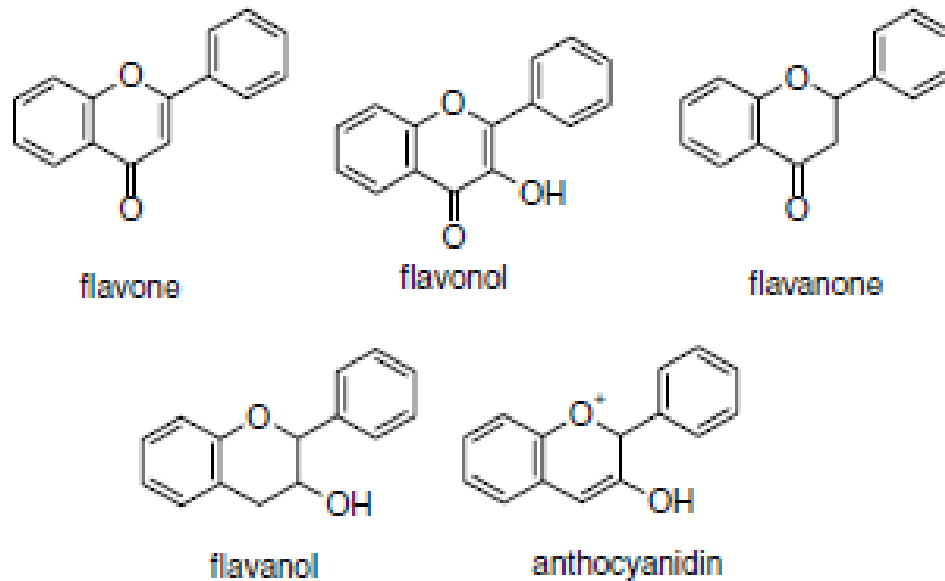


Figure 1-3. Structures génériques des principaux flavonoïdes (Balasundram et coll., 2006).

2.4 Les catéchines

Dans la famille des flavonoïdes, les flavanols constituent le groupe le plus commun. Les flavanols aussi nommés flavan-3-ols et leurs produits de condensation, les catéchines, sont considérés dans l'alimentation humaine comme des ingrédients fonctionnels ainsi que médicinaux. La présence des flavanols dans les produits alimentaires contribue à certains paramètres de qualité comme l'astringence, l'amertume, la douceur, le goût et la formation de couleur (Santos-Buelga et Scalbert, 2000).

2.4.1 Structure et caractéristiques chimiques

Les monomères des flavan-3-ols sont communément appelés catéchines. Toutes les catéchines ont le squelette flavan de base (Figure 1-2), deux anneaux benzène (A et B) unis par un hétérocycle dihydropyrane (anneau C) (Senanayake, 2013). Il existe différentes structures de catéchines qui diffèrent de cette structure comme les gallo-catéchines qui contiennent un troisième groupe hydroxyle dans l'anneau B à la position C5' et les catéchine-gallates qui contiennent un résidu d'acide gallique estérifié à l'hydroxyle du C3. En raison de la présence de deux atomes de carbone chiraux dans l'anneau C (C2 et C3), plusieurs stéréo-isomères existent pour chaque structure de catéchine, dépendamment de l'orientation du groupe hydroxyle, (soit cis ou trans) et sont nommés catéchines pour les trans et épicatechines pour les cis.

Le squelette flavan montré dans la Figure 1-2, avec l'anneau A sur la gauche et l'anneau B sur la droite, dépendamment de la position stéréochimique du C3 est décrit comme (+) si le groupe hydroxyle est orienté vers le haut (sur le plan de la page) et (-) si le groupe hydroxyle est orienté vers le bas (dans le plan de la page). Les principales catéchines dans l'alimentation humaine sont l'épicatéchine, l'épigallocatechine, l'épicatéchine gallate, et l'épigallocatechine gallate (EGCG) (Khanbabaee et Ree, 2001; Valcic et coll., 1999 ; Yang et coll., 2000). (Figure 1-4).

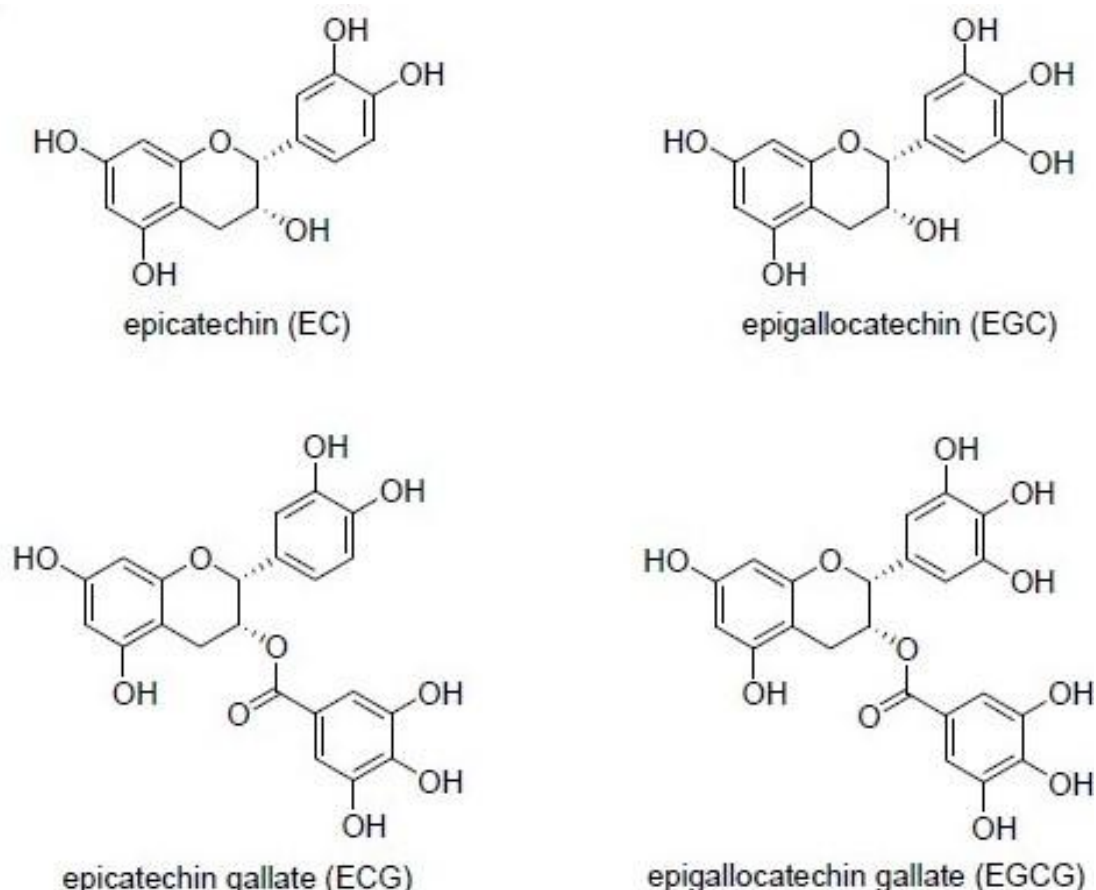


Figure 1-4. Structures des quatre plus importantes catéchines du thé vert. EC : épicatechine, EGC : épigallocatechine, ECG : épicatechine-gallate, EGCG : épigallocatechine-gallate, (Sonoda et coll., 2015)

2.4.2 Stabilité thermique et pH

De nombreux aliments contenant des catéchines sont soumis à différents changements de températures pendant les procédés de transformation de la récolte jusqu'à la consommation, tels que la pasteurisation, la cuisson et la fermentation. Par conséquent, la stabilité thermique est un facteur déterminant quant à la concentration des composés qui seront bioaccessibles et bio disponibles pour l'absorption et le métabolisme ultérieur lors de l'ingestion.

Les catéchines sont relativement solubles dans l'eau et ont une certaine stabilité aux changements thermiques. Kaufman et coll. (2005) rapportent que les catéchines sont relativement solubles dans l'eau, stables à haute température, préservant leur activité antioxydante. Il a été rapporté que la solubilité dans l'eau de l'EGCG était de 521,7 g/ L (Lee et Lee, 2008). Ces auteurs ont démontré que l'EGCG est mieux extrait dans l'eau que dans l'éthanol et que le rendement de l'extraction augmente avec la température. Cependant, les données relatives à la stabilité des catéchines peuvent varier en fonction des conditions utilisées pour les étudier. Par exemple, Chen et coll. (2001) ont démontré une perte de 20 % de la teneur totale de catéchines après plus de 7h à 100 °C. D'autres études (Su et coll., 2003) ont démontré une perte en catéchines de 0 %, 25 % et 29 % après une incubation des catéchines dans l'eau pendant 3 h. à 24, 70 et 100 °C respectivement. Wang et coll. (2006) ont démontré que l'EGCG dans l'eau distillée est dégradé de 30 % à 100 °C (90 min), de 50 % à 121 °C (60 min), de 60 % à 135°C (45 min) et de 70 % à 165 °C (20 min). Les réactions des catéchines les plus prédominantes pendant le chauffage semblent être l'isomérisation et l'auto-oxydation (Wang et coll., 2006; Wang et coll., 2008, Fang et coll., 2016).

Le pH de la solution auquel les catéchines se trouvent est un facteur qui influence grandement leur stabilité. Ainsi, Chen et coll. (2001) ont montré que 50 % de l'EGCG était dégradé lorsque l'EGCG est maintenu à pH de 7,4 pendant une période de 2 heures. Une autre étude réalisée par Yoshino et collaborateurs (1999) a rapporté que les catéchines sont stables à pH acide, mais que l'EGCG et l'EGC sont instables à un pH supérieur à 7,4, tandis que l'ECG et l'EC étaient relativement stables. De plus ces auteurs ont démontré que 85 % de l'EGCG était dégradé après 30 minutes dans un milieu gastro-intestinal à pH 8,5 et que 79 % était dégradé après 30 minutes dans le plasma à pH 7,4 chez la souris. Zhu et coll. (1997) ont indiqué que dans une solution alcaline (pH > 8), les catéchines sont extrêmement instables tandis qu'à pH acide (pH < 4), elles se dégradent légèrement. Tous ces changements affectent leur présence dans les produits alimentaires et modifient à la fois les paramètres de qualité des aliments tels que l'astringence, l'amertume, la douceur, le goût et la formation de couleur (Santos-Buelga et Scalbert, 2000). Les caractéristiques physiques et chimiques des catéchines tels que leur stabilité thermique et le pH, influent sur leur capacité à agir comme antioxydant.

2.4.3 Sources alimentaires

Les catéchines se retrouvent dans de nombreux fruits et légumes - fraises, pommes, raisins, cacao etc. On les trouve également en grandes quantités dans le vin rouge ou le thé (noir et vert). Dans le thé vert, par exemple, les catéchines représentent jusqu'à 85 % des polyphénols totaux et leur quantité est de 420 mg de catéchines par litre de thé, Yilmaz (2006). Elles sont principalement constituées de l'(-)-épicatéchine (EC), l'(-)-épicatéchine gallate (ECG), l'(-)-épigallocatechine (EGC) et l'(-)-épigallocatechine gallate (EGCG) (Wang et coll., 2000) (figure 2.4), cette dernière représentant approximativement 59% du total des catéchines (Cabrera et coll., 2006).

2.4.4 Activité biologique des catéchines

La possible activité préventive du thé vert contre les différentes maladies tels que le cancer et les maladies cardiovasculaires, a été largement étudiée au cours des dernières années et a été attribuée aux catéchines, notamment à l'EGCG qui a démontré des effets positifs sur différents types de cancer (Khan et Mukhtar, 2007; Singh et coll., 2011). Il a ainsi été démontré que les catéchines présentent une large panoplie de propriétés : antibactériennes, anti-inflammatoires, antiallergiques, hépatoprotectrices, anti-thrombotiques, antivirales, anticancéreuses et vasodilatatrices (Middleton et coll., 2000), plusieurs de ces propriétés étant attribuées à leur capacité à piéger des radicaux libres, tels que les radicaux hydroxyl, peroxy et superoxyde (Yilmaz, 2006).

2.4.5 Activité antioxydante

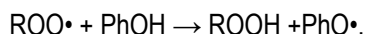
Les radicaux libres sont des molécules ou des atomes aux électrons non appariés. Le résultat de ces électrons non appariés est un niveau élevé de réactivité car les radicaux libres « cherchent » un autre électron pour former une paire (Sumpio et coll., 2006). Ce sont des sous-produits du métabolisme cellulaire, mais sont également produits par l'action des rayonnements ultraviolets, des substances toxiques, de l'ozone, de la fumée de cigarette, des attaques microbiennes et même par l'organisme humain, après une activité physique intensive (Kanter, 1998).

L'oxydation cellulaire de l'ADN, des protéines, des lipides, s'accumule avec l'âge et contribue à la dégénérescence de cellules somatiques et à la pathogenèse des maladies telles que les cancers, l'ostéoporose et les maladies cardiovasculaires (Middleton et coll., 2000).

Les antioxydants présents dans les aliments peuvent aider à limiter ces dommages en agissant directement sur les espèces réactives de l'oxygène ou en stimulant les systèmes de défense endogènes. Plusieurs des fonctions biologiques des polyphénols ont été attribuées à leur capacité à piéger des radicaux libres. Ces et

coll. (2004) ont démontré que les flavan-3-ols exercent leur activité antioxydante par différents mécanismes tels que le piégeage de radicaux libres, la chélation de métaux de transition ou l'inhibition des enzymes.

Les antioxydants phénoliques (PhOH) interfèrent avec l'oxydation des lipides et d'autres molécules par le don rapide d'un atome d'hydrogène aux radicaux libres (ROO•) :



Les radicaux phénoxy intermédiaires sont relativement stables, donc ils ne vont pas initier ou propager d'autres réactions des radicaux (Valko et coll., 2006).

Les groupes phénoliques présents dans les catéchines peuvent accepter un électron pour former un radical phénoxy relativement stable, perturbant ainsi les réactions d'oxydation en chaîne des composants cellulaires (Kehrer et Frei, 1994). Les polyphénols qui contiennent dans leur structure le groupement catéchol (des anneaux aromatiques avec deux groupes hydroxyle en position ortho) ont une capacité antioxydante supérieure à ceux ayant de simples groupes phénol (anneaux aromatiques à un seul groupe hydroxyle) (Rice-Evans et coll., 1996).

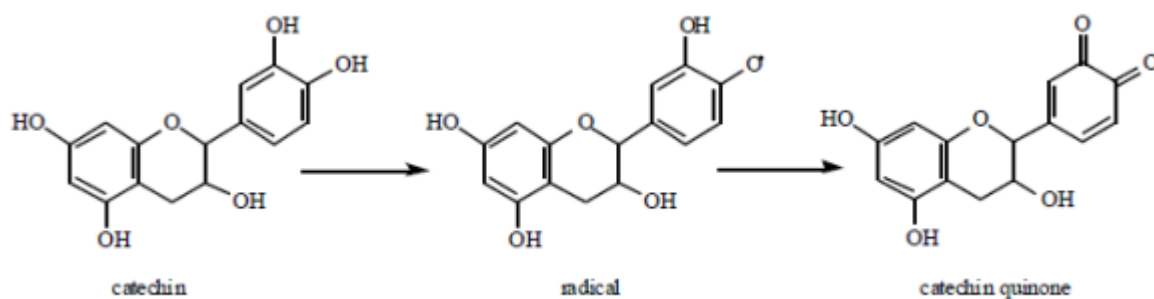


Figure 1-5. Forme oxydée de l'épicatéchine. Caractéristiques structurelles de l'activité antioxydante (Rice-Evans, 2001).

Les catéchines ont la propriété de piéger des radicaux libres hydroxyles, peroxy et superoxyde (Yilmaz, 2006). Le radical peroxy peut avoir une activité dix fois plus importante que celle du L-ascorbate et du β -carotène (Nakao et coll., 1998). D'autre part, Guo et coll. (1999) ont montré que la capacité de piéger des radicaux libres suit l'ordre : ECG > EGCG > CG > EGC > EC. Cao et coll. (1997), mentionnent qu'aussi bien l'activité antioxydante que l'activité pro-oxydante d'un flavonoïde, dépendent du nombre de substitutions hydroxyle dans la structure de base. Rice-Evans (2001) mentionne que les groupes fonctionnels qui confèrent la capacité antioxydante à la molécule de l'EGCG sont le groupe catéchol (3', 4'- dihydroxy) dans l'anneau B,

une double liaison insaturée 2,3, et le groupe hydroxyle dans l'anneau C. L'étude de Valcic et coll. (1999) a signalé que l'oxydation de l'EGCG par les radicaux peroxydes provoquait seulement des changements dans l'anneau B de leur structure de base et non dans l'anneau gallate (Figure 1-6).

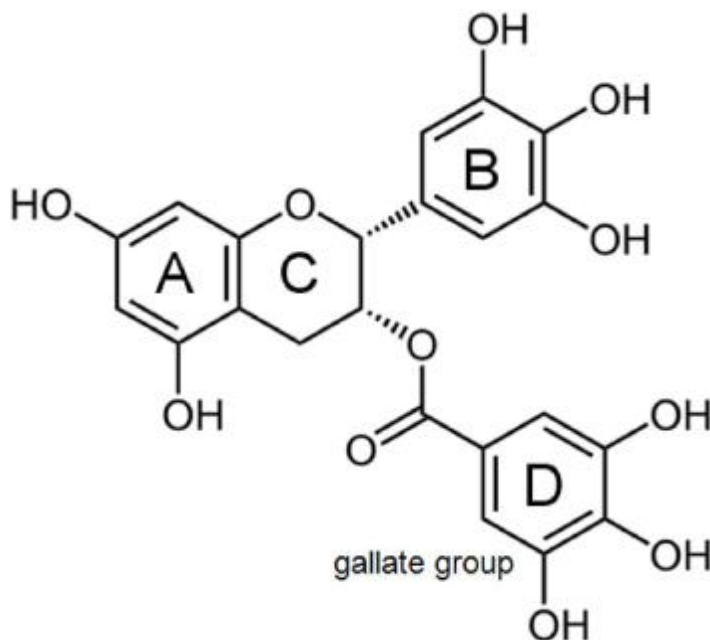


Figure 1-6. Structure chimique de l'EGCG. (Mereles et coll., 2010)

Xu et coll. (2004) ont étudié l'épimerisation des épicatechines pour évaluer les changements dans leur activité antioxydante. Ils ont chauffé à 120°C pendant 20 minutes des catéchines extraites du thé vert pour induire la formation des épimères et ont trouvé que l'EGCG et son précurseur, le gallocatéchine gallate (GCG), présentaient une capacité antioxydante similaire. Plusieurs études cliniques ont démontré qu'une seule dose de thé peut améliorer la capacité antioxydante des adultes en santé dans les 30 à 60 minutes après l'ingestion (Khan et Mukhtar, 2007). Toutefois, sous certaines conditions, par exemple une forte concentration d'antioxydants phénoliques, la présence de métaux tels que le cuivre et le fer et un pH élevé, peut favoriser le comportement prooxydant des polyphénols. Des études réalisées par Lambert et coll. (2007) ont démontré que l'EGCG est instable dans les conditions de culture cellulaire et qu'il peut subir une polymérisation oxydative avec une cogénération de H₂O₂. Ces auteurs ont également constaté que l'EGCG, donné à de fortes doses (200-400 mg/de poids chez l'humain), peut former des composés pro-oxydants tel que les quinones (Figure 1-7), (Lambert et coll., 2007).

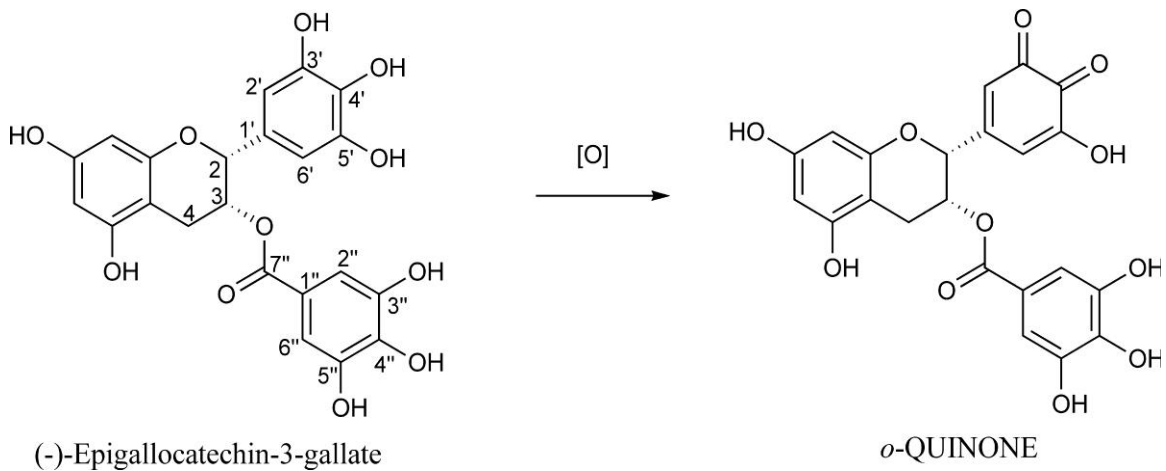


Figure 1-7. Formation d'EGCG-o-quinone réactive (Lambert et coll., 2007)

Du point de vue chimique, une fois qu'elles ont donné un électron ou un atome d'hydrogène, les molécules de polyphénols deviennent elles-mêmes des radicaux libres. Tel que mentionné auparavant, elles peuvent potentiellement causer des activités pro-oxydantes si leur concentration est élevée (200 à 400 mg/kg de poids chez l'humain), ce qui pourrait causer des dommages à l'organisme humain; bien que cette question nécessite des recherches supplémentaires (Halliwell, 2008, Braicu et coll., 2013).

2.4.6 Métabolisme des catéchines

Les catéchines, comme la plupart des polyphénols, doivent être absorbées dans l'intestin pour exercer un effet thérapeutique. Cependant, elles sont faiblement absorbées en raison de leur faible solubilité et de leur sensibilité aux valeurs de pH du tractus digestif auxquelles elles sont sensibles (pH très acide de l'estomac et neutre de l'intestin) (Zhu et coll., 1997). De plus, elles interagissent avec diverses molécules dans le tractus gastro-intestinal et de ce fait, elles peuvent perdre leur capacité antioxydante voire se transformer en composés pro oxydants ou toxiques à fortes doses (2 500 mg/kg de poids corporel) (Williams et coll., 2004; da Silva et coll., 2002).

Le mécanisme par lequel les catéchines sont absorbées par l'intestin n'est pas encore bien élucidé. Elles traversent probablement la paroi intestinale par diffusion passive. En fait, les études réalisées par Donovan et coll. (2001) concluent que les catéchines natives entrent dans les cellules épithéliales de l'intestin nommées entérocytes, en passant par les hépatocytes pour finalement arriver dans la circulation sanguine subissant, lors de ce processus, différentes réactions de méthylation et glucurono-conjugaison. La figure 2.8 présente un schéma du mécanisme d'absorption et métabolisme des catéchines proposé chez le rat. Il existe aussi, des résultats montrant que les catéchines subissent une transformation supplémentaire dans le côlon, où les

enzymes de la microflore intestinale les dégradent en acides phénoliques simples, qui peuvent être absorbés et ensuite métabolisés dans le foie (Spencer, 2003; Scalbert et coll., 2002).

