



POTENTIEL NUTRACEUTIQUE DES CONSTITUANTS DU BABEURRE

Thèse

Valérie Conway

Doctorat en Sciences et technologie des aliments
Philosophiae Doctor (Ph. D.)

Québec, Canada

© Valérie Conway, 2013

-Résumé-

Les composés mineurs de la membrane du globule de gras laitier (*milk fat globule membrane*, MFGM) ont été associés à diverses activités biologiques. Le babeurre, en raison de son processus d'obtention, est un produit d'origine laitière particulièrement riche en composés de la MFGM. Cette caractéristique explique l'intérêt grandissant porté à ce sous-produit de la fabrication du beurre, quadruplant le nombre d'articles scientifiques lui étant consacré au cours des 20 dernières années (PubMed). La grande majorité des travaux réalisés jusqu'à aujourd'hui au sujet du babeurre visait à fractionner ou encore à concentrer ses différents constituants, principalement ses phospholipides. Par contre, l'impact biologique de l'ensemble des composantes du babeurre, avant et après digestion, reste encore mal connu. Le but de cette recherche était donc d'évaluer l'impact de l'ensemble des constituants du babeurre sur différents facteurs de risque associés aux maladies cardiovasculaires (CVD).

Dans un premier temps, les résultats de cette recherche ont permis de démontrer le potentiel du babeurre frais concentré par microfiltration (MF) à diminuer la solubilité micellaire du cholestérol dans un modèle d'étude *in vitro*. Ces résultats probants laissaient présager la capacité de certains constituants du babeurre à moduler l'absorption intestinale du cholestérol. Par contre, le fractionnement de ces derniers s'est avéré avoir un impact négatif sur le potentiel d'insolubilisation du cholestérol observé précédemment.

Ensuite, les constituants mineurs du babeurre, fort probablement en raison de ses phospholipides, ont démontré leur capacité à influencer positivement le profil lipidique chez des sujets modérément hypercholestérolémiques lors d'une étude clinique réalisée en chassé-croisé. De plus, lors de cette même étude clinique, la consommation de babeurre, possiblement en résultante de l'action de composantes peptidiques, s'est avérée capable d'abaisser la tension artérielle chez des patients normotendus lorsque comparée à un placebo.

Enfin, des peptides issus de l'hydrolyse de babeurre frais (UF) ont démontré un potentiel antioxydant supérieur à ceux obtenus du lactosérum (UF) et du lait écrémé dans un modèle d'étude *in vitro*. Dans le cadre de l'ensemble des études de ce projet, les différentes activités biologiques se sont avérées peu influencées par l'action des traitements thermiques lorsque les produits subissaient une hydrolyse (p. ex. à la suite de leur consommation).

Les résultats de cette étude permettent de mieux comprendre les propriétés bénéfiques du babeurre et ouvrent la voie à une nouvelle utilisation de ce dernier comme ingrédient actif. En effet, ce projet novateur a permis de démontrer le potentiel du babeurre en tant qu'aliment fonctionnel plutôt que comme une source de

composés nutraceutiques devant être purifiés ou concentrés. Ainsi, il semble que l'ensemble des constituants du babeurre joue un rôle au niveau des bienfaits observés sur les facteurs de risque de CVD.

-Abstract-

The minor components in milk fat globule membrane (MFGM) are associated with various biological activities. Buttermilk, owing to its obtainment process, is a milk product particularly rich in MFGM components. This feature accounts for the growing interest in this by-product of the manufacturing of butter. The number of scientific articles dedicated to it has quadrupled in the past 20 years (PubMed).

Until today the vast majority of tasks involving buttermilk aimed at either dividing or concentrating its various components, primarily, phospholipids. However, the biological effects of all the components in buttermilk before and after their digestion remains poorly understood. Therefore, the purpose of this research was to evaluate the impact that buttermilk components have on the different risk factors associated with cardiovascular disease (CVD).

Initially, the results of *in vitro* model study revealed that buttermilk freshly concentrated by microfiltration (MF) has the potential to reduce the micellar solubility of cholesterol. These conclusive results presaged the capacity of certain components in buttermilk to regulate the intestinal absorption of cholesterol. Despite, their division proved to have a negative impact on the potential insolubilization of the cholesterol previously observed.

Then, in a clinical crossover analysis, minor components of buttermilk - most likely phospholipids - demonstrated a capacity to positively influence the lipid profiles of moderately hypercholesterolemic subjects. Moreover, during this same study, the consumption of buttermilk compared with a placebo proved capable of lowering blood pressure in some patients, possibly resulting from its peptide components.

That is to say that, *in an in vitro* model study, peptides derived from the hydrolysis of fresh buttermilk (UF) demonstrated antioxidant potential superior to those obtained from whey (UF) and skim milk. Within the framework of all studies on this project, various biological activities proved almost uninfluenced by the action of heat treatment when products were hydrolyzed following their consumption.

The results of this study allow for a better understanding of the beneficial properties of buttermilk and pave the way for new uses of it as an active ingredient. Indeed, this innovative project has allowed us to demonstrate the potential of buttermilk as a functional food rather than as a source of ingredients needing to undergo a purification or concentration process. In this way, it seems that all components in buttermilk play a role in the observed benefits on risk factors of CVD.

-Avant-Propos-

Cette thèse visait à mieux comprendre la bioactivité des constituants du babeurre et constitue la suite de travaux sur le potentiel hypocholestérolémiant entrepris dans le cadre de ma maîtrise. Ce document rassemble l'ensemble des résultats obtenus au cours de ce projet de recherche s'échelonnant sur quatre années, lesquels sont présentés sous forme de quatre publications scientifiques (deux publiées, une acceptée et une soumise). Le but général du projet de recherche faisant l'objet de cette thèse était d'évaluer l'activité biologique de l'ensemble des constituants du babeurre, et ce, grâce à des modèles *in vitro* et clinique. Plus spécifiquement, ce projet visait à déterminer le pouvoir hypocholestérolémiant, antihypertensif et antioxydant des constituants du babeurre.

L'introduction de cette thèse a pour but de présenter les prémices sous-jacentes à ce projet de recherche. Le premier chapitre constitue une revue de littérature exposant les divers aspects théoriques nécessaires à la compréhension de la problématique de recherche ainsi que des travaux réalisés dans le cadre de ce projet de recherche. Le deuxième chapitre du présent document souligne la problématique, l'hypothèse, le but, les objectifs et hypothèses spécifiques de ce projet de recherche. Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse sont présentés aux troisième, quatrième et cinquième chapitres, sous la forme d'articles scientifiques rédigés en anglais.

Ainsi, le Chapitre 3 traite de l'évaluation du potentiel hypocholestérolémiant de différentes fractions de babeurre frais obtenues par MF, et ce, grâce à un modèle d'étude *in vitro*. Ce modèle d'étude est basé sur l'évaluation de la capacité des fractions de babeurre à diminuer la solubilisation du cholestérol sous forme micellaire. L'impact de la digestion et des traitements thermiques sur les capacités hypocholestérolémiantes *in vitro* des fractions de babeurre frais font aussi l'objet de ce chapitre. La rédaction de ce chapitre, sous forme d'article, a été supervisée par Dr Yves Pouliot et Dre Sylvie Gauthier qui sont aussi coauteurs. Les analyses de la solubilité micellaire du cholestérol ont été réalisées à la suite des précieux travaux de mise au point de Mme Johanne Marin. Les résultats présentés dans ce chapitre ont été publiés dans le journal *Dairy Science and Technology* 90 (2010) 449–460. Les résultats ont aussi fait l'objet de trois conférences orales dont l'une donnée dans le cadre du congrès international de la Fédération internationale du lait (FIL), à Rennes en France en 2009. Ils ont aussi été présentés sous forme d'affiche dans différents congrès.

Le Chapitre 4 porte ensuite sur l'évaluation clinique du potentiel hypocholestérolémiant du babeurre et l'étude de son mode d'action grâce à l'utilisation de différents marqueurs biologiques de l'homéostasie du cholestérol. La rédaction de ce chapitre, sous forme d'article, a été supervisée par Dr Benoît Lamarche, Dr Patrick Couture, Dr Yves Pouliot et Dre Sylvie Gauthier qui sont aussi coauteurs. La formulation des produits utilisés dans le cadre de cette étude clinique a été réalisée en collaboration avec Pharmalab inc. Les résultats

présentés dans le chapitre 4 ont fait l'objet d'un article original accepté pour publication dans *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.numecd.2013.03.003>. Les résultats ont fait l'objet de deux publications par affiche, dont l'une lors du troisième congrès international de la ICAO (*International Congress on Abdominal Obesity*) tenu à Québec en juin 2012.

Le Chapitre 5, présenté sous forme d'article, porte sur l'étude clinique de la capacité antihypertensive du babeurre. Le mécanisme d'action de ce dernier a été évalué grâce aux niveaux plasmatiques de différents marqueurs biologiques du système rénine-angiotensine-aldostérone. La rédaction de ce chapitre a été supervisée par Dr Benoît Lamarche, Dr Patrick Couture, Dr Yves Pouliot et Dre Sylvie Gauthier qui sont aussi coauteurs. La formulation des produits utilisés dans le cadre de cette étude clinique a été réalisée en collaboration avec Pharmalab inc. Les résultats présentés dans ce chapitre font l'objet d'une courte communication soumise au journal *Nutrition*.

Le Chapitre 6 porte sur la capacité antioxydante *in vitro* de concentrés de babeurre frais obtenus par UF. L'identification de différentes séquences peptidiques obtenues par la digestion du babeurre et le potentiel de ces dernières à inhiber, *in vitro*, l'action des radicaux libres sont traités. Dans cette étude, les performances antioxydantes du babeurre sont comparées à celles du lactosérum et du lait écrémé et l'impact des traitements technologiques sur leur pouvoir anti-radicalaire est discuté. La rédaction de ce chapitre, sous forme d'article, a été supervisée par Dr Yves Pouliot et Dre Sylvie Gauthier qui sont aussi coauteurs. Les analyses ORAC ont été réalisées grâce à l'aide de M. Pascal Dubé. Les résultats présentés au Chapitre 6 ont été publiés dans le *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61 (2013) 364–372. Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une conférence orale lors du Colloque STELA : *repousser les frontières de la science laitière* en 2009. Ils ont aussi été à l'origine de plusieurs présentations par affiche, dont l'une a gagné la deuxième place lors de la Conférence de la CIFST/AAFC tenue à Winnipeg en 2010.

Le Chapitre 7 tient le rôle de chapitre récapitulatif et présente une conclusion générale pour l'ensemble des travaux discutés dans cet ouvrage. Les références bibliographiques sont présentées à la toute fin de ce document.

*Je dédie cette thèse à ma famille et à mes
amis, sans quoi cette belle aventure n'aurait
pas été possible, ainsi qu'à Thomas.....ma
plus belle réussite*

-Remerciements-

L'ensemble de ces travaux a bien évidemment été la résultante de l'action concertée de plusieurs individus qui ont participé, chacun à leur façon, au bon déroulement de ce projet de recherche. Je tiens donc à remercier sincèrement :

Le Dr Yves Pouliot pour sa direction tout au long de ce projet. Je tiens à souligner sa flexibilité et son soutien, autant académique que personnel, durant ces quatre années de direction. Je tiens à le remercier de la grande confiance dont il a su faire preuve en me laissant mener mes recherches d'une façon autonome. Finalement, je le remercie de tout mon cœur d'avoir accepté certaines difficultés et limitations liées à mon choix de devenir maman en cours de doctorat.

La Dre Sylvie Gauthier, pour sa rigueur scientifique, son honnêteté et ses justes conseils, mais aussi pour son enthousiasme et ses encouragements. Je la remercie d'avoir rigoureusement corrigé chacun de mes travaux et de m'avoir ainsi transmis une qualité d'une grande importance; le souci du détail.

Le Dr Benoît Lamarche et toute l'équipe derrière le projet d'étude clinique. Je le remercie chaleureusement de m'avoir accepté dans son équipe, de m'avoir habilement encadré et de m'avoir accordé tout le temps qui m'était nécessaire en tant qu'étudiante néophyte dans le domaine de la nutrition clinique et de la lipidologie. Je le remercie non seulement pour sa solide expertise, mais aussi pour son humanité. Cette expérience très formatrice a permis de compléter ma formation en m'ouvrant à de nouveaux horizons. Un merci tout particulier à Johanne Marin, Amélie Charest et Caroline Richard pour leur aide précieuse.

Le Dr Jean-Christophe Vuilleumard pour avoir généreusement accepté d'effectuer la prélecture de cette thèse.

L'équipe de recherche de Pharmalab inc. pour leur étroite collaboration dans la formulation et la production des produits donnés aux participants de l'étude clinique. Un merci tout particulier à Francis Chénard et à Nancy Tremblay pour m'avoir épaulé.

L'équipe du Dr Yvan Chouinard pour l'aide à la caractérisation du profil en acide gras des produits donnés aux participants de l'étude clinique. Merci à Philippe Rioux pour son expertise, sa patience et son appui dans la mise au point d'une méthode pour le dosage des phospholipides. Merci aussi pour son amitié.

M. Pascal Dubé pour son expertise dans l'analyse du potentiel antioxydant ainsi que pour ces savants conseils couplés à sa grande disponibilité.

L'équipe du laboratoire pilote, plus particulièrement M. Pascal Cliche et Mme Mélanie Martineau, pour leur aide dans toutes les étapes de préparation et de fractionnement nécessaires à la préparation des différents concentrés et fractions de babeurre.

L'équipe du laboratoire analytique, particulièrement Mme Diane Gagnon et M. Alain Gaudreau, pour leur assistance et leur soutien technique dans la réalisation de différentes manipulations au cours de ce projet de recherche.

Tous mes collègues du centre STELA et de l'INAF qui sont devenus, pour certains, de bons amis et qui ont permis d'ajouter une belle touche de couleur à cette grande étape de vie.

Tous mes proches pour m'avoir encouragés, supportés, motivés et écoutés au cours de ces années parfois difficiles et d'avoir gardé une confiance inébranlable en moi. Sans leur présence, cette expérience n'aurait pas été possible. Je dois à chacun une certaine partie de l'aboutissement de ce projet. Merci papa, maman, Martin, Thomas, Gabriel et Audrey. Merci à Jean-François pour son amour inconditionnel.

Le Programme de recherche en partenariat pour l'innovation en production et transformation laitières - action concertée du Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies (FQRNT), du Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ) et de Novalait inc.

-Table des matières-

-Résumé-.....	iii
-Abstract-.....	v
-Avant-Propos-.....	vii
-Remerciements-.....	xi
-Table des matières-.....	xiii
-Liste des tableaux-.....	xvii
-Liste des tableaux en anglais (Tables)-.....	xix
-Liste des figures-.....	xxi
-Abréviations-.....	xxv
-Introduction-.....	1
CHAPITRE 1.....	3
-Revue de littérature-.....	3
1.1 Le babeurre.....	3
1.1.1 Composition.....	3
1.1.2 Origine et composition de la MFGM.....	8
1.1.3 Influence des traitements technologiques sur les composantes du babeurre.....	18
1.1.4 Digestion des composantes du babeurre.....	21
1.1.5 Le potentiel nutraceutique des constituants du babeurre.....	32
1.2 Métabolisme des lipoprotéines.....	36
1.2.1 Les lipoprotéines du plasma.....	36
1.2.2 Les voies de régulation du cholestérol.....	40
1.2.3 Marqueurs d'absorption, de synthèse et de clairance du cholestérol.....	48
1.3 Lipides et maladies cardiovasculaires.....	51
1.3.1 Marqueurs de risques.....	51
1.3.2 Facteurs alimentaires pouvant influencer la cholestérolémie.....	52
1.4 L'hypertension artérielle.....	53
1.4.1 Voie de régulation de l'hypertension artérielle.....	53
1.4.2 Les peptides des protéines majeures du lait et l'hypertension.....	55
1.5 Oxydation, stress oxydatif et antioxydants.....	57
1.5.1 Méthode de mesure de la capacité antioxydante <i>in vitro</i>	59
1.5.2 Mécanismes d'action des antioxydants alimentaires.....	63
1.5.3 Les peptides antioxydants des protéines majeures du lait.....	64
CHAPITRE 2.....	67
-Problématique, hypothèse et objectifs-.....	67
2.1 Problématique.....	67
2.2 L'hypothèse générale.....	67

2.2.1	Hypothèses spécifiques	67
2.3	Objectifs spécifiques	68
	Premier objectif	68
	Deuxième objectif	68
	Troisième objectif.....	68
	-Transition contextuelle-.....	69
	CHAPITRE 3	71
	-Effect of cream pasteurization, microfiltration and enzymatic proteolysis on <i>in vitro</i> cholesterol-lowering activity of buttermilk solids-.....	71
	-Résumé-	73
	-Abstract-	75
3.1	Introduction	77
3.2	Materials and methods	78
3.2.1	Processing conditions	78
3.2.2	Chemical analysis	78
3.2.3	Measurement of the <i>in vitro</i> micellar solubility of cholesterol	79
3.2.4	<i>In vitro</i> enzymatic hydrolysis of buttermilk.....	79
3.2.5	Statistical analysis.....	80
3.3	Results	81
3.3.1	Effect of cream pasteurization and MF fractionation on buttermilk composition	81
3.3.2	Effect of cream pasteurization and MF fractionation on the <i>in vitro</i> cholesterol micellar solubility.....	86
3.3.3	Effect of proteolysis on the cholesterol micellar solubility in the presence of buttermilk solids obtained from raw and pasteurized cream	88
3.4	Discussion.....	90
3.5	Conclusion	92
3.6	Acknowledgements	93
	-Transition contextuelle-.....	95
	CHAPITRE 4	97
	-Impact of buttermilk consumption on plasma lipids and surrogate markers of cholesterol homeostasis in men and women-	97
	-Résumé-	99
	-Abstract-	101
4.1	Introduction	103
4.2	Methods	104
4.2.1	Population sample.....	104
4.2.2	Study design	104
4.2.3	Buttermilk and placebo formulations	104
4.2.4	Compliance	105
4.2.5	Risk factor assessment.....	105

4.2.6	Anthropometric measures.....	106
4.2.7	Statistical analysis	106
4.3	Results.....	108
4.3.1	Participants.....	108
4.3.2	Plasma lipids and lipoproteins	108
4.3.3	Cholesterol homeostasis markers	111
4.4	Discussion.....	117
4.5	Conclusion	120
4.6	Acknowledgements.....	121
	-Transition contextuelle-.....	123
	CHAPITRE 5.....	125
	-Impact of buttermilk consumption on blood pressure in moderately hypercholesterolemic men and women-.....	125
	-Résumé-.....	127
	-Abstract-.....	129
5.1	Introduction	131
5.2	Methods	132
5.2.1	Subjects.....	132
5.2.2	Study design.....	132
5.2.3	Study products and diet instructions.....	132
5.2.4	Biochemical assessments	133
5.2.5	Anthropometric and blood pressure assessments	133
5.2.6	Statistical analysis	133
5.3	Results.....	134
5.3.1	Subjects.....	134
5.4	Discussion.....	136
5.5	Conclusion	138
5.6	Acknowledgements.....	139
	-Transition contextuelle-.....	141
	CHAPITRE 6.....	143
	-Antioxidant activities of buttermilk proteins, whey proteins and their enzymatic hydrolyzates-.....	143
	-Résumé-.....	145
	-Abstract-.....	147
6.1	Introduction	149
6.2	Materials and methods.....	150
6.2.1	Dairy products and reagents	150
6.2.2	Preparation of buttermilk and cheese whey concentrates.....	150
6.2.3	Denaturing of the dairy proteins	150

6.2.4	<i>In vitro</i> enzymatic hydrolysis	151
6.2.5	Fractionation of the buttermilk hydrolyzate by isoelectric focusing	151
6.2.6	Chemical analyses	151
6.2.7	Free radical scavenging activity (ORAC _{FL})	152
6.2.8	Metal ion chelating capacity	152
6.2.9	LC-MS analysis	152
6.2.10	Statistical analysis	153
6.3	Results and discussion	154
6.3.1	Protein concentrate composition and hydrolyzate characterization	154
6.3.2	Effect of enzymatic hydrolysis on free radical scavenging ability	156
6.3.3	Metal chelating capacity (MCC) of enzymatic hydrolysates	160
6.3.4	Fractionation and identification of potential antioxidant peptides	162
6.4	Conclusion	171
6.5	Acknowledgements	172
CHAPITRE 7	173
-Conclusion Générale-	173
7.1	Résultats et avancement des connaissances	174
7.2	Importance des résultats	176
7.3	Perspectives futures	177
-Bibliographie-	179

-Liste des tableaux-

Tableau 1 : Composition de divers produits laitiers exprimée sur base sèche (100 g).....	4
Tableau 2 : La composition protéique moyenne du lait bovin.....	8
Tableau 3 : Composition lipidique moyenne de la MFGM d'origine bovine.	11
Tableau 4 : Les caractéristiques et fonctions des principales protéines constituant la MFGM.....	17
Tableau 5 : Propriétés des quatre grandes classes de lipoprotéines du plasma humain.....	37
Tableau 6 : Propriétés et fonctions des apolipoprotéines (Apo) majeures du plasma humain.	38
Tableau 7 : Peptides hypotenseurs du lait bovin chez des modèles de rats SHR.....	56
Tableau 8 : Comparaison des différentes méthodes de mesure de la TAC.	61
Tableau 9 : Peptides antioxydants (<i>in vitro</i>) provenant du lait des bovins.	65

-Liste des tableaux en anglais (Tables)-

Table 1 : Statistical significance of heat treatment (of the cream) and of microfiltration on the ash, protein and lipid contents of buttermilk	83
Table 2 : Relative proportions (%) ^a of phospholipids ^b measured in buttermilk solids obtained from raw or pasteurized cream and in the fractions obtained by microfiltration (MF permeate and MF retentate).....	84
Table 3 : Cholesterol micellar solubility determined <i>in vitro</i> in the presence of buttermilk solids and MF fractions made from raw or pasteurized cream.	87
Table 4 : Effect of enzymatic hydrolysis of buttermilk solids obtained from raw or pasteurized cream on the <i>in vitro</i> cholesterol micellar solubility.	89
Table 5 : Composition of the ready-to-use buttermilk and placebo pouches (22.5 g) ^a	110
Table 6 : Baseline characteristics of the study participants at screening (<i>n</i> = 34) ^a	111
Table 7 : Effect of buttermilk consumption on serum lipid concentration and surrogate markers of cholesterol homeostasis in men and women with mild hypercholesterolemia (<i>n</i> = 34) ^a	115
Table 8 : Univariate correlations between the percentage of changes in surrogate makers of cholesterol homeostasis and the percentage of changes in total serum cholesterol and LDL-C concentrations with buttermilk (<i>n</i> = 34) ^a	116
Table 9 : Effect of buttermilk consumption on blood pressure and on biomarkers of the RAS system in 34 normotensive men and women ^a	135
Table 10 : Sample composition and degree of hydrolysis (DH) during treatment with pepsin (2 h) followed by trypsin (5 h).	155
Table 11 : Free radical scavenging activity ^a before (0 h) and during treatment with pepsin (2 h) followed by trypsin (5 h).	159
Table 12 : Metal-chelating capacity (MCC) of dairy proteins hydrolyzed by pepsin and trypsin tested at different concentrations and compared to a standard (Na ₂ EDTA).	161
Table 13 : Free radical scavenging activity ^a of hydrolyzed buttermilk concentrate (HBC) and its liquid-phase IEF fractions (F1–F3).....	162
Table 14 : Scale used to attribute antioxidant scores to peptides based on the presence and position of certain amino acid residues ^a within the amino acid sequence.	163
Table 15 : Potentially antioxidant peptides derived from buttermilk proteins, as identified by LC-MS.	169

-Liste des figures-

Figure 1 : Représentation schématique des principaux constituants du babeurre (valeurs exprimées en % moyen). Figure adaptée de [23, 24].	5
Figure 2 : Représentation schématique de la micelle de caséine. Figure tirée de [29].	6
Figure 3 : Représentation schématique du mécanisme de sécrétion des globules de gras bovins. Figure tirée de [39].	9
Figure 4 : Photographie par microscopie électronique d'un globule de gras laitier ayant subi une cryofracture. Photo tirée de [40].	10
Figure 5 : Structure des principaux glycérophospholipides retrouvés dans le lait. En fonction de nature de la tête polaire (éthanolamine, choline, sérine ou inositol) on distingue différents glycérophospholipides. Figure inspirée de [41, 42].	13
Figure 6 : Structure générale des sphingolipides. Selon la nature du radical (R), différentes formes de sphingolipides seront formés. [Disponible sur] : http://journals.cambridge.org/fulltext_content/ERM/ERM4_28/S146239940200546Xsup003.pdf (consulté le 19 octobre 2012).	14
Figure 7 : Structure de la MFGM et arrangement hétérogène de ces protéines majeures. ADPH , adipophiline; BTN , butyrophiline; CD36 , <i>Cluster of differentiation 36</i> ; MUC1 et 15 , mucine1 et 15; PAS6/7 , lactadhérine. Figure adaptée de [11].	16
Figure 8 : Changements au niveau de la MFGM suivant la pasteurisation de la crème. Figure tirée de [56].	20
Figure 9 : Représentation schématique du système digestif humain. [Disponible sur] : http://www.intestinfo.com/Site/page.php?ID_PAGE=40&ID_RUB=5 (consulté le 25 janvier 2013).	22
Figure 10 : Représentation schématique simplifiée de la digestion des glucides, des protéines et des lipides chez l'humain. Figure inspirée de [62].	23
Figure 11 : Activation des protéases gastriques et pancréatiques. Figure inspirée de [61].	25
Figure 12 : Classification des protéases selon leur mode d'action. Les endopeptidases hydrolysent les liaisons peptidiques situées à l'intérieur des chaînes d'acides aminés alors que les exopeptidases s'attaquent à celles situées à l'extrémité carboxylique des chaînes peptidiques [65].	26
Figure 13 : Représentation schématique des quatre étapes de la digestion des lipides. 1) Émulsification, 2) fixation de la colipase et de la lipase pancréatique, 3) hydrolyse et 4) formation des micelles mixtes. BA , acide biliaire; DG , diglycérade; FA , acide gras libre; MG , monoglycérade; PL , phospholipide. Figure tirée de [68].	29
Figure 14 : Représentation schématique de : A) la structure d'un triglycérade avec, encerclé, le glycérol formant le squelette de la molécule; B) l'action hydrolytique de la lipase pancréatique sur les triglycérades. Les flèches représentent deux sites de coupure. [Disponible sur] : http://www.nutriology.com/TGmetab.html (consulté le 25 janvier 2013).	30
Figure 15 : Fonctions des divers peptides bioactifs des protéines du lait bovin. Figure inspirée de [80].	33
Figure 16 : Structure générale des lipoprotéines du plasma humain. [Disponible sur] : http://www.prevention.ch/hyperlipedemie.html (consulté le 19 octobre 2012).	38

Figure 17 : Importance clé de l'enzyme acétyl-CoA cholestérol-acyl-transférase (ACAT) dans la régulation de l'absorption intestinale du cholestérol. La présence de cholestérol libre au niveau du réticulum endoplasmique des cellules provoque : 1) une diminution de la synthèse de cholestérol endogène et une diminution de l'activité des R-LDL; 2) une estérification du cholestérol par l'enzyme ACAT soit pour des fins de stockage, ou pour être exporté via l'action des lipoprotéines du sang; 3) une élimination accrue du cholestérol dans la bile. Tirée de [96].42

Figure 18 : Représentation schématique de l'absorption intestinale du cholestérol. **ACAT**, Acétyl-CoA Cholestérol Acyl Transférase; **ABCA1**, *ATP binding cassette A1*; **ABCG5/G8**, *ATP binding cassette G5/G8*; ApoB-48, Apolipoprotéine B-48; **HDL**, lipoprotéine de haute densité **MTP**, protéine microsomale de transfert des triglycérides; **NPC1L1**, Récepteur *Nieman-Pick C1-Like 1*; **RBC**, globule rouge; **TG**, triglycéride. Figure adaptée de [98].43

Figure 19 : Représentation simplifiée du métabolisme des lipoprotéines par la voie exogène et endogène. **ABCG5/G8**, *ATP binding cassette G5/G8*; **CM**, chylomicron; **IDL**, lipoprotéine de densité intermédiaire; **LCAT**, lécithine-cholestérol-transférase; **LDL**, lipoprotéine de faible densité; **LH**, lipase hépatique; **LPL**, lipoprotéines lipase; **NPC1L1**, récepteur *Nieman-Pick C1-Like 1*; **rCM**, résidu de chylomicron; **R-LDL**, récepteur LDL; **SR-B1**, récepteur HDL; **VLDL**, lipoprotéine de très faible densité. Figure inspirée de [93, 94].45

Figure 20 : Schéma simplifié de la voie du transport inverse du cholestérol. **Apo**, apolipoprotéine; **BA**, acide biliaire; **CE**, esters de cholestérol; **CETP**, protéine de transfert des esters de cholestérol; **FC**, cholestérol libre; **HDL**, lipoprotéine de haute densité; **LDL**, lipoprotéine de faible densité; **R-LDL**, récepteur LDL; **SR-B1**, récepteur HDL; **VLDL**, lipoprotéine de très faible densité. Figure tirée de [99] et adapté selon [93, 94].47

Figure 21 : Structure chimique de divers stérols retrouvés chez l'humain : le cholestérol, le lathostérol et le β -sitostérol.49

Figure 22 : Mécanisme endogène et exogène d'action de la proprotéine convertase PCSK9 sur les récepteurs de LDL des cellules hépatiques (R-LDL). Figure tirée de [107].50

Figure 23 : Schématisation du système rénine-angiotensine-aldostérone (RAS) et bradykinine illustrant les cibles pour les peptides antihypertensifs. Figure inspirée de [126].54

Figure 24 : Illustration de différentes espèces oxygénées réactives (ROS) communes. [Disponible sur] : <http://www.biotech.com/resources/articles/reactive-oxygen-species.html> (consulté le 19 octobre 2012).58

Figure 25 : Équations des réactions antioxydantes. A–H, antioxydant, FL–H, substrat oxydable et sonde; $M(n)$, oxydant métallique. [Disponible sur] : <http://bhavanajagat.com/tag/oxidation-reduction-or-redox-reactions> (consulté le 11 novembre 2012).60

Figure 26 : Courbe de la cinétique obtenue par la méthode ORAC. La zone hachurée correspond à l'aire sous la courbe de la réaction avec et sans antioxydant. Figure tirée de [153].62

Figure 27 : Effect of cream pasteurization on the ash (a), protein (b) and lipid (c) contents (% dry matter) of buttermilk and its MF fractions (mean \pm SEM, $n = 4$).82

Figure 28 : SDS-PAGE (under reducing conditions) profiles of proteins in buttermilk made from raw or pasteurized cream. STD = molecular weight (MW) standard; 1 = buttermilk from raw cream; 2 = buttermilk from pasteurized cream; 3 = MF permeate (raw); 4 = MF permeate (pasteurized); 5 = MF retentate (raw); 6 = MF retentate (pasteurized). Protein bands are : MUC1 = mutin 1; XO = xanthine oxidase; CD36 = cluster of

differentiation; BTN = butyrophilin; PAS 6/7 = periodic acid Schiff 6/7; α -CN = α -casein; β -CN = β -casein; κ -CN = κ -casein; β -LG = β -lactoglobulin; α -LA = α -lactalbumin. 86

Figure 29 : Flow of patients through the clinical study. Of the 2 patients who chose to stop the study for medical issues, health problems were not linked to the treatments. 109

Figure 30 : Individual changes in LDL-C concentrations with Buttermilk expressed as % change from the placebo phase in subjects with LDL-C < or > 3.7 mmol/L, the median LDL-C at screening. There are 17 subjects in each group. 112

Figure 31 : (A) Total-C, (B) LDL- C, (C) Phytosterol and (D) β -sitosterol response to buttermilk treatment compared with placebo (Δ) according to baseline LDL-C values. The *P* values for interaction were obtained from the MIXED model using each variable as a continuous variable. The median baseline value of LDL-C (3.72 mmol/L) was used to categorize individuals with high or low levels and to present interactions graphically. * Values are significantly different from those of the placebo treatment within each LDL group (*P* < 0.05). Baseline LDL-C : \blacktriangle : <3.7 mmol/L, \bullet : >3.7 mmol/L. Values are means \pm SEM. 113

Figure 32 : SDS-PAGE analysis of dairy protein concentrates before (0 h) and during hydrolysis with pepsin (2 h) followed by trypsin (5 h). MFGM, milk fat globule membrane; BC, buttermilk concentrate; DBC, denatured buttermilk concentrate; WC, whey concentrate; DWC, denatured whey concentrate; SM, skim milk. 157

Figure 33 : RP-HPLC elution profiles (absorbance measured at 214 nm) of hydrolyzed (2 h pepsin followed by 3 h trypsin treatment) skim milk proteins (a), hydrolyzed buttermilk protein concentrate (b), and of peptide fractions obtained by liquid-phase isoelectric focusing of hydrolyzed buttermilk protein concentrate (c = F1; d = F2; e = F3)..... 164

Figure 34 : RP-HPLC elution profiles (absorbance measured at 280 nm) of hydrolyzed (2 h pepsin followed by 3 h trypsin treatment) skim milk proteins (a), hydrolyzed buttermilk protein concentrate (b), and of peptide fractions obtained by liquid-phase isoelectric focusing of hydrolyzed buttermilk protein concentrate (c = F1; d = F2; e = F3)..... 165

-Abréviations-

α-LA	α -Lactalbumine
β-LG	β -Lactoglobuline
ABCA1	<i>ATP binding cassette A1</i>
ABCG5/G8	<i>ATP binding cassette G5/G8</i>
ACAT	Acétyl-CoA cholestérol acyl transférase
ACE	<i>Angiotensin Converting Enzyme</i> , enzyme de conversion de l'angiotensine
ADPH	Adipophiline
AFPSN	Aliment fonctionnel et produit de santé naturel
Apo	Apolipoprotéine
BA	<i>Bile acid</i> , acide biliaire
BHA	Hydroxyanisole butylé
BMI	<i>Body Mass Index</i> , indice de masse corporelle
BTN	Butyrophiline
CD36	<i>Cluster of Differentiation 36</i>
CE	Cholestérol Estérifié
CETP	<i>Cholesterylester Transfer Protein</i> , protéine de transfert des esters de cholestérol
CHD	<i>Coronary Heart Diseases</i> , cardiopathies coronariennes
CM	Chylomicron
CN	Caséine
CRP	<i>C-Reactive Protein</i> , protéine C-réactive

CVD	<i>Cardiovascular Disease</i> , maladies cardiovasculaires
DBP	<i>Diastolic Blood Pressure</i> , pression artérielle diastolique
ELSD	<i>Electroevaporative Light Scattering Detector</i>
FA	<i>Fatty Acid</i> , acides gras
FABP	<i>Fatty Acid-Binding Protein</i>
FFQ	Food-Frequency Questionnaire, questionnaire de fréquence alimentaire
FRAP	<i>Ferric Reducing/Antioxidant Power</i>
FSH	<i>Follicular-Stimulating Hormone</i>
HMG-CoA	Hydroxyméthylglutaryl-Coenzyme A
IEF	<i>Liquid-phase Isoelectric Focusing</i> , focalisation isoélectrique en phase liquide
GC	<i>Gaz Chromatography</i> , chromatographie gazeuse
GluCer	Glucosylcéramide
GSH	Glutathion réduit
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i> , lipoprotéine de haute densité
HPLC	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i> , chromatographie liquide haute performance
IDL	<i>Intermediaire Density Lipoprotein</i> , lipoprotéine de densité intermédiaire
LaCer	Lactosylcéramide
LCAT	Lécithine-Cholestérol-Acyl-Transférase
LC-MS	<i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i> , chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i> , lipoprotéine de faible densité

LDL-R	<i>Low Density Lipoprotein Receptor</i>
LH	Lipase Hépatique
LPL	Lipoprotéine Lipase
LRP-R	<i>LDL Related Protein Receptor</i>
MAP	<i>Mean Arterial Blood Pressure</i> , pression artérielle moyenne
MCC	<i>Metal Chelating Capacity</i> , capacité de chélation d'ions métalliques
MF	Microfiltration
MFGM	<i>Milk Fat Globule Membrane</i> , membrane du globule de gras laitier
MTP	Protéine microsomale de transfert des triglycérides
MW	<i>Molecular Weight</i> , poids moléculaire
MWCO	<i>Molecular Weight Cut-Of</i>
NPC1L1	<i>Niemann-Pick C1-Like 1</i>
ORAC	<i>Oxygen Radical Absorption Capacity</i>
PC	Phosphatidylcholine
PCSK9	<i>Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin type 9</i>
PE	Phosphatidyléthanolamine
PI	Phosphatidylinositol
PL	Phospholipide
PS	Phosphatidylsérine
PSN	Produit de santé naturel
rCM	Résidus de Chylomicron

RAS	<i>Renin-Angiotensin System</i> , système rénine angiotensine
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> , espèce oxygénée réactive
SBP	<i>Systolic Blood Pressure</i> , pression artérielle systolique
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SHR	<i>Spontaneously Hypertensive Rats</i> , rat spontanément hypertensif
SL	Sphingolipide
SM	Sphingomyéline
SR-B1	<i>Scavenger Receptor class B1</i>
TAC	<i>Total Antioxidant Capacity</i> , capacité antioxydante totale
TE	<i>Trolox Equivalents</i> , équivalents Trolox
TEAC	<i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i>
TG	Triglycéride
TRAP	<i>Total Radical Absorption Potentials</i>
UF	Ultrafiltration
VLDL	<i>High Density Lipoprotein</i> , lipoprotéine de haute densité

ACIDE AMINÉ :

A	Ala	Alanine
C	Cys	Cystéine
D	Asp	Acide aspartique
E	Glu	Acide glutamique
F	Phe	Phénylalanine
G	Gly	Glycine
H	His	Histidine
I	Ile	Isoleucine
K	Lys	Lysine
L	Leu	Leucine
M	Met	Méthionine
N	Asn	Asparagine
P	Pro	Proline
Q	Gln	Glutamine
R	Arg	Arginine
S	Ser	Sérine
T	Thr	Thréonine
V	Val	Valine
W	Trp	Tryptophane
Y	Tyr	Tyrosine

-Introduction-

Les nutraceutiques peuvent être regroupés sous le terme plus général de produits de santé naturels (PSN). Selon la définition de Santé Canada, un PSN « est un produit provenant de sources naturelles, souvent vendu sous forme posologique, et conçu pour préserver ou promouvoir la santé, restaurer ou corriger la fonction de santé humaine, ou diagnostiquer, traiter ou prévenir la maladie ». Quant aux aliments fonctionnels, ils sont définis comme « des aliments semblables en apparence aux aliments conventionnels, faisant partie de l'alimentation normale et procurant des bienfaits physiologiques démontrés et (ou) réduisant le risque de maladie chronique au-delà des fonctions nutritionnelles de base » [1].

Selon les résultats de l'Enquête sur les aliments fonctionnels et les produits de santé naturels (AFPSN) publiés en 2009 par Statistique Canada [2], tous les secteurs du domaine des AFPSN ont subi une augmentation significative entre 2004 et 2007. Par exemple, le nombre d'entreprises actives dans le domaine de AFPSN au Canada est passé de 389 à 689 en 2007, soit un accroissement de 77 % de leur nombre, lorsque comparé à l'année 2004. Toujours selon les résultats de cette enquête, quatre principaux objectifs de santé avaient une importance majeure pour les opérations des entreprises canadiennes œuvrant dans le domaine des AFPSN: la santé cardiovasculaire, le contrôle du poids, l'énergie et le bien-être en général. Il n'est pas étonnant que la santé cardiovasculaire soit une cible importante du domaine de AFPSN puisque, selon les dernières statistiques canadiennes, les maladies cardiovasculaires (CVD) se retrouvaient tout juste derrière le cancer comme cause principale de décès au niveau national, causant près de 70 000 décès en 2008 [3]. Selon cette même source, une hausse de 0,2 % des décès par CVD a été enregistrée entre 2007 et 2008, propulsant leur éventualité chez les Canadiens et Canadiennes à 28,0 % et à 29,7 %, respectivement. Fait important à noter, les CVD représentaient la principale cause de décès chez la femme en 2008 faisant près de 35 000 victimes au niveau national. De plus, selon une étude publiée en 2003, ces maladies auraient engendré des coûts annuels de plus de 20,9 milliards de dollars en frais de services médicaux, en coûts hospitaliers, en perte de salaire et en perte de productivité [4].