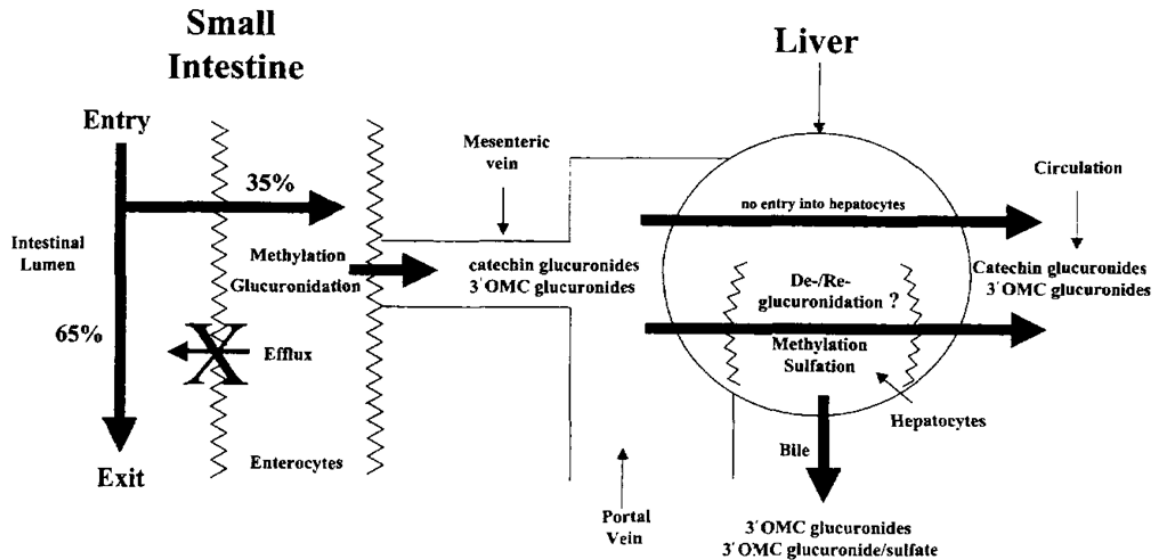


Figure 1-8. Représentation schématique des possibles mécanismes de l'absorption et du métabolisme des catéchines (Donovan et coll., 2001)

2.4.7 Biodisponibilité et bioaccessibilité

Pour que les catéchines soient absorbées par l'organisme, il faut qu'elles soient premièrement bioaccessibles, c'est à dire libérées de la matrice alimentaire dans le lumen gastro-intestinal pour ensuite être biodisponibles (Rein et coll., 2013). Il a été démontré que la biodisponibilité orale des catéchines est faible (Manach et coll., 2005b; Henning et coll., 2005). Plusieurs facteurs contribuent à ce phénomène, notamment leur instabilité aux conditions gastro intestinales (pH acide de l'estomac et alcalin dans l'intestin). De plus, pendant leur processus de métabolisme, les catéchines se transforment en plusieurs métabolites se solvant par une faible concentration dans la circulation (Manach et coll., 2005, Henning et coll., 2005).

Pour pallier ces problèmes, plusieurs études ont cherché différentes approches pour améliorer la bioaccessibilité et biodisponibilité des catéchines tels que la modification chimique, le dosage et la combinaison et/ ou l'interaction avec d'autres composants alimentaires. Des travaux ont démontré que les polyphénols interagissent avec les protéines par différents types d'interaction : ponts hydrogène (Rawel et coll., 2001); interactions hydrophobes (Baxter et coll., 1997) voire des interactions covalentes, qui ont lieu

principalement quand l'oxydation des composés phénoliques est possible (Rawel, et coll., 2001). Ces interactions peuvent avoir des effets négatifs sur la capacité antioxydante des composés phénoliques (Frazier et coll., 2003; Rohn et coll., 2004) ou synergiques. Ainsi, Almajano et coll. (2007a) ont démontré que la sérum-albumine bovine (BSA) exerce un effet synergique sur l'activité des catéchines dans une émulsion.

2.4.8 Impact des interactions des catéchines sur les propriétés fonctionnelles des protéines

Les interactions entre les composants phénoliques et les protéines jouent un rôle important dans l'élaboration de divers produits alimentaires, tels que dans la clarification du vin (Ferreira et coll., 2001 ; Van Sluyter et coll., 2015), dans la production de jus de fruits et de bière (Siebert et coll., 1996) où les interactions protéines-polyphénols sont responsables de la formation de la brume dans les procédés de fabrication. De plus, il a été démontré que les interactions covalentes entre les protéines et certains polyphénols, tels que l'acide caféique, améliorent la formation de gels de gélatine, ce qui leur confèrent une meilleure force mécanique et une stabilité thermique plus élevée (Strauss et Gibson, 2004). Par contre, ces interactions sont problématiques pour l'extraction des protéines telles que les protéines de tournesol (González-Pérez et coll., 2002).

Arts et coll. (2002) ont démontré que la formation du complexe protéine-flavonoïde réduisait la capacité antioxydante des flavonoïdes et que cette diminution était dépendante des protéines et des composants phénoliques utilisés. De plus Lorenz et coll. (2007) ont signalé que l'ajout du lait au thé diminuait leurs effets santé sur la fonction vasculaire, ce qui serait dû à l'interaction des catéchines avec les protéines du lait. Cependant, plusieurs études montrent que les protéines peuvent servir de véhicules pour transporter des composants phénoliques et les protéger de l'environnement gastro-intestinal (Onoue et coll., 2011 ; Xie et coll., 2013). Dans ce contexte, les protéines laitières, spécifiquement la β -lactoglobuline, pourrait, en raison de ces propriétés d'interaction, être un bon substrat pour la protection des catéchines (Chen, Remondetto, Subirade, 2006).

2.5 Les protéines laitières : le cas de la β -lactoglobuline bovine

Les protéines du lactosérum sont constituées de protéines mineures, principalement les immunoglobulines et la sérum-albumine bovine, et par les protéines majeures, la β -lactoglobuline et l' α -lactalbumine (de Wit, 1998 ; Cayot et Lorient, 1998).

La β -lactoglobuline (β -Lg), protéine majeure du lactosérum, représente environ 50% des protéines du lactosérum bovin. La valeur nutritionnelle de la β -Lg est due à la présence de tous les acides aminés et à la teneur en acides aminés essentiels qui représentent à eux seuls, 58% des acides aminés totaux. C'est la protéine du lait la plus riche en acides aminés de ce type (Jouan, 2002).

2.5.1 Caractéristiques structurales

La β -Lg fait partie de la famille des lipocalines qui typiquement sont des protéines de petite taille (160-180 résidus), extracellulaires et qui ont en commun la propriété de lier des molécules hydrophobes. Elles sont classifiées principalement comme protéines de transport (Flower et coll., 2000). La β -Lg a un poids moléculaire de 18 362 daltons et un point isoélectrique de 5,1. La structure primaire de cette protéine est composée de 162 résidus d'acides aminés (Kontopidis et coll., 2004.) Il existe 7 variantes génétiques, mais les plus fréquentes sont les variantes A et B (Cayot et Lorient, 1998).

La β -Lg est une protéine globulaire, sa structure secondaire contient environ 50 % de feuillets β , 15 % d'hélice α et 30 % d'enroulements au hasard (Figure 1-9). La quantité de feuillets β serait responsable des interactions entre les monomères, pouvant mener jusqu'à l'agrégation et la gélification de la protéine (Sawyer et Kontopidis, 2000).

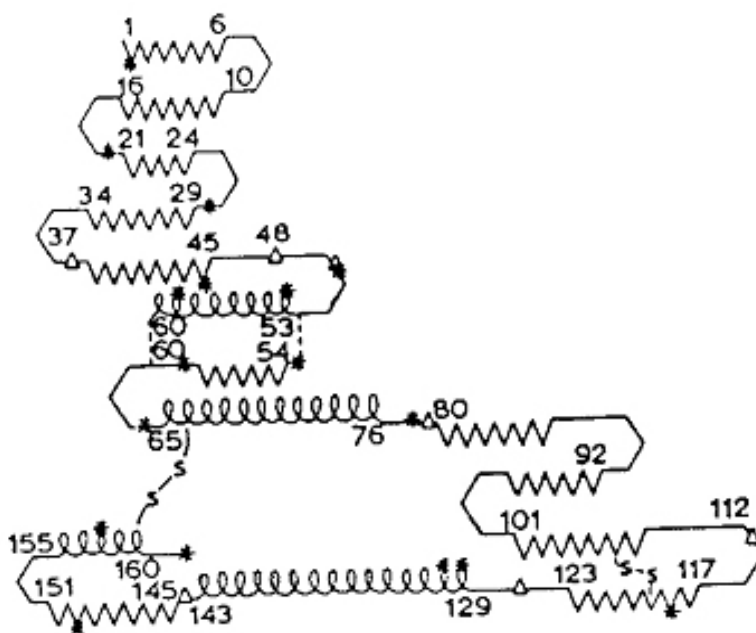


Figure 1-9. Représentation schématique de la structure secondaire de la β -Lg variant B la localisation des feuillets β (VVV) des hélices α (lllll), des prolines (Δ) et de résidus substitués (*) dans les variantes génétiques, est illustré. (Creamer et coll., 1983).

La structure tertiaire de la β -Lg comprend 8 feuillets β antiparallèles (A à H) qui forment la cavité centrale hydrophobe, elle a aussi une hélice α située sur la surface extérieure et un neuvième feuillet β (I) adjacent au premier. Cette structure, dite en tonneau — β , est commune à la famille de protéines nommées lipocalines (Kontopidis et coll., 2004). La structure tertiaire de la β -Lg est présentée à la Figure 1-10.

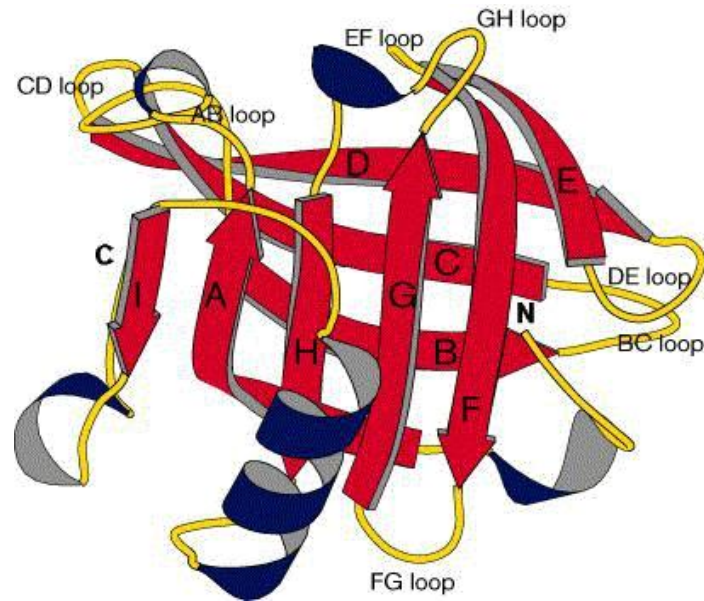


Figure 1-10. Structure tertiaire de la β -Lg. (Brownlow et coll., 1997)

2.5.2 Influence du milieu sur la structure

La conformation de la β -Lg est affectée par divers facteurs, comme les variations de pH et de températures. La β -Lg se trouve sous la forme de dimère dans la zone de pH de 3 à 7 (Jouan, 2002). La détermination de la structure de la forme cristalline triclinique obtenue à pH 6,5 montre que la β -Lg est un dimère (Brownlow et coll., 1997). Elle est stable à pH acide, résiste à la dénaturation à pH 2 ainsi qu'à l'hydrolyse gastrique (Papiz et coll., 1986 ; Qin et coll., 1998). À pH 7, la β -Lg subit un changement de conformation du à la *transition de Tanford*. Des analyses de rayon X suggèrent que la boucle EF située à l'entrée du tonneau est responsable de cette transition (Tanford et coll., 1959 ; Sakurai et Goto, 2006). Cette dernière pourrait être impliquée dans la fixation réversible des ligands à la β -Lg, assurant ainsi leur transport et leur protection dans le tractus digestif.

Des études, réalisées par Mahe et coll. (1996), sur la digestibilité de la β -Lg ont démontré qu'à pH acide (pH gastrique) la conformation globulaire de la protéine est stable ce qui lui confère une résistance à l'hydrolyse pepsique. Cependant, elle est hydrolysée par les protéases pancréatiques dans l'intestin.

La température influence également la structure de la β -Lg. À température ambiante et à pH neutre, la β -Lg existe à l'état de dimères. Ces derniers se dissocient lorsque la température se situe entre 50 °C et 80 °C (Cayot et Lorient, 1998). De Wit (2009) mentionne qu'à 65 °C les modifications dans la structure tertiaire de la protéine sont significatives, induisant l'exposition des régions hydrophobes. En même temps, le groupe sulfhydryle s'active et peut mener à la formation d'un pont disulfure avec d'autres molécules qui ont aussi un

groupe sulfhydryle; ce qui fera en sorte que la β -Lg ne se retrouvera plus à son état natif. À températures plus élevées que 65 °C, le dépliement des structures secondaires et tertiaires s'intensifie jusqu'à atteindre la dénaturation de la protéine (de Wit, 2009). Des études par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier ont montré que la protéine subit d'importants changements dans la structure secondaire après un traitement thermique, comme la dissociation de dimères en monomères ainsi que la formation de différentes structures moléculaires après l'agrégation (Lefèvre et Subirade, 2000).














Structure	Temperature	Time	Result
	20°C	-----	Native dimer
			Dissociation at conc. ≤ 25 mg/ml
2x 	55°C	-----	Monomers
			
	60 - 70°C	≥ 15 min	Molten globule $\Delta H^1 = 142$ kJ/mol
			
	65-75°C	5-10 min	Partial unfolding $\Delta H^1 = 280$ kJ/mol Dimerization by thiol-oxidation
			
	75 - 85°C	5- 10 min	Disulphide and hydrophobic aggregation
			
	85 - 105°C	≈ 10 min and fast cooling	Only disulphide aggregation
			
	$> 125^\circ\text{C}$	5- 10 min	Disulphide breakdown and Complete unfolding

Figure 1-11. Représentation schématique du comportement thermique proposé de la β -Lg à pH $>6,8$ entre 20 et 150 °C (de Wit, 2009)

2.5.3 Capacité de liaison de la β -Lactoglobuline

Comme mentionné, la β -Lg a la capacité de lier des molécules de caractère hydrophobe telles que le resvératrol (Liang et coll., 2008), la riboflavine (Diarrassouba et coll., 2013), la vitamine D3 (Diarrassouba et coll., 2014), les acides gras (Frapin et coll., 1993 ; Wu et coll., 1999), le rétinol, le β -carotène (Dufour et Haertlé, 1991), le benzopyrène, l'ellipticine, l'acide cis parinarique (Dufour et coll., 1992) ou des composés de saveurs (Dufour et Haertlé, 1990 ; Jegasothy et Stockman, 2003). Elle peut également lier des cations comme Ca^{2+} (Sawyer et Kontopidis, 2000 ; Dufour, 2004), et différents composés phénoliques comme la quercétine (Mirpoor et coll., 2017), la rutine (Al-Sahbib et coll., 2018), les catéchines (Chaphai et coll., 2018), et le lysozyme (Diarrassouba et coll., 2015), entre autres.

2.5.4 Propriétés fonctionnelles de la β -Lactoglobuline

Les protéines de lactosérum sont largement utilisées dans les produits alimentaires pour leur haute valeur nutritionnelle et pour leurs propriétés fonctionnelles telles que leur habileté à former des gels, à stabiliser des émulsions et des mousses. Ces propriétés en font des matériaux de choix pour la formation d'hydrogels, micro- et nanoparticules, pour l'encapsulation de composés bioactifs (Chen et coll., 2006).

Divers auteurs démontrent l'intérêt des protéines du lactosérum pour la préparation de microparticules en raison de leur grande disponibilité, biodégradabilité et leur non-toxicité (Katti et Krishnamurti, 1999 ; Tada et coll., 2005 ; Rosemberg et Young, 1993). Beaulieu et coll. (2002) ont démontré que les sphères de protéines de lactosérum obtenues par gélification à froid, ont une excellente capacité à encapsuler des molécules bioactives qui sont hydrophobes et sensibles au pH de l'estomac.

Les microparticules, élaborées à partir de protéines, ont trouvé des applications rapidement croissantes dans l'industrie alimentaire parce qu'elles peuvent être conçues avec précision afin de les utiliser dans plusieurs formulations d'aliments et pratiquement n'importe quel ingrédient peut être encapsulé, soit hydrophobe, soit hydrophile ou même microbien (Chen et coll., 2006).

2.5.5 Propriétés gélifiantes

La gélification de la β -Lg peut se faire de façon chimique (acidification, enzymes) ou physique (hautes pressions, température) ou une combinaison des deux (gélification à froid). (Remondetto et coll., 2002).

Le procédé thermique provoque un dépliement des chaînes protéiques et leur agrégation subséquente. Ce procédé dépend en grande partie des interactions de la protéine ainsi que des forces moléculaires entre les chaînes de polypeptides, de la concentration en protéine ainsi que des conditions d'élaboration du gel (pH, température). Suivant les conditions de pH du milieu, deux types de gels peuvent se former avec des caractéristiques structurales différentes. Quand la protéine est chauffée à un pH inférieur à 4 ou supérieur à

6, la protéine forme des gels transparents connus comme filamenteux, possédant une microstructure dense et régulière, constituée de brins fins d'agrégats protéiques arrangés de façon linéaire. Tandis qu'à un pH compris entre 4 et 6, le gel formé est opaque, moins élastique, et il a une faible rétention d'eau. Le gel est constitué d'un réseau aléatoire d'agrégats sphériques et appelé gel particulaire (Boye et coll., 1997, Langton et Hermansson 1992).

Ces gels -particulaire et filamenteux- présentent également des différences au niveau moléculaire. À l'aide de la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR), Lefèvre et Subirade (2000) ont montré les différences qui se produisent pendant le processus de dénaturation : la formation des agrégats dans la structure de la protéine à l'intérieur du réseau du gel, ainsi qu'entre les agrégats eux-mêmes. Dans la formation de gels filamenteux, le traitement thermique entraîne premièrement la dissociation de dimères en monomères. Ensuite, pendant l'étape d'agrégation (75 °C), le spectre infrarouge montre la formation des structures très représentatives des β -feuillets intermoléculaires antiparallèles, et qui se maintiennent après le refroidissement indiquant que l'agrégation de la protéine est irréversible. Le déplacement de la bande d'agrégation dans le spectre FTIR à 31 °C est le résultat du renforcement des ponts hydrogènes intermoléculaires entre les β -feuillets. Par contre, pendant la formation de gels particuliers, la structure de la protéine se maintient presque intacte sous forme de dimères jusqu'à 75-80 °C. Au début de l'agrégation à 85 °C, la protéine s'associe pour constituer des oligomères. Après refroidissement, il n'y a pas de déplacement de la bande d'agrégation dans le spectre FTIR, ce qui démontre que les ponts hydrogène dans les gels particuliers sont plus faibles que dans les gels filamenteux; dans les gels particuliers, la protéine est moins dépliée que dans les gels filamenteux.

La gélification à froid est réalisée en deux étapes: la première nécessite une pré-dénaturation thermique de la protéine à une concentration très inférieure à sa concentration de gélification et la seconde nécessite l'ajout d'un ion (en principe divalent) susceptible d'induire la gélification (Hongsprabhas et. Barbut, 1997 ; Remondetto et coll., 2002, Remondetto et Subirade, 2003).

2.6 Hypothèse

La revue de littérature a permis de mettre en évidence que les catéchines possèdent une importante activité antioxydante, néanmoins leur biodisponibilité dans l'organisme est faible à cause de leur instabilité dans le milieu gastro-intestinal. D'autre part, la bêta lactoglobuline est capable de se lier à des molécules hydrophobes les protégeant de leur oxydation. De plus, elle a des propriétés fonctionnelles très utiles pour la formulation de systèmes de protection.

Les travaux de cette recherche viseront donc à valider l'hypothèse suivante :

La β -lactoglobuline se lie à une (ou plusieurs) molécules de catéchines la (les) protégeant de l'oxydation ce qui modifie les propriétés fonctionnelles du système formé.

2.7 Objectifs

L'objectif général de ce projet de recherche vise à étudier la capacité de la β -lactoglobuline à lier des molécules de catéchines et à les préserver de l'oxydation. Pour atteindre cet objectif, deux objectifs spécifiques ont été poursuivis :

- 1 : Étude de l'interaction de l'EGCG avec la β -Lg, : caractérisation moléculaire et implication biologique.
- 2 : Étude des changements moléculaires dans la formation et la structure de gels thermiques du complexe EGCG- β -lactoglobuline.

Les deux objectifs sont à l'origine des travaux présentés aux chapitres 3 et 4, respectivement.

2. Chapitre : Interaction of epigallocatechin-3-gallate with beta-Lactoglobulin: molecular characterization and biological implication

Article publié au Dairy Science & Technology. Référence bibliographique :

Zorrilla, R.¹, Liang, L.¹, Remondetto, G.², & Subirade, M.¹ (2011). Interaction of epigallocatechin-3-gallate with β -lactoglobulin: molecular characterization and biological implication. Dairy Science & Technology, 91(5), 629.

¹Canada Research Chair in Proteins, Biosystems and Functional Foods, Nutraceuticals and Functional Foods Institute (INAF/STELA). Université Laval, Quebec G1K 7P4, Canada.

² Coopérative Agropur, 4700 rue Armand Frappier, St-Hubert, QC, J3Z 1G5

2.1. Résumé

L'épigallocatechine-3-gallate (EGCG), un antioxydant présent dans le thé vert, pourrait jouer un rôle important dans la prévention du cancer. Cependant, sa biodisponibilité est faible en raison de son instabilité dans le milieu gastro-intestinal. La β -Lactoglobuline (β -Lg), principale protéine du lactosérum, est connue pour sa capacité à lier des molécules bioactives les protégeant de l'oxydation.

L'interaction entre la β -Lg et l'EGCG a été étudiée à pH 7,0 et à pH 4,0 en utilisant la spectroscopie de fluorescence et la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier. De plus, son impact sur l'activité antioxydante de l'EGCG a été déterminé en utilisant la méthode FRAP. Les résultats démontrent que l'EGCG s'est lié à la β -Lg à l'état natif ou dénaturé par des liaisons hydrogène et éventuellement par des interactions hydrophobes tant au pH 7,0 qu'à pH 4,0. L'affinité de l'EGCG pour la β -Lg à l'état dénaturé à pH 7,0 est plus grande que pour la β -Lg native et supérieure à son affinité pour la protéine à pH 4,0 dans les deux états. La formation d'un complexe avec la β -Lg a diminué l'activité antioxydante de l'EGCG dans toutes les conditions étudiées. Bien que la protection de l'EGCG par la β -Lg était très limitée, cette protection était légèrement plus efficace quand la protéine était à l'état dénaturé à pH 7. Cette étude montre des caractéristiques de liaison entre la β -Lg et l'EGCG et l'impact de cette interaction sur l'activité antioxydante du flavonoïde.

2.2. Abstract

Epigallocatechin-3-gallate (EGCG), an antioxidant present in green tea, could play an important role in the prevention of cancer. However; its bioavailability is low due to its instability in gastrointestinal environment. β -Lactoglobulin (β -Lg), the major protein in whey, is known for its capacity to bind bioactive molecules and could protect them from oxidation. Interaction between β -Lg and EGCG was investigated at pH 7.0 and pH 4.0 using fluorescence and Fourier transform infrared spectroscopy and its impact on EGCG antioxidant activity was determined using the ferric reducing antioxidant power (FRAP) method. EGCG bound to native or heat-denatured β -Lg by hydrogen bonding and possibly hydrophobic interaction at pH 7.0 and 4.0. The affinity of EGCG for heat-denatured β -Lg at pH 7.0 was greater than for native β -Lg and greater than its affinity for the protein in either state at pH 4.0. Complexing with β -Lg decreased the antioxidant activity of EGCG under all conditions investigated. However, the protein provided limited protection of EGCG against degradation over time, the heat-denatured form being slightly more effective at pH 7.0. This study provides insight into the characteristics of β -Lg binding with a flavonoid and its impact on the antioxidant activity of flavonoids in food systems.