En 2009, selon les dernières données disponibles concernant la fabrication des produits et sous-produits du lait, le Québec et le Canada ont généré plus de 32 000 et 86 000 tonnes métriques de beurre respectivement [5]. Cette industrie produit, conjointement, une quantité considérable de babeurre, un sous-produit dont la valeur ajoutée reste encore aujourd'hui minime et principalement concentrée sur ses propriétés technologiques. Par contre, depuis quelques années, plusieurs travaux ont permis de reconnaître le babeurre comme un vecteur d'une quantité importante de composés au potentiel nutraceutique. En effet, diverses propriétés bénéfiques ont été associées aux composés constituant la membrane des globules de gras laitier (*Milk Fat Globule Membrane*, MFGM) ainsi qu'à diverses séquences peptidiques générées par l'hydrolyse des

protéines du lait écrémé. Retrouvée en grande quantité dans le babeurre, la MFGM est constituée d'un arrangement complexe et hautement structuré de lipides polaires et de protéines mineures uniques. Celle-ci sert non seulement à entourer et à protéger la matière grasse laitière, mais aussi à transmettre différents composés bioactifs de façon efficace au nouveau-né. Parmi les effets bénéfiques associés aux composés de la MFGM, l'action de ses lipides polaires sur la santé cardiovasculaire a récemment été mentionnée dans plusieurs publications [6-12]. Outre la MFGM, les protéines du lait écrémé (c.-à-d. environ 90 % du contenu protéique du babeurre) sont reconnues comme un véhicule naturel de composés bioactifs influençant positivement les systèmes cardiovasculaire, nerveux, gastro-intestinal et immunitaire [13]. Ainsi, la littérature renferme de plusieurs articles de synthèse discutant des propriétés cardioprotectrices de divers peptides issus des protéines laitières [14-21].

Jusqu'à présent, quoique le bienfait sur la santé cardiovasculaire de diverses molécules spécifiques contenues dans le babeurre ait été avancé par quelques recherches, ces dernières demeurent préliminaires et peu de résultats provenant d'études cliniques contrôlées sont actuellement disponibles dans la littérature. Ainsi, avec l'avancement des connaissances sur le pouvoir nutritionnel et les applications possibles pour le babeurre, la valorisation de ce sous-produit de l'industrie laitière dans la production d'ingrédients santé est envisageable.

L'objectif principal de cette thèse était donc d'étudier le potentiel nutraceutique de l'ensemble des constituants du babeurre en mesurant leur activité biologique, et ce, grâce à des modèles *in vitro* et clinique visant spécifiquement à déterminer leur pouvoir hypocholestérolémiant, antihypertensif et antioxydant.

Le chapitre suivant (c.-à-d. le Chapitre 1) constitue une revue de littérature visant à discuter des connaissances actuelles concernant : la composition du babeurre, l'origine de la MFGM, l'influence des traitements technologiques sur la structure de cette dernière, la digestion de ses composantes, ainsi que le potentiel nutraceutique des constituants véhiculés par le babeurre. Dans un second temps, ce chapitre a pour but la vulgarisation de notions de base concernant le métabolisme du cholestérol, les marqueurs de risques de CVD, ainsi que les approches alimentaires disponibles pouvant moduler la cholestérolémie d'un individu. Ensuite, des notions portant sur l'hypertension, l'oxydation et le stress oxydatif sont présentées, le but étant de faciliter la compréhension de l'ensemble des travaux présentés dans cette thèse.

CHAPITRE 1

-Revue de littérature-

1.1 Le babeurre

1.1.1 Composition

Le babeurre représente la fraction aqueuse libérée lors de l'inversion de phases nécessaire à l'obtention du beurre à partir de crème. Il possède une composition similaire à celle du lait écrémé à l'exception du fait qu'il contient plus de matières grasses, soit environ 5,8 % comparativement à 0,8 %, lorsqu'exprimé sur base sèche [22]. De plus, le babeurre se distingue par sa proportion importante de composés issus de la MFGM. En effet, durant le processus de fabrication du beurre, la crème contenant entre 38 et 42 % de matières grasses est agitée afin de provoquer, par chocs physiques et incorporation d'air, la rupture des membranes entourant les globules de gras laitier. N'étant plus protégées par une membrane, les gouttelettes de gras en solution s'agglomèrent entre elles en raison de leur nature hydrophobe. Se faisant, deux phases distinctes sont formées, soit une phase solide (c.-à-d. le beurre) et une phase liquide (c.-à-d. le babeurre). La phase liquide se trouve naturellement enrichie des constituants solubles de la crème et des fragments membranaires du globule de gras laitier; fragments riches en phospholipides. Ainsi, un peu plus de 80 % des protéines du babeurre sont comparables à celles du lait écrémé bovin, soit constituées majoritairement de caséines et de protéines sériques. Le reste des protéines contenues dans le babeurre (c.-à-d. environ 18 %) sont issues de la MFGM [23]. Quant à ses lipides, ils sont similaires à ceux du lait écrémé à l'exception d'une plus grande concentration en lipides polaires. Le Tableau 1 présente la composition moyenne du lait entier et écrémé, comparativement à celle du babeurre alors que la Figure 1 expose de façon schématique la composition générale du babeurre. Dans cette figure, les principales différences au niveau de la composition entre le babeurre et le lait écrémé ont été mises en évidence (c.-à-d. en bleu).

Tableau 1 : Composition de divers produits laitiers exprimée sur base sèche (100 g).

	Lait entier	Lait écrémé	Babeurre
Protéines, g	26,3	36,2	34,3
Matière grasse, g	26,7	0,77	5,78
-Saturés, g	16,7	0,50	3,60
-Mono-insaturés, g	7,92	0.20	1,67
-Polyinsaturés, g	0,67	0,03	0,22
-Cholestérol, mg	97	20	69
Glucides, g	38,4	52,0	49,0
Humidité, %	2,47	3,16	2,97
Calcium, mg	912	1257	1184
Potassium, mg	1330	1794	1592
Phosphore, mg	776	968	933
Sodium, mg	371	535	517
Magnésium, mg	85	110	110

Adapté de [22].

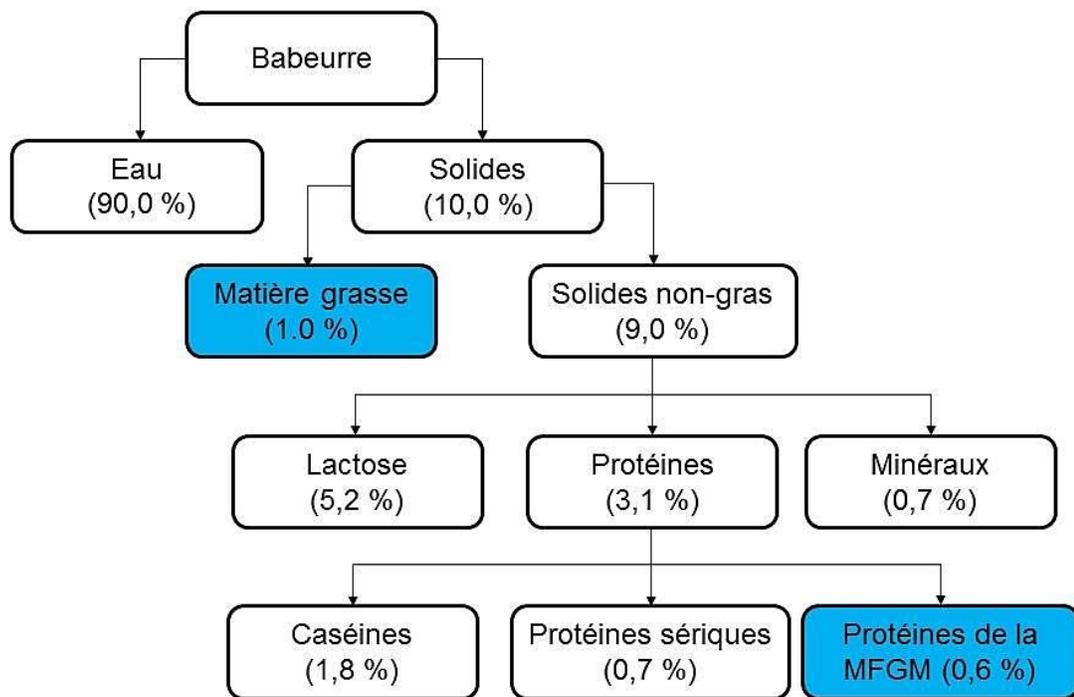


Figure 1 : Représentation schématique des principaux constituants du babeurre (valeurs exprimées en % moyen). Figure adaptée de [23, 24].

1.1.1.1 Les protéines majeures du babeurre

Les protéines représentent tout près de 38 % des solides non-gras du lait bovin [22], un peu moins dans le cas du babeurre (Figure 1). Ces dernières sont représentées en quasi-totalité (c.-à-d. autour de 90 %) par deux grandes classes de protéines, soit les caséines (CN) et les protéines sériques. Les CN se définissent comme étant les protéines du lait cru écrémé précipitant à un pH de 4,6 et à une température de 20 °C, alors que les protéines sériques regroupent celles restant solubles dans ces mêmes conditions [25]. Constituant jusqu'à 75 % des protéines retrouvées dans le babeurre, les CN sont des protéines dites hydrophobes et hautement chargées, contenant peu de résidus cystéines, beaucoup de résidus prolines et adoptant une conformation ouverte et flexible [26, 27]. Cette dernière caractéristique les rend très accessibles à l'action des enzymes protéolytiques. Au niveau du lait, environ 95 % des CN sont en suspension colloïdale, naturellement

regroupées sous forme de micelles sphériques d'un diamètre variant entre 40 et 300 nm [28]. D'un diamètre moyen de 150 nm, celles-ci sont formées de sous-micelles constituées de plusieurs CN maintenues par l'action de ponts hydrophobes et salins telles que représentées à la Figure 2 [29].

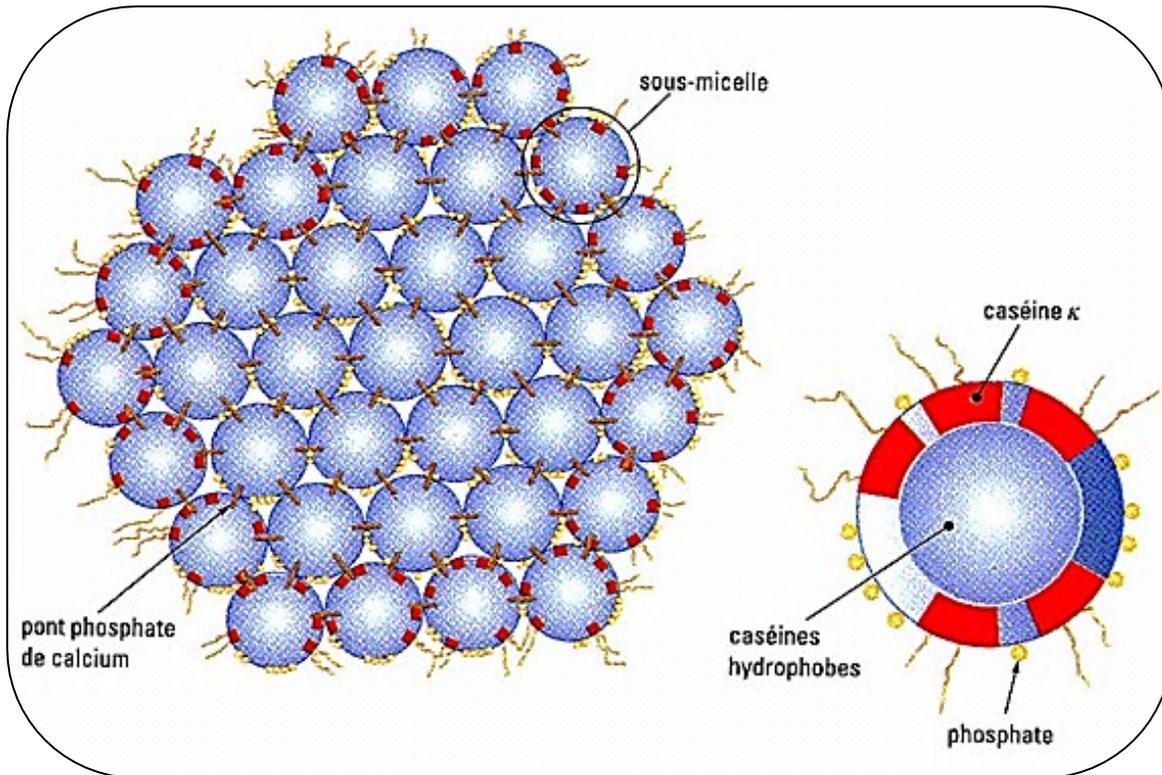


Figure 2 : Représentation schématique de la micelle de caséine. Figure tirée de [29].

Quatre différentes CN peuvent être identifiées par leur mobilité électrophorétique sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE), soit l' α_{s1} -CN, l' α_{s2} -CN, la β -CN et la κ -CN. Cette dernière se distingue des autres CN par la présence d'une portion glucidique très hydrophile, le glycomacropéptide, expliquant la localisation de cette CN à la surface externe de la micelle. Essentielle à la solubilité de cette dernière en milieu aqueux, l'hydrolyse de la κ -CN sous l'action de la présure libère la portion glycomacropéptide et provoque la perte de solubilité des micelles de CN [29].

De plus petites tailles que les CN, les protéines sériques sont retrouvées en solution colloïdale et, pour la plupart, sont des protéines dites globulaires. Ces dernières forment un groupe de protéines ayant un caractère

hydrophobe et adoptant une structure repliée compacte leur permettant d'accroître leur solubilité. Elles sont principalement représentées par la β -lactoglobuline (β -LG) (c.-à-d. environ 55 %), l' α -lactalbumine (α -LA) (c.-à-d. environ 22 %) , les immunoglobulines (c.-à-d. environ 13 %), ainsi que l'albumine sérique [29]. La β -LG est de loin la protéine sérique la plus abondamment rencontrée dans le babeurre. D'un poids moléculaire de 18 283 Da, elle possède une structure tridimensionnelle dimérique à son état natif formant une cavité très hydrophobe appelée « β -calyx ou β -barrel»). Cette particularité structurale lui permet de lier de petites molécules lipophiles [30]. Sa séquence primaire révèle cinq résidus cystéines; quatre sont impliqués dans la formation de ponts disulfures et un, enfoui au centre de la molécule, reste libre et très réactif [31, 32]. L' α -LA est, quant à elle, stabilisée par quatre ponts disulfures, mais ne contient aucun groupement sulfhydryle libre. Avec un poids moléculaire de 14 176 Da, elle représente la plus petite des protéines sériques, mais aussi la plus résistante à la dénaturation thermique [33]. Le Tableau 2 expose les caractéristiques des différents représentants des deux classes de protéines majeures du lait, soit les CN et les protéines sériques.

De plus, une petite portion des protéines du babeurre sont représentées par les protéines de la MFGM. Selon Britten et coll. [23], les protéines de la MFGM représentent environ 19 % des protéines totales du babeurre, alors que pour certains cette proportion serait plutôt autour de 10 % [31]. Quoiqu'il en soit, les protéines de la MFGM sont concentrées dans le babeurre puisqu'elles ne représentent que 1 à 4 % des protéines totales du lait bovin [24]. Malgré leur faible quantité, ce groupe diversifié de protéines joue un rôle primordial au niveau de la stabilité et de l'intégrité des globules de gras laitier en émulsion. Les différentes protéines de la MFGM seront étudiées plus en détail dans la sous-section 1.1.2.3.

Tableau 2 : La composition protéique moyenne du lait bovin.

Protéines	Proportion relative (g/kg de lait)	Poids moléculaire (Da)
α_{s1} -CN	11,5	23 614
α_{s2} -CN	3,0	25 230
β -CN	9,5	23 983
κ -CN	3,4	19 023 ^a
γ -CN	1,2	~20 500
α -LA	1,2	14 176
β -LG	3,1	18 283
Albumine sérique	0,4	66 267
Immunoglobulines	0,8	150 000–900 000
Protéose-peptones	1,0	4 000–40 000

^aPoids sans résidu glucidique. **CN**, Caséine; **LA**, lactalbumine; **LG**, lactoglobuline. Adapté de [26, 34].

1.1.2 Origine et composition de la MFGM

1.1.2.1 Origine et structure de la MFGM

Le lait bovin contient entre 3 et 5 % de matière grasse sous forme de globules sphériques d'une taille moyenne d'environ 3,5 à 4 μm [35], mais dont 70 à 90 % sont d'une taille inférieure à 1 μm [36]. La taille des globules de gras est influencée par divers facteurs tels que l'espèce, la diète, le taux de matière grasse du lait ou encore, la variation interindividuelle au niveau de l'activité métabolique des glandes mammaires [35]. Entourés d'une membrane multicouche complexe dont la composition et la structure sont influencées par le mécanisme de sécrétion, les globules de gras bovin se développent d'une façon unique à l'intérieur des cellules de l'épithélium sécrétoire de la glande mammaire. Le mécanisme par lequel les globules de gras laitier sont sécrétés est complexe et reste encore aujourd'hui incomplètement élucidé. La mécanistique derrière la formation et la sécrétion des globules de gras laitiers fait d'ailleurs l'objet de plusieurs publications d'intérêt [12, 35-38].

De façon sommaire, le mécanisme de sécrétion débute par la génération de gouttelettes de triglycérides (TG) par le réticulum endoplasmique rugueux des cellules épithéliales. Ces dernières s'accumulent ensuite dans le cytoplasme sous forme de microglobules de gras d'une taille inférieure à 0,5–2 μm [35]. À l'intérieur du cytosol, ces gouttelettes de TG sont enrobées d'une première membrane monocouche formée d'un mélange de phospholipides (PL), de glycosphingolipides, de cholestérol et de protéines [12]. Lors de l'étape finale de sécrétion des globules de gras hors des cellules de l'épithélium des glandes mammaires, ces derniers migrent vers le pôle apical d'où elles bourgeonnent. Par le fait même, ces derniers y sont enrobés d'une deuxième couche, cette fois de type bicouche, issue de la membrane plasmique du pôle apical de la cellule. Le mécanisme de sécrétion des globules de gras du lait bovin est illustré de façon simplifiée à la Figure 3.

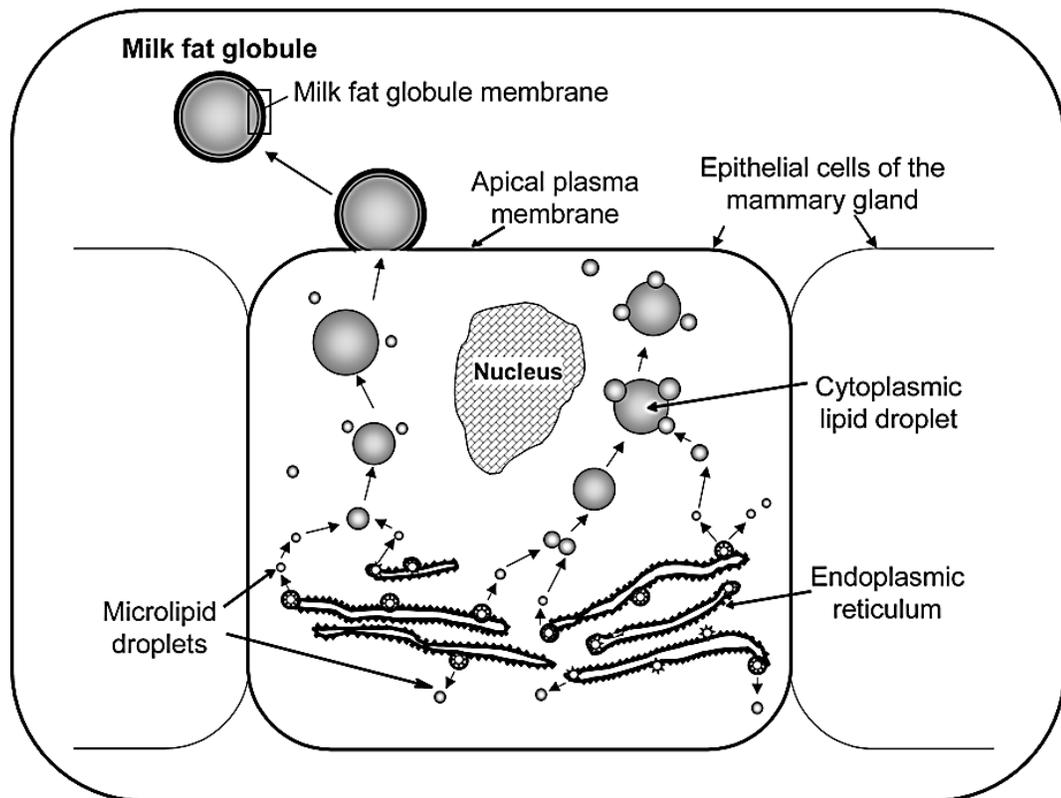


Figure 3 : Représentation schématique du mécanisme de sécrétion des globules de gras bovins. Figure tirée de [39].

Ainsi, la structure maintenant acceptée pour la MFGM est une membrane formée de trois strates, dont la partie externe est originaire en grande partie et même en totalité de la membrane apicale des cellules sécrétrices. Cette bicouche possède, sur sa face interne, une couche « électron-dense » majoritairement constituée de protéines en provenance du cytoplasme. Finalement, la membrane interne est constituée d'une monocouche de matériaux dont l'origine est le réticulum endoplasmique [37]. La structure multicouche de la MFGM est illustrée à la Figure 4.

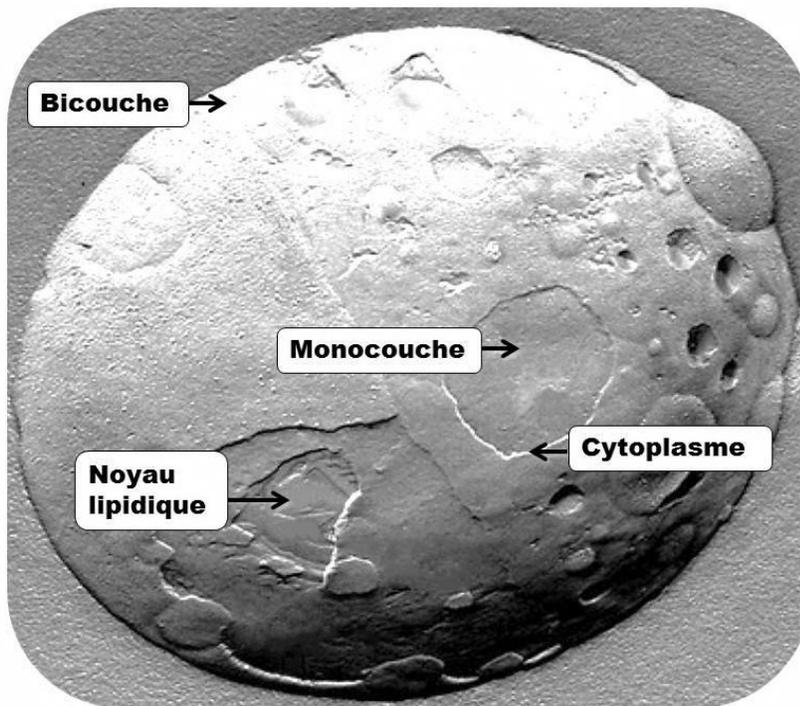


Figure 4 : Photographie par microscopie électronique d'un globule de gras laitier ayant subi une cryofracture. Photo tirée de [40].

1.1.2.2 Composition lipidique de la MFGM

D'une épaisseur variant entre 10 et 50 nm [39], la MFGM totalise approximativement 2 à 6 % de la masse totale des globules de gras laitier [12]. En raison de sa fonction d'émulsifiant naturel, la MFGM doit pouvoir faire le lien entre son cœur de nature lipidique et son environnement de nature aqueuse. Ainsi, celle-ci est formée d'un amalgame complexe et unique de protéines et de lipides, neutres et polaires, représentant plus de 90 % de son poids sec [9]. Le Tableau 3 présente la composition lipidique moyenne de la MFGM. Les lipides neutres, constituant de 72 à 80 % de tous les lipides de la MFGM, sont représentés par les TG, les monoglycérides, les diglycérides, les esters et le cholestérol. Les TG représentent à eux seuls de 37 % à plus de 60 % de la composition en lipides de la MFGM [24].

Tableau 3 : Composition lipidique moyenne de la MFGM d'origine bovine.

Classe de lipides	Lipides totaux (%)
Neutres :	
Triglycérides	62
Diglycérides	9
Monoglycérides	Trace
Stérols	0,2–2,0
Esters	0,1–0,3
Acides gras libres	0,6-6,0
Polaires :	
Phospholipides	26–31
- Phosphatidylcholine	36 ^a
- Phosphatidyléthanolamine	27 ^a
- Shingomyéline	22 ^a
- Phosphatidylinositol	11 ^a
- Phosphatidylsérine	4 ^a
- Lysophosphatidylcholine	2 ^a

Adapté de [38]. ^aRésultats exprimés en (%) des phospholipides totaux.

Par contre, il semble qu'une large quantité des TG retrouvés au niveau de la MFGM soit issue d'une contamination par le globule de gras en lui-même lors du processus d'isolement de la MFGM. Ainsi, la teneur en TG de la MFGM est variable et fonction de la méthode d'extraction employée. Quant aux stéroïdes, ils sont représentés en quasi-totalité par le cholestérol [12].

Les lipides polaires, soit les PL, sont largement responsables de la stabilité des globules de gras en émulsion. D'ailleurs, la MFGM renferme environ 60 à 70 % de tous les PL présents dans le lait bovin [11]. Au niveau de la MFGM elle-même, les lipides polaires représentent de 15 à 43 % des lipides totaux [24]. Parmi ces derniers, les glycérophospholipides représentent les lipides polaires les plus communément rencontrés et regroupent les principales composantes des membranes biologiques, dont la MFGM. Les glycérophospholipides sont des molécules amphiphiles, c'est-à-dire des molécules ayant une structure à la fois polaire et apolaire. La tête polaire des glycérophospholipides est formée de trois parties : un radical qui définit la nature du PL, un groupement phosphate chargé négativement ainsi qu'une molécule de glycérol formant la base du glycérophospholipide. Comme illustré à la Figure 5, sur cette structure de base viennent se greffer deux chaînes d'acides gras de 14 à 24 carbones (c.-à-d. C14–C24) formant la partie apolaire de la molécule. Les acides gras retrouvés au niveau des glycérophospholipides ont la particularité d'être principalement de type insaturé et de longue chaîne (c.-à-d. C18:1, C18:2 et C18:3) contrairement à la matière grasse du lait qui est typiquement riche en acides gras de courtes et moyennes chaînes (c.-à-d. C4–C14) [11]. Ces acides gras insaturés sont responsables du maintien de la fluidité de la MFGM [39].

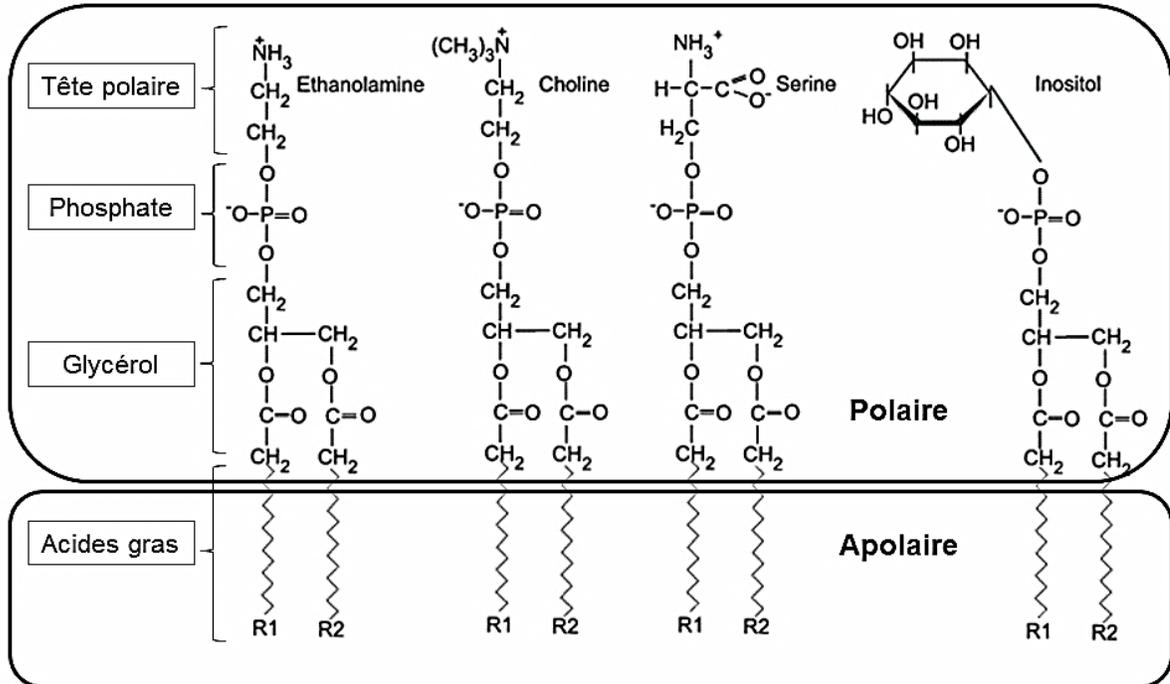
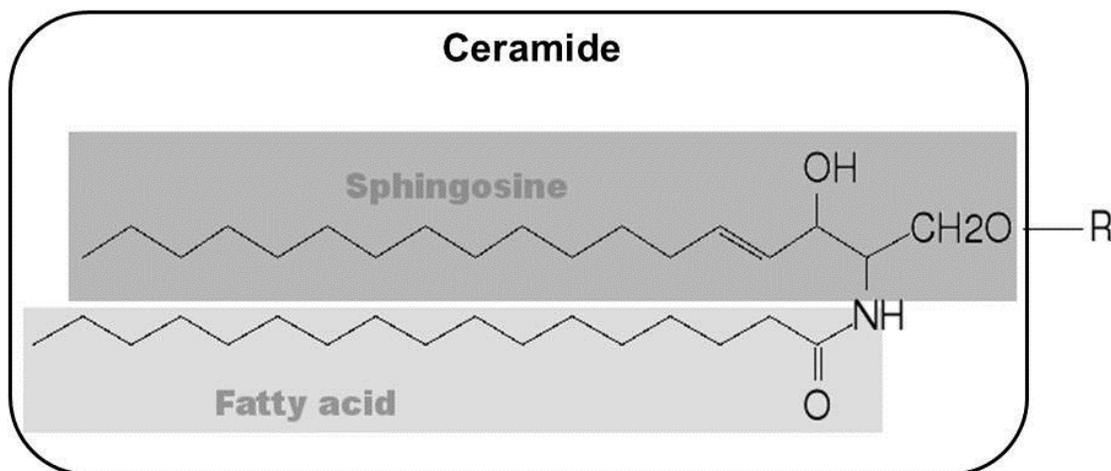


Figure 5 : Structure des principaux glycérophospholipides retrouvés dans le lait. En fonction de nature de la tête polaire (éthanolamine, choline, sérine ou inositol) on distingue différents glycérophospholipides. Figure inspirée de [41, 42].

Outre les glycérophospholipides, les sphingolipides (SL) représentent une autre classe importante de lipides polaires constituant les membranes biologiques. Ces derniers sont des dérivés de la sphingosine sur laquelle peuvent se greffer différents groupements qui définissent la nature du SL. Ainsi, un acide gras peut se fixer au groupement amide de la sphingosine pour former un céramide (Figure 6). Les céramides peuvent aussi être additionnés d'un sucre (c.-à-d. un hexose) pour alors devenir des cérébrosides [42]. Les lactosylcérébrosides et les glucosylcérébrosides, retrouvés en faible quantité dans la MFGM d'origine bovine, sont deux exemples de cérébrosides. Keenan et Mather [38] ont estimé leur teneur à environ $13 \mu\text{g}/\text{mg}$ de protéine, soit une abondance en moyenne 18 fois moins élevée que celle des PL (c.-à-d. $0,13\text{--}0,34 \text{ mg}/\text{mg}$ de protéines). Finalement, les sphingomyélines (SM) sont formées lorsqu'un groupement phosphocholine est estérifié au squelette du céramide (Figure 6). Ces dernières représentent, contrairement aux autres sphingolipides, une classe bien particulière de PL en raison de leur groupement phosphate. En effet, parmi tous les PL, un seul porte un céramide comme queue hydrophobe; la SM [42].

Les SL, principalement la SM, ont la singularité de contenir des acides gras saturés à longues chaînes et à haut point de fusion (c.-à-d. C16:0, C22:0, C23:0 et C24:0). En effet, la SM possède un profil en acides gras dit non commun puisque la quasi-totalité de ses acides gras sont saturés (c.-à-d. environ 97 %). De plus, une quantité supérieure à 17 % de ceux-ci sont représentés par des acides gras à très longues chaînes (c.-à-d. C23:0) [11].



Substituent (R)	Sphingolipids
H	Ceramide
Phosphocholine	Sphingomyelin
Sugar	Glycosphingolipid

Figure 6 : Structure générale des sphingolipides. Selon la nature du radical (R), différentes formes de sphingolipides seront formées. [Disponible sur] : http://journals.cambridge.org/fulltext_content/ERM/ERM4_28/S146239940200546Xsup003.pdf (consulté le 19 octobre 2012).

1.1.2.3 Composition protéique de la MFGM

Les protéines représentent de 25 à 60 % de la masse de la MFGM [12] et de 1 à 4 % des protéines totales du lait. Cette grande variation est apportée par la méthode utilisée pour isoler la MFGM ainsi que par les traitements subis par le lait [24]. Nonobstant, plus de 40 protéines spécifiques à la MFGM, principalement des glycoprotéines, ont pu être identifiées par la combinaison d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) et de focalisation isoélectrique. Grâce aux nouvelles approches protéomiques, c'est maintenant plus de 120 protéines de la MFGM qui sont connues; 71 % provenant directement de la membrane et 29 % d'origine cytoplasmique ou encore sécrétée par l'épithélium des glandes mammaires [43]. Malgré cette grande diversité, on reconnaît huit protéines majeures de la MFGM. Ces dernières sont la butyrophiline (BTN), la xanthine oxydase/déshydrogénase ou oxydoréductase (XO/XDH), les *mucin-like* glycoprotéines (c.-à-d. MUC1 et MUC15), la *cluster of differentiation* 36 (CD36), la lactadhérine (PAS6/7), l'adipophiline (ADPH) et la *fatty acid-binding protein* (FABP) [38, 44, 45]. À noter que seulement l'ADPH et la FABP ne sont pas des protéines glycosylées. La structure, la séquence en acides aminés ainsi que les diverses fonctions de ces protéines sont présentées de façon détaillée dans l'article de revue de Mather [45].

Brièvement, la MFGM est formée d'un amalgame de diverses protéines et d'enzymes distribuées de façon hétérogène au niveau de la membrane. La BTN (c.-à-d. 35–40 %), la XO/XDH (c.-à-d. 12–20 %) et l'ADPH, d'une abondance intermédiaire entre la BTN et XO/XDH, constituent à elles seules la grande majorité de l'ensemble des protéines de la MFGM [12, 35, 38]. La XO/XDH représente la plus importante enzyme de la MFGM. Par contre, outre celle-ci, la MFGM contient environ 28 enzymes différentes [38]. Ces dernières sont soit de réels constituants de la MFGM ou encore, sont entraînées de façon fortuite lors du processus de sécrétion hors des cellules de l'épithélium sécrétoire de la glande mammaire (c.-à-d. d'origine cytoplasmique). Au niveau de la structure de la MFGM (Figure 7), la PAS6/7 ainsi que la protéase peptone 3 (PP3) sont attachées lâchement à la surface de la bicouche externe [11]. Les glycoprotéines transmembranaires, comme le sont la BTN, MUC1, la MUC15 (c.-à-d. anciennement PAS III) et la CD36, exposent quant à elles leur partie cytosolique dans l'espace intermembranaire de la MFGM comme illustrée à la Figure 7 [11, 46]. Cet espace entre la monocouche interne et la bicouche externe se remplit de matériaux cytoplasmiques à la suite du processus de sécrétion. Cet interstice renferme l'enzyme soluble XO/XDH et l'ADPH, formant ainsi la couche « électro-dense » observée en microscopie électronique. La XO/XDH semble fortement liée, par des ponts disulfures, à la queue cytoplasmique de la BTN. L'ADPH paraît aussi agir avec le complexe BTN–XO/XDH et serait importante au niveau du processus de sécrétion des globules de gras et de leur interaction avec la région apicale de la membrane des cellules sécrétrices [37]. Le rôle des autres protéines au niveau de la

sécrétion des globules de gras reste jusqu'à aujourd'hui inconnu. Le Tableau 4 présente les caractéristiques ainsi que les principales fonctions connues des principales protéines de la MFGM.

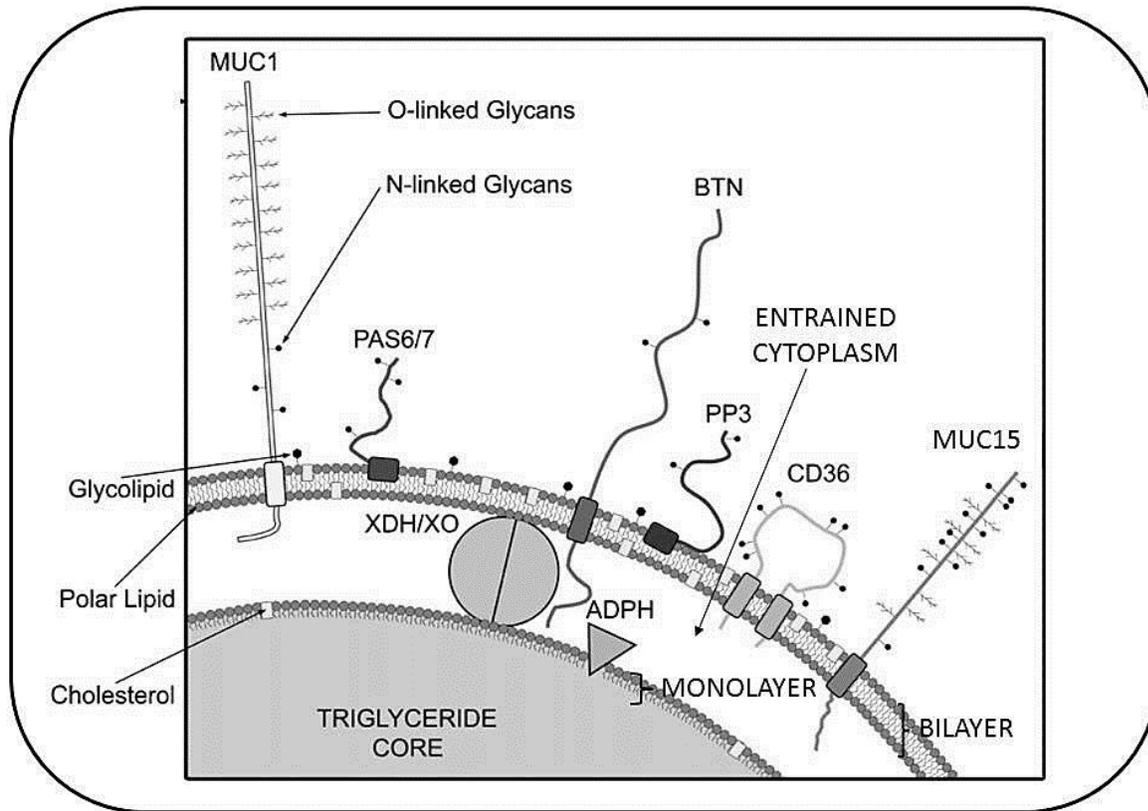


Figure 7 : Structure de la MFGM et arrangement hétérogène de ces protéines majeures. **ADPH**, adipophiline; **BTN**, butyrophiline; **CD36**, *Cluster of differentiation 36*; **MUC1 et 15**, mucine1 et 15; **PAS6/7**, lactadhérine. Figure adaptée de [11].

Tableau 4 : Les caractéristiques et fonctions des principales protéines constituant la MFGM.

Protéine		pI	Masse moléculaire (kDa)	Fonctions
Mucine1	MUC1	<4,5	160–200	Immunoprotection (contre les bactéries et virus) Protection de l'intégrité de la MFGM
Xanthine oxydoréductase	XO/XDH	7,8	150	Sécrétion des lipides Métabolisme des purines Protéine de défense (antimicrobienne)
Mucine15	MUC15	<4,5	95–100	Immunoprotection (contre les bactéries et virus)
Cluster of differentiation 36	CD36	<7,0	76–78	Système hématopoïétique et vasculaire Reconnaissance des cellules apoptotiques
Butyrophiline	BTN	5,3	66–67	Sécrétion des lipides Membre de la superfamille des immunoglobulines
Adipophiline	ADPH	7,5–7,8	52–54	Absorption et transport des acides gras et des triglycérides
Lactadhérine	PAS6/7	6–6,6	48–54	Fixation des phospholipides de la MFGM Immunoprotection (contre les bactéries et virus)
Fatty acid binding protein	FABP	5–5,5	13	Transport des acides gras et régulation du métabolisme des lipides

Adapté de [11, 35, 38, 44, 45, 47].