2.3. Introduction

Flavonoids are biologically active polyphenolic compounds widely distributed in plants and occurring in fruits, stems, nuts, seeds and roots. Plant-based beverages like wine and tea are also major sources of flavonoids. Green tea is arousing growing interest because of its antioxidant activity and hence potential health benefit of preventing cancer and cardiovascular disease. This activity is attributed mainly to catechins, which represent approximately 80% of the total flavonoids of green tea and include epicatechin, epigallocatechin, epicatechin-gallate and epigallocatechin-3-gallate (EGCG). Catechins have strong ROO \cdot scavenging activity, being ten times more effective than L-ascorbate and β -carotene (Nakao et al., 1998). EGCG (Figure 2-1) is one of the most abundant catechins in green tea and contributes most of its antioxidant activity (Fournneau et al., 1998). Both the catechin and gallate moieties contribute to antioxidant activity by virtue of phenolic hydroxyl groups (Harbowy and Balentine, 1997).

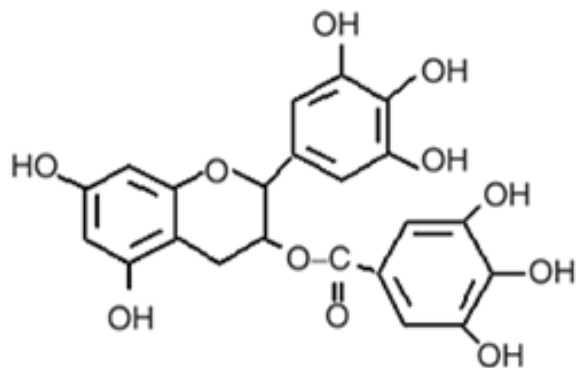


Figure 2-1. Chemical structure of EGCG

The majority of polyphenols must be absorbed in the small intestine in order to exert a therapeutic antioxidant effect. Absorption of EGCG is low because of its instability in the gastrointestinal environment (Zhu et al., 1997). Other factors that affect the absorption and activity of polyphenols include molecular structure, extent of bioconversion in the intestine and interactions with macromolecules like proteins causing a variation on their antioxidant capacity (Arts et al., 2002). Polyphenols interact with proteins primarily through hydrogen bonding (Rawel et al., 2001) and hydrophobic interactions (Baxter et al., 1997) and this may have negative effects on their antioxidant capacity (Rohn et al., 2004) but could also have synergistic effects (Almajano et al., 2007a).

Beta-lactoglobulin (β -Lg), the major whey protein in cow milk, is a small globular protein folded into a calyx (Figure 2-2) formed by eight antiparallel β -strands and a three-turn α -helix located at the outer surface of the β -barrel (Kontopidis et al., 2002). It is widespread in our diet and has a significant nutritional role as well as valuable functional properties. Its capacity for binding molecules such as fatty acids (Wu et al., 1999), retinol and β -carotene (Dufour and Haertlé, 1991), phospholipids (Lefèvre and Subirade, 2001), vitamin D (Wang et al., 1997, Yang et al., 2007), polyphenolic compounds (Liang et al., 2008, Rawel et al., 2001, Almajano et al., 2007b) and folic acid (Liang et al. 2010) is well known. Three sites have been proposed for the binding of ligands to β -Lg: the internal cavity of the β -barrel, the surface hydrophobic pocket in a groove between the α -helix and the β -barrel, and the outer surface near Trp19-Arg124 (Papiz et al., 1986; Sawyer et al., 1998).

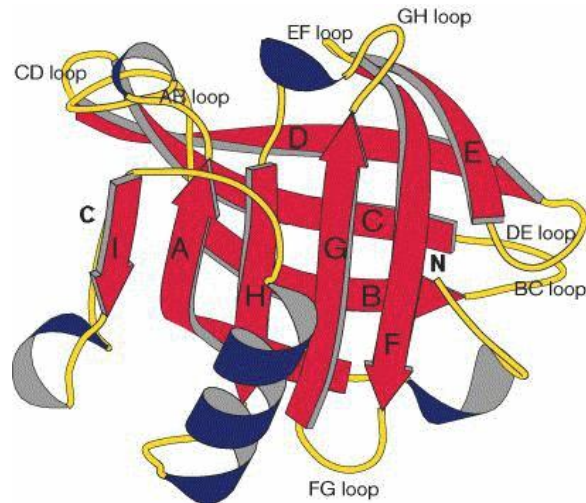


Figure 2-2. Representation of β -Lg secondary structure. The β strands and joining loops are labelled. (Brownlow et al. 1997)

Binding of ligands to β -Lg has been reported to depend on the structure and oligomeric state of the protein (Wang et al., 1998, Riihimäki et al., 2008), which are related to environmental factors such as pH and temperature. At neutral pH and room temperature, β -Lg exists as a dimer, while at pH below 3 or above 8 it dissociates into monomers. Between pH 3.5 and 5.5, β -Lg tends to form octamers (Sawyer and Kontopidis, 2000). As the temperature increases from 50°C to 80°C, β -Lg dimers dissociate to monomers and the latter then undergo conformational modifications (Cayot and Lorient 1998), which may destroy the three specific ligand-binding sites of native β -Lg and expose more hydrophobic residues to the solvent phase. This protein may therefore be considered heat-sensitive.

Assemblies based on heat-denatured β -Lg have been described for possible use as protective vehicles of bioactive compounds (Chen et al., 2006). Gels with a pH-dependent microstructure can be formed from β -Lg. Opaque particulate gels are formed near the isoelectric point (pI) of β -Lg (i.e. pH 4-6) while transparent fine-stranded gels are formed near neutral pH (Stading and Hermansson, 1990).

Maiti and collaborators (2006) have studied the molecular interaction of EGCG with human serum albumin and the binding capacity of EGCG to β -Lg has been reported recently (Riihimäki et al., 2008; Shpigelman et al., 2010). In order to gain better understanding of the mechanism of interaction and hence the potential of β -Lg as a carrier of EGCG, the interactions of this polyphenol with native and heat-denatured β -Lg were investigated at pH 7.0 and 4.0 using fluorescence, Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy and the ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay.

2.4. Materials and Methods

3.4.1 Materials

β -Lactoglobulin (variant B from bovine milk, purity \geq 90%), EGCG (purity 80%), D₂O (99.9% deuterium), NaOD and DCI were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Co. and used without further purification.

β -Lg and EGCG stock solutions were prepared in 20 mM phosphate buffer at pH 7.0 or in 20 mM acetate buffer at pH 4.0. For FTIR analyses, these buffers were prepared in D₂O. The protein and EGCG concentrations were determined spectrophotometrically (HP 8453 UV-VIS spectrophotometer) using $\epsilon_{280} = 17,600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for β -Lg (Collini et al., 2000) and $\epsilon_{270} = 11,920 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for EGCG (Pelillo et al., 2004). Heat-denatured β -Lg (h- β -Lg) solutions were prepared by heating at 85°C for 30 minutes in a 50/50 water-ethylene glycol bath and then cooling at room temperature. Solutions containing β -Lg (or h- β -Lg) and EGCG at molar ratios of 1:1, 1:2 and 1:10 were obtained by combining stock solutions.

3.4.2 FTIR spectroscopic measurements

Solutions of 2.7-mM β -Lg and 27.2 mM EGCG were prepared in D₂O. Their pD was adjusted with NaOD or DCI to 7.4 and 4.4 using an Accumet pH meter 915 (Fisher Scientific), in view of the correction factor $\text{pD} = \text{pH} + 0.4$ (Boye et al., 1996). The β -Lg solution was kept for 48h under a nitrogen atmosphere to achieve complete H/D exchange and h- β -Lg solution was prepared subsequently from this. These solutions were blended to obtain protein-EGCG ratios of 1:1, 1:2 and 1:10 relative to 1.4 mM β -Lg (or h- β -Lg). The samples were held for two hours at room temperature before recording spectra. All procedures were performed under a nitrogen atmosphere.

FTIR measurements were conducted at 24°C on a Magna 560 Nicolet spectrometer (Madison WI) equipped with a mercury-cadmium-telluride detector. The spectrometer was continuously purged with dry air. Samples were placed between two CaF₂ windows separated by 23- μm polyethylene terephthalate spacers. Each spectrum was the result of an average of 128 scans and apodized with a Happ-Genzel function. The contribution of D₂O to the amide I' region was eliminated by subtracting D₂O spectra such that the baseline was flat between 2000 and 1700 cm^{-1} . In order to identify each overlapped component present under the broad amide I' band, Fourier self-deconvolution was applied to the spectra (Arrondo et al., 1993). The subtraction and deconvolution were obtained using the Omnic software provided with the spectrometer. Band narrowing was achieved with full width at a half-height of 18 cm^{-1} and a resolution enhancement factor of 2 cm^{-1} .

3.4.3 Fluorescence Spectroscopy

Protein-EGCG samples were prepared by mixing 40 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ β -Lg or h- β -Lg solution with an equal volume of EGCG solution at concentrations of 400, 80 and 40 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ and holding at room temperature for two hours before analysis. Protein intrinsic fluorescence spectra were recorded on a Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer (Varian Inc.). Emission spectra were recorded from 300 to 500 nm with an excitation wavelength of 295 nm using a quartz optical cell with a 10 mm path length. The excitation and emission bandwidths were 5 nm (Nagaoka H. et al., 2002). The background contributed by EGCG was negligible, since it is not fluorescent under these conditions. Fluorescence intensity was calculated using the following equation:

$$\log [(F_0 - F) / F] = \log K_s + n \log [\text{EGCG}] \quad (\text{Eq. 1})$$

Where F_0 is initial fluorescence intensity, F is fluorescence intensity in the presence of the quenching agent (EGCG), K_s is the binding constant and n is the binding number (Ghosh et al., 2008).

3.4.4 FRAP assay

In order to study the effect of adduct formation on its antioxidant capacity, the ferric-reducing antioxidant power (FRAP) of EGCG was determined (Benzie and Strain, 1996). This method is based on the reduction of a ferric complex of 2,4,6-tripyridil-s-triazine (Fe^{3+} -TPTZ) to the ferrous form (Fe^{2+} -TPTZ). Sample preparation was the same as for fluorescence measurement except that the final protein concentration was 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ and the EGCG concentrations were 10, 20 and 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. The FRAP reagent was prepared freshly by mixing 2.5 mL of 10 mmol.L^{-1} TPTZ solution and 2.5 mL of 20 mmol.L^{-1} $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ in 25 mL of 0.3-M acetate buffer at pH 3.6. Sample solution (100 μL) was added to 3 mL of FRAP reagent and after holding at room temperature for 15 minutes, absorbance was read at 593 nm on a HP 8453 UV/VIS spectrophotometer (Palo Alto, Ca). Absorbance measurements were done at 2, 3, 6, 24, 48, 72 hours and 7 days. The optical path length was 1 cm and FRAP reagent was used as a blank. Aqueous solutions of known Fe^{2+} concentrations in the range of 100-2000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ were used for calibration. Data were expressed as $\mu\text{M Fe}^{2+}/\text{L}$ (FRAP units).

2.5. Results and Discussion

3.5.1 The β -Lg/EGCG interaction studied by fluorescence quenching

Intrinsic protein fluorescence is a valuable tool in the investigation of the structure, function and reactivity of proteins and other biological molecules in solution. β -Lg contains two tryptophan residues (Trp19 and Trp61). Trp19 is in an apolar environment within the cavity of β -Lg, whereas Trp61 is adjacent to strand I located near the C terminus of the protein (Figure 2-2). It has been shown that Trp19 is the major fluorophore in native β -Lg (Cho et al., 1994) and contributes about 80% of total fluorescence of the protein, because Trp61 is probably quenched by the proximity of the Cys66-Cys160 disulfide bond (Chen and Barkley, 1998).

Figure 2-3 shows fluorescence spectra of β -Lg (A) and h- β -Lg (B) in the presence of EGCG at different concentrations at pH 7.0. β -Lg produces a strong fluorescence emission with a λ_{max} at 334 nm (Figure 2-3A). Addition of EGCG shifts the λ_{max} to longer wavelengths of 336, 338 and 345 nm respectively at β -Lg/EGCG ratios of 1:1, 1:2 and 1:10, indicating that interaction with EGCG makes the environment of the β -Lg Trp residues more hydrophilic. Furthermore, the β -Lg fluorescence intensity gradually decreased to 10.2% that of the pure protein as the EGCG concentration increased to ten times the protein concentration. In comparison with β -Lg, h- β -Lg has a λ_{max} of 340 nm with a red shift of 6 nm (Figure 2-3B), due to the partial loss of the hydrophobicity of the Trp19 environment and stronger intensity because of the decreased quenching of Trp61 (Palazolo et al., 2000). Addition of EGCG to h- β -Lg induced changes in λ_{max} somewhat analogous to those obtained with β -Lg, but at longer wavelengths ($\lambda_{\text{max}} = 352$ nm at a protein/antioxidant ratio of 1:10). This indicates that interaction with EGCG moves the Trp residues of h- β -Lg to a completely hydrophilic environment. EGCG also decreased the fluorescence intensity of h- β -Lg slightly more than it did with β -Lg, down to 8.7 % that of the pure protein when the h- β -Lg-EGCG ratio was 1:10. The concentration dependence of the fluorescence intensity was analyzed using the linear plot of $\log [(F_0 - F) / F]$ as a function of $\log [\text{EGCG}]$ shown in the insets of Figure 2-3 A and 3B (Equation 1). The number n of bound ligands per protein molecule is 0.94 and 1.05 respectively for β -Lg and h- β -Lg, based on the slope of the straight line. The binding constant K_s is $1.25 (\pm 0.01) \times 10^4 (\text{Mol.L}^{-1})^{-1}$ for β -Lg and $3.70 (\pm 0.24) \times 10^4 (\text{Mol.L}^{-1})^{-1}$ for h- β -Lg, as calculated from the intercept. The greater affinity of EGCG for heat-denatured protein is consistent with a recent study by Shpigelman et al. (2010), in which the pH was around neutral.

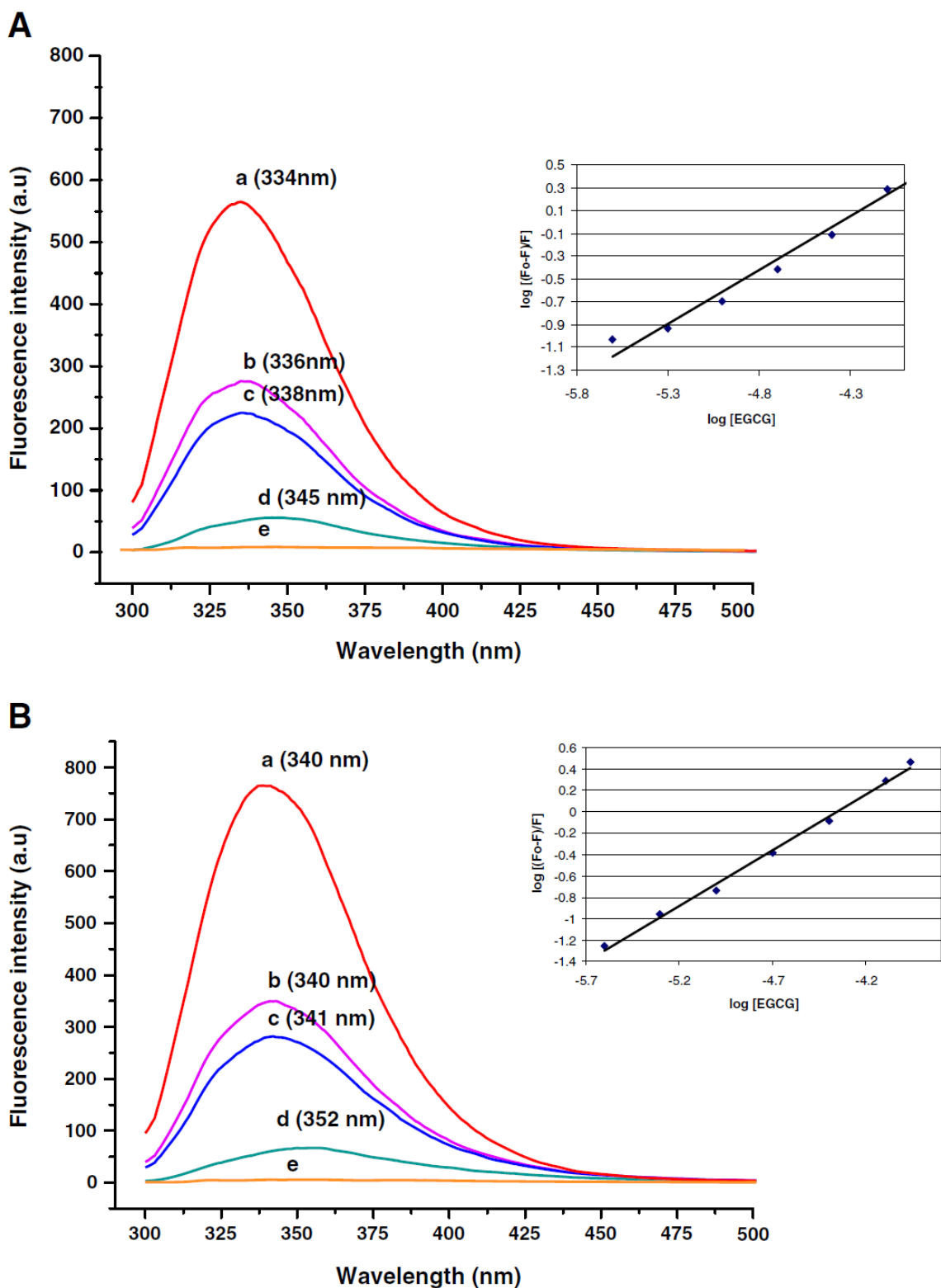


Figure 2-3. Fluorescence emission spectra ($\lambda_{ex}=295$ nm) of β -lactoglobulin at pH 7.0 in the presence of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) at different protein/antioxidant molar ratios: **A** native protein; **B** heat-denatured protein; **a** β -Lactoglobulin alone ($40 \mu\text{mol.L}^{-1}$); **b** 1:1; **c** 1:2; **d** 1:10; **e** epigallocatechin-3-gallate alone ($40 \mu\text{mol.L}^{-1}$). **Insets** Plot of $\log [(F_0-F)/F]$ as a function of $\log [EGCG]$ as per Eq. 1

Figure 2-4 shows fluorescence spectra of β -Lg (A) and h- β -Lg (B) in the presence of various concentrations of EGCG at pH 4.0. The λ_{max} for β -Lg was 336 nm and the fluorescence intensity about 72% of that obtained at pH 7.0. The lower intensity may be due to increased quenching caused by the formation of octamers near the pI of β -Lg (Sawyer and Kontopidis, 2000). Adding EGCG did not change λ_{max} but fluorescence intensity dropped to 9.0% (at the 1:10 ratio) of that of the pure protein, which is a slightly greater decrease than at pH 7.0. In the case of h- β -Lg (Figure 2-4B), the λ_{max} was 338 nm and the intensity about 66% of that measured for native β -Lg at this pH, suggesting increased quenching due to greater aggregation as a result of denaturing. In the presence of the antioxidant at a molar ratio of 10, h- β -Lg fluorescence dropped to 10.8% that of the pure protein, without a significant shift in λ_{max} . The change in fluorescence intensity was analyzed using the linear plot of $\log [(F_0 - F) / F]$ as a function of $\log [\text{EGCG}]$ shown in the insets of Figure 2-4 A and B. The number n of bound ligands per protein molecule is 0.94 and 0.86 respectively for β -Lg and h- β -Lg. The binding constant K_s is $1.05 (\pm 0.06) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ and $4.10 (\pm 0.05) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ respectively for β -Lg and h- β -Lg, indicating that EGCG has a greater affinity for β -Lg than for h- β -Lg at pH 4.0. This might be due to increased aggregation of protein monomers and hence more shielding of functional groups. For the same reason, the affinity of EGCG for the proteins is lower at pH 4.0 than at pH 7.0. These results show that even though decreased at acidic pH, the interaction of EGCG with both β -Lg and h- β -Lg can still be observed and characterized.

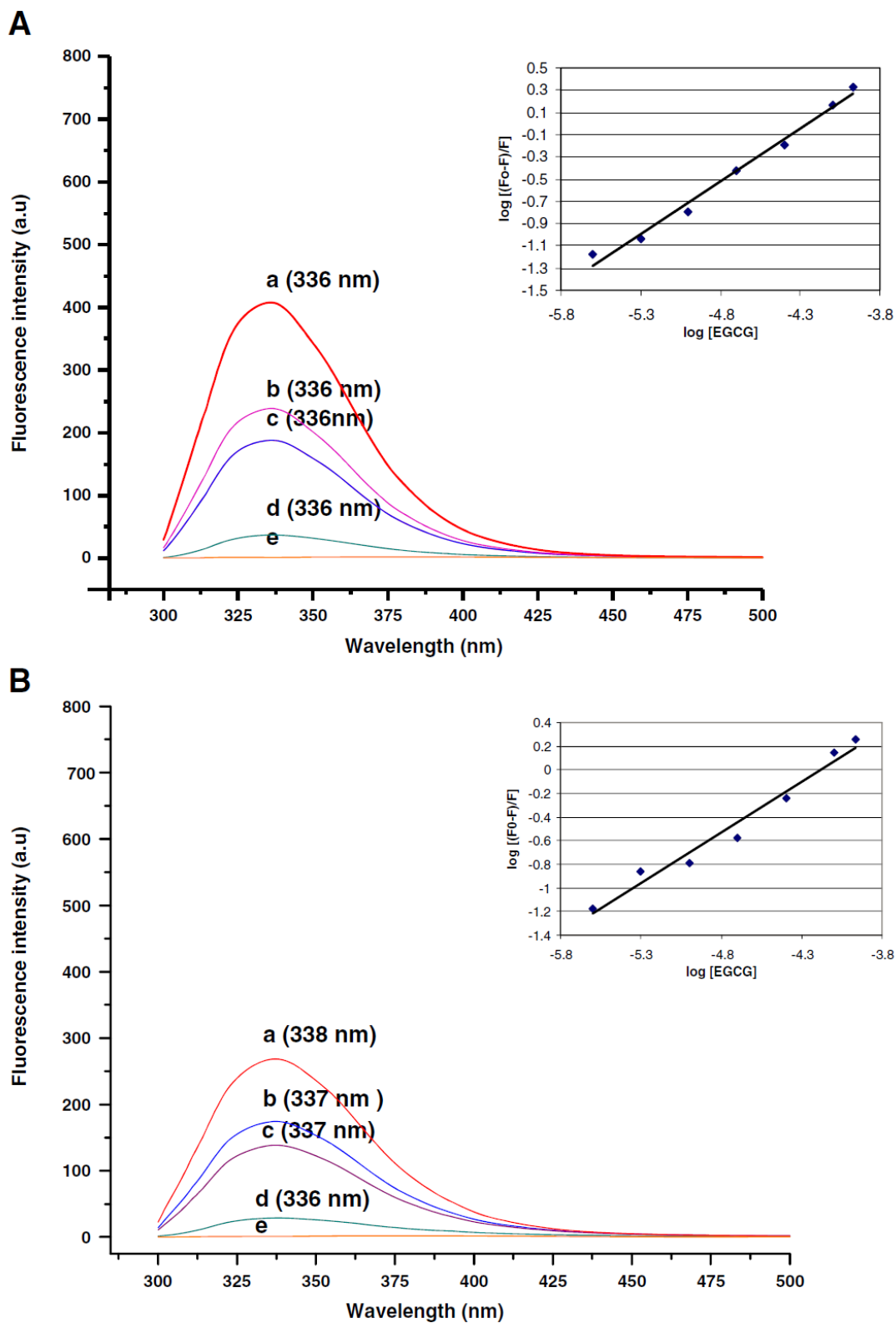


Figure 2-4. Fluorescence emission spectra (λ_{ex} =295 nm) of β -lactoglobulin at pH 4.0 in the presence of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) at different protein/antioxidant molar ratios: **A** native protein; **B** heat-denatured protein; **a** β -Lactoglobulin alone ($40 \mu\text{mol.L}^{-1}$); **b** 1:1; **c** 1:2; **d** 1:10; **e** epigallocatechin-3-gallate alone ($40 \mu\text{mol.L}^{-1}$). **Insets** Plot of $\log [(F_0-F)/F]$ as a function of $\log [EGCG]$ as per Eq. 1

3.5.2 FTIR analysis of the influence of EGCG binding on β -Lg and h- β -Lg structure

Coupling between transition dipoles and hydrogen bonding play a major role in changes in β -Lg amide bond conformation as expressed in FTIR spectral bands. The 1700-1600 cm^{-1} spectral region corresponds mainly to the amide I' C=O stretching mode and is related to protein secondary structure. Figure 2-5 presents the deconvoluted spectra of native β -Lg (A) and heat-denatured h- β -Lg (B) in the absence and presence of EGCG at pD 7.4. The deconvoluted spectrum of β -Lg (Figure 2-5A) presents individual corresponding to particular secondary structures that are well documented (Lefèvre and Subirade, 2000). The bands at 1692 and 1678 cm^{-1} are both related to β -sheets and turns. The component located at 1660 cm^{-1} is related to turns, while that at 1648 cm^{-1} is attributed to random coils and α -helix. The components at 1634 cm^{-1} and 1623 cm^{-1} are attributed respectively to β -sheets and strongly bonded β -strands. Their simultaneous presence characterizes β -Lg in the dimer form (Lefèvre and Subirade, 1999). The presence of EGCG at concentrations up to twice the protein concentration appears to have no significant effect on the secondary structure of β -Lg. Nevertheless, increasing the EGCG concentration to 10 times that of β -Lg caused the components located at 1678 cm^{-1} , 1648 cm^{-1} and 1634 cm^{-1} to shift respectively to 1677 cm^{-1} , 1645 cm^{-1} and 1632 cm^{-1} with a decrease in their intensities, while the 1692, 1660 and 1623 cm^{-1} components are nearly distinguishable. These results indicate a change in protein structure, the disappearance of the component at 1623 cm^{-1} suggesting that EGCG at this concentration disrupted the intermolecular β -sheet hydrogen bonds of the protein dimers. Rawel and collaborators (2001) mentioned that the phenolic hydroxyl group is an excellent hydrogen bond donor and forms strong hydrogen bonds with the amide carbonyl group of the peptide backbone. EGCG has eight phenolic hydroxyl groups capable of forming hydrogen bonds with β -Lg by competition with intermolecular β -sheet hydrogen bonds. It thus appears likely that interaction with EGCG induced a change from the dimeric to the monomeric structure of β -Lg.