1.1.3 Influence des traitements technologiques sur les composantes du babeurre

Il est maintenant bien établi que les traitements thermiques appliqués au lait produisent des réactions entre les protéines sériques et les micelles de CN et ce, même-ci ces dernières sont thermiquement stables pour deux grandes raisons [48]. Premièrement, les micelles sont stabilisées par des interactions renforcées par l'action de la chaleur les rendant thermiquement stables. Deuxièmement, les CN la constituant, en raison de leur faible présence de structures secondaires et tertiaires, sont particulièrement difficiles, voire impossibles à dénaturer [26]. Pourtant, les CN ainsi que leur micelle peuvent interagir avec les autres protéines du lait via des liaisons covalentes suivant un traitement thermique suffisant (c.-à-d. toutes températures supérieures à 75 °C) [49].

Les protéines sériques sont quant à elles facilement dénaturées et interagissent entre elles pour former des homopolymères ou des hétéropolymères suivant l'application de chaleur. De plus, elles forment des complexes avec les κ -CN grâce à la création de ponts disulfures (c.-à-d. des liaisons covalentes) [50]. Quoique l' α_2 -CN possède aussi la capacité de former des liaisons disulfures, la κ -CN jouie d'une position favorable à la création d'interactions avec les protéines du milieu environnant en raison de sa position à la surface externe des micelles de CN comme discuté précédemment. Les agglomérats formés à la suite de la dénaturation thermique des protéines sériques sont dits limités en taille et en quantité puisqu'ils semblent être fonction du nombre de κ -CN présentes en solution [26]. Bien que la structure de l' α -LA ne renferme aucun groupement sulfhydryle libre, lorsque celle-ci est mise en présence de protéines qui en sont porteuses, elle forme des liaisons et se fixe aux agglomérats de κ -CN et de β -LG du milieu. Toutefois, l' α -LA ne semble que très peu influencer le phénomène d'agrégation et de création de ponts disulfures à la suite d'un traitement thermique dans les conditions normalement rencontrées dans le lait [32, 51]. D'ailleurs, il semble qu'à une température inférieure à 90 °C, température sous laquelle la β -LG et l' α -LA possèdent un comportement cinétique semblable, ces deux protéines réagissent ensemble pour former des intermédiaires qui se complexent, par la suite, aux micelles de CN, suggérant ainsi le caractère essentiel de la β -LG à l'association de l' α -LA [48, 51]. La quantité de complexes β -LG/ κ -CN et α -LA/ κ -CN serait significativement influencée par le temps de chauffage, la température, mais aussi la concentration en protéines sériques du milieu. De plus, le pH ainsi que la force ionique auraient une influence en modulant les forces électrostatiques de répulsion et donc, la facilité à former des complexes protéiques [52]. Si la formation de complexes entre protéines sériques et micelles de CN est la conséquence principale des réactions induites par l'application d'un traitement thermique à une matrice laitière, les protéines de la MFGM peuvent aussi participer aux réactions provoquées par la chaleur [48].

En effet, quoiqu'en moindre quantité, à une température supérieure à 65 °C, de fortes interactions covalentes sont rapidement formées entre la β -LG, l' α -LA et les composantes de la MFGM [53]. Selon Dalgleish et Banks [54], parmi toutes les réactions possibles impliquant les protéines sériques (c.-à-d. des réactions avec les κ -CN, des réactions entre elles ou des réactions avec la MFGM), celles impliquant la MFGM seraient les plus favorisées. Ainsi, tandis que dans un lait cru la membrane entourant les globules de gras est principalement composée de PL et de protéines de la MFGM, cette dernière se recouvre d'une couche principalement constituée de protéines sériques à la suite d'un traitement thermique (Figure 8). Tout comme pour les réactions entre les micelles de CN et les protéines sériques, les réactions impliquant les constituants de la MFGM sont fortement dépendantes de la température et du temps de chauffage. Ces interactions semblent résulter principalement de la formation de ponts disulfures entre protéines porteuses de résidus cystéines [48]. Les protéines de la MFGM sont particulièrement riches en groupements disulfides et thiols (c.-à-d. sulfhydryle) et cette caractéristique laisse penser que les groupements thiols libres des protéines de la MFGM pourraient initier les réactions avec la β -LG. D'ailleurs, des interactions entre la MFGM et la β -LG ont été rapportées à des températures comprises entre 60 et 65 °C, soit bien en dessous des températures de dénaturation de cette dernière (c.-à-d. environ 78 °C). Cette observation vient supporter la thèse selon laquelle les protéines de la MFGM viendraient initier les interactions avec les protéines majeures du lait [55] et permettraient les liaisons subséquentes de la β -LG avec l' α -LA et la κ -CN par la création de ponts disulfures. Fait intéressant à noter, il semble que la quantité de β -LG et d' α -LA fixées à la surface de la MFGM soit positivement reliée à l'accroissement de la température. Cette dernière atteint un seuil limite à 1,0 mg/g de gras et 0,2 mg/g de gras respectivement pour la β -LG et d' α -LA, indiquant la quantité limitée d'interactions possibles avec la MFGM [56].

Outre les réactions se produisant entre les protéines majeures du lait et la surface de la MFGM à la suite de l'application d'un traitement thermique, les protéines constituant cette membrane peuvent aussi réagir entre elles pour former des complexes [11]. En effet, à une température de 60 °C, un début de formation de larges agrégats entre la BTN et la XO/XDH est observée [57]. À une température supérieure à 62 °C, température de dénaturation de la XO/XDH, cette dernière libère les molécules de fer fixées à ces cystéines laissant des groupements libres pour la formation d'interactions disulfides [55]. Cette libération de fer à la suite d'un traitement thermique induit une modification de la coloration du babeurre. En effet, Corredig et Dalgleish [53] ont observé que le babeurre passait d'un brun rosé à un blanc jaunâtre lorsqu'il était fabriqué à partir d'une crème pasteurisée. De plus, outre la formation de complexes, les traitements thermiques modifient la forme et la distribution de tailles des globules de gras en solution [58] et, au niveau du babeurre, semblent influencer la teneur en PL [56]. En effet, comme présenté à la Figure 8, en modifiant la surface de la MFGM les traitements thermiques favorisent la formation d'agrégats entre globules de gras (c.-à-d. des particules >20 μ m). Cette

réaction provoque une augmentation de la viscosité de la crème avant son barattage [56, 59]. Par contre, l'impact du traitement thermique sur la teneur en PL reste controversé.

Finalement, les traitements mécaniques tels que l'agitation, le pompage et l'homogénéisation ont aussi pour effet de modifier la composition de la MFGM en plus d'influencer la taille des globules de gras laitier [36]. Par exemple, outre la désorganisation partielle ou totale de la MFGM, l'homogénéisation, en diminuant la taille des globules de gras, multiplie par plus de 10 fois la surface de matière grasse devant être stabilisée. En absence de traitement thermique, seules les CN s'absorbent à la surface de la MFGM afin de rétablir la stabilité du globule de gras. Par contre, à la suite de l'application d'un traitement thermique, des protéines sériques viennent aussi s'adsorber sur cette surface [59, 60]. Dans les laits commerciaux ayant subi un ensemble de procédés technologiques (c.-à-d. refroidissement, agitation, pompage, homogénéisation, pasteurisation, etc.) on estime que 66 à 87 % de la surface de la MFGM est recouverte de protéines majeures du lait (c.-à-d. de protéines sériques et de CN) [58].

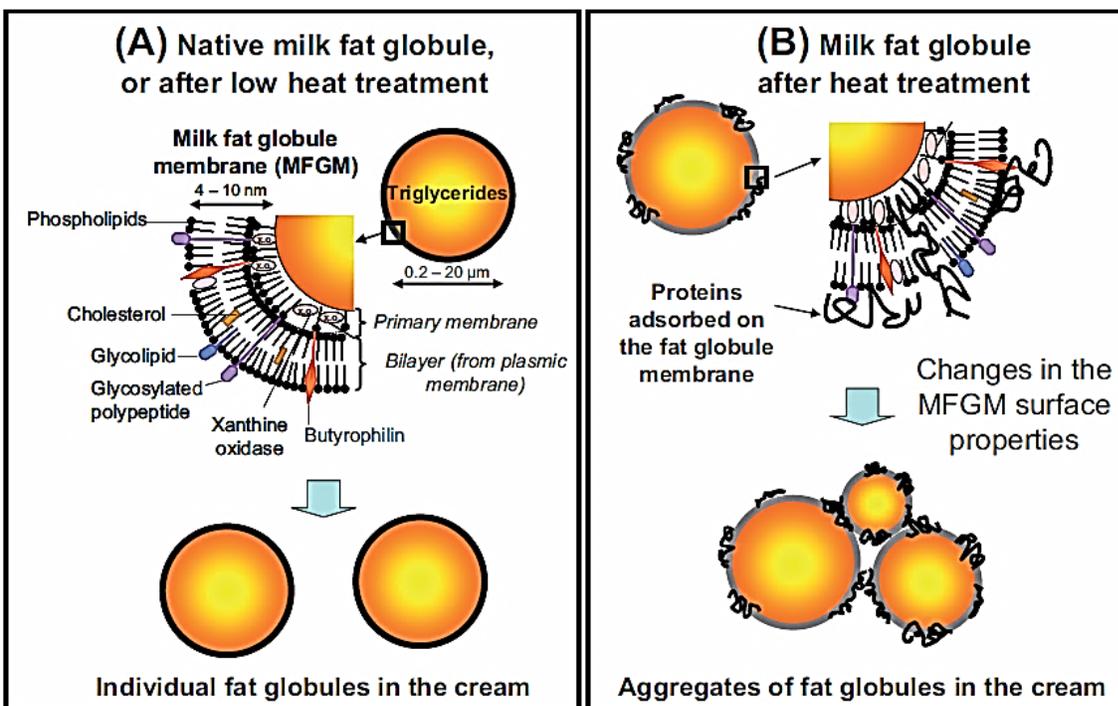


Figure 8 : Changements au niveau de la MFGM suivant la pasteurisation de la crème. Figure tirée de [56].

1.1.4 Digestion des composantes du babeurre

La digestion comprend différentes étapes visant la décomposition des glucides, des protéines et des lipides provenant de l'alimentation, et ce, en unités suffisamment petites pour être absorbées par les cellules de la muqueuse intestinale. Les diverses parties du tractus gastro-intestinal (c.-à-d. la cavité buccale, l'œsophage, l'intestin grêle et le gros intestin) ainsi que les glandes et organes connexes (c.-à-d. la langue, les glandes salivaires, le pancréas, le foie et la vésicule biliaire) sont représentés à la Figure 9. Les diverses enzymes digestives participant à l'hydrolyse des différentes macromolécules retrouvées dans l'alimentation sont, quant à elles, schématisées à la Figure 10.

Lorsque la digestion en unités absorbables est complétée, ces dernières passent dans la lymphe ou la circulation sanguine pour ensuite être réassemblées ou utilisées comme source d'énergie selon les besoins de l'organisme [61]. Ainsi la digestion est essentielle à la libération des composés bioactifs du babeurre (p. ex. des peptides et des produits de la digestion des lipides mineurs) et c'est pourquoi les prochaines sous-sections (1.1.4.1 et 1.1.4.2) visent à survoler rapidement, et de façon générale, les différentes étapes de la digestion des protéines et des lipides.

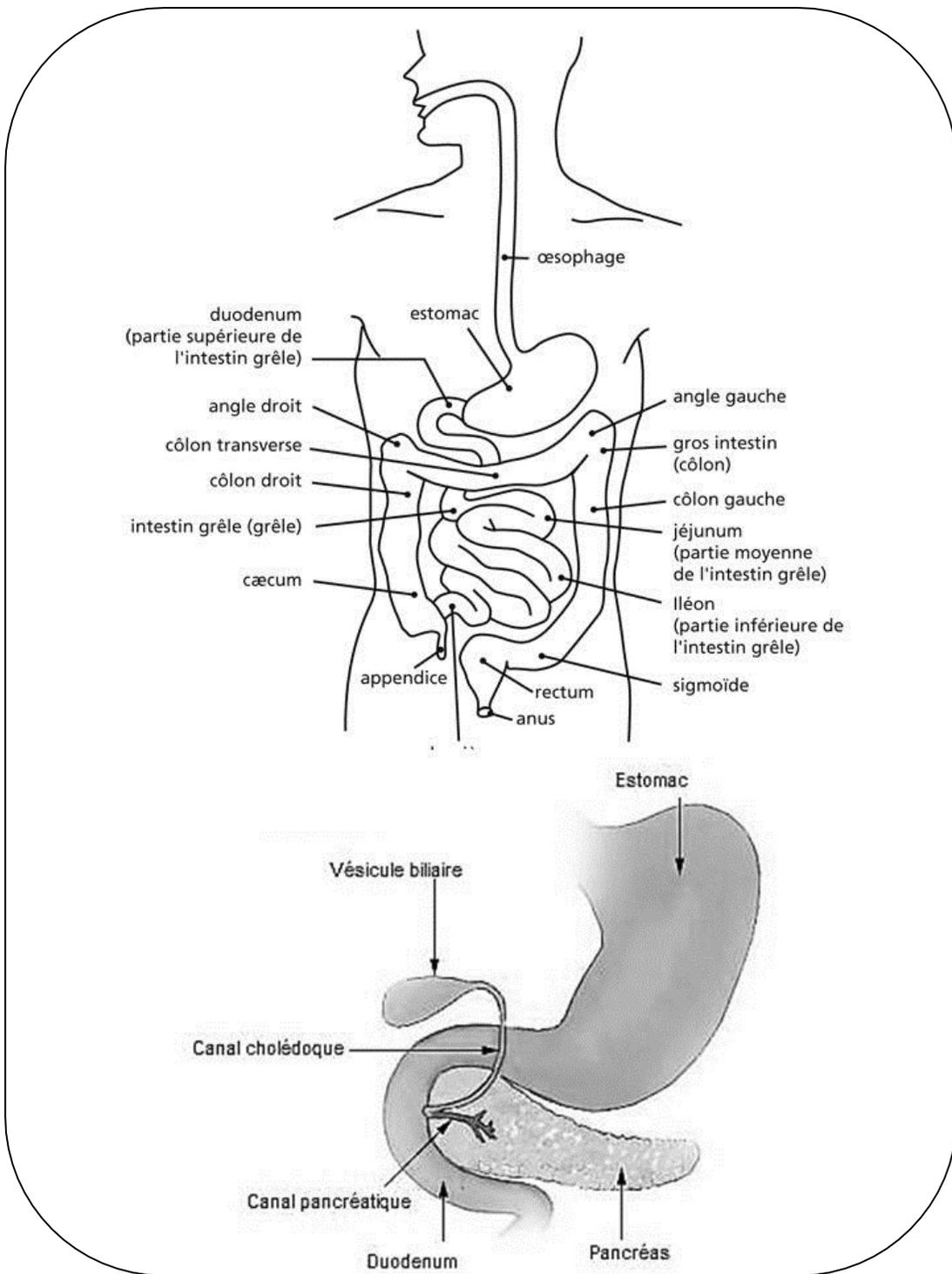


Figure 9 : Représentation schématique du système digestif humain. [Disponible sur] : http://www.intestinfo.com/Site/page.php?ID_PAGE=40&ID_RUB=5 (consulté le 25 janvier 2013).

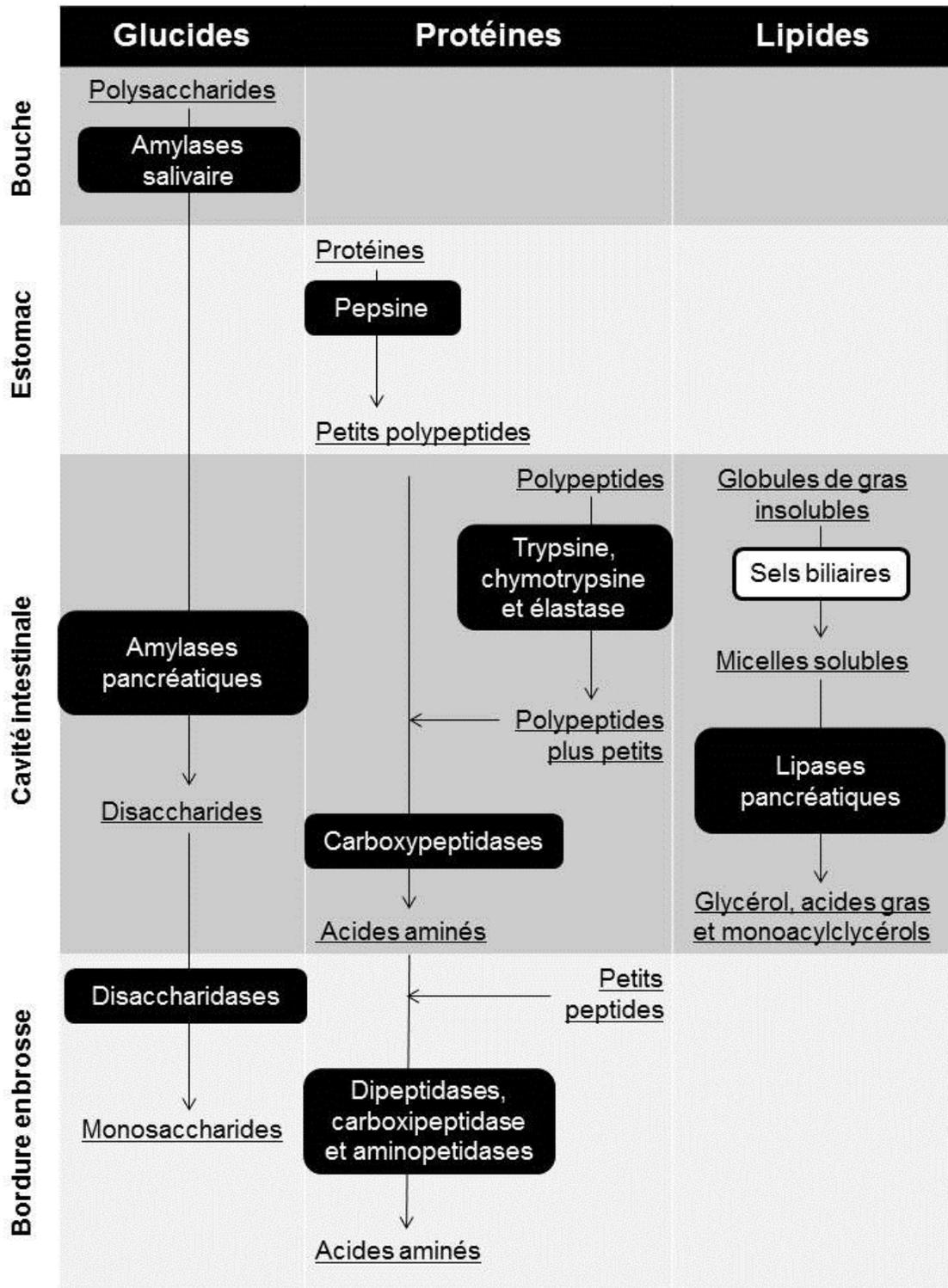


Figure 10 : Représentation schématique simplifiée de la digestion des glucides, des protéines et des lipides chez l'humain. Figure inspirée de [62].

1.1.4.1 La digestion des composantes protéiques

1.1.4.1.1 *Digestion gastrique*

La digestion des protéines s'amorce au niveau stomacal par l'action de la pepsine (EC. 3.4.23.1). Dans l'estomac, l'eau, l'acide hydrochlorique et les enzymes se mélangent à la nourriture pour former le chyme gastrique [61]. Sécrétée par la muqueuse de l'estomac sous sa forme inactive de pepsinogène (c.-à-d. une proenzyme), la pepsine est d'ailleurs activée grâce à l'acidité du chyme gastrique (Figure 11). En plus d'activer la pepsine, cette acidité permet de briser les liaisons hydrogènes responsables de la structure tridimensionnelle des protéines et ainsi, en facilite l'action. La pepsine est une endopeptidase à large action permettant d'hydrolyser les protéines alimentaires en s'attaquant aux liaisons peptidiques de part et d'autre d'acides aminés hydrophobes, avec une préférence pour ceux de nature aromatique (c.-à-d. des résidus Phe, Tyr ou Trp) [61]. Elle hydrolyse de façon préférentielle les liaisons peptidiques en position C-terminale des résidus Leu et Phe et, d'une façon moindre, elle peut aussi cliver les liaisons présentes en position C-terminale des résidus Glu. Par contre, cette endopeptidase ne peut cliver les liens peptidiques impliquant des résidus Val, Gly et Arg [63]. Suivant cette première étape de la digestion des protéines, il résulte de larges polypeptides, des oligopeptides de tailles variées ainsi que quelques acides aminés libres [64]. Ces derniers sont envoyés vers la première partie du petit intestin (c.-à-d. le duodénum) suivant la vidange gastrique. Ce faisant, puisque le pH optimal d'action de la pepsine est situé entre 1,6 et 3,2 [61], elle est désactivée de façon irréversible par les bicarbonates alcalins des sucs pancréatiques.

1.1.4.1.2 *Digestion intestinale*

Au niveau du petit intestin, on retrouve cinq principales enzymes pancréatiques (c.-à-d. la trypsine, la chymotrypsine, l'élastase et les carboxypeptidases A et B). Le processus de digestion, sous contrôle hormonal, est stimulé par l'arrivée du chyme gastrique. En effet, l'arrivée du chyme acide au niveau du duodénum stimule la sécrétion de cholécystokinine par les cellules de la muqueuse intestinale [61]. Cette hormone induit le déversement des sucs pancréatiques ainsi que ceux de la vésicule biliaire dans le duodénum via le canal pancréatique et le canal cholédoque (Figure 9). Tout d'abord sécrétées sous leur forme inactive de proenzymes, les enzymes pancréatiques sont activées suivant leur clivage enzymatique, principalement grâce à l'action hydrolytique de la trypsine (Figure 11) [61].

Parmi les enzymes pancréatiques, la trypsine, la chymotrypsine et l'élastase sont tous les trois membres de la famille des sérines protéases. Ces dernières sont des endopeptidases, chacune ayant une spécificité et une action complémentaire, permettant d'hydrolyser les polypeptides et les oligopeptides (c.-à-d. les peptides

allants de 2–6 acides aminés) formés lors de la digestion gastrique [64]. Quant aux carboxypeptidases (A et B), elles font partie de la famille des métallopeptidases et agissent en tant qu'exopeptidases. Elles permettent ainsi de libérer les acides aminés en hydrolysant les liaisons peptidiques situées aux extrémités carboxyliques (c.-à-d. en position C-terminale) des chaînes peptidiques (Figure 12) [61].

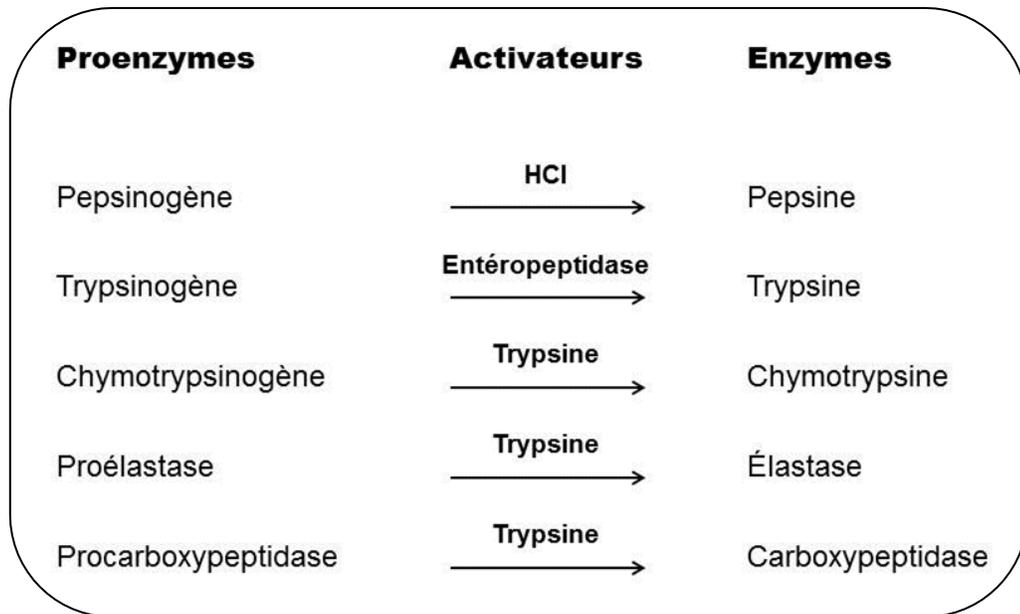


Figure 11 : Activation des protéases gastriques et pancréatiques. Figure inspirée de [61].

La trypsine (EC 3.4.21.4) est une enzyme très spécifique permettant de couper de façon préférentielle les liens peptidiques en position C-terminale d'acides aminés basiques (c.-à-d. des résidus Arg et Lys), sauf s'ils sont suivis d'un résidu Pro [64]. Tout d'abord sécrétée par le pancréas sous forme de trypsinogène, elle est activée grâce à l'action hydrolytique des entéropeptidases de la bordure en brosse de l'intestin grêle (Figure 11). Cette dernière possède un rôle très important puisqu'elle est responsable de l'activation des autres enzymes pancréatiques (Figure 11) [61]. La chymotrypsine (EC 3.4.21.1) s'attaque, quant à elle, préférentiellement aux liaisons peptidiques en position C-terminale d'acides aminés aromatiques (c.-à-d. des résidus Phe, Tyr et Trp), mais aussi à ceux impliquant des acides aminés hydrophobes tels que les résidus Met ou Leu [63, 64]. Quant à l'élastase (EC 3.4.21.36), quoiqu'elle possède un très large spectre d'action, elle s'attaque de façon préférentielle aux liaisons en position C-terminale d'acides aminés aliphatiques neutres (c.-à-d. des résidus Ala, Leu, Gly, Val et Ile) [63, 64]. Finalement, les carboxypeptidases A et B (EC. 3.4.17.1 et 2)

s'attaquent, un à un, aux acides aminés en position C-terminale des petits polypeptides et oligopeptides formés par l'action des sérines protéases pancréatiques. En résultante de l'action combinée de ces cinq enzymes, la majorité des protéines sont hydrolysées sous forme d'oligopeptides et d'acides aminés libres.

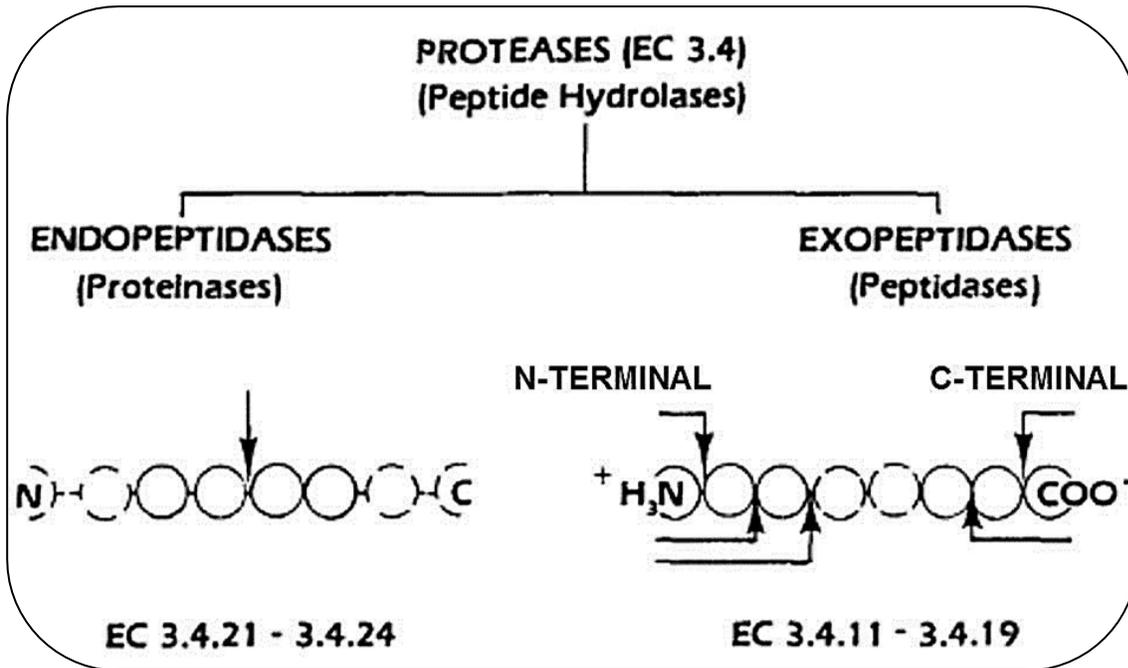


Figure 12 : Classification des protéases selon leur mode d'action. Les endopeptidases hydrolysent les liaisons peptidiques situées à l'intérieur des chaînes d'acides aminés alors que les exopeptidases s'attaquent à celles situées à l'extrémité carboxylique des chaînes peptidiques [65].

Il est maintenant bien accepté que la digestion finale des peptides se produit soit à la surface, ou encore à l'intérieur des entérocytes de la muqueuse intestinale grâce à l'action de peptidases (c.-à-d. les carboxypeptidases, les aminopeptidases et les dipeptidases). Même si la grande majorité des peptides sont hydrolysés sous forme d'acides aminés et ensuite absorbés par différents mécanismes d'action (c.-à-d. par diffusion passive ou facilitée ou encore par transport actif) [66], certains d'entre eux s'avèrent résistants à l'hydrolyse intestinale. Ces derniers sont alors transportés, tels quels, au travers de la membrane des entérocytes. C'est à l'intérieur des cellules de la bordure en brosse de l'intestin qu'ils sont hydrolysés par l'action de diverses peptidases intracellulaires [61, 67]. L'absorption des petits peptides se produit par un mécanisme indépendant de ceux impliqués dans l'absorption des acides aminés libres et principalement par transport actif via le transporteur de peptides PepT1 [66]. Quoique la grande majorité des peptides soient hydrolysés rapidement par des enzymes cytoplasmiques, on reconnaît que certains petits peptides peuvent circuler dans le plasma sanguin [64]. Les peptides qui se retrouvent au niveau de la circulation sanguine sont transportés vers les différentes cellules où ils sont hydrolysés et utilisés dans la synthèse protéique. Dans toutes les études réalisées chez les différentes espèces animales, il semble que l'on retrouve chez chacune d'elle une capacité considérable pour l'absorption de petits peptides [66].

1.1.4.2 Digestion des composantes lipidiques

En raison de leur nature insoluble et apolaire, la digestion et l'absorption des lipides requièrent plusieurs modifications physicochimiques ainsi que l'action de plusieurs enzymes afin de pouvoir être absorbés [68]. Les principaux lipides de l'alimentation humaine sont les TG, les PL et les stérols. Pour cette raison, les enzymes majeures de la digestion des lipides sont la lipase pancréatique, la phospholipase A₂ et la carboxyl-ester hydrolase aussi dénommée cholestérol-estérase [69]. Quoiqu'il y ait aussi des lipases linguales et gastriques, la digestion des lipides se produit principalement au niveau de l'intestin grêle, plus spécifiquement au niveau du duodénum et du jéjunum (Figure 10). En effet, la digestion gastrique ne semble avoir que peu d'importance au niveau du processus global de digestion de la matière grasse chez les individus ne présentant aucune insuffisance pancréatique [61]. Par contre, cette dernière serait aussi importante au niveau de la digestion de certains lipides comme ceux de la matière grasse laitière [69].

1.1.4.2.1 Digestion des triglycérides

La digestion des TG, représentant plus de 95 % de la matière grasse apportée par l'alimentation moyenne, peut être divisée en quatre grandes étapes telles que schématisées à la Figure 13 [68]. Dans un premier

temps, la mastication, couplée à l'agitation mécanique de l'estomac, permet d'émulsifier les TG sous forme de gouttelettes de matière grasse (c.-à-d. 2–4 μm) formant le chyme gastrique [68]. Les quelques produits de la digestion précoce des TG par les lipases linguales et gastriques s'associent aux autres lipides non hydrolysés ainsi qu'à d'autres molécules en présence (c.-à-d. certaines protéines chargées, des PL alimentaires ainsi que du cholestérol) dans le but de stabiliser les gouttelettes de matière grasse émulsifiées dans le chyme. Dans un deuxième temps, à l'arrivée du chyme gastrique dans la première partie du duodénum, le bulbe duodénal, le pH acide de celui-ci stimule la sécrétion de sécrétine provoquant le déversement de bicarbonates alcalins en provenance du pancréas [61]. Conjointement, stimulée par la cholécystokinine, la vésicule biliaire se contracte et le pancréas sécrète les proenzymes pancréatiques dans le duodénum. La cholécystokinine permet aussi d'inhiber la vidange du contenu gastrique [68]. L'alcalinisation par les bicarbonates des sucs pancréatiques permet de neutraliser l'acidité gastrique, de favoriser l'action optimale de la lipase pancréatique, en plus de réduire la taille des gouttelettes de matière grasse (c.-à-d. $< 0,5 \mu\text{m}$). Cette réduction de taille permet d'augmenter la surface disponible pour l'action hydrolytique des enzymes [61, 68]. En effet, comme schématisé à la Figure 13, cette dernière doit pouvoir se fixer, grâce à l'interaction préalable de la coenzyme colipase, à l'interface huile/eau pour exercer son rôle de façon optimale [69]. Comme pour les protéases pancréatiques, la colipase est présente dans les sucs pancréatiques sous forme de proenzyme activée par l'action protéolytique de la trypsine [61]. En plus de permettre l'interaction de la lipase pancréatique avec les gouttelettes de matière grasse, la colipase modifie le pH optimal d'action de celle-ci. En effet, ce dernier passe de 8,0 à 6,0, soit près du pH du duodénum (c.-à-d. un pH de 6,5) [61, 69]. Dans un troisième temps, la lipase pancréatique hydrolyse les TG en deux acides gras libres et un 2-monoglycéride.

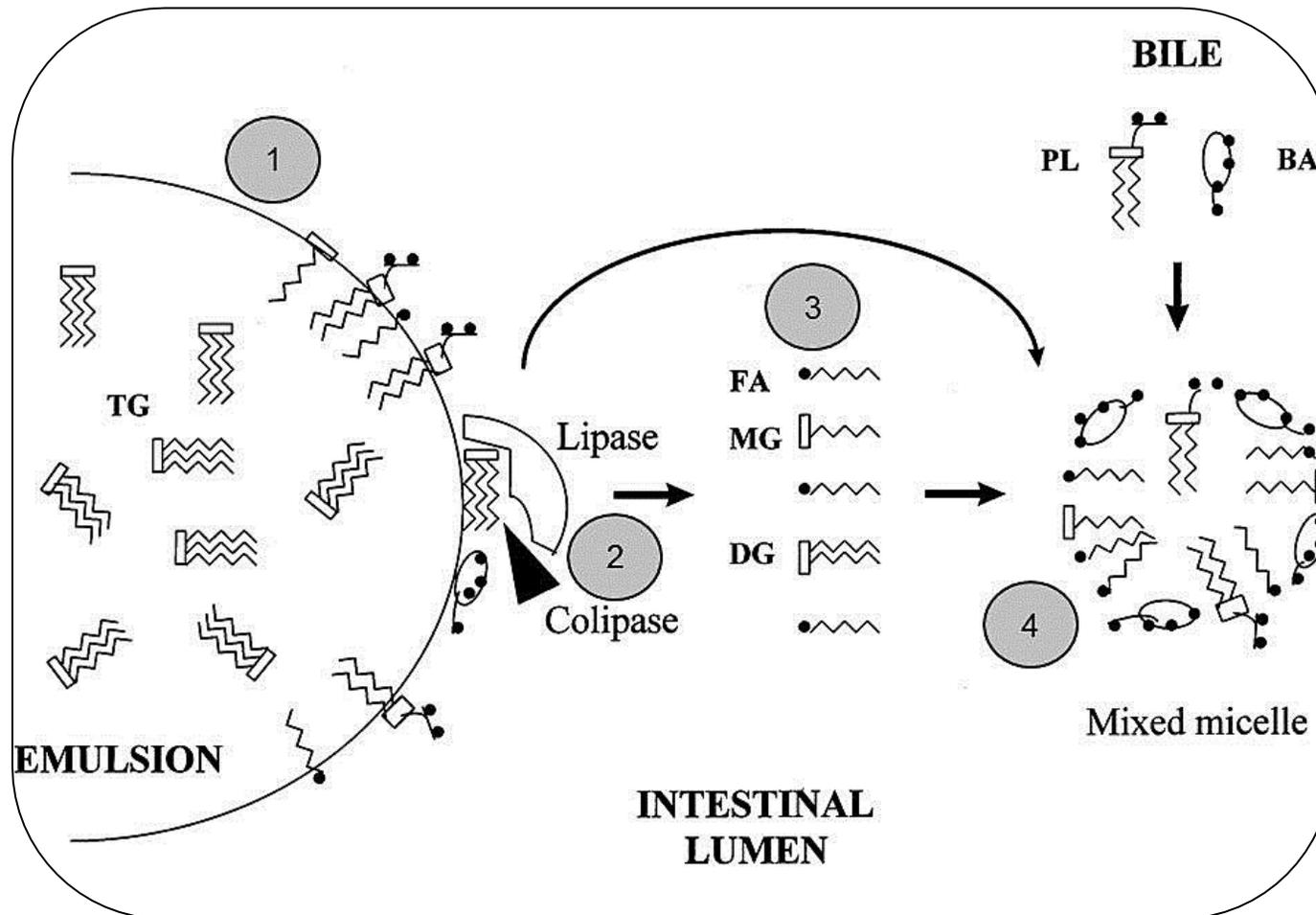


Figure 13 : Représentation schématique des quatre étapes de la digestion des lipides. 1) Émulsification, 2) fixation de la colipase et de la lipase pancréatique, 3) hydrolyse et 4) formation des micelles mixtes. **BA**, acide biliaire; **DG**, diglycérade; **FA**, acide gras libre; **MG**, monoglycérade; **PL**, phospholipide. Figure tirée de [68].

En effet, la lipase pancréatique s'attaque aux liaisons en position 1 et 3 du glycérol tel que présenté à la Figure 14. Dans l'étape finale de la digestion des TG, les produits de l'hydrolyse des enzymes pancréatiques (c.-à-d. les acides gras libres, les 2-monoglycérides, les lysophospholipides et le cholestérol non-esterifié) s'associent à la bile pour former des agrégats solubles possédant une structure ordonnée appelée micelle mixte. Pour être absorbés par les entérocytes, les produits de la digestion doivent migrer hors des micelles et traverser la couche aqueuse non-agitée présente en bordure de la muqueuse intestinale. La micelle réussit à contrer la résistance apportée par cette couche aqueuse en assurant une concentration locale élevée d'acides gras libres, de 2-monoglycérides et de cholestérol non-estérifiés. De plus, en raison de son pH légèrement acide (c.-à-d. un pH de 5,3–6,0), elle permet d'accroître la polarité des acides gras en permettant leur protonation. Au fur et à mesure que les produits de la digestion sont absorbés, principalement au niveau proximal du jéjunum, de nouvelles molécules viennent les remplacer dans la micelle formant ainsi un équilibre dynamique entre la matière grasse émulsifiée et celle solubilisée sous forme micellaire [68].