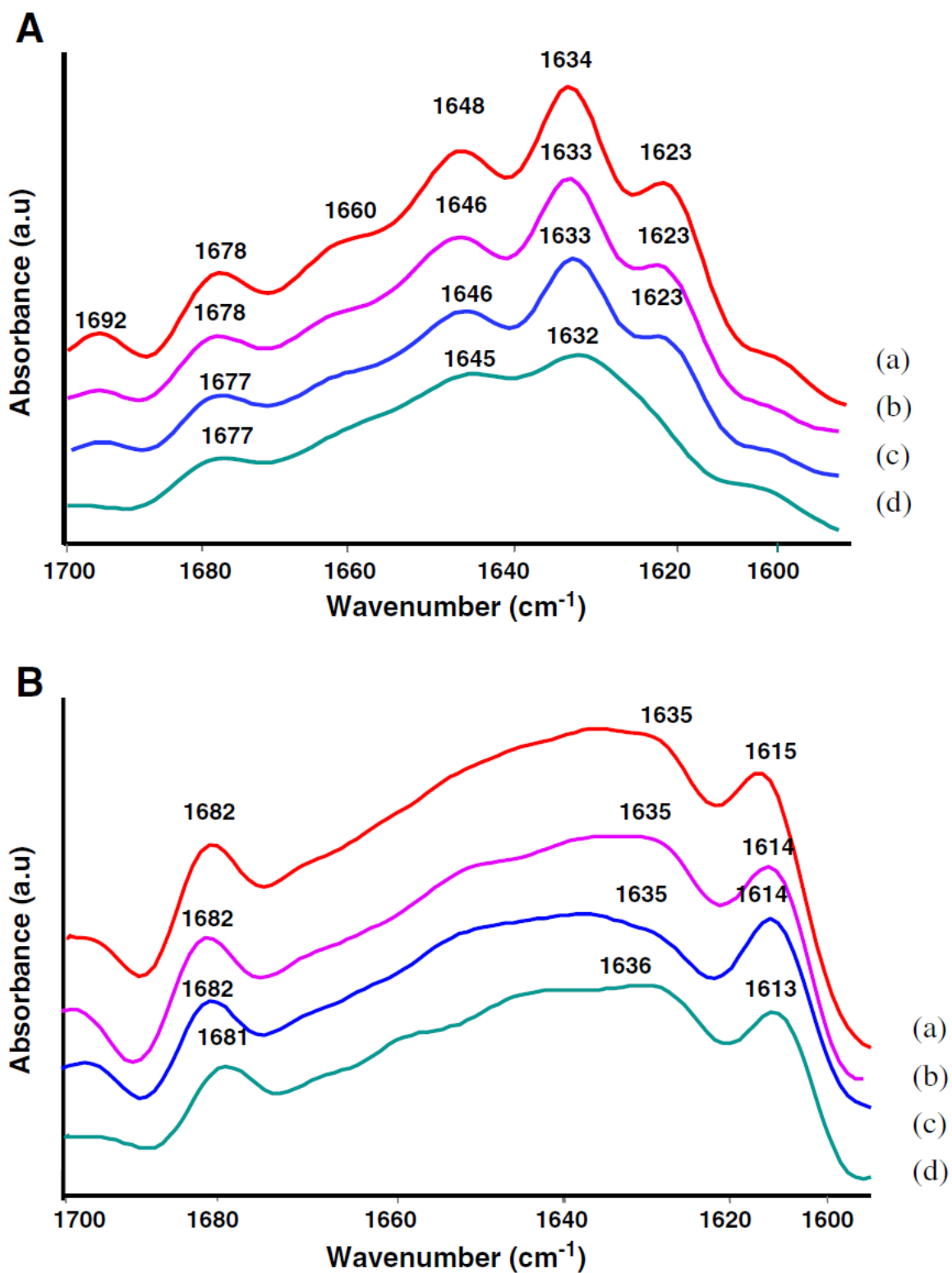


Figure 2-5. Amide I' region of the de-convoluted FTIR spectra of β -Lg in the presence of EGCG at different protein/antioxidant molar ratios (A) native protein and (B) heat-denatured protein; (a) β -Lg alone; (b) 1:1; (c) 1:2 (d) 1:10. All samples were at pD 7.4 in D₂O. Spectra were recorded at 24°C.

The deconvoluted spectrum of heat-denatured β -Lg (Figure 2-5B) differs substantially from that of the native protein. Denaturing resulted in broadening of the spectral feature wavenumber range and the appearance of new components at 1615 and 1682 cm^{-1} . These are common to numerous proteins and attributed to intermolecular hydrogen-bonded anti-parallel β -sheet structures resulting from aggregation (Lefèvre and Subirade, 1999). The presence of EGCG at ten times the molar concentration of h- β -Lg induced a shift of the aggregation component located at 1615 cm^{-1} to 1613 cm^{-1} , indicating a strengthening of intermolecular hydrogen bonds in β -sheets (Lefèvre and Subirade, 2000). This differs from the interaction of β -Lg with EGCG, which weakened the β -sheet intermolecular hydrogen bonds. Two possible explanations for this difference are different EGCG binding sites on h- β -Lg and β -Lg and the h- β -Lg/EGCG interaction being based on forces other than hydrogen bonds.

Figure 2-6 shows the deconvoluted spectra of native β -Lg (A) and heat-denatured h- β -Lg (B) in the absence and presence of EGCG at pD 4.4. The β -Lg spectrum (Figure 2-6A) is similar to that obtained at pD 7.4, but the six components mentioned above show red shifts of several nm and a new and weak component appeared at 1614 cm^{-1} . This component persisted until the β -Lg/EGCG ratio reached 1:2. All spectral components decreased in intensity at the β -Lg/EGCG ratio of 1:10. The fading of the 1626 and 1636 cm^{-1} components characteristic of protein dimers and the 1683 and 1614 cm^{-1} components characteristic of protein aggregation suggests that EGCG may compete with intermolecular β -sheet hydrogen bonds at pD 4.4 as it does at pD 7.4 and that EGCG at this concentration affects the oligomeric form of the protein. In the case of h- β -Lg (Figure 2-6B), the components located at 1632, 1647 and 1658 cm^{-1} are still present, suggesting the presence of β -sheets and unordered structures or α -helix segments in the polypeptide chains at pD 4.4, since β -Lg is known to be more resistant to denaturing at acidic pH (Cayot and Lorient, 1998). However, the broadening and decreased definition of the components and the disappearance of the 1694 cm^{-1} component indicate the occurrence of partial protein denaturing at pD 4.4. The spectrum displays similar characteristics at a EGCG/ h- β -Lg molar ratio of 1:10, suggesting that EGCG has little effect on the secondary structure of denatured protein at acidic pH.

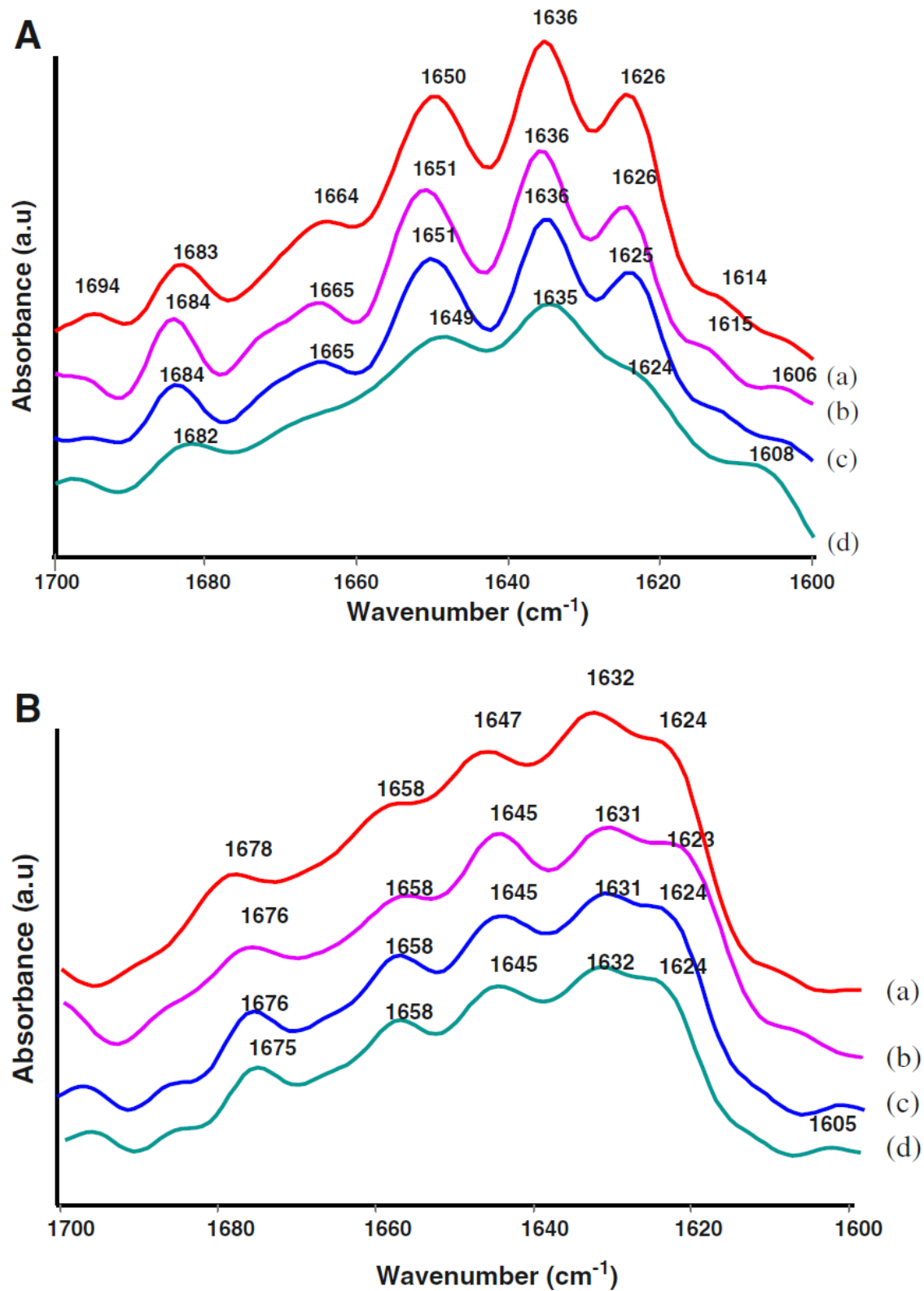


Figure 2-6. Amide I' region of the de-convoluted FTIR spectra of β -Lg in the presence of EGCG at different protein/antioxidant molar ratios (A) native protein and (B) heat-denatured protein; (a) β -Lg alone; (b) 1:1; (c) 1:2 (d) 1:10. All samples were at pD 4.4 in D₂O. Spectra were recorded at 24°C.

3.5.3 Effect of complex formation on the antioxidant capacity of EGCG

The FRAP assay is a method of assessing antioxidant power by reduction of ferric to ferrous ion, which causes a colored ferrous-trypyridyltriazine complex to form at acidic pH (Benzie and Strain, 1996). Figure 2-7 shows the FRAP value of EGCG at three different concentrations in the presence of 20 μM $\beta\text{-Lg}$ or $\text{h-}\beta\text{-Lg}$ at pH 7.0 and pH 4.0. The FRAP value was analyzed after two hours of reaction time and obtained by subtracting the protein background from the protein/EGCG mixtures. At pH 7.0, the FRAP value of EGCG alone was about 153 at 20 μM and was proportional to concentration up to 200 μM (Figure 2-7A). Adding $\beta\text{-Lg}$ decreased the antioxidant activity to a FRAP value of 18 at 20 μM EGCG. This effect was of almost the same proportion at all EGCG concentrations. The mask effect on the antioxidant activity of flavonoids has been reported previously for plasma proteins (Arts et al, 2001). An explanation for this is that $\beta\text{-Lg}$ forms hydrogen bonds with EGCG phenolic hydroxyl groups, which contribute to the antioxidant activity (Almajano et al, 2007b), in lieu of protein intermolecular $\beta\text{-sheet}$ hydrogen bonds, as deduced from FTIR (Figure 2-5A). It is noteworthy that $\text{h-}\beta\text{-Lg}$ induced a very similar decrease in the antioxidant activity of EGCG, suggesting that $\text{h-}\beta\text{-Lg}$ also interacts with EGCG phenolic hydroxyl groups by hydrogen bonding. However, no FTIR evidence was found for hydrogen bonding between EGCG and $\text{h-}\beta\text{-Lg}$ (Figure 2-5B). We therefore speculate that EGCG binds to different moieties of $\beta\text{-Lg}$ and $\text{h-}\beta\text{-Lg}$ at pH 7.0.

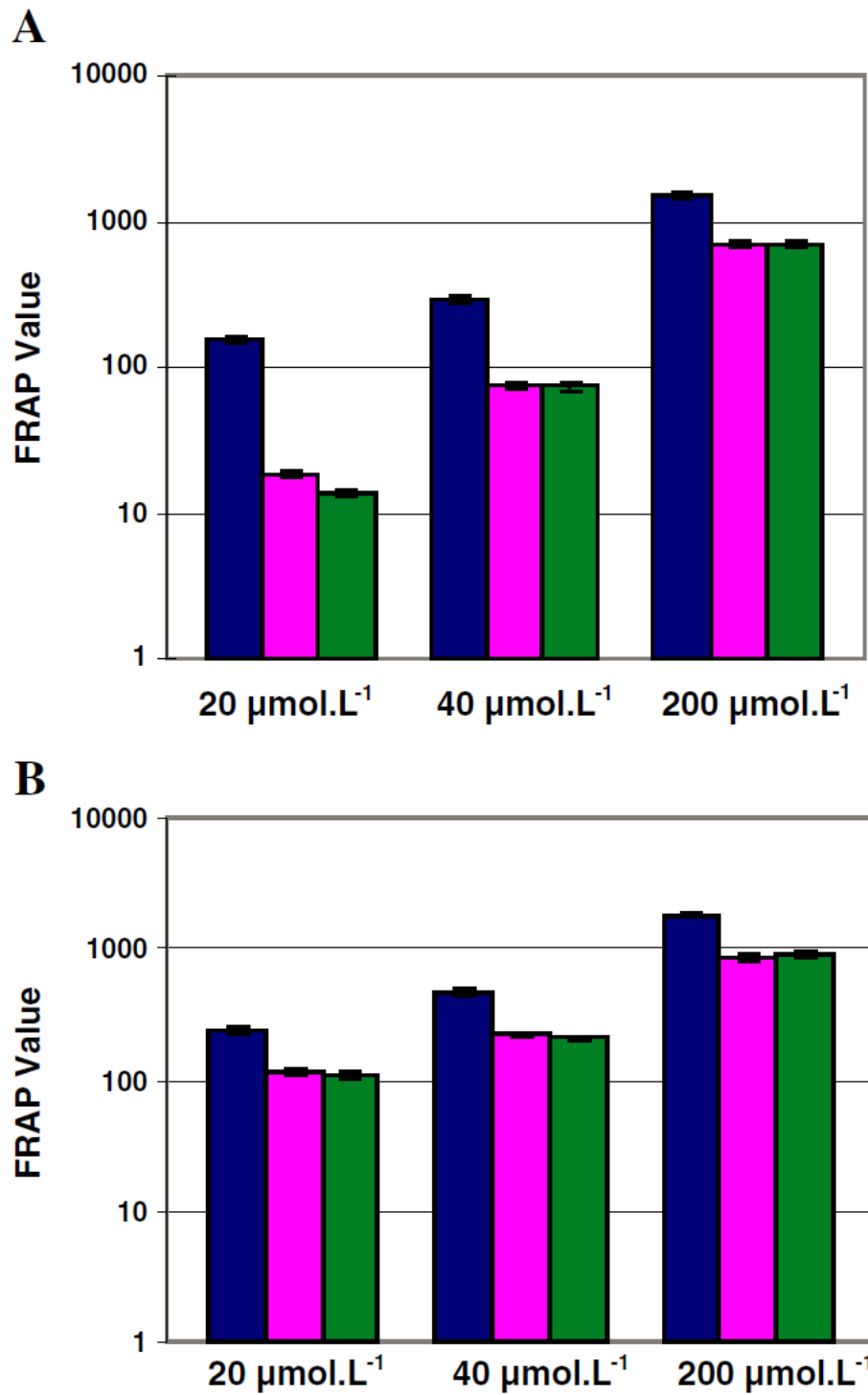


Figure 2-7. Antioxidant activity (FRAP) of 20, 40 and 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ EGCG measured at pH 7.0 (A) and pH 4.0 (B); alone (■), with 20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ β -Lg (■) or with 20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ h- β -Lg (■)

At pH 4.0 (Figure 2-7B), the antioxidant activity of EGCG was proportional to its concentration, but greater than at pH 7.0 (Figure 2-7A). Adding either β -Lg or h- β -Lg again decreased the antioxidant value almost proportionately at all EGCG concentrations (Figure 2-7B). These results suggest that both β -Lg and h- β -Lg interact with EGCG by hydrogen bonding with phenolic hydroxyl groups. However, the affinity of EGCG for β -Lg was about 2.6 times higher than for h- β -Lg at pH 4.0, based on fluorescence analysis. The decreases in FRAP values at pH 4.0 were smaller than those observed at pH 7.0 and almost identical for β -Lg and h- β -Lg, which is inconsistent with the observed differences in affinities from fluorescence results. We therefore speculate that forces other than hydrogen bonding, such as hydrophobic interaction, which has been reported for polyphenol interaction with proteins (Papadopoulou et al, 2005), occurs between EGCG and β -Lg in both states.

In order to study the possible protective effect of protein on EGCG stability, antioxidant activity as a function of time at a protein/EGCG ratio of 1:1 was measured at pH 7.0 and 4.0 (Figure 2-8 A B). At pH 7.0, the antioxidant activity of EGCG gradually decreased over time, reaching a plateau after 72 h. However, activity did not change significantly in the presence of β -Lg, remaining about 1.2 times that of pure EGCG for 24 h and about 1.8 times that of pure EGCG for 48 h in the presence of h- β -Lg. The greater protection provided by h- β -Lg than by β -Lg is possibly due to the higher affinity of EGCG for h- β -Lg (Figure 2-3). The activity decreased to 14 FRAP units at 168 h in the presence of h- β -Lg. This indicates that the protection provided by β -Lg in both its native and denatured states is time-limited at pH 7.0. At pH 4.0, the antioxidant activity of EGCG remained constant until 72 h, after which a small decrease was observed, since EGCG is more stable at acidic pH. A similar change was observed in the presence of both β -Lg and h- β -Lg.

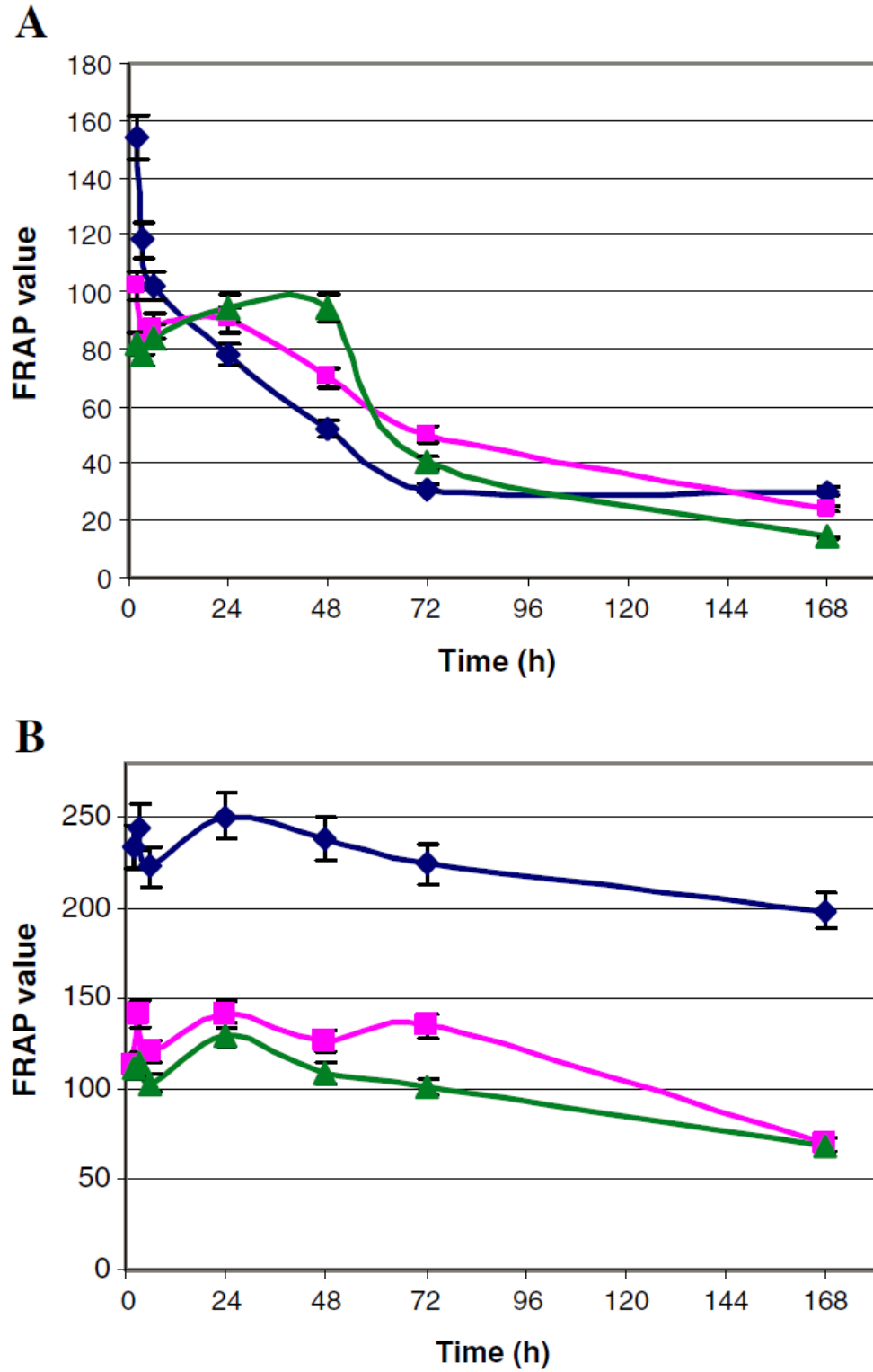


Figure 2-8. Antioxidant activity (FRAP) of (♦) pure EGCG, (■) β -Lg and EGCG 1:1, (▲) *h*- β -Lg and EGCG 1:1 measured over time at pH 7.0 (A) and pH 4.0 (B)

2.6. Conclusions

Based on our spectroscopic results, EGCG interacts with β -Lg and heat-denatured β -Lg at pH 7.0 and 4.0. The interactions changed the tertiary structure (Trp environment) and secondary structure of the protein. Hydrogen bonding occurs between EGCG and the protein in both its native and denatured states, which decreased the antioxidant activity of EGCG. Hydrophobic interaction may also be involved in the interaction. The affinity of EGCG for h- β -Lg at pH 7.0 is greater than for β -Lg and greater than for the protein in either state at pH 4.0. Complexing with β -Lg provides limited protection of EGCG against degradation at pH 7.0 but not at pH 4.0. This protection was slightly greater with h- β -Lg. The present research provides further insight into the characteristics of β -Lg binding with flavonoids such as EGCG and the impact of this interaction on their antioxidant activity.