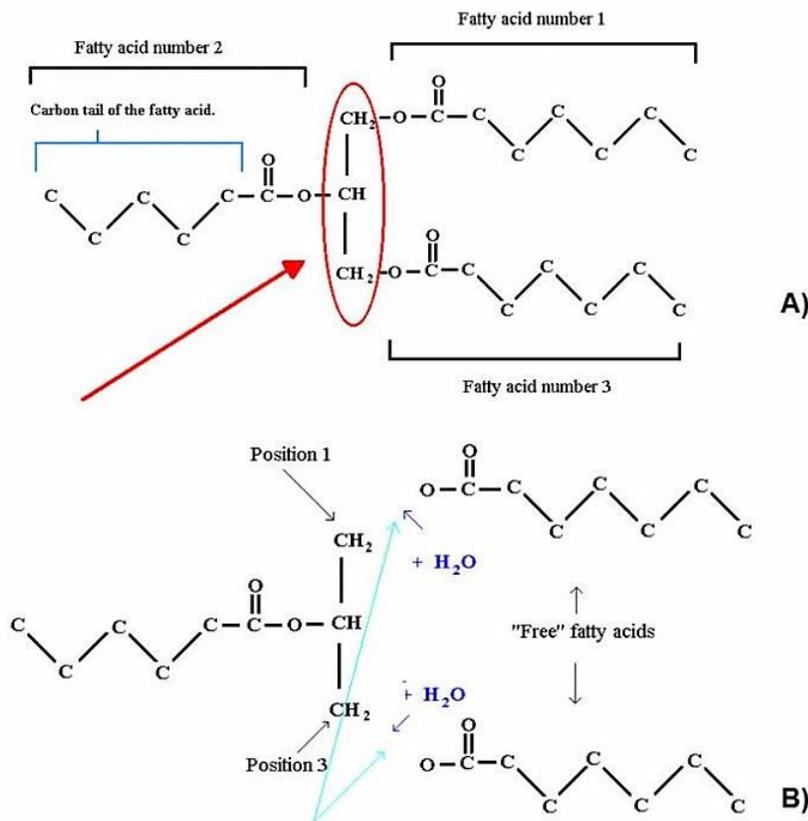


Figure 14 : Représentation schématique de : A) la structure d'un triglycéride avec, encerclé, le glycérol formant le squelette de la molécule; B) l'action hydrolytique de la lipase pancréatique sur les triglycérides. Les flèches représentent deux sites de coupure. [Disponible sur] : <http://www.nutriology.com/TGmetab.html> (consulté le 25 janvier 2013).

1.1.4.2.2 *Digestion des lipides mineurs*

Contrairement aux produits de la digestion des TG discutée précédemment, le cholestérol non-estérifié résultant de l'action de la cholestérol-estérase pancréatique est un composé beaucoup plus hydrophobe. De ce fait, il doit absolument se lier à d'autres molécules pour être absorbé par l'organisme par un mécanisme complexe [68]. Brièvement, dans la lumière intestinale, tout comme pour les TG, le cholestérol biliaire (c.-à-d. la bile) et le cholestérol alimentaire s'associent aux divers produits de la digestion des lipides sous forme de micelles mixtes. Comme exposé précédemment, le caractère soluble des micelles formées permet leur diffusion à l'intérieur du contenu intestinal et leur passage à travers la muqueuse jusqu'à la surface des entérocytes [70]. Comme pour les produits de la digestion des TG, le cholestérol non-estérifié ne peut être absorbé par les entérocytes que sous forme de monomères et doit donc se dissocier et migrer hors des micelles pour être absorbé par les cellules intestinales.

Par contre, contrairement aux produits de la digestion des TG, le cholestérol non-estérifié, en raison de sa nature hautement hydrophobe et non chargée, est absorbé plus difficilement et à un rythme beaucoup plus lent. Cette inefficacité au niveau de l'absorption intestinale du cholestérol laisse supposer que la présence de molécules alimentaires ayant une forte affinité pour ce dernier pourrait diminuer son absorption en limitant son mouvement et donc, sa biodisponibilité [71]. Les SL par exemple, sont hydrolysés de façon lente en raison, entre autres, de leur complexation avec les molécules de cholestérol ainsi que de l'action inhibitrice de l'acide biliaire sur la sphingomyélinase alcaline [72]. Différemment de la plupart des autres composantes lipidiques, les SL sont absorbés dans la partie distale du petit intestin. La capacité des SL alimentaires à limiter l'absorption du cholestérol sera d'ailleurs discutée en détail au point 1.1.5.2.1.

Les autres PL sont quant à eux hydrolysés grâce à l'action des phospholipases pancréatiques, principalement la phospholipase A₂. Un peu comme pour la lipase pancréatique, cette dernière est activée par la trypsine et vient hydrolyser la liaison ester en position 2 du glycérol. Il en résulte des acides gras libres et des 2-lysophospholipides qui seront incorporés aux micelles mixtes [61].

1.1.5 Le potentiel nutraceutique des constituants du babeurre

1.1.5.1 Bioactivité des protéines majeures du babeurre

Les protéines majeures du lait bovin et du babeurre, soit les CN et les protéines sériques, sont reconnues comme des vecteurs naturels de composés bioactifs. Ces composés sont, pour la plupart, inactifs ou latents au niveau de la protéine native et la protéolyse s'avère essentielle à la libération de séquences spécifiques d'acides aminés (c.-à-d. des peptides) responsables de leur activité biologique. Cette protéolyse peut être produite par le processus normal de digestion tel qu'exposé précédemment, ou encore, par l'action d'enzymes naturellement présentes dans le lait ou grâce à la fermentation [73].

Pour la première fois mentionnée dans la littérature dans les années 50 par Mellander [74], les peptides bioactifs sont définis comme des composés ayant un impact positif sur diverses fonctions de l'organisme en apportant des bénéfices au-delà de leurs apports en acides aminés. De toutes les protéines existantes, animales ou végétales, les protéines du lait représentent la plus importante source de peptides bioactifs [75]. Les peptides bioactifs alimentaires sont généralement constitués de 2–9 résidus d'acide aminé, quoique des peptides de plus grande taille (c.-à-d. > 20 résidus d'acide aminé) aient déjà été associés à une activité biologique (p. ex. le glycomacropéptide avec 64 résidus d'acide aminé) [76].

Les principaux sites d'action de ces peptides peuvent être divisés en quatre grandes catégories : le système cardiovasculaire, le système nerveux, le système immunitaire et le système digestif (Figure 15). Parmi les propriétés bénéfiques attribuées aux protéines majeures du lait, on retrouve, entre autres, des effets antihypertensifs, antithrombotiques, cytomodulateur (c.-à-d. anticancer), antioxydants, immunostimulants, antimicrobiens, opioïdes, ostéoprotecteurs, ainsi qu'hypocholestérolémiant [14, 15, 18-21, 77, 78]. De plus, la libération par hydrolyse enzymatique de peptides laitiers ayant de multiples fonctionnalités biologiques a été rapportée dans la littérature [79].

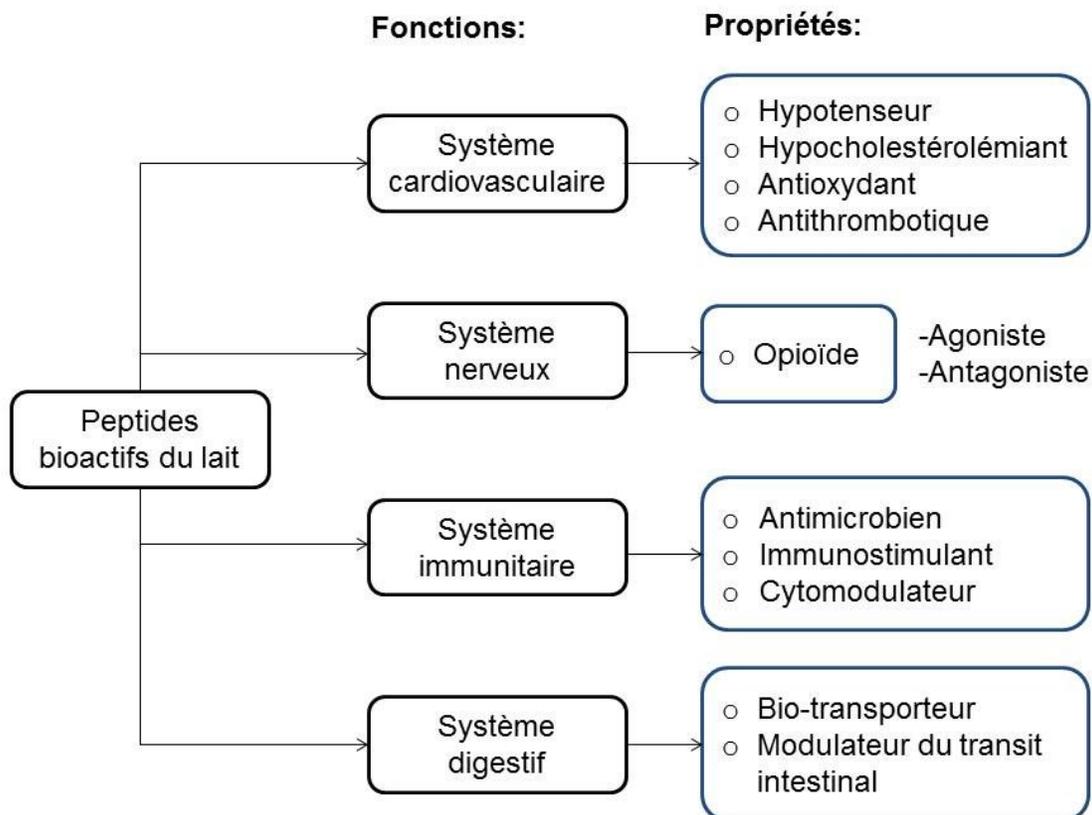


Figure 15 : Fonctions des divers peptides bioactifs des protéines du lait bovin. Figure inspirée de [80].

1.1.5.1.1 Fonctions des peptides laitiers au niveau du système cardiovasculaire

À titre de maladies chroniques, les CVD sont associées à plusieurs facteurs de risques dont, entre autres, l'hyperlipidémie, l'hypertension, l'hyperglycémie et l'obésité [81]. L'hypercholestérolémie étant l'un des principaux risques de CVD, il n'est pas étonnant que l'influence des protéines alimentaires sur le cholestérol sanguin ait fait l'objet de plusieurs publications ces dernières années [82]. La plupart de ces études visaient à comparer le potentiel des CN et des protéines de soya à diminuer le taux de cholestérol sanguin. Par contre, les protéines sériques, plus particulièrement la β -LG, ont démontré une capacité hypocholestérolémiante supérieure aux protéines de soya et aux CN chez le rat [78]. D'ailleurs, l'étude de Nagaoka et coll. [78] a été la première étude à identifier quatre peptides hypocholestérolémiants *in vitro* issus de l'hydrolyse trypsique de la

β -LG. Un de ces peptides, un pentapeptide, a démontré une capacité à diminuer l'absorption du cholestérol dans un modèle d'étude *in vivo*. Les auteurs ont attribué, en partie, la capacité hypocholestérolémiant *in vitro* des hydrolysats de β -LG à leur capacité à diminuer la solubilité micellaire du cholestérol et, par le fait même, à en limiter l'absorption intestinale. L'importance de la solubilité micellaire sur l'efficacité d'absorption ainsi que sur les niveaux plasmatiques de cholestérol sera discutée au point 1.1.5.2.1.

Outre l'hypercholestérolémie, l'hypertension artérielle est responsable de nombreuses lésions au niveau de la paroi des artères et représente, à long terme, un important facteur de risque de CVD. Une multitude d'études chez l'humain ont permis de confirmer le potentiel hypotenseur de peptides d'origine laitière à des doses aussi faibles que 2–6 mg. Les réductions généralement obtenues chez l'humain sont modestes, mais ont l'avantage de ne provoquer aucun effet secondaire [83]. Les diverses études portant sur les propriétés anti-hypertensives ainsi que les mécanismes d'action des peptides d'origine laitière seront spécifiquement traités de façon plus détaillée dans la section 1.4 de cette thèse.

Finalement, le stress oxydatif est bien connu pour jouer un rôle prépondérant dans le développement de l'artériosclérose et autres CVD. En effet, ce dernier induit la production excessive d'espèces oxygénées réactives pouvant, entre autres, favoriser l'oxydation des particules de LDL (c.-à-d. les lipoprotéines de faible densité). Il existe maintenant des évidences solides concernant la capacité de peptides provenant de l'alimentation à neutraliser ces espèces oxygénées réactives [84]. Par exemple, Hernández-Ledesma et coll. [79] ont rapporté pour la première fois les propriétés antioxydantes d'hydrolysats enzymatiques de β -LG et d' α -LA. Les auteurs de cette étude ont rapporté le fort potentiel antioxydant d'une des séquences peptidiques de la β -LG obtenue par l'action de la Corolase PP® (Trp-Tyr-Ser-Leu-Ala-Met-Ala-Ala-Ser-Asp-Ile). Dans cette étude, ce peptide constitué de 11 acides aminés a permis de capter de façon plus efficace des radicaux libres générés *in vitro* que l'hydroxyanisole butylé (c.-à-d. le BHA), un antioxydant de synthèse largement utilisé comme additif alimentaire. Un résumé des études réalisées sur la nature et le mode d'action des peptides antioxydants d'origine laitière sera présenté dans la section 1.5 du présent document.

1.1.5.2 Bioactivité des lipides mineurs du babeurre

Malgré leur faible quantité (0,8 %) [85], les lipides polaires du lait sont reconnus pour leurs bienfaits au niveau de la santé. Plus particulièrement, les SL sont reconnus comme des molécules hautement bioactives, efficaces à faibles concentrations [11, 86]. Découverts pour la première fois en 1884 par J.L.W. Thudichum en étudiant les constituants du cerveau, les SL sont d'importants lipides structuraux retrouvés en faible quantité dans la plupart des aliments [87]. Ces derniers se concentrent dans les membranes cellulaires, dans les

lipoprotéines et les autres structures riches en lipides tels que la MFGM du babeurre. Ayant longtemps été considérés comme de simples molécules structurales, les SL sont aujourd'hui reconnus comme des composants ayant diverses fonctions au niveau de la régulation cellulaire [88]. D'ailleurs, depuis plus de 30 ans, la recherche ne cesse de mettre en lumière la relation unique qui existe entre les SL et le cholestérol ainsi que l'influence profonde de la SM sur l'homéostasie et le transport de ce dernier [8, 89, 90].

1.1.5.2.1 Fonctions des composantes lipidiques mineures du babeurre au niveau de la santé du système cardiovasculaire

C'est en 1979 que remontent les premières observations du pouvoir hypocholestérolémiant des composés de la MFGM [91]. En effet, les auteurs Howard et Marks avaient remarqué que le taux de cholestérol sanguin chez des volontaires ayant consommé de la crème, aliment contenant des fragments de la MFGM, n'augmentait pas autant que ceux ayant consommé du beurre. Par la suite, d'autres recherches ont permis de cibler les composants associés aux effets hypocholestérolémiants de la MFGM. Ainsi, les SL se sont avérés responsables de l'effet observé par Howard et Marks [91]. Par exemple, une étude chez le rat a démontré l'effet hypocholestérolémiant des SL consommés sur une période prolongée en permettant une diminution d'environ 30 % du cholestérol libre et du cholestérol total du plasma sanguin après 28 semaines [92].

Selon Eckhardt et coll. [71], la solubilisation du cholestérol à l'intérieur des micelles formées au niveau intestinal dépend principalement de la nature et de la concentration en PL ainsi qu'en sels biliaires. Les résultats de cette étude ont permis de comprendre qu'il était possible, en modifiant les PL présents dans la lumière intestinale et donc, disponibles pour la formation des micelles, de modifier la solubilité du cholestérol à l'intérieur de ces dernières. Cette modification de la solubilité permet de moduler la quantité de cholestérol pouvant être transférée des micelles aux entérocytes comme exposée précédemment au point 1.1.4.2.2.

À la lumière de ces informations, d'autres études se sont intéressées, plus spécifiquement, au pouvoir hypocholestérolémiant de la consommation de SM [7, 8, 71]. En effet, puisque les SM possèdent naturellement une forte affinité pour le cholestérol en plus de ne pas être digérées complètement dans la partie proximale de l'intestin, elles ont le pouvoir de fixer le cholestérol sur une grande portion du petit intestin et d'ainsi diminuer sa solubilité micellaire. Effectivement, comme exposée précédemment, la fixation très rigide du cholestérol par les SM se solde par une désorption beaucoup plus lente du cholestérol et des produits de la digestion des lipides hors des micelles [10]. Lors d'une étude effectuée chez le rat, les SM provenant de la diète ont démontré leur action inhibitrice contre l'absorption intestinale du cholestérol. Ainsi, une infusion duodénale de SM provenant de l'œuf a permis de diminuer l'absorption intestinale de cholestérol et d'autres

produits de la digestion des lipides [7]. Une relation positive entre la dose et la réponse enregistrée a même été observée par les chercheurs. Plus récemment, les SM provenant du lait se sont avérées être encore plus efficaces dans la diminution de l'absorption intestinale du cholestérol chez le rat [8]. Ces évidences portent à croire que les interactions possibles entre les SM du lait et le cholestérol pourraient influencer la prévalence de l'athérosclérose via la diminution d'un des facteurs de risques, soit les niveaux plasmatiques de cholestérol.

Dans les prochaines sections de cette thèse (c.-à-d. les sections 1.2 à 1.5), les capacités hypocholestérolémiantes, antihypertensives et antioxydantes des composantes protéiques et lipidiques du babeurre seront discutées. Ces sections visent à présenter les principaux mécanismes d'action de ces composantes en plus d'exposer les notions nécessaires à une bonne compréhension des données disponibles dans la littérature ainsi que des informations véhiculées dans les prochains chapitres de cette thèse.

1.2 Métabolisme des lipoprotéines

Les lipides alimentaires et les lipides synthétisés par le foie sont distribués dans tout l'organisme grâce à l'action des diverses lipoprotéines plasmatiques. Le métabolisme des lipoprotéines est un métabolisme très complexe faisant intervenir une multitude de récepteurs et d'enzymes. Ce métabolisme sera exploré de façon simplifiée dans cette section.

1.2.1 Les lipoprotéines du plasma

Les lipides alimentaires (c.-à-d. le cholestérol, les TG et les PL), en raison de leur nature hydrophobe, sont transportés dans le plasma grâce à l'action des lipoprotéines. Comme schématisée à la Figure 16, la surface externe des lipoprotéines est formée de PL, de cholestérol non-estérifié (FC) et de protéines spécifiques (c.-à-d. les apolipoprotéines). Le cœur des lipoprotéines est quant à lui composé de TG et de cholestérol estérifiés (CE). La densité des diverses lipoprotéines est fonction de leur composition chimique et de leur contenu en lipides et en protéines. Ainsi, les lipoprotéines peuvent être classifiées selon leur densité en quatre différentes catégories telles que présentées au Tableau 5.

Les particules de chylomicrons (CM) et les lipoprotéines de très faible densité (VLDL) sont constituées majoritairement de lipides, soit à 99 % et 92 % respectivement. Cette caractéristique explique leur très faible densité; inférieure à 0,95 g/ml pour les CM et à 1,006 g/ml pour les VLDL. En raison de leur composition hautement lipidique, les CM et les VLDL ont pour principale fonction le transport des TG [93]. Constituées à 50 % de CE, les lipoprotéines de faible densité (LDL) sont quant à elles les principaux transporteurs de

cholestérol au niveau du plasma sanguin, suivi par les lipoprotéines de haute densité (HDL) [93]. On retrouve aussi des lipoprotéines de densité dite intermédiaire (IDL), allant de 1,006-1,019 g/ml [94].

Les différentes classes de lipoprotéines possèdent, à leur surface, des apolipoprotéines de différentes natures assurant chacune des fonctions spécifiques (c.-à-d. assemblage des lipoprotéines et stabilité de la particule, activation/inhibition enzymatique ou capture des lipoprotéines) [94]. Le Tableau 6 présente les caractéristiques et fonctions majeures de quelques-unes des principales apolipoprotéines retrouvées dans le plasma chez l'humain.

Tableau 5 : Propriétés des quatre grandes classes de lipoprotéines du plasma humain.

	Chylomicron	VLDL	LDL	HDL
Densité (g/ml)	<0,95	0,95–1,006	1,019–1,063	1,063–1,21
Apolipoprotéines majeures	apoB-48, apoA-I et A-IV	apoB-100	apoB-100	apoA-I et A-II
Autres apolipoprotéines		apoC-I, II, III et apoE		apoC-I, II, III et apoE
Origine	Intestin	Foie	VLDL	Foie, intestin
Fonction principale	Transport intestinal des TG/C	Transport hépatique des TG/C	Apporte le C aux cellules	Transport inverse du C
	Composition (%)			
Cholestérol (C)	3	22	50	20
Triglycérides (TG)	90	55	5	5
Phospholipides	6	15	25	25
Protéines	1	8	20	50

C, cholestérol; **HDL**, lipoprotéine de haute densité; **LDL**, lipoprotéine de faible densité; **TG**, triglycéride; **VLDL**, lipoprotéine de très faible densité. Tiré de [93, 94].