3. Chapitre : Molecular structure of β -lactoglobulin heat-set gels interacting with epigallocatechin-3-gallate

Auteurs:

Raquel Zorrilla¹ Li Liang¹ Gabriel Remondetto² and Muriel Subirade¹

¹ Department of Food Science, Institute of Nutrition and Functional Foods (INAF/STELA). Université Laval, Quebec G1K 7P4, Canada.

² Coopérative Agropur, 4700 rue Armand Frappier, St-Hubert, QC, J3Z 1G5

3.1. Résumé

L'épigallocatechine-3-gallate (EGCG) est un flavonoïde qui a des bénéfices potentiels pour la santé humaine en raison de sa capacité antioxydante. Dans des travaux antérieurs, il a été démontré que l'EGCG peut interagir avec la β -Lactoglobuline (β -Lg) et que cette interaction modifie l'activité de l'EGCG. Cependant, l'impact de cette interaction sur les propriétés fonctionnelles de la β -Lg est méconnu.

Pour aborder ce point, l'impact de l'EGCG sur le comportement thermique de la β -Lg a été étudié en utilisant la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) et la microscopie électronique. Les spectres FTIR de la β -Lg ont été enregistrés en présence et en absence d'EGCG en fonction de la température pendant les étapes de chauffage et de refroidissement ultérieures. Les expériences ont été menées dans les conditions permettant la formation des gels filamenteux (pH 7.0) et particuliers (pH 4.0).

Les résultats montrent que la présence d'EGCG modifie les profils d'agrégation de la β -Lg aux deux valeurs de pH. De plus à pH 7.0, une différence plus marquée dans le profil de dénaturation et d'agrégation de la BLg en présence d'EGCG a été observé comparé que pH 4.0. La présence d'EGCG pourrait entraîner un renforcement du gel au niveau moléculaire, bien que les études microscopiques présentent des images similaires en présence et en l'absence d'EGCG, suggérant que les gels formés ont une microstructure assez semblable.

3.2. Abstract

Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) is a flavonoid having potential benefits for human health due to its antioxidant activity. In a previous work, we showed that EGCG can interact with β -lactoglobulin (β -Lg) and that its activity is thereby modified. However, little is known about the impact of this interaction on the functional properties of β -Lg.

We used Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and electron microscopy to study the behaviour of β -Lg in the presence of EGCG during heating and cooling in the range of 30–85°C. The experiments were conducted at pH 7.0 and 4.0, where β -Lg is known to form respectively fine-stranded and particulate gels.

The presence of EGCG affected the aggregation of β -Lg at both pH values. Marked differences in the degree of molecular denaturation were noted at pH 7.0. Using destabilizing agents, we showed that EGCG strengthens the gel network, although the microstructure does not appear to be altered.

3.3. Introduction

Green tea is one of the most popular beverages consumed worldwide. Epidemiological studies have associated green tea consumption with a reduced risk of several chronic diseases including cancer and cardiovascular disorders (Scalbert et al., 2005). This has been attributed to the antioxidant activity of polyphenols (Nagle et al., 2006). In addition to their potent anti-oxidant activity, these molecules constitute one of the most potent classes of anti-aggregation agents and may be used for the prevention and treatment of Alzheimer's and other neurodegenerative diseases involving amyloid fibril formation associated with protein mis-folding (Ferreira et al., 2009, Ehrnhoefer, 2008). Catechins are the most abundant polyphenols in green tea. They are known to bind to proteins in solution. The properties of the resulting complexes vary depending on the structure of the molecules involved (Almajano et al., 2007a, Almajano et al., 2007b). Polyphenol-rich extracts from green tea are now being incorporated into many food products, including cereals, biscuits, dairy products, meat products and snack foods (Wang et al., 2000, Bellés et al., 2017). Polyphenols have been used to improve various functional properties of milk and dairy products, such as foaming, oxidative stability and heat stability (O'Connell and Fox, 2001).

Due to their nutritional and functional properties, whey proteins are used widely as food ingredients. Beta-lactoglobulin (β -Lg, Figure 3-1) is the most abundant protein in whey, the primary gelling agent and the principal determinant of the thermal behaviour of whey protein (Relkin, 1996). The texture and strength of protein thermal gels are affected by intrinsic factors such as protein composition and concentration and by extrinsic factors such as heating temperature, pH, ionic strength and the presence of other food components (Foegeding, 1989, Totosaus et al., 2002). Depending on pH, β -Lg can form two types of gels with a wide range of properties. Above pH 6 and below pH 4, the gels are transparent and composed of flexible and "fine-stranded" linear networks (Stading and Hermansson, 1990). They are morphologically similar to the β -sheet-rich fibrillar aggregates or amyloids observed in many diseases (Krebs et al., 2009, Giurleo et al., 2008, Hamada, 2009). Between pH 4 and 6, the gels are opaque and characterized by randomly associated spherical aggregates or "particulate" networks (Stading and Hermansson, 1990). These types of gel can be differentiated by Fourier transform infrared spectroscopy, which reveals protein denaturation and unfolding,

aggregate formation and the strength of the intermolecular interactions (Lefèvre and Subirade, 2000b).

In a previous study, we showed that β -Lg interacts at pH 7.0 and pH 4.0 with epigallocatechin-3-gallate (EGCG), the most abundant and active polyphenol in green tea (Figure 3-2). EGCG binds to the surface of β -Lg with a binding constant of about 10^4 M^{-1} and a molar binding ratio close to 1 (Zorrilla et al., 2011). In complexes with β -Lg, it retains slightly more antioxidant ability. However, nothing is known about the effect of this association on β -Lg functional properties such as thermal gelling. The goal of this study was to investigate the effects of EGCG on the thermal behaviour of fine-stranded and particulate β -Lg gels using Fourier-transform infrared spectroscopy. FTIR has been used previously to monitor modifications of protein conformation and hence denaturation as well as aggregation during gel formation (Lefèvre and Subirade, 2000b). Using specific destabilizing agents, let to study the interactions that happens during gel disintegration. Further characterization was obtained using scanning and transmission electronic microscopy. Macroscopic observations and color measurements were also performed.

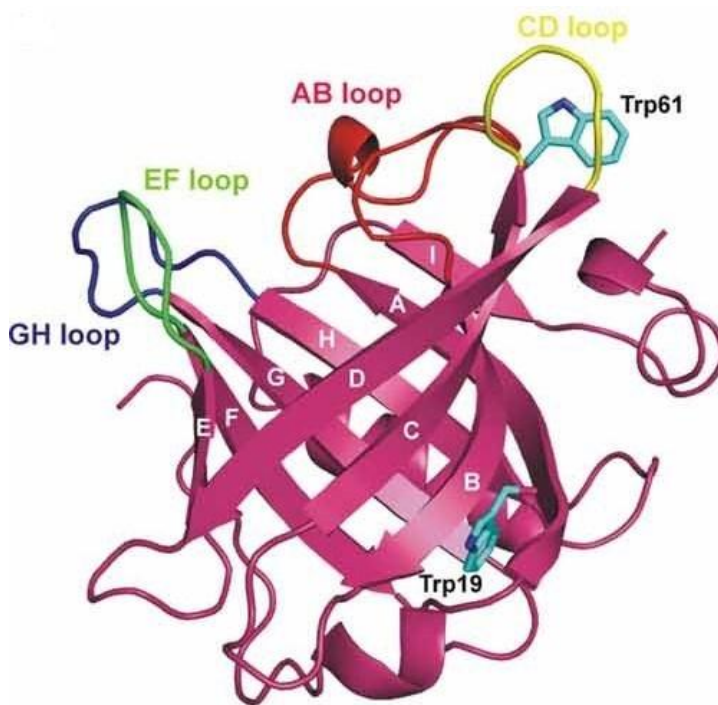


Figure 3-1. Representation of bovine β -Lg unliganded form. Eight antiparallel β -strands (A-H) form central calyx surrounded by flexible loops: AB, CD, EF and GH (Loch et., al 2011)

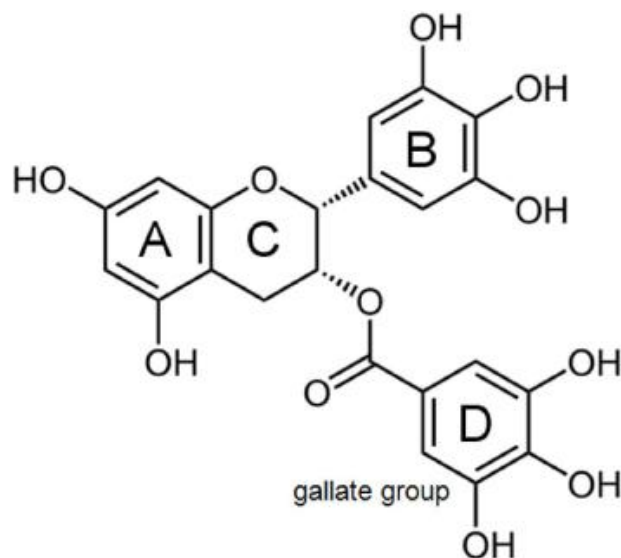


Figure 3-2. Chemical structure of EGCG (Mereles et al., 2010)

3.4. Materials and Methods

4.1.1 Materials

Beta-lactoglobulin from bovine milk (a mixture of variants A and B, crystallized and lyophilized, purity $\geq 90\%$), EGCG from green tea (purity $\geq 80\%$), D₂O (99.9 atom %D), NaOD and DCl were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Co. and used without further purification. All other reagents were of analytical grade.

4.1.2 FT-IR spectroscopic Measurements

Solutions of β -lactoglobulin and EGCG (both 2.7 mM) dissolved in D₂O were adjusted to pD 7.4 and 4.4 with NaOD or DCl. The pD was measured with an Accumet pH meter 915 (Fisher Scientific) using a correction factor of 0.4, that is, pD = pH + 0.4 (Boye et al., 1996). The β -lg solutions were kept for 48 h under a nitrogen atmosphere to achieve complete H/D exchange at room temperature. Each solution was then added to a freshly prepared EGCG solution to obtain a β -lg/EGCG ratio of 1:1. The final concentrations of both compounds were approximately 1.35 mM. The samples were kept for 24 h under nitrogen at room temperature.

FTIR spectra were obtained using a Magna 560 Nicolet spectrometer (Madison, WI) equipped with a mercury-cadmium-telluride detector. The spectrometer was continuously purged with dried air. Samples were placed between two CaF₂ windows separated by polyethylene terephthalate film spacers (23 μ m thick) and then in a thermostat-controlled cell. Temperature was controlled with a homemade Peltier-effect apparatus with an accuracy of $\pm 0.5^\circ\text{C}$. The sample was heated to a temperature in the 30–85 $^\circ\text{C}$ range in steps of 5 $^\circ\text{C}$, and was

equilibrated for 5 minutes at desired temperature before recording the spectra. Samples were then cooled to 31°C in steps of 5°C and recorded under the same conditions. The temperature was ramped on average at 0.6°C min⁻¹ up or down. Each spectrum is the average of 128 scans and apodized with a Happ-Genzel function. For the study of the amide I region of the protein, spectral processing was performed with *Omniscan* software. The D₂O contribution in the amide I region was eliminated by subtracting the D₂O spectrum at the same temperature, such that the baseline was corrected between 2000 and 1700 cm⁻¹. Fourier self deconvolution was applied in order to identify each overlapped component present under the broad amide I band (Arrondo et al., 1993). Band narrowing was achieved using full width at a half-height of 18 cm⁻¹ and a resolution enhancement factor of 2 cm⁻¹.

4.1.3 Destabilizing agents test

Sample preparation

Gels were obtained from β-Lg solution (11% w/w) prepared by dispersing the protein in phosphate buffer at pH 7.0 or in acetate buffer at pH 4.0 with or without EGCG (β-Lg/ EGCG ratio 1:1). Dispersions were stirred for 2 h at low velocity, degassed for 30 min, heated at 85°C for 30 min using a water/ethylene glycol bath then cooled and held at 4°C for 24 h.

Gels placed in centrifugation tubes were contacted with the following specific destabilizing agents prepared in a pH 7.0 buffer solution : 2 M urea to disrupt hydrogen bonding, 1% sodium dodecyl sulphate to interfere with hydrophobic interactions, 0.2 M 2-mercaptoethanol to disrupt disulphide bonds, and water as a reference. An oscillatory shaker at constant speed (50 strokes per minute) was used. Aliquots of 200 μL were removed each hour for 6 h, and the protein concentrations were measured using the Pierce® BCA protein assay reducing agent (Walker, 2002). The experiment was repeated three times. Results were expressed as mean ± standard deviation

4.1.4 Electron Microscopy

Transmission electron microscopy (TEM)

Gels prepared as described above were fixed in 2.5% glutaraldehyde and 4% paraformaldehyde in 0.1 M cacodylate buffer at pH 7.3 for 24 h at 4°C, washed three times in cacodylate buffer, post-fixed in 1% osmium tetroxide for 1.5 h, washed twice in cacodylate buffer and three times with distilled water, then dehydrated with a series of solutions of increasing ethanol concentration. The dehydrated samples were embedded in a mixture of EPON™ resin and propylene oxide 1:1. Sections (60–80 nm thick) deposited on nickel grids were stained with aqueous solutions of uranyl acetate (3%) and lead citrate (0.1%). A JEOL 1200EX electron microscope (JEOL Ltd., Akishima, Japan) operated at 80 kV was used to obtain micrograph images.

Scanning electron microscopy (SEM)

Gels prepared as described above were fixed in 2.5% glutaraldehyde + 4% paraformaldehyde in 0.1 M cacodylate buffer at pH 7.3 for 24 h at 4°C, washed three times in cacodylate buffer and post-fixed in 1% osmium tetroxide for 3 h, washed again three times in cacodylate buffer and dehydrated in solutions of ethanol at increasing concentrations. The dehydrated samples were embedded in hexamethyldisilazane. Each sample was critical-point-dried then sputter-coated with gold/palladium particles (30 nm). A JEOL 6360LV electron microscope (JEOL Ltd., Akishima, Japan) operated at 15 kV was used to obtain micrograph images.

4.1.5 Macroscopic gel observations

The appearance of the gels was observed directly and photographed with a HP PhotoSmart™ M425 camera (Hewlett-Packard Development Company, L.P. Houston, USA).

4.1.6 Color measurements

Surface reflectance of prepared gels (10 mm thick and 28 mm wide) was measured with a Minolta CR-300 Chroma meter using the CIE color system to determine the parameters L* (whiteness, from 0 to 100), a* (green to red) and b* (blue to yellow). For each gel, L*, a* and b* values were recorded in triplicate from 3 samples. Results were expressed as mean ± standard deviation.

3.5. Results

4.5.1 FTIR data

The effect of EGCG on the formation of fine-stranded β -lactoglobulin gels at pH 7.0 (pD 7.4) and of particulate gels at pH 4.0 (pD 4.4) was apparent in FTIR spectra collected temperatures between 30°C and 85°C. Proteins that unfold upon heating are often capable of refolding at least partly during cooling. Conformational changes of β -Lg during cooling from 85°C to 31°C were observable in situ. Temperature-induced changes in β -Lg secondary structure in the presence and absence of EGCG were apparent in the amide I' region based on activity at wavenumbers in the 1600–1700 cm^{-1} range. This activity is due primarily (about 80%) to carbonyl stretching vibrations of the peptide bond, which is weakly coupled with the in-plane N-H bending and the C-N stretching vibration, and is highly sensitive to changes in molecular structure.

The de-convoluted spectra of β -Lg at pH 7.0 during the heating and cooling in the absence and presence of EGCG are shown in Figures Figure 3-3 A and Figure 3-3 B respectively. The features apparent in the absence of EGCG are assigned to protein structural components on the basis of previous studies (Lefèvre and Subirade, 2000b; Lefèvre and Subirade, 1999). Before heating (at 30°C), the amide I' band featured six individual components that correspond to particular secondary structures, activity at 1634 cm^{-1} indicating intra-

molecular β -sheet structures and 1623 cm^{-1} indicating exposure of strongly bonded β -sheets. Their simultaneous presence is characteristic of β -Lg in the dimer form (Lefèvre and Subirade, 1999). Activity at 1648 cm^{-1} is attributed to random coils and α -helix, whereas 1660 cm^{-1} and 1676 cm^{-1} correspond respectively to β -sheets and turn structures. The small activity at 1612 cm^{-1} is due to vibration of aromatic amino acid residues. As the temperature increased to 50°C , minor modifications were noted. Beyond 60°C , activity at 1623 cm^{-1} vanished, indicating a shift of the monomer-dimer equilibrium toward the monomer. At 65°C , only 1632 cm^{-1} activity remained, reflecting the prevalence of the monomer. At 80°C , two new components appeared, first at 1617 cm^{-1} , which is attributable to intermolecular β -sheets, and then at 1681 cm^{-1} , indicating that the β -sheets are antiparallel. These components increased in intensity between 80°C and 85°C , showing that aggregation was underway. The amide I band broadened simultaneously as a result of a further loss of secondary structures. At 85°C , the spectrum acquired a featureless broad band between 1677 cm^{-1} and 1622 cm^{-1} with a maximum located at 1636 cm^{-1} . As the temperature decreased to 81°C , the spectral profile changed slightly, whereas at 71°C , activities at 1617 , 1628 , 1644 and 1658 cm^{-1} became noticeable. From 71°C down to 31°C , the spectral profiles changed very little, showing that the protein remained aggregated, which was expected since aggregation involves irreversible breakage of disulphide bridges. The aggregation band shifted from 1617 cm^{-1} at 85°C to 1615 cm^{-1} at 31°C , an effect resulting from strengthening of intermolecular hydrogen bonding between β -sheets.

At 30°C , the spectra obtained in the presence and absence of EGCG are fairly similar (Figure 3-3). However, features are located at slightly different wavenumbers, indicating structural modification of the protein in the presence of EGCG. A notable difference is the less obvious activity at 1623 cm^{-1} , suggesting a shift toward the β -Lg monomer and implying that binding EGCG changes the configuration of β -Lg (Zorrilla et al., 2011). The 1623 cm^{-1} band disappeared at 50°C instead of 70°C . Increasing the temperature to 75°C brought additional slight modifications. At 80°C , activities at 1615 and 1679 cm^{-1} became apparent, indicating aggregation. These two features increased in intensity at 85°C . However, this increase was less apparent in the presence of EGCG, showing that the β -Lg aggregation process was affected. In addition, the 1622 – 1677 cm^{-1} band developed features not seen in the absence of the polyphenol, notably activities at 1649 cm^{-1} and 1638 cm^{-1} . These persisted when the temperature was decreased to 71° , and then smoothed out with a shift to a maximum at 1630 cm^{-1} , suggesting reorganization of polypeptide chains within the network. There is also a slight shift in the aggregation component from 1615 cm^{-1} at 85°C to 1614 cm^{-1} at 31°C , showing strengthening of intermolecular hydrogen bonds throughout the gel network upon cooling. The intensity of this component is also much lower than the corresponding intensity at 1615 cm^{-1} in the absence of EGCG. As shown previously, increases in this intensity reflect the extent of protein self-association and aggregation (Lefèvre and Subirade, 2000b). EGCG thus appears to inhibit the aggregation process somewhat. This is in agreement with previous studies (Ehrnhoefer et al., 2006). EGCG has been found to inhibit amyloid-fibril formation (Ehrnhoefer et al.,

2008, Hudson et al., 2009). Of interest is that β -Lg aggregates into well-ordered amyloid fibrils at pH 7.0 (Krebs et al., 2009). EGCG thus might interfere with intermolecular β -sheet formation in β -Lg. However, it does not appear to inhibit aggregation of β -Lg as strongly as it does other protein aggregation processes (Kang et al., 1999; Lill et al., 2003).

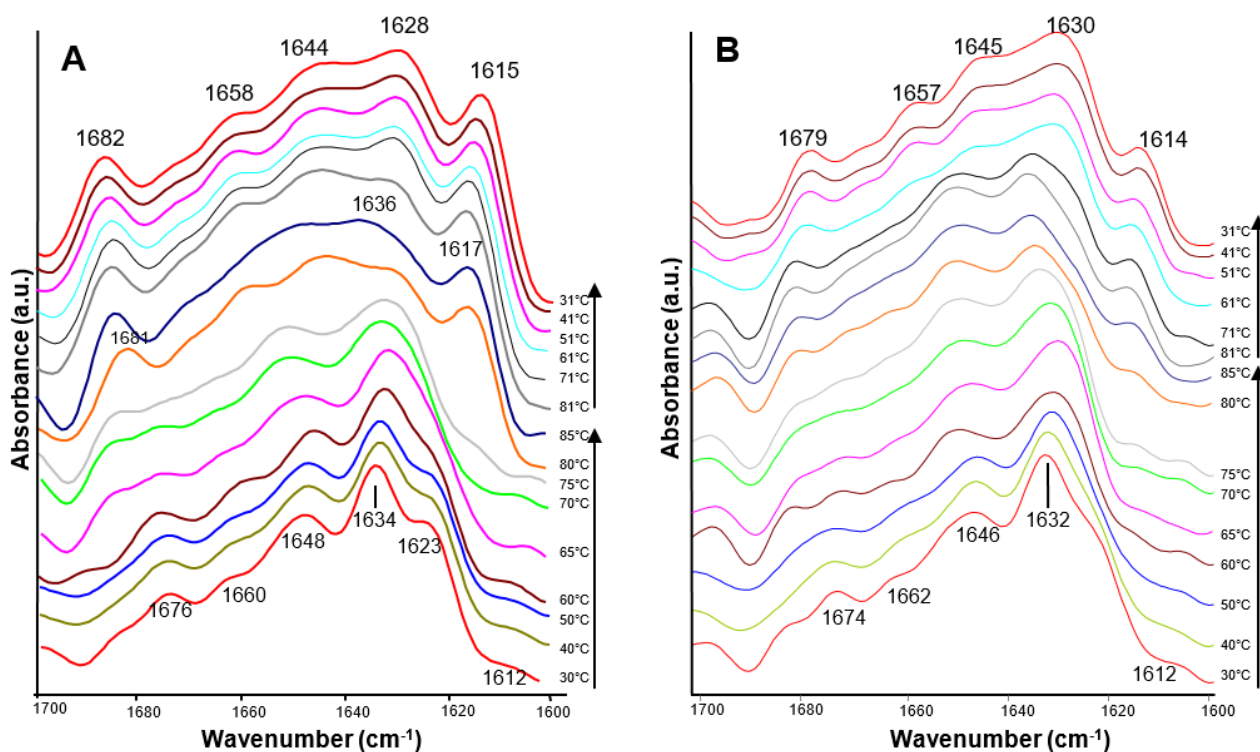


Figure 3-3. Deconvoluted spectra of β -Lg in D_2O at pH 7.0 in the absence (A) and in the presence (B) of EGCG as a function of temperature during heating up to 85°C and subsequent cooling.

Figure 3-4 shows the results of the above experiment performed at pH 4.0. In the absence of EGCG (Figure 3-4 A), the spectrum of unheated β -Lg (at 30°C) had seven notable features. The activities at 1635 cm^{-1} and 1624 cm^{-1} characterize β -Lg dimers. As the temperature increased up to 80°C, almost no change occurred in the profiles, indicating that the protein structure was preserved and suggesting that β -Lg has better thermal stability at pH 4.0 than at pH 7.0. Significant changes in intensity and broadening of features occurred at 85°C, and the activity at 1692 cm^{-1} disappeared. Such changes characterize the onset of protein denaturation. The increase at 1624 cm^{-1} and shift to 1623 cm^{-1} is associated with protein aggregation, as observed previously for particulate gels (Lefèvre and Subirade, 2000b). The features located at 1632 cm^{-1} , 1644 cm^{-1} and 1658 cm^{-1} indicate the persistence of native secondary structures such as β -sheets, unordered structures, α -helices and

turns in the polypeptide chain. The stability of the spectral profile during cooling indicates that aggregation is irreversible in fine-stranded β -Lg gels. The wavenumbers were relatively preserved, although it is noteworthy that the aggregation feature located at 1615 cm^{-1} at pH 7.0 was found at 1623 cm^{-1} , showing that hydrogen bonding strengthening was less pronounced at pH 4.0.

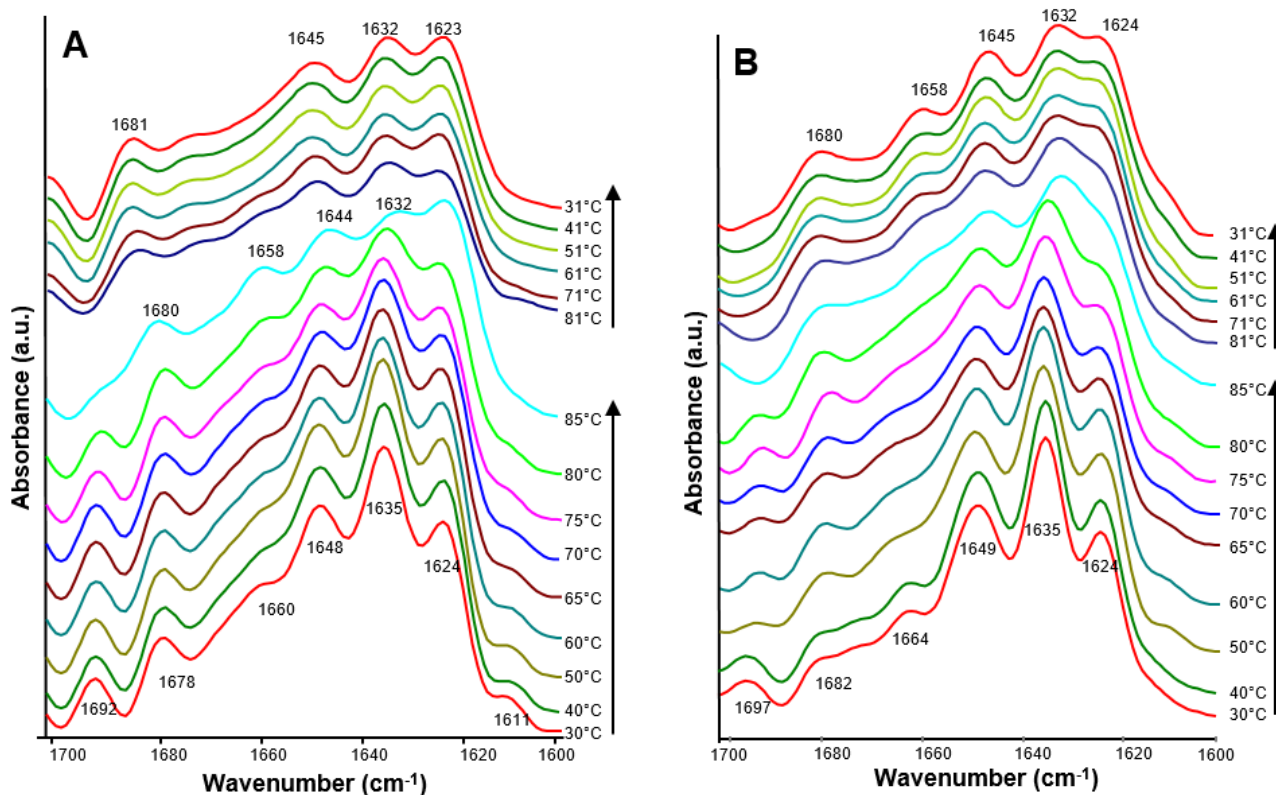


Figure 3-4. Deconvoluted spectra of β -Lg in D₂O at pH 4.0 in the absence (A) and in the presence (B) of EGCG as a function of temperature during heating up to 85°C and subsequent cooling.

The spectrum of unheated β -Lg obtained in the presence of EGCG (Figure 3-4 B) resembled that obtained in its absence, with activities at 1624 cm^{-1} and 1635 cm^{-1} characteristic of dimers. These features were retained until 80°C but were nearly lost along with the 1697 cm^{-1} feature at 85°C, due to denaturation. The presence of EGCG strongly affected the 1624 cm^{-1} feature at temperatures higher than 70°C. Upon cooling, features at 1632 cm^{-1} , 1645 cm^{-1} , 1658 cm^{-1} and 1624 cm^{-1} reappeared, suggesting less unfolding than at neutral pH. The wavenumber of the aggregation band remains in the $1622\text{--}1624\text{ cm}^{-1}$ range, indicating that intermolecular hydrogen bonding is similar for fine-stranded and particulate gels. As in the absence of EGCG, the conservation of the spectral profile during cooling indicates that aggregation is irreversible.

4.5.2 Destabilizing agents test

Since FTIR detects only hydrogen bonding, it cannot be ruled out that other interactions played a major role in β -Lg aggregation. Given that covalent bonding, hydrophobic interactions and van der Waals forces are involved in protein gel formation, their influence on β -Lg gel structure was monitored using destabilizing agents known to interfere with them: urea for hydrogen bonding, SDS for hydrophobic interactions, 2-mercaptoethanol for disulphide bridges, and water as a reference.

Figure 3-5 shows dissolving as a function of time in the presence of different destabilizing agents for β -Lg gels produced at pH 7.0 (fine-stranded) and at pH 4.0 (particulate) in the presence or absence of EGCG. Under the reference condition (Figure 3-5A), the protein was diluted slightly, and fine-stranded gels dissolved faster. The presence of EGCG had no significant effect on the dissolution of either type of gel.

In the presence of SDS, considerably less protein was dissolved after 1 hour when EGCG was also present, regardless of gel type (Figure 3-5B). Subsequent dissolution was comparable to that in water only and reached a slightly higher level after 6 h. In the absence of EGCG, dissolution was slower than in water, in spite of the somewhat higher levels at 1 h. These results suggest that hydrophobic interaction is involved in the stabilization of fine-stranded and particulate gels. It is interesting that in the presence of EGCG, the initial dissolution of both gels was lower, close to that obtained in water. However, both subsequently caught up to concentrations reached in the absence of EGCG. This suggests that EGCG can delay the disruptive effect of SDS on hydrophobic interaction.

In the presence of urea (Figure 3-5C), β -Lg fine-stranded and particulate gels dissolved at a fixed rate starting from levels not far from those measured at 1 h with SDS. However, fine-stranded gels dissolved somewhat more, exceeding the levels measured in the presence of SDS and reaching nearly twice those measured in water only. This suggests that hydrogen bonding is involved in the stabilization of both gels and plays a more important role than hydrophobic interaction in fine-stranded gel. The effect of urea was indifferent to the presence of EGCG.

The presence of 2-mercaptoethanol had by far the greatest effect on β -Lg gel solubility, allowing 20 times more dissolution than in water and at least 10 times more than in the presence of SDS or urea (Figure 3-5D). Disulphide bonds thus appear to play a major role while hydrogen bonding and hydrophobic interactions play minor roles in the gel structure. The dissolution of fine-stranded gel started more slowly but caught up to the particulate gel over time. EGCG had no significant influence on the dissolution of particulate gel but had a significant initial effect on fine-stranded gel and might have had a slowing effect on the concentration of dissolved protein reached after 6 h.

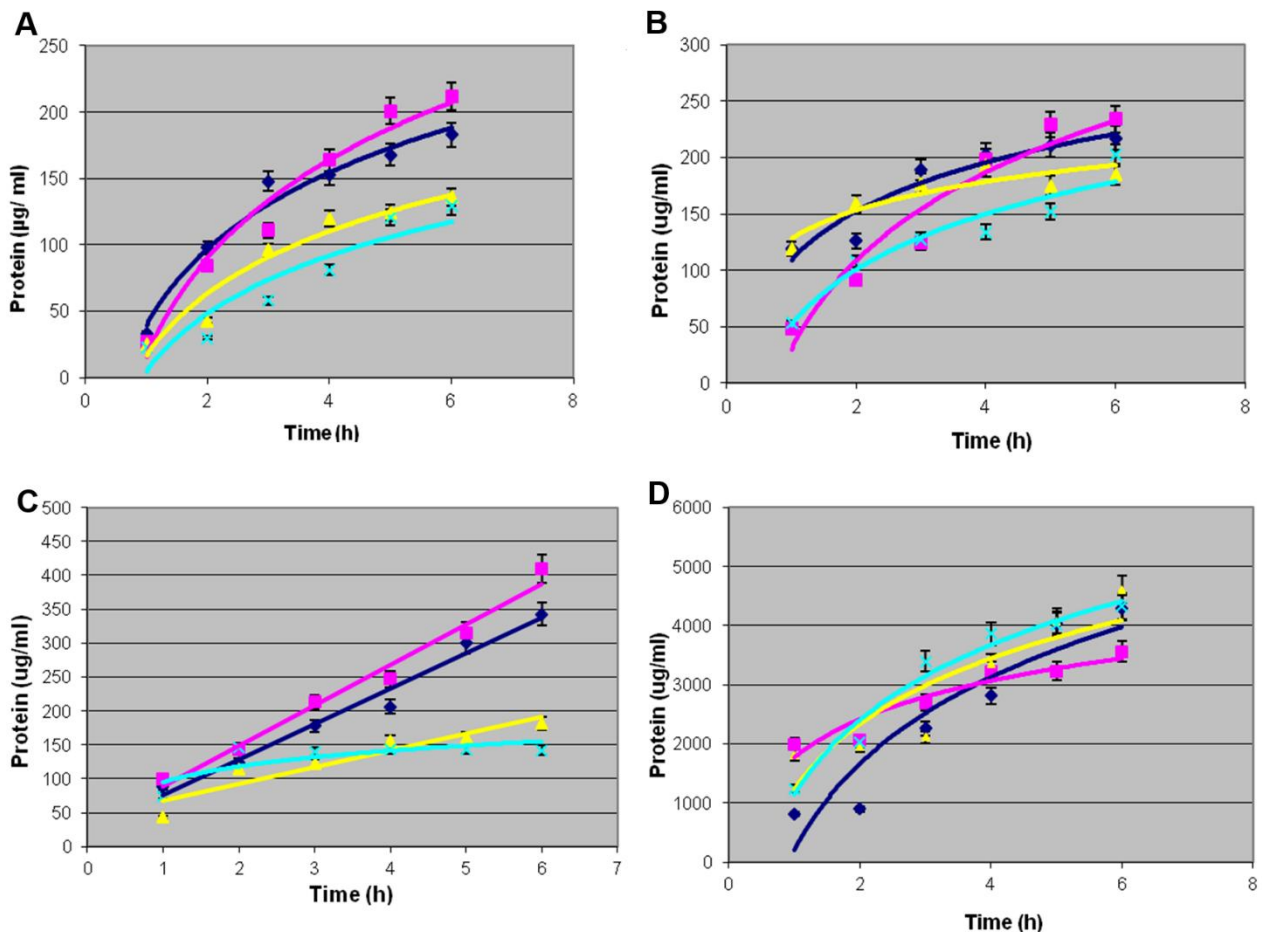


Figure 3-5. Dissolved protein concentration vs. time for protein gels: (♦) fine-stranded; (■) fine-stranded-EGCG; (▲) particulate and (■) particulate-EGCG in (A) water; (B) 1%SDS; (C) 2M Urea and (D) 0.2 M 2-mercaptoethanol

4.5.3 Microscopic studies

TEM images and SEM images of β -Lg gels formed in the absence (A, C) or presence (B, D) of EGCG at pH 7.0 (A, B) or at pH 4.0 (C, D) reveal differences in microstructure. At pH 7.0, the structure was fairly homogeneous, finely porous (Figure 3-6) and dense (Figure 3-7), whether EGCG was present or not. At pH 4.0, a coarser microstructure is observed. Dense agglomerations of protein were formed, again regardless of the presence of EGCG (Figure 3-6 C, D), although the aggregates appear to be slightly smaller in its absence. The network was irregular, consisting of thick aggregates and large pores characteristic of particulate gels (Figure 3-7). These results indicate that EGCG modified β -Lg gel microstructure slightly, but without affecting the fine-stranded and particulate structures formed at pH 7.0 and pH 4.0 respectively.

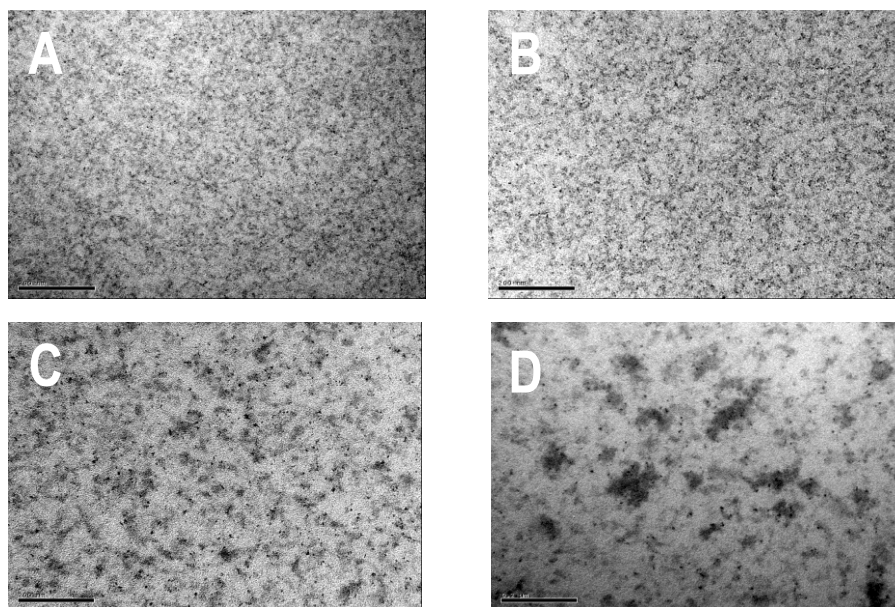


Figure 3-6. Transmission electron micrographs of heat gels of β -Lg : at pH 7.0 in the absence (A) and in the presence (B) of EGCG and at pH 4.0 in the absence (C) and in the presence (D) of EGCG.

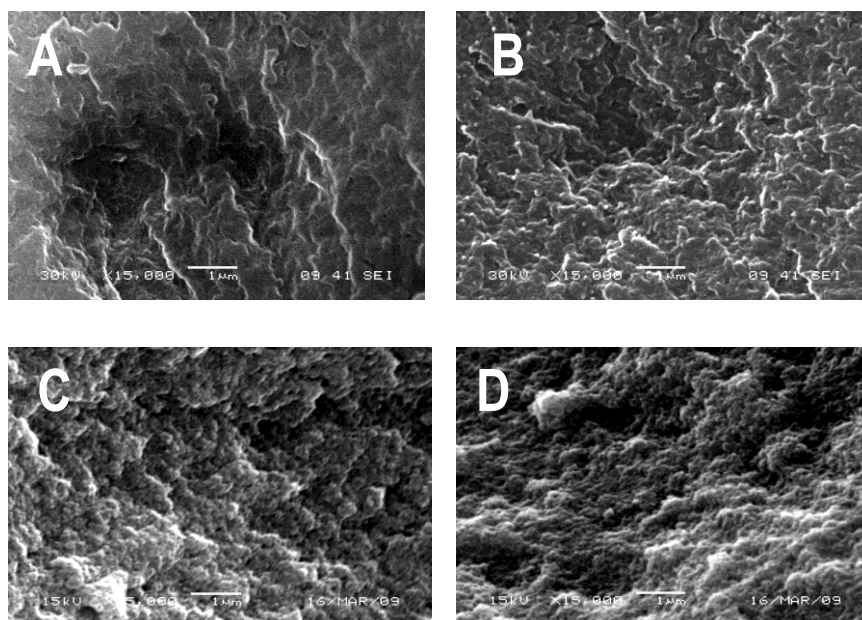


Figure 3-7. Scanning electron micrographs of heat gels of β -Lg : at pH 7.0 in the absence (A) and in the presence (B) of EGCG and at pH 4.0 in the absence (C) and in the presence (D) of EGCG.

4.5.4 Macroscopic studies

Figure 3-8 presents photographs taken 24 h after preparation of β -Lg heat-set gels formed in the absence (A, C) or presence (B, D) of EGCG at pH 7.0 (A, B) or pH 4.0 (C, D). At pH 7.0, the gels were almost transparent and exhibited the same uniform and brilliant appearance with soft structure regardless of EGCG, its presence producing only a slight yellowish coloration. At pH 4.0, the gels were opaque, more in the presence of EGCG, suggesting that the flavonoid increased random aggregation of the gel network.

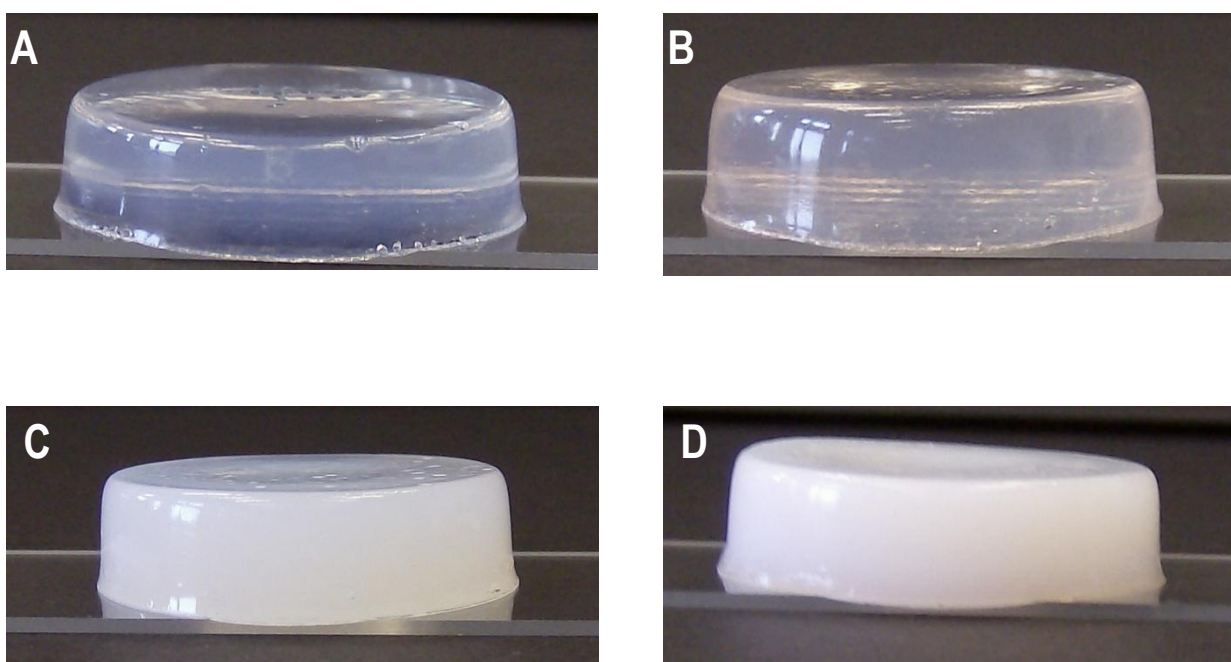


Figure 3-8. Photographs of β -Lg gels: at pH 7.0 in the absence (A) and in the presence (B) of EGCG and at pH 4.0 in the absence (C) and in the presence (D) of EGCG.

The light (L^*) and color (a^* and b^*) values for β -Lg heat-set gels formed in the absence or presence of EGCG at pH 7.0 and pH 4.0 are shown in Table 3-1. L^* values at pH 7.0 were lower, whether EGCG was present or not, indicating a finer protein strand network. The presence of EGCG increased L^* values slightly at pH 7.0, and much more at pH 4.0, which is consistent with large aggregate formation, as shown by TEM, and with gel opacity. It has been shown previously that gel whiteness is related to particle size (Doi, 1993; Marangoni et al., 2000; Chantrapornchai and McClements, 2002). In fact, L^* can be used as an indicator of the degree of aggregation throughout a gel network. An opaque or whiter gel should have a higher L^* value, mainly because

larger aggregates scatter more light than do smaller, more numerous particles. This indicates that EGCG increased β -Lg aggregate size. In addition, the presence of the flavonoid increased the color parameters a^* and b^* for both gel types.

Table 3-1. Results of color parameters for β -Lg heat-set gels in the absence and in the presence of EGCG at pH 7.0 and pH 4.0

Treatment	L*	a*	b*
β -Lg pH 7.0	50.61 \pm 1.42	+ 0.51 \pm 0.18	+3.85 \pm 0.35
β -Lg-EGCG pH 7.0	53.53 \pm 0.57	+ 4.39 \pm 0.05	+16.38 \pm 0.05
β -Lg pH 4.0	71.08 \pm 0.24	- 4.03 \pm 0.07	-14.25 \pm 0.15
β -Lg-EGCG pH 4.0	81.54 \pm 0.42	- 2.53 \pm 0.10	-7.45 \pm 0.24

3.6. Discussion

In a previous study, we showed that the antioxidant activity of EGCG changes as a result of binding to β -Lg (Zorrilla et al., 2011). In the present work, changes to the molecular structure of β -Lg gels formed in the presence of EGCG were studied. This dairy protein is known to form two different types of gels, one composed of variably flexible linear strands (at neutral pH) and the other characterized by random association of more or less spherical aggregates (at acidic pH). These types are called respectively “fine-stranded” and “particulate”. The presence of EGCG induces some differences in the gel structure.

4.6.1 Differences in gel formation and structure due to EGCG

FTIR spectroscopy has been used extensively to study changes in the molecular structure of β -Lg at different temperatures (Casal et al., 1988, Qi et al., 1997), pressures (Subirade et al., 1998) and pH (Boye et al., 1996; Casal et al., 1988). Several authors have studied the characteristics of heat-set gels of β -Lg (Lefèvre and Subirade, 2000b; Lefèvre and Subirade, 2000a, Boye et al., 1995, Matsuura and Manning, 1994). Differences between fine-stranded and particulate gels appear primarily in the denaturation mechanism, aggregate formation process and resulting protein structure (Lefèvre and Subirade, 2000b). In the present work, the impact of EGCG on structural changes occurring during thermal gelation was studied using FTIR at pH 7.0 and pH 4.0. Although many spectral features are indifferent to the presence of EGCG, various molecular differences are detectable, depending on the type of gel.

In the case of fine-stranded gels (formed at pH 7.0), EGCG induced a shift towards the β -Lg monomer at 30°C, as revealed by the near absence of absorbance at 1623 cm^{-1} (Figure 3-3 B versus Figure 3-3 A). This suggests modification of the molecular structure, which could be due to binding of EGCG. We have reported previously that EGCG binds to the surface of β -Lg under physiological conditions (Zorrilla et al., 2011). Absorbance at 1614–1615 cm^{-1} is lowered in the presence of EGCG, suggesting that the polyphenol interfered with protein self-association and aggregation, based on previous findings (Lefèvre and Subirade, 2000b). Inhibition of protein aggregation by EGCG and of amyloid-fibril formation in particular has been shown previously (Ehrnhoefer et al., 2006; Ehrnhoefer et al., 2008; Hudson et al., 2009; Cheng et al., 2013; Doig and Derreumaux, 2015). It is interesting that β -Lg aggregates into well-ordered amyloid fibrils at pH 7.0 (Krebs et al., 2009). This suggests the possibility that EGCG interferes with intermolecular β -sheet formation. However, the effect of EGCG on β -Lg aggregation appears to be modest compared to its effect on the aggregation of other proteins (Kang et al., 1999; Lill et al., 2003; Debnath et al., 2016).

In the case of particulate gels formed at pH 4.04, EGCG had much the same attenuating effect on the aggregation-associated spectral features as observed at pH 7.0. Even though EGCG had no impact on β -Lg dissociation at this pH (since the protein remains in the dimer form until aggregation), these results suggest that EGCG can modify β -Lg aggregation at acidic pH as well by decreasing intermolecular β -sheet formation.

These results show that EGCG can modify the aggregation state of fine-stranded or particulate β -Lg gels but does not inhibit the gelling process.

4.6.2 EGCG-induced microscopic and visible differences in β -Lg gel structure

Although EGCG had some impact on the aggregation of both types of gel, it did not inhibit gel formation or the characteristic structures at pH 7.0 or pH 4.0, as revealed by microscopic analysis. Gel integrity depended largely on disulphide bonds, while hydrophobic attractions and hydrogen bonding played lesser roles, as revealed by experiments with destabilizing agents. Non-covalent interactions appeared to be more important for fine-stranded than for particulate gels. The presence of EGCG had little effect on gel dissolution kinetics but did delay SDS-induced disruption of hydrophobic interactions, indicating that its presence reinforced these interactions. These results are in agreement with previous reports showing that binding of EGCG by casein involved mainly hydrophobic interactions and caused compaction of the casein micelle (Jöbstl et al., 2006).

Using destabilizing agents, it was shown that EGCG could induce small differences in both fine-stranded and particulate gels. At pH 7.0, it likely begins to oxidize and react with free amino groups, thereby acting as a covalent cross-linking agent. Various authors have studied this behaviour (Strauss and Gibson, 2004; Jöbstl et al., 2006; Chen et al., 2011) and its impact on gel strength (Balange and Benjakul, 2009; Nuthong et al., 2009).

We found that the EGCG-containing fine-stranded gels contacted with 2-mercaptoethanol dissolved more slowly, suggesting that the polyphenol did strengthen the gel matrix.

On the other hand, we observed no significant difference between the dissolution of β -Lg gels with or without EGCG in the presence of destabilizing agents at pH 4.0, except for slowing in the case of particulate gels in the presence of urea. Since EGCG is stable under acidic conditions, cross-linking is less likely. However, EGCG OH groups are strongly polar and therefore could interact with amino acid side chains through hydrogen bonding. Under acidic conditions, protein gels tend to be weak and brittle due to the relative lack of disulphide bonds and to pH-associated effects on denaturation and aggregation (Errington and Foegeding, 1998), and are maintained principally by hydrogen bonding and hydrophobic interactions, probably counteracted by electrostatic repulsion (Otte et al., 2000). Our results indicate that EGCG might strengthen the gel network without causing microstructural or macro-structural changes.

EGCG delayed SDS-induced disruption of hydrophobic interaction in both gel types. However, in the presence of 2-mercaptoethanol, the fine-stranded gel containing EGCG dissolved at first more quickly than the other three gels and then more slowly. The reason for this different behaviour under this specific condition remains unclear. The stability of EGCG at pH 4.0 implies that its OH groups remained available for hydrogen bonding with polypeptide chain side groups. On the other hand, free thiol groups are less reactive under acidic conditions, thus making disulphide bond formation less likely. The integrity of particulate β -Lg gels therefore would depend more on a combination of hydrogen bonding and hydrophobic interactions (Lupano et al., 1996; Otte et al., 2000), while disulphide bridges would be more involved in maintaining the integrity of fine-stranded gels. However, this does not explain why fine-stranded gels dissolved more than particulate gels did in the presence of SDS or urea. Furthermore, the dissolution of fine-stranded gel containing EGCG was slower in the presence of 2-mercaptoethanol, in spite of a higher initial level, suggesting that the polyphenol somehow interfered with the disruption of disulphide bridges.

Finally, no macroscopic manifestation of the effect of EGCG on the molecular structure of β -Lg was apparent in either type of gel.

3.7. Conclusions

This study showed that EGCG has detectable effects on the thermal denaturation and aggregation of β -lactoglobulin. These effects were more apparent at pH 7.0. Using destabilizing agents, it was shown that EGCG strengthens the resulting gel. However, no major supra-molecular effect was observed using FTIR,

which suggests that β -lactoglobulin gels formed at a given pH are very similar in structure, regardless of the presence of EGCG.

This study suggests that EGCG can be incorporated into food matrices to contribute health-promoting antioxidant activity without altering functional properties, although it might induce changes in protein structure that could be useful in food technology applications. Further research on its effects on other functional properties of β -lactoglobulin would be helpful in the development of novel functional foods.

Conclusion

Les bienfaits de l'épigallocatechine-3-gallate, principal composant phénolique du thé vert, sur la santé humaine sont reconnus depuis plusieurs années. Cependant sa faible biodisponibilité, due à son instabilité dans le milieu gastro-intestinal, limite ses effets chez l'humain. De son côté, la β -Lactoglobuline (β -Lg) est connue pour sa capacité à lier des molécules bioactives et à les protéger de l'oxydation. Ce projet de recherche a permis d'étudier les interactions entre la β -Lactoglobuline (β -Lg) et l'épigallocatechine-3-gallate (EGCG) et l'impact de ces interactions sur la protéine et l'EGCG.

Premièrement, l'interaction entre l'EGCG et la β -Lg a été étudiée à l'aide de la spectroscopie de fluorescence et de la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier. Les résultats ont montré que l'EGCG a la capacité d'interagir avec la protéine à l'état natif ou dénaturée à pH 7 et à pH 4. L'EGCG a modifié la structure moléculaire de la protéine. L'interaction entre la protéine et l'EGCG est régie par des liaisons hydrogène et possiblement aussi par des interactions hydrophobes. De plus, les résultats montrent que l'EGCG présente une affinité plus importante pour la protéine dénaturée à des conditions de pH neutre, où le nombre de ligands liés par molécule de protéine est de 1. L'interaction provoque une diminution de l'activité antioxydante de l'EGCG dans toutes les conditions étudiées. Cependant, on observe que la β -Lg assure une protection limitée à l'EGCG contre la dégradation dans le temps : la forme dénaturée de la protéine à pH 7 étant légèrement plus efficace.

Dans la deuxième étape, l'impact des interactions β -Lg-EGCG sur les propriétés fonctionnelles de la β -Lg a été étudié en utilisant la spectroscopie FTIR et la microscopie électronique comme outils d'analyse. Les essais ont été réalisés aux pH 7.0 et 4.0 pour permettre de caractériser les gels formés, filamenteux et particuliers, respectivement. Les résultats montrent que la présence de l'EGCG modifie le profil d'agrégation de la protéine aux deux valeurs de pH. La β -Lg à pH 7,0 présente cependant une différence plus marquée dans le profil de dénaturation et d'agrégation en présence de l'EGCG par rapport à la β -Lg à pH 4,0. Les études avec des agents déstabilisants montrent que la présence d'EGCG pourrait aider à renforcer le réseau du gel formé. Néanmoins, les résultats microscopiques des gels ne montrent pas de différence en présence d'EGCG, suggérant que les gels ont une microstructure similaire.

Des études supplémentaires portant sur le processus de libération de l'EGCG dans l'organisme, en conditions gastro-intestinales, pourraient être effectuées afin de mieux caractériser le comportement de deux types de gels (filamenteux et particuliers), la biodisponibilité de l'EGCG et son activité antioxydante.

Dans une perspective de développement de nouveaux aliments fonctionnels, l'EGCG lié à la β -Lg pourrait être inclus dans une matrice alimentaire. Bien que cette interaction réduit l'activité antioxydant de l'EGCG, elle

permettrait de garder une partie de l'activité antioxydante de la catéchine intacte qui pourrait éventuellement être biodisponible dans l'intestin.

Bibliographie

Almajano, M.P., Delgado, M.E., Gordon, M.H. 2007a. Albumin causes a synergistic increase in the antioxidant activity of green tea catechins in oil-in-water emulsions. *Food Chemistry*.10: 1375-1382.

Almajano, M.P., Delgado, M.E., Gordon, M.H. 2007b. Changes in the antioxidant properties of protein solutions in the presence of epigallocatechin gallate. *Food Chemistry*. 101: 126-130.

Al-Shabib, N. A., Khan, J. M., Ajamaluddin, M., Alsenaidy, M.A., Rehman, M.T., Alajmi, F.M., Alsenaidy, A.M., Husain, F.M., Hasanhan, M.H. 2018. Molecular insight into binding behavior of polyphenol (rutin) with beta lactoglobulin: Spectroscopic, molecular docking and MD simulation studies. *Journal of Molecular Liquids*. 269: 511-520.

Arrondo, J.L.R., Muga, A., Castresana, J., Goñi, F.M. 1993. Quantitative studies of the structure of proteins in solution by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 59: 23-56.

Arts, M.J.T. J., Haenen, G.R.M.M., Wilms, L.C., Beetstra, S.A.J.N., Heijnen, C.G.M., Voss, H.P. Bast, A. 2002. Interactions between flavonoids and proteins: effect on the total antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 1184-1187.

Arts, M.J.T.J., Haenen, G.R.M.M., Voss. H.-P., Bast. A. 2001. Masking of antioxidant capacity by the interaction of flavonoid with protein. *Food and Chemical Toxicology*. 39: 787-791.

Balange, A, Benjakul, S. 2009. Enhancement of gel strength of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*) surimi using oxidised phenolic compounds. *Food Chemistry*. 113(1): 61-70.

Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*. 99(1): 191-203.

Bastianetto, S., Dumont, Y., Quirion, R. 2010. Catechins and resveratrol as protective polyphenols against beta-amyloid-induced toxicity: possible significance to Alzheimer's disease. *Recent Advances on Nutrition and the Prevention of Alzheimer's Disease*. 661(2): 145-154.

Baxter, N.J., Lilley, T.H., Haslam, E., Williamson, M.P. 1997. Multiple interactions between polyphenols and a salivary proline-rich protein repeat result in complexation and precipitation. *Biochemistry*. 36: 5566-5577.

- Beaulieu, L., Savoie, L., Paquin, P., Subirade, M. 2002. Elaboration and characterization of whey protein beads by an emulsification/cold gelation process: application for the protection of retinol. *Biomacromolecules*. 3(2): 239-248.
- Bech-Larsen, T., K. G. Grunert. 2003. The perceived healthiness of functional foods: A conjoint study of Danish, Finnish and American consumers perception of functional foods. *Appetite*. 40(1): 9-14.
- Bellés, M., Alonso, V., Roncalés, P., Beltrán, J.A. 2017. Effect of borage and green tea aqueous extracts on the quality of lamb leg chops displayed under retail conditions. *Meat Science*. 129: 153-160
- Benzie, I.F.F., Strain, J.J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. 239 (1) : 70-76.
- Boye, J I., Ismail, A A., Alli, I. 1996. Effects of physicochemical factors on the secondary structure of beta-lactoglobulin. *Journal of Dairy Research*. 63 (1): 97-109.
- Boye, J. I., Kalab, M., Alli, I., Ma, C. Y. 2000. Microstructural properties of heat-set whey protein gels: Effect of pH. *LWT-Food Science and Technology*. 33(3): 165-172.
- Boye, J. I., Ma, C. Y., Ismail, A., Harwalkar, V. R., Kalab, M. 1997. Molecular and microstructural studies of thermal denaturation and gelation of β -lactoglobulins A and B. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45(5): 1608-1618.
- Boye, J.I., Alli, I., Ismail, A.A., Gibbs, B.F., and Konishi, Y. 1995. Factors affecting molecular characteristics of whey protein gelation. *International Dairy Journal*. 5: 337-353.
- Braicu, C., Ladomery, M. R., Chedea, V.C., Irimie, A., Berindan-Neagoe, I. 2013. The relationship between the structure and biological actions of green tea catechins. *Food Chemistry*. 141(3): 3282-3289.
- Bravo, L. 1998. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*. 56(11): 317-333.
- Brownlow, S., Morais Cabral, J.H., Cooper, R., Flower, D.R., Yewdall, S.J., Polikarpov, I., North, A.C.T., Sawyer, L. 1997. Bovine β -Lactoglobulin at 1.8 Å resolution- still an enigmatic lipocalin. *Structure*. 5: 481-495.
- Cabrera, C., Artacho, R., Giménez, R. 2006. Beneficial effects of green tea--A review. *Journal of the American College of Nutrition*. 25(2): 79-99.

Cao, G., Sofic, E. 1997. Antioxidant and Prooxidant behavior of flavonoids: Structure-activity relationships. *Free Radical Biology and Medicine*. 22(5): 749-760.

Casal, H.L., Köhler Ulrich and Mantsch, H.H. 1988. Structural and conformational changes of β -lactoglobulin B: an infrared spectroscopic study of the effect of pH and temperature. *Biochimica et Biophysica Acta*. 957: 11-20.

Cayot, P. ; and Lorient, D. 1998. Structures et Techno fonctions des protéines du lait. Pp.229-286. Paris : Airlait recherches.

Champagne, C. P. Fustier, P. 2007. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology. Plant biotechnology / Food biotechnology*. 18(2): 184-190.

Chanphai, P., Bourassa, P., Kanakis, C.D., Tarantilis, P.A., Polissiou, M.G., Tajmir-Riahi, H.A. 2018. Review on the loading efficacy of dietary tea polyphenols with milk proteins. *Food Hydrocolloids*. 77: 322-328.

Chantrapornchai, W., McClements, D. J. 2002. Influence of NaCl on optical properties, large-strain rheology and water holding capacity of heat-induced whey protein isolate gels. *Food Hydrocolloids*. 16(5): 467-476.

Chen, L., Remondetto, G.E., Subirade, M. 2006. Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. *Trends in Food Science & Technology*. 17:272-283.

Chen, R., Wang, J.B., 2011. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate (EGCG) induced intermolecular cross-linking of membrane proteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 507(2): 343-349.

Chen, Y. Barkley, M.D. 1998. Towards understanding tryptophan fluorescence in proteins. *Biochemistry*. 37: 9976-9982.

Chen, Z.Y., Zhu, Q. Y. 2001. Degradation of green tea catechins in tea drinks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49(1): 477-482.

Cheng, B., Gong, H. 2013. Inhibiting toxic aggregation of amyloidogenic proteins: A therapeutic strategy for protein misfolding diseases. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. 1830(10): 4860-4871

- Cheyrier, V. 2005. Polyphenols in foods are more complex than often thought. *The American journal of clinical nutrition*. 81(1), 223S-229S.
- Cho, Y., Batt, C.A., Sawyer, L. 1994. Probing the retinol- binding site of bovine β -Lactoglobulin. *The Journal of Biological Chemistry*. 259: 11102-11107.
- Clark, A. H., Ross-Murphy, S. B. 1987. Structural and mechanical properties of biopolymer gels. *Advanced in Polymers Science*. 83: 57-192.
- Collini, M., D'Alfonso. L., Baldini. G. 2000. New insight on beta-lactoglobulin binding sites by 1-anilinonaphthalene- 8-sulfonate fluorescence decay. *Protein Science*. 9: 1968-1974.
- Cos, P., Bruyne, T. D., Hermans, N., Apers, S., Berghe, D. V., Vlietinck, A. J. 2004. Proanthocyanidins in health care: current and new trends. *Current medicinal chemistry*.11(10): 1345-1359.
- Creamer, L. K., Parry, D. A. D. 1983. Secondary structure of bovine (beta)-lactoglobulin B. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 227: 98-105.
- Danaei, G., Ding, E. L., Mozaddarian, D., Taylor, B., Rehm, J., Murray, C.J.L., Ezzati, M 2009. The preventable causes of death in the United States: Comparative risk assessment of dietary, lifestyle, and metabolic risk factors. *PLoS Medicine*. 6(4): 10.1371.
- de Vos, P., Faas, M. M., Spasojevic, M., Sikkema, J. 2010. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal. US/Ireland Functional Foods Conference, Dietary Optimization of Gut Function and the Microbiota*. 20(4): 292-302.
- De Wit, J. N. 1998. Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. *Journal of dairy science*. 81(3): 597-608.
- De Wit, J. N. 2009. Thermal behaviour of bovine β -lactoglobulin at temperatures up to 150 C. A review. *Trends in Food Science & Technology*. 20(1): 27-34.
- Debnath, K., S., Shekhar,S., Kumar,V., Jana, N.R., Jana N.R. 2016. Efficient inhibition of protein aggregation, disintegration of aggregates, and lowering of cytotoxicity by green tea polyphenol-based self-assembled polymer nanoparticles. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 8(31): 20309-20318.
- DeFelice, S. 2002. FIM. Rationale and proposed guidelines for the nutraceutical research & education act -NREA. *Foundation for Innovation in Medicine*.

- Diarrassouba, F., Garrait, G., Remondetto, G., Alvarez, P. Beyssac, E., Subirade, M. 2014. Increased stability and protease resistance of the β -lactoglobulin/vitamin D3 complex. *Food Chemistry*. 145: 646-652.
- Diarrassouba, F., Remondetto, G., Garrait, G., Alvarez, P. Beyssac, E., Subirade, M. 2015. Self-assembly of β -lactoglobulin and egg white lysozyme as a potential carrier for nutraceuticals. *Food Chemistry*. 173: 203-209.
- Diarrassouba, F., Liang,L., Remondetto, G., Subirade, M. 2013. Nanocomplex formation between riboflavin and β -lactoglobulin: Spectroscopic investigation and biological characterization. *Food Research International. Science and innovation: improvement for healthy and safe foods*. 52(2): 557-567.
- Doi, E. 1993. Gels and gelling of globular proteins. *Trends in Food Science and Technology*. 4: 1-5.
- Doig, A. J. Derreumaux, P. 2015. Inhibition of protein aggregation and amyloid formation by small molecules. *Current Opinion in Structural Biology Folding and binding/Nucleic acids and their protein complexes*. 30: 50-56.
- Donovan, J.L. Crespy, V. Manach, C. Morand, C. Besson, C. Scalbert, A. Rémésy C. 2001. Catechin is metabolized by both the small intestine and liver of rats. *The Journal of Nutrition*. 131: 1753-1757.
- Dufour, E. 2004. Structure des protéines solubles majeures. Minéraux et produits laitiers. 343-390. Tec and Doc Paris
- Dufour, E. Haertlé, T. 1991. Binding of retinoids and β -carotene to β -lactoglobulin. Influence of protein modifications. *Biochemica et Biophysica Acta*. 1079: 316-320.
- Dufour, E., Haertle, T. 1990. Binding affinities of. beta.-ionone and related flavor compounds to. beta.-lactoglobulin: effects of chemical modifications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 38(8): 1691-1695.
- Dufour, E., Roger, P., Haertle, T. 1992. Binding of benzo(α)pyrene, ellipticine, and cis-parinaric acid to β -lactoglobulin: Influence of protein modifications. *Journal of Protein Chemistry*. 11: 645-652.
- Ehrnhoefer, D. E.; Bieschke, J.; Boeddrich, A.; Herbst, M.; Masino, L.; Lurz, R.; Engemann, S.; Pastore, A.; Wanker, E. E. 2008. EGCG redirects amyloidogenic polypeptides into unstructured, off-pathway oligomers. *Nature Structural & Molecular Biology*.15: 558-566.

- Ehrnhoefer, D.E., Duennwald, M., Markovic, P., Wacker, J.L., Engemann, S., Roark, M., Legleiter, J., Marsh, J.L., Thompson, L.M., Lindquist, S. 2006 Green tea (-)-epigallocatechin-gallate modulates early events in huntingtin misfolding and reduces toxicity in Huntington's disease models .*Human Molecular Genetics*. 15: 2743-2751.
- Errington, A. D., Foegeding, E. A. 1998. Factors determining fracture stress and strain of fine-stranded whey protein gels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46(8): 2963-2967.
- Fang, F.-Y., Shi, M. 2016. Differential behaviors of tea catechins under thermal processing: Formation of non-enzymatic oligomers. *Food Chemistry*.196: 347-354.
- Ferrari, C. 2004. Functional foods, herbs and nutraceuticals: towards biochemical mechanisms of healthy aging. *Biogerontology*. 5: 275-289.
- Ferreira, N., Cardoso, I., Domingues, M.R., Vitorino, R., Bastos, M., Bai, G., Saraiva, M.J., Almeida, M.R. 2009. Binding of epigallocatechin-3-gallate to transthyretin modulates its amyloidogenicity. *FEBS Letters* 583: 3569-3576.
- Ferreira, N., Saraiva, M. J., Almeida, M. R. 2012. Epigallocatechin-3-gallate as a potential therapeutic drug for TTR-related amyloidosis:“in vivo” evidence from FAP mice models. *PLoS one*. 7(1): e29933.
- Ferreira, R. B., Piçarra-Pereira, M. A., Monteiro, S., Loureiro, V. B., Teixeira, A. R. 2001. The wine proteins. *Trends in food science & technology*. 12(7): 230-239.
- Flower, D. R., North, A.C., Sansom, C.E. 2000. The lipocalin protein family: structural and sequence overview. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1482: 9.
- Foegeding, E.A. 1989. Molecular properties and functionality of proteins in food gels. In: Kinsella, J.E. and Soucie, W., Editors. *Food Proteins*, American Oil Chemists Society. pp. 185–194.
- Fourneau, C., Laurens, A., Hocquemiller, R., Cavé, A. 1998. Radical scavenging evaluation of green tea extracts. *Phytotherapy Research*. 10: 529-530.
- Frapin, D., Dufour, E., Haertle, T. 1993. Probing the fatty acid binding site of beta-lactoglobulins. *Journal of Protein Chemistry*. 12 (4): 443-449.

- Frazier, A.R., Papadopoulou, A., Mueller-Harvey, I., Kisson, D., Green, J.R. 2003. Probing protein-tannin interactions by isothermal titration macrocalorimetry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51: 5189-5195.
- Frewer, L. J., Scholderer, J., Lambert, N. 2003. Consumer acceptance of functional foods: issues for the future. *British Food Journal*. 105 (10) : 714-731.
- Friedman, M. 1996. Food browning and its prevention: An overview *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44(3): 631-653.
- Gasymov, O. K., A. R. Abduragimov, Gasimov, E.O., Yusifov, T.N., Dooley, A.N., Glasgow, B.J. 2004. Tear lipocalin: potential for selective delivery of rifampin. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. 1688(2): 102-111.
- Ghosh KS, Sahoo BK, Dasgupta S. 2008. Spectrophotometric studies on the interaction between (-)-epigallocatechin gallate and lysozyme. *Chemical Physics Letters*. 452:193–197
- Giurleo, J.T., He, X., Talaga, D.S. 2008. [beta]-Lactoglobulin assembles into amyloid through sequential aggregated intermediates. *Journal of Molecular Biology*. 381: 1332-1348.
- González-Pérez, S., Merck, K. B. 2002. Isolation and characterization of undenatured chlorogenic acid free sunflower (*Helianthus annuus*) proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50(6): 1713-1719.
- Granato, D., Nunes, D.S., Barba, F.J. 2017. An integrated strategy between food chemistry, biology, nutrition, pharmacology, and statistics in the development of functional foods: A proposal. *Trends in Food Science & Technology*. 62: 13-22.
- Guo, Q., Zhao, B., Shen, S., Hou, J., Hu, J., Xin, W. 1999. ESR study on the structure-antioxidant activity relationship of tea catechins and their epimers. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1427(1): 13-23.
- Guo, W., Kong, E., Meydani, 2009. Dietary polyphenols, inflammation, and cancer. *Nutrition and Cancer*. 61(6): 807-810.
- Hagerman, A. E. 1992. Tannin-protein interactions. phenolic compounds in food and their effects on health. *American Chemical Society. ACS Symposium Series*. 506: 236-247, SE-19.

- Halliwel, B. 2008. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 476: 107-112.
- Hamada, D., Tanaka, T., Tartaglia, G.G., Pawar, A., Vendruscolo, M., Kawamura, M., Tamura, A., Tanaka, N., Dobson, C.M. 2009. Competition between folding, native-state dimerisation and amyloid aggregation in [β]-lactoglobulin. *Journal of Molecular Biology*. 386: 878-890.
- Harborne, J. B, Williams, C.A. 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*. 55(6): 481-504.
- Harbowy, M. E. Balentine, D. A. 1997. Tea Chemistry. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 16 (5) 415-480.
- Henning, S. M., Niu, Y. 2005. Bioavailability and antioxidant effect of epigallocatechin gallate administered in purified form versus as green tea extract in healthy individuals. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 16: 610-616.
- Hongsprabhas, P. Barbut, S 1997. Ca²⁺-Induced cold gelation of whey protein isolate: effect of two-stage gelation. *Food Research International*. 30(7): 523-527.
- Huang, M. T., Lee, C. Y., Ho, C. T. 1992. Phenolic compounds in food and their effects on health. In ACS symposium series (USA). American Chemical Society.
- Hudson, S.A.; Ecroyd, H.; Dehle, F. C.; Musgrave, I. F.; Carver, J. A. 2009. (-)-Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG) maintains [κ]-Casein in its pre-fibrillar state without redirecting its aggregation pathway. *Journal of Molecular Biology*. 392: 689-700.
- Jegasothy, H., Stockmann, R. 2003. Binding of organic compounds to β -lactoglobulin: Use of the protein as a carrier. *Australian Journal of Dairy Technology*. 58(2): 191.
- Jobstl, E., Howse, J. R., Fairclough, J.P.A., Williamson, M.P. 2006. Noncovalent cross-linking of casein by Epigallocatechin gallate characterized by single molecule force microscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54(12): 4077-4081.
- Jouan, P. 2002. Lactoprotéines et lactopeptides: propriétés biologiques. Editions Quae. Université Laval, Institut National de la Recherche Agronomique. pp.127
- Kang, W.S., Lim, I.H., Yuk, D.Y., Chung, K.H., Park, J.B., Yoo, H.S., Yun, Y.P. 1999. Antithrombotic activities of green tea catechins and (-)-epigallocatechin gallate. *Thrombosis Research*. 96: 229-237.

- Kanter, M. 1998. Free radicals, exercise and antioxidant supplementation. *Proceedings of the Nutrition Society*. 57(1): 9-13.
- Katti, D. 1999. Preparation of albumin microspheres by an improved process. *Journal of microencapsulation*. 16(2): 231-242.
- Kehrer, J. P. 1994. Free radicals in biology: sources, reactivities and roles in the etiology of human diseases. *Natural antioxidants in human health and disease*. 25-62.
- Khan, N., Mukhtar, H. 2007. Tea polyphenols for health promotion. *Life Sciences*. 81(7): 519-533.
- Khanbabaee, K., van Ree, T. 2001. Tannins: Classification and definition. *Natural Product Reports*. 18(6): 641-649.
- King, A., Young, G. 1999. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *Journal of the American Dietetic Association*. 99(2): 213-218.
- Kontopidis, G., Holt, C., Sawyer, L. 2004. Invited Review: β -Lactoglobulin: Binding properties, structure, and function. *Journal of Dairy Science*. 87: 785-796.
- Kontopidis, G., Holt, C., Sawyer, L. 2002. The ligand-binding site of bovine β -lactoglobulin: evidence for a function. *Journal of Molecular Biology*. 318 : 1043-1055.
- Korhonen, H. Pihlanto, A. 2006. Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal*. 4th NIZO Dairy Conference - Prospects for Health, Well-being and Safety. 16(9): 945-960.
- Krebs, M.R.H., Devlin, G.L., Donald, A.M. 2009. Amyloid fibril-like structure underlies the aggregate structure across the pH range for β -lactoglobulin. *Biophysical Journal*. 96: 5013-5019.
- Lambert, J. D., Sang, S. Yang, C.S. 2007. Possible controversy over dietary polyphenols: Benefits vs risks. *Chemical Research in Toxicology*. 20(4): 583-585.
- Langton, M., Hermansson, A.M. 1992. Fine-stranded and particulate gels of β -lactoglobulin and whey protein at varying pH. *Food Hydrocolloids*. 5(6): 523-539.
- Lee, K. J., Lee, S. H. 2008. Extraction behavior of caffeine and EGCG from green and black tea. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 13(5) :646-649.

- Lefèvre, T., Subirade, M. 2000. Interaction of [beta]-lactoglobulin with phospholipid bilayers: a molecular level elucidation as revealed by infrared spectroscopy. *International Journal of Biological Macromolecules*. 28(1): 59-67.
- Lefèvre, T., Subirade, M. 1999. Structural and interaction properties of β -Lactoglobulin as studied by FTIR spectroscopy. *International Journal of Food Science and Technology*. 34: 419-428.
- Lefèvre, T., Subirade, M. 2000. Molecular differences in the formation and structure of fine- stranded and particulate β -lactoglobulin gels. *Biopolymers*. 54: 578-586.
- Lefèvre, T., Subirade, M. 2001. Molecular structure and interaction of biopolymers as viewed by Fourier transformed infrared spectroscopy: model studies on β -lactoglobulin. *Food Hydrocolloids*. 15: 365-376.
- Liang, L., Subirade, M. 2010. β -Lactoglobulin/folic acid complexes: formation, characterization, and biological implication. *The Journal of Physical chemistry B*. 114: 6707–6712.
- Liang, L., Tajmir-Riahi, H. A., Subirade, M. 2008. Interaction of β -lactoglobulin with resveratrol and its biological implications. *Biomacromolecules*. 9: 50–56.
- Lill, G., Voit, S., Schrör, K., Weber, A.A. 2003. Complex effects of different green tea catechins on human platelets. *FEBS Letters* 546: 265-270.
- Liu, R. H. 2004. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: Mechanism of action. *The Journal of Nutrition*. 134 (12): 3479S-3485S
- Loch, J., Polit, A., Górecki, A., Bonarek, P., Kurpiewwska, K., Dziedzicka-Wasylewska, M., Lewinski, K. 2011. Two modes of fatty acid binding to bovine beta-lactoglobulin-crystallographic and spectroscopic studies. *Journal of Molecular Recognition*. 24: 341-349.
- Lorenz, M., Jochmann, N., von Krosigk, A., Martus, P., Baumann, G., Stangl, K., Stangl, V. 2007. Addition of milk prevents vascular protective effects of tea. *European Heart Journal*. Oxford. 28: 219-223.
- Lupano, C.E., Renzi, L.A., Romera, V. 1996. Gelation of whey protein concentrate in acidic conditions: Effect of pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44: 3010-3014.
- Mahe, S., Roos, N., Benamouzig, R., Davin, L., Luengo, C., Gagnon, L., . Tomé, D. 1996. Gastrojejunal kinetics and the digestion of beta-lactoglobulin and casein in humans: the influence of the nature and quantity of the protein. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 63(4): 546-552.

- Maiti, T.K., Ghosh, K.S., Dasgupta, S. 2006. Interaction of (-)-epigallocatechin-3-gallate with human serum albumin: Fluorescence, Fourier transform infrared, circular dichroism, and docking studies. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 64: 355-362.
- Manach, C., Mazur, A., Scalbert, A. 2005a. Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Current Opinion in Lipidology*. 16(1) : 77-84.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A. Rém.sy, C. 2005b. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 81: 230S-242S.
- Marangoni, A. G., Barbut, S., McGauley, S. E., Marcone, M., Narine, S. S. 2000. On the structure of particulate gels-the case of salt-induced cold gelation of heat-denatured whey protein isolate. *Food Hydrocolloids*. 14: 61-74.
- Matsuura, J.E., Manning, M.C. 1994. Heat-induced gel formation of beta-lactoglobulin: A study on the secondary and tertiary structure as followed by circular dichroism spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 42: 1650-1656.
- Mereles, M.D., Buss, S.J., Hardt, S.E., Hunstein, W., Katus, H.A. 2010. Effects of the main green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate on cardiac involvement in patients with AL amyloidosis. *Clinical Research in Cardiology*. 99: 483-490.
- Middleton, E., Kandaswami, C., Theoharides, C.T. 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*. 52 (4): 673-751.
- Mirpoor, S. F., Hosseini, S. M. H. 2017. Efficient delivery of quercetin after binding to beta-lactoglobulin followed by formation soft-condensed core-shell nanostructures. *Food Chemistry*. 233: 282-289.
- Nagaoka, H., Toyoshima, S., Takeda, K. 2002. Spectrofluorometric determination of catechins with 1,2-diphenylethylenediamine. *Analytical Sciences*. 18(8): 951–953.
- Nagle, D.G., Ferreira, D., Zhou, Y.D. 2006. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG): chemical and biomedical perspectives. *Phytochemistry*. 67:1849–1855.
- Nakao, M., Takio, S., Ono, K. 1998. Alkyl peroxy radical-scavenging activity of catechins. *Phytochemistry*. 49 (8): 2379–2382.

- Nichenametla, S. N., Taruscio, T. G., Barney, D.L., Exon, J.H. 2006. A review of the effects and mechanisms of polyphenolics in cancer. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 46(2): 161-183.
- Nuthong, P., Benjakul, S., Prodpran, T. 2009. Effect of phenolic compounds on the properties of porcine plasma protein-based film. *Food Hydrocolloids*. 23(3): 736-741.
- O'Connell, J.E., Fox, P.F. 2001. Significance and applications of phenolic compounds in the production and quality of milk and dairy products: a review. *International Dairy Journal*. 11: 103-120
- Onoue, S., Ochi, M., Yamada, S. 2011. Development of (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG)-loaded enteric microparticles with intestinal mucoadhesive property. *International Journal of Pharmaceutics*. 410(1): 111-113.
- Otte, J., Zakora, M., Qvist, K.B. 2000. Involvement of disulfide bonds in bovine β -Lactoglobulin B gels set thermally at various pH. *Journal of Food Science*. 65: 384-389.
- Palazolo, G., Rodriguez, F., Farruggia, B., Pico, G., Delorenzi, N. 2000. Heat treatment of β -Lactoglobulin: Structural changes studied by partitioning and fluorescence. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 3817-3822.
- Papadopoulou, A., Green, R.J., Frazier, R.A. 2005. Interaction of flavonoids with bovine serum albumin: a fluorescence quenching study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53:158-163.
- Papiz, M.Z., Sawyer, L., Eliopoulos, E.E., North, A.C.T., Findlay, J.B.C., Sivaprasadarao, R., Jones, T.A., Newcomer, M.E., and Kraulis, P.J. 1986. The structure of [β]-lactoglobulin and its similarity to plasma retinol-binding protein. *Nature*. 324: 383-385.
- Parr, A. J., Bolwell, G.P. 2000. Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80(7): 985-1012.
- Pelillo, M. E., Cuvelier, B., Biguzzi, T., Toschi, G., Berset, C., Lercker, G. 2004. Calculation of the molar absorptivity of polyphenols by using liquid chromatography with diode array detection: the case of carnosic acid. *Journal of Chromatography A*. 1023: 225-229.
- Peressini, D., Sensidoni, A. 2009. Effect of soluble dietary fibre addition on rheological and bread making properties of wheat doughs. *Journal of Cereal Science*. 49(2):190-201.

- Pripp, A. H., Vreeker, R. 2005. Binding of olive oil phenolics to food proteins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 85(3): 354-362.
- Prosky, L. 2000. When is dietary fiber considered a functional food?. *BioFactors*. 12(1): 289-297.
- Qi, X.L., Holt, C., McNulty, D., Clarke, D.T., Brownlow, S., Jones, G. R. 1997. Effect of temperature on the secondary structure of beta-lactoglobulin at pH 6.7, as determined by CD and IR spectroscopy: a test of the molten globule hypothesis. *Biochemical Journal*. 324: 341-346.
- Qin, B. Y., Bewley, M. C., Creamer, L.K., Baker, H.M., Baker, E.N., Jameson, G.B. 1998. Structural basis of the Tanford transition of bovine beta-lactoglobulin. *Biochemistry*. 37: 14014-14023.
- Rao, A. V., Rao, L.G. 2007. Carotenoids and human health. *Pharmacological Research. Nutritional Pharmacology*. 55(3): 207-216.
- Rawel, H.M., Kroll, J., Hohl, U.C. 2001. Model studies on reactions of plant phenols with whey proteins. *Nahrung/Food*. 45 (2) : 72-81.
- Rein, M. J., Renouf, M. 2013. Bioavailability of bioactive food compounds: a challenging journey to bioefficacy. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 75: 588-602.
- Relkin, P., Mulvihill, D.M. 1996. Thermal unfolding of β - lactoglobulin, α -lactalbumin, and bovine serum albumin. A thermodynamic approach. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 36: 565-601.
- Remondetto, G. E., Subirade, M. 2003. Molecular mechanisms of Fe²⁺-induced β -lactoglobulin cold gelation. *Biopolymers*. 69(4): 461-469.
- Remondetto, G. E., Paquin, P., Subirade, M. 2002. Cold gelation of β -lactoglobulin in the presence of Iron. *Journal of Food Science*. 67(2): 586-595.
- Rice-Evans, C. 2001. Flavonoid antioxidants. *Current Medicinal Chemistry*. 8: 797-807.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N.J., Paganga, G. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*. 20(7): 933-956.
- Riihimäki, L. H., Vainio, M. J., Heikura, J. M. S., Valkonen, K. H., Virtanen, V. T., Vuorela, P. M. 2008. Binding of phenolic compounds and their derivatives to bovine and reindeer β -lactoglobulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56: 7721-7729.

- Rohn, S., Rawel, H., Kroll, J. 2004. Antioxidant activity of protein-bound quercetin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52: 4725-4729.
- Rosenberg, M., Young, S. L. 1993. Whey proteins as microencapsulating agents. Microencapsulation of anhydrous milkfat-structure evaluation. *Food Structure*. 12(1): 4.
- Sacco, J. E., Tarasuk, V. 2009. Health Canada's proposed discretionary fortification policy is misaligned with the nutritional needs of Canadians. *The Journal of Nutrition*. 139(10): 1980-1986.
- Sakurai, K., Goto, Y. 2006. Dynamics and mechanism of the Tanford transition of bovine β -lactoglobulin studied using heteronuclear NMR spectroscopy. *Journal of molecular biology*. 356(2): 483-496.
- Santé Canada. 2004. Coordination de la recherche en produits de santé naturels au Canada CCAB -3-0285 Rapport final.
- Santini, A., Cammarata, S. M., Capone, G., Ianaro, A., Tenore, G. C., Pani, L., Novellino, E. 2018. Nutraceuticals: opening the debate for a regulatory framework" *British Journal of Clinical Pharmacology*. 84(4): 659-672.
- Santos-Buelga, C. Scalbert, A. 2000. Proanthocyanidins and tannin-like compounds: nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80(7): 1094-1117.
- Sawyer, L., Kontopidis, G. 2000. The core lipocalin, bovine β -Lactoglobulin. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1482: 136-148.
- Sawyer, L., Brownlow, S., Polikarpov, I., Wu, S.-Y. 1998. [β]-Lactoglobulin: structural studies, biological clues. *International Dairy Journal*. 8: 65-72.
- Scalbert, A., Morand, C. 2002. Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 56: 276-282.
- Scalbert, A., Johnson, I. T., Saltmarsh, M. 2005a. Polyphenols: antioxidants and beyond. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 81(1): 215S-217S.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L. 2005b. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 45: 287-306.

- Shpigelman, A., Israeli, G., Livney, Y.D. 2010. Thermally-induced protein-polyphenol co-assemblies: beta lactoglobulin-based nanocomplexes as protective nanovehicles for EGCG. *Food Hydrocolloids*. 24: 735-743.
- Siebert, K. J., Carrasco, A., Lynn, P.Y.1996. Formation of protein-polyphenol haze in beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44(8): 1997-2005.
- Simopoulos, A. 2006. Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. *Biomedical Pharmacotherapy*. 60(9): 502-507.
- Singh, B. N., Shankar, S. 2011. Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): Mechanisms, perspectives and clinical applications. *Biochemical Pharmacology*. 82(12): 1807-1821.
- Sonoda N. K., Kawachi A, Tomishige, E., Motoya, T. 2015. Green tea catechins -pharmacokinetic properties and health beneficial effects. *Pharmaceutica Analytica Acta*. 6 (333) : 2
- Spencer, J. P. E. 2003. Metabolism of tea flavonoids in the gastrointestinal tract." *The Journal of Nutrition*. 133(10): 3255S-3261S.
- Stading, M., Hermansson, A.M. 1990. Viscoelastic behaviour of [beta]-lactoglobulin gel structures. *Food Hydrocolloids*. 4 :121-135.
- Comité consultatif des statistiques canadiennes sur le cancer : Statistiques canadiennes sur le cancer 2018. Toronto, ON : Société canadienne du cancer; 2018. Sur Internet : cancer.ca/Canadian-Cancer-Statistics-2018-FR (consulté le 15 mars 2019).
- Strauss, G., Gibson, S. M. 2004. Plant phenolics as cross-linkers of gelatin gels and gelatin-based coacervates for use as food ingredients. *Food Hydrocolloids*. 18(1): 81-89.
- Su, Y. L., Leung, L. K., Huang, Y., Chen, Z. Y. 2003. Stability of tea theaflavins and catechins. *Food Chemistry*. 83(2): 189-195.
- Subirade, M., Loupil F., Allain, A-F., Paquin, P. 1998. Effect of dynamic high pressure on the secondary structure of β -lactoglobulin and on its conformational properties as determined by Fourier transform infrared spectroscopy. *International Dairy Journal*. 8: 135-140.
- Sumpio, B. E., Cordova, A. C., Berke-Schlessel, D. W., Qin, F., Chen, Q. H. 2006. Green tea," the Asian paradox",and cardiovascular disease. *Journal of the American College of Surgeons*. 202(5): 813-825.

- Tada, D., Tanabe, T., Tachibana, A., Yamauchi, K. 2005. Drug release from hydrogel containing albumin as crosslinker. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 100: 551-555.
- Tanford, C., Bunville, L. G., Nosaki, Y. 1959. The Reversible transformation of β -Lactoglobulin at pH 7.51. *Journal of the American Chemical Society*. 81: 4032-4036.
- Tomás-Barberán, F. A, Andrés-Lacueva, C. 2012. Polyphenols and health: current state and progress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60(36): 8773-8775.
- Totosaus, A., Montejano, J.G., Salazar, J.A., and Guerrero, I. 2002. A review of physical and chemical protein-gel induction. *International Journal of Food Science & Technology*. 37: 589-601.
- Valcic, S., Muders, A., 1999. Antioxidant chemistry of green tea catechins. Identification of products of the reaction of (-)-Epigallocatechin Gallate with Peroxyl radicals. *Chemical Research in Toxicology*. 12(4): 382-386.
- Valko, M., Rhodes, C. J. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*. 160(1): 1-40.
- Van Sluyter, S. C., McRae, J. M., Falconer, R.J., Smith, P.A., Bacic, A., Waters, E.J., Marangon, M. 2015. Wine protein haze: mechanisms of formation and advances in prevention. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 63(16): 4020-4030.
- Visioli, F., Lastra, C. A. D. L., Andres-Lacueva, C., Aviram, M., Calhau, C., Cassano, A., Llorach, R. 2011. Polyphenols and human health: a prospectus. *Critical reviews in food science and nutrition*. 51(6): 524-546.
- Walker, J. 2002. The Bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation. In *The protein protocols handbook*. (ed. J.M. Walker), pp. 11-14. Humana Press.
- Wang, H., Provan, G.J., and Helliwell, K. 2000. Tea flavonoids: their functions, utilisation and analysis. *Trends in Food Science & Technology* 11: 152-160.
- Wang, Q., Allen, J.C., Swaisgood, H.E. 1998. Protein concentration dependence of Palmitate-binding to [β]-Lactoglobulin. *Journal of Dairy Science*. 81: 76-81.
- Wang, Q., Allen, J.C., Swaisgood, H.E. 1997. Binding of vitamin D and cholesterol to β -lactoglobulin. *Journal of Dairy Science*. 80: 1054-1059.

- Wang, R., Zhou, W. 2006. Kinetic study of the thermal stability of tea catechins in aqueous systems using a microwave reactor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54(16): 5924-5932.
- Wang, R., Zhou, W. 2008. Reaction kinetics of degradation and epimerization of Epigallocatechin gallate (EGCG) in aqueous system over a wide temperature range. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56(8): 2694-2701.
- Wellman, N. S. 2007. Prevention, Prevention, Prevention: Nutrition for Successful Aging. *Journal of the American Dietetic Association*. 107(5): 741-743.
- Williams, R.J., Spencer, J.P.E., Rice-Evans, C. 2004. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules?. *Free Radical Biology & Medicine*. 36 (7): 838-849.
- Wilson, D., Nash, P., Buttar, H., Griffiths, K., Singh, R., De Meester, F., Horiuchi, R., Takahashi, T. 2017. The role of food antioxidants, benefits of functional foods, and influence of feeding habits on the health of the older person: an overview. *Antioxidants*. 6(4):81-101.
- Wu, S.-Y., Pérez, M.D., Puyol, P., Sawyer, L. 1999. β -lactoglobulin binds palmitate within its central cavity. *Journal of Biological Chemistry*. 274: 170-174.
- Wu, W., Clifford, M., Howell, N.K. 2007. The effect of instant green tea on the foaming and rheological properties of egg albumen proteins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 87(10): 1810-1819.
- Xie, Y., Kosińska, A., Xu, H., & Andlauer, W. 2013. Milk enhances intestinal absorption of green tea catechins in in vitro digestion/Caco-2 cells model. *Food research international*. 53(2): 793-800.
- Xu, J. Z., Yeung, S. Y. V., Chang, Q., Huang, Y., & Chen, Z. Y. 2004. Comparison of antioxidant activity and bioavailability of tea epicatechins with their epimers. *British Journal of Nutrition*. 91(6): 873-881.
- Yang, B., Arai, K., Kusu, F. 2000. Determination of catechins in human urine subsequent to tea ingestion by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Analytical Biochemistry*. 283(1): 77-82.
- Yang, M. C., Guan, H. H., Liu, M. Y., Lin, Y. H., Yang, J. M., Chen, W. L., Chen, C. J., Mao, S. J. 2007. Crystal structure of a secondary vitamin D3 binding site of milk β -lactoglobulin. *Proteins*. 1197-1210.
- Yilmaz, Y. 2006. Novel uses of catechins in foods. *Trends in Food Science & Technology*. 17: 64–71.

Yoshino, K., Suzuki, M., Sasaki, K., Miyase, T., Sano, M. 1999. Formation of antioxidants from (-)-epigallocatechin gallate in mild alkaline fluids, such as authentic intestinal juice and mouse plasma. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 10(4): 223-229.

Zeisel, S. H. 1999. Regulation of nutraceuticals. *Science*. 285 (5435): 1853-1855.

Zhu, Q.Y., Zhang, A., Tsang, D., Huang, Y. Chen, Z-Y. 1997. Stability of Green Tea Catechins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45: 4624-4628.

Zorrilla, R., Liang, L, Remondetto, G., Subirade, M. 2011. Interaction of epigallocatechin-3-gallate with β -lactoglobulin: molecular characterization and biological implication. *Dairy Science & Technology*. 91(5): 629-644.