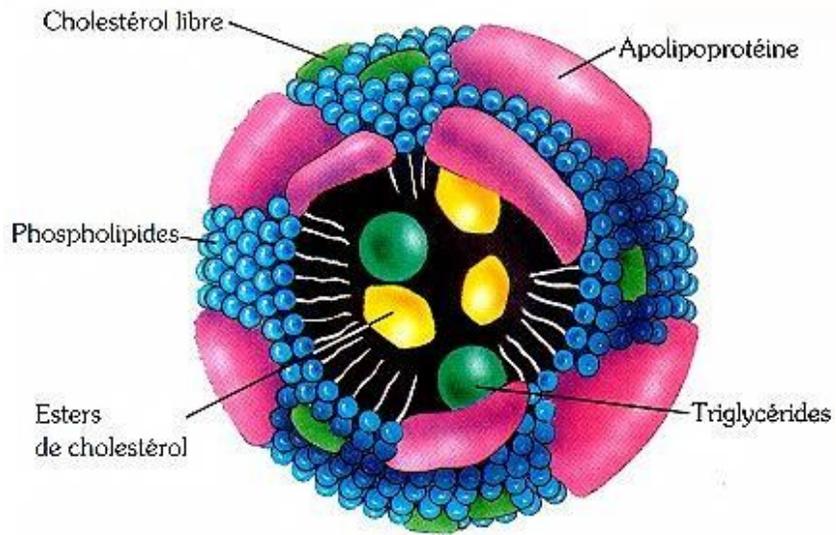


Figure 16 : Structure générale des lipoprotéines du plasma humain. [Disponible sur] : <http://www.prevention.ch/hyperlipedemie.html> (consulté le 19 octobre 2012).

Tableau 6 : Propriétés et fonctions des apolipoprotéines (Apo) majeures du plasma humain.

	Lipoprotéine (principale)	Concentration (mg/dL)	Poids moléculaire (Da)	Rôles principaux
ApoA-I	HDL	90–160	29 016	<ul style="list-style-type: none"> – Active l'enzyme LCAT – Facilite la capture des HDL (foie)
ApoA-II	HDL	25–45	17 414	<ul style="list-style-type: none"> – Inhibe l'enzyme LH
ApoA-IV	HDL	10–20	44 465	<ul style="list-style-type: none"> – Active les enzymes LCAT et LPL – Facilite la sécrétion des CM
ApoB-48	CM	0–100	240 800	<ul style="list-style-type: none"> – Aide à la sécrétion des CM (intestin) – Stabilise la structure des lipoprotéines
ApoB-100	LDL et VLDL	50–150	512 723	<ul style="list-style-type: none"> – Aide à la fixation au niveau des R-LDL – Facilite la sécrétion des VLDL (foie)
ApoC-I	CM, VLDL, HDL	5–6	6 630	<ul style="list-style-type: none"> – Inhibe la fixation de l'apoE aux R-LDL – Stimule l'enzyme LCAT – Inhibe l'enzyme CETP et les SR-B1
ApoC-II	CM, VLDL, HDL	3–5	8 900	<ul style="list-style-type: none"> – Cofacteur de l'enzyme LPL
ApoC-III	CM, VLDL, HDL	10–14	8 800	<ul style="list-style-type: none"> – Inhibe l'enzyme LPL – Inhibe la fixation de l'apoE aux R-LDL
ApoE	rCM, VLDL et HDL	2–8	34 145	<ul style="list-style-type: none"> – Aide à la fixation aux récepteurs R-LDL (affinité variable)

CETP, protéine de transfert des esters de cholestérol; **CM**, chylomicron; **HDL**, lipoprotéine de haute densité; **IDL**, lipoprotéine de densité intermédiaire; **LCAT**, lécithine-cholestérol-transférase; **LDL**, lipoprotéine de faible densité; **LH**, lipase hépatique; **LPL**, lipoprotéines lipase; **rCM**, résidu de chylomicron; **R-LDL**, récepteur LDL; **SR-B1**, récepteur HDL; **VLDL**, lipoprotéine de très faible densité. Adapté de [93, 94].

1.2.2 Les voies de régulation du cholestérol

De façon simplifiée, chez l'homme, on reconnaît trois voies principales de régulation du cholestérol : la voie endogène, la voie exogène et la voie du transport inverse du cholestérol. La voie exogène du cholestérol, ou entéro-hépatique, vise la distribution des lipides provenant de l'alimentation de l'intestin vers le foie par l'intermédiaire des particules de CM. Ensuite, la voie endogène permet la distribution des lipides vers les différents tissus par l'intervention des particules de VLDL et de LDL. Finalement, la voie du transport inverse du cholestérol permet de nettoyer les tissus de l'excès de cholestérol libre par l'action des particules de HDL. L'homéostasie du cholestérol est le résultat d'une balance très sensible entre son absorption intestinale et sa synthèse endogène principalement par l'hydroxyméthylglutaryl-Coenzyme A réductase (HMG-CoA réductase) [68]. Chacune des voies de régulation du flux de cholestérol fait intervenir une multitude d'enzymes, des transporteurs et de récepteurs spécifiques et sera donc discutée de façon simplifiée dans les prochaines sous-sections (c.-à-d. 1.2.2.1 à 1.2.2.3).

1.2.2.1 La voie exogène

La majeure partie de l'hydrolyse des lipides alimentaires débute au niveau du duodénum grâce à l'action de la lipase pancréatique, de la phospholipase A₂ et de la cholestérol-estérase [95]. Comme exposé précédemment, sous l'action des sels biliaires, des enzymes digestives et du péristaltisme, les produits de la lipolyse ainsi que les lipides non-hydrolysés, forment spontanément des agrégats solubles appelés micelles mixtes [68]. Le caractère soluble des micelles mixtes formées dans le duodénum permet au cholestérol alimentaire et endogène (c.-à-d. sous forme d'acide biliaire) de circuler malgré leur nature hautement hydrophobe. Typiquement, autour d'un tiers du cholestérol retrouvé dans le contenu intestinal est d'origine alimentaire (c.-à-d. 300 à 500 mg), principalement sous forme non-estérifiée, alors qu'autour des deux tiers proviennent de la synthèse endogène de ce dernier par les hépatocytes et les entérocytes (800 à 1200 mg de cholestérol biliaire) [95]. Sous forme de micelles mixtes, ces deux sources de cholestérol peuvent voyager à l'intérieur du contenu intestinal jusqu'à la surface des entérocytes pour y être absorbées par transport actif via des récepteurs de haute affinité (c.-à-d. les NPC1L1) [68, 70, 93]. À noter que seulement le cholestérol non-estérifiés (FC) est absorbé par les cellules intestinales et selon un taux extrêmement variable selon les individus (20–80 %) [68]. Puisqu'en surabondance le cholestérol peut être cytotoxique, l'absorption excessive de ce dernier est contrecarrée par l'action de protéines de transport (c.-à-d. les transporteurs ABCG5/G8) qui permettent de retourner le cholestérol en excès dans la lumière intestinale [93].

Au moment de l'absorption, les différents produits de la lipolyse se dissocient de la micelle mixte, traversent la couche aqueuse non-agitée et sont captés par les cellules de la muqueuse intestinale selon un rythme plus ou moins rapide en fonction de leur degré de polarité [68]. Ainsi, les acides gras libres et les 2-monoglycérides, en raison de leur plus grande polarité, sont absorbés plus rapidement et plus efficacement que les monomères de cholestérol, principalement au niveau du duodénum et de la partie proximale du jéjunum [95]. Lorsque les acides gras libres et les 2-monoglycérides sont absorbés, par diffusion passive, ces derniers sont transportés vers le réticulum endoplasmique des entérocytes par une protéine de transport (*Fatty Acid Binding Protein*, FABP). À l'intérieur des cellules de la muqueuse, ces derniers reforment des TG alors que le cholestérol libre y est quant à lui réestérifié par l'acétyl-CoA cholestérol-acyl-transférase (ACAT) [68]. L'estérification du cholestérol par la ACAT est une étape essentielle au processus d'absorption du cholestérol et expliquerait la mauvaise absorbabilité des phytostérols (voir section 1.2.3) [96].

Quoique les acides gras de courtes et de moyennes chaînes passent directement dans la circulation sanguine par la veine porte, les acides gras de longues chaînes et les CE sont assemblés, à l'intérieur des entérocytes, à l'apolipoprotéine B-48 (apoB-48), l'apoA-I et l'apoA-IV pour former des particules de CM naissante grâce, entre autres, à l'action de la protéine microsomale de transfert des triglycérides (MTP) [97]. Les particules de CM naissantes passent ensuite de la lymphe intestinale, grâce aux chylifères, à la circulation sanguine via le canal thoracique [97]. Les CM entrent dans la circulation sanguine et acquièrent de l'apoC (c.-à-d. I, II et III) et de l'apoE à la suite d'échanges avec les particules de HDL en présence pour devenir des CM matures [93]. Puisque les CM sont de trop grosses particules pour pouvoir être directement absorbées par les cellules, les TG véhiculés par ces dernières sont hydrolysés par la lipoprotéine lipase (LPL), enzyme activée par l'apoC-II des CM [97]. Ce faisant, elles libèrent, vers les cellules musculaires ou adipeuses, des acides gras libres nécessaires à la production ou au stockage d'énergie. À noter que l'apoC-III permet quant à elle une rétroaction visant à diminuer l'activité de la LPL. Les résidus de CM (rCM) résultant de l'action de la LPL, maintenant enrichis en apoE et en CE, sont rapidement captés par les cellules hépatiques via les récepteurs LDL-R ou via les récepteurs spécifiques aux rCM (LRP-R) [94]. La rapidité avec laquelle les CM deviennent des rCM est fonction du ratio d'apoC-II/apoC-III des particules de CM.

Les particules de rCM permettent d'acheminer le CE au foie afin qu'il puisse y être utilisé par l'organisme selon ses besoins. L'homéostasie du cholestérol est maintenue en contrebalançant l'absorption du cholestérol alimentaire et biliaire par une diminution de la synthèse de cholestérol endogène ainsi que de l'activité des récepteurs LDL-R. Selon les besoins de l'organisme, le cholestérol pourra être éliminé grâce aux transporteurs hépatiques ABCG5/G8, sous forme de cholestérol libre, ou encore sous forme d'acide biliaire grâce à l'action de la 7α -hydroxylase. Il pourra aussi être stocké sous forme estérifiée ou redistribué dans l'organisme grâce aux particules de VLDL (Figure 17) [93].

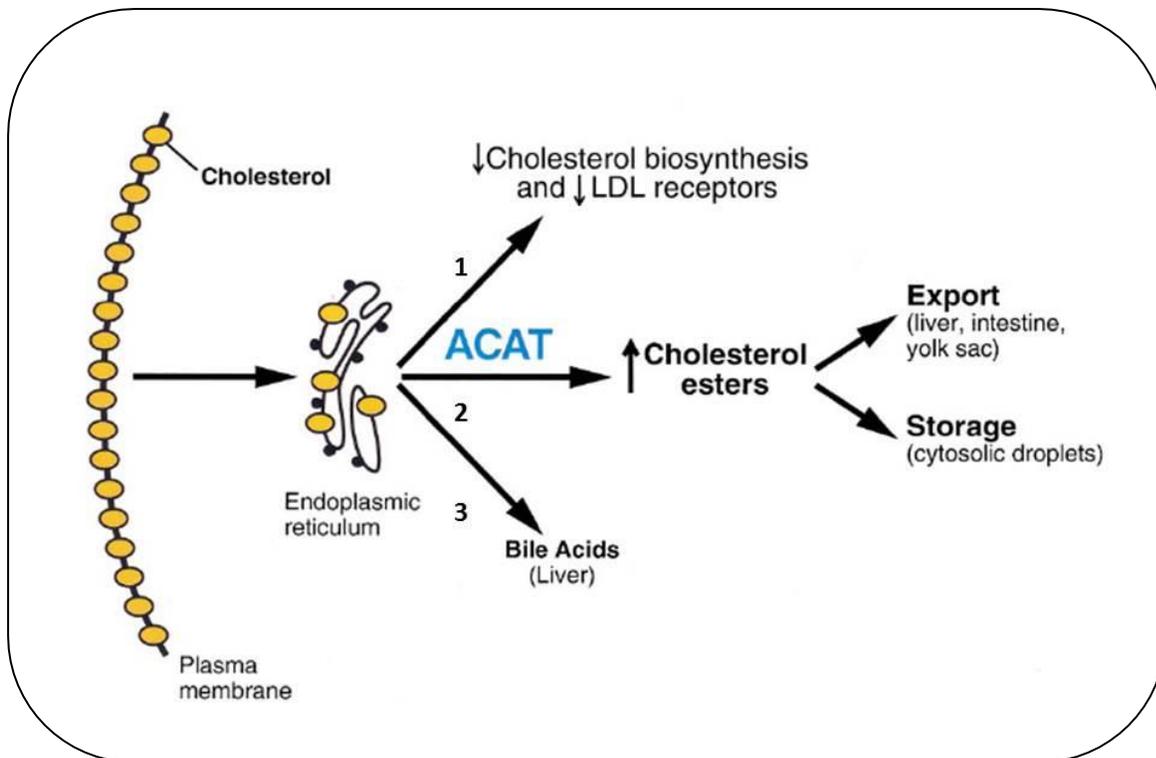


Figure 17 : Importance clé de l'enzyme acétyl-CoA cholestérol-acyl-transférase (ACAT) dans la régulation de l'absorption intestinale du cholestérol. La présence de cholestérol libre au niveau du réticulum endoplasmique des cellules provoque : 1) une diminution de la synthèse de cholestérol endogène et une diminution de l'activité des R-LDL; 2) une estérification du cholestérol par l'enzyme ACAT soit pour des fins de stockage, ou pour être exporté via l'action des lipoprotéines du sang; 3) une élimination accrue du cholestérol dans la bile. Tirée de [96].

Les particules de CM ont un temps de demi-vie très court. Ainsi, quelques heures suivant un repas, la quantité de CM en circulation est faible et les besoins en TG de l'organisme sont assurés par les lipides du foie, synthétisés ou transitant par celui-ci, grâce à la voie endogène du cholestérol. La Figure 18 illustre de façon simplifiée les différentes étapes de l'absorption intestinale du cholestérol par l'organisme.

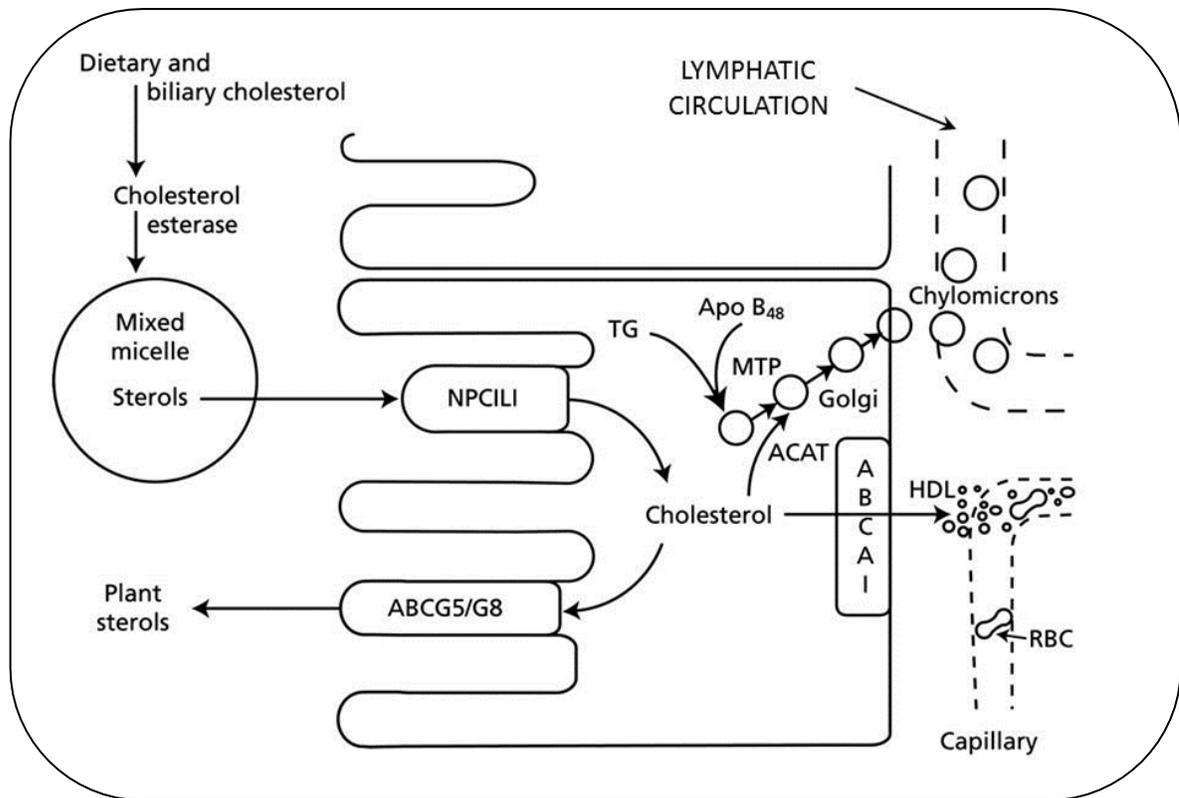


Figure 18 : Représentation schématique de l'absorption intestinale du cholestérol. **ACAT**, Acétyl-CoA Cholestérol Acyl Transférase; **ABCA1**, *ATP binding cassette A1*; **ABCG5/G8**, *ATP binding cassette G5/G8*; ApoB-48, Apolipoprotéine B-48; **HDL**, lipoprotéine de haute densité **MTP**, protéine microsomale de transfert des triglycérides; **NPC1L1**, Récepteur *Nieman-Pick C1-Like 1*; **RBC**, globule rouge; **TG**, triglycéride. Figure adaptée de [98].

1.2.2.2 La voie endogène

Le foie synthétise de façon continue des acides gras et du nouveau cholestérol afin de subvenir aux besoins des différents tissus et de maintenir l'homéostasie de ce dernier. Le foie achemine les CE et les TG endogènes vers les organes grâce à la synthèse continue de particules naissantes de VLDL porteuse d'apoB-100 et d'apoE [94]. De la même manière que les CM, les VLDL entrent dans la circulation et acquièrent de l'apoC (I, II et III) grâce aux particules de HDL pour devenir des particules de VLDL dites matures [93]. Grâce à apoC-II présente à leur surface, les particules de VLDL sont progressivement délipidées par la LPL pour former des particules de IDL. Le temps de demi-vie des particules VLDL dans la circulation est très court, soit de 30 à 60 minutes [94]. Ce sont les particules IDL qui permettent d'assurer un apport régulier en acide gras aux tissus musculaires et/ou adipeux. La grande majorité des particules IDL est captée par le foie par via les

R-LDL hépatiques. Une certaine partie des IDL est aussi hydrolysée par la lipase hépatique (HL) pour former des particules LDL, riches en CE [93]. Les particules de LDL ont un temps de demi-vie de deux à trois jours [94]. Elles sont retirées de la circulation majoritairement par l'action des cellules hépatiques grâce auxquelles leur contenu en CE est retiré de la circulation. En cas de surplus de cholestérol, ce dernier est éliminé sous forme libre par les transporteurs hépatiques ABCG5/G8 ou sous forme d'acide biliaire tel qu'expliqué précédemment. La capture des CE en provenant des particules de LDL provoque une diminution de l'activité de l'HMG-CoA réductase ainsi que des R-LDL afin de maintenir la balance du cholestérol de l'organisme. À noter qu'une certaine quantité des particules LDL est aussi captée au niveau des tissus périphériques reconnaissant l'apoB-100.

Lorsque le niveau des particules de LDL excède un certain seuil (c.-à-d. autour de 100 mg/dL), le processus d'élimination via les R-LDL est surchargé [93]. Il en résulte une accumulation de particules chargées de cholestérol dans les cellules formant l'endothélium des vaisseaux sanguins. Cette accumulation amorce la formation de plaque d'athérosclérose. En effet, ces dépôts lipidiques induisent la formation de cellules spumeuses (c.-à-d. des macrophages gorgés de particules de LDL oxydées), la migration de cellules musculaires lisses et la production de cytokines pro-inflammatoires. À long terme, cette cascade réactionnelle induit la formation de plaque d'athérosclérose instable limitant le diamètre des vaisseaux sanguins et augmentant le risque de thrombose (c.-à-d. un caillot résultant de la rupture de la plaque d'athérosclérose) [94]. Les mécanismes complexes impliqués dans la voie exogène et endogène du métabolisme des lipoprotéines sont schématisés à la Figure 19.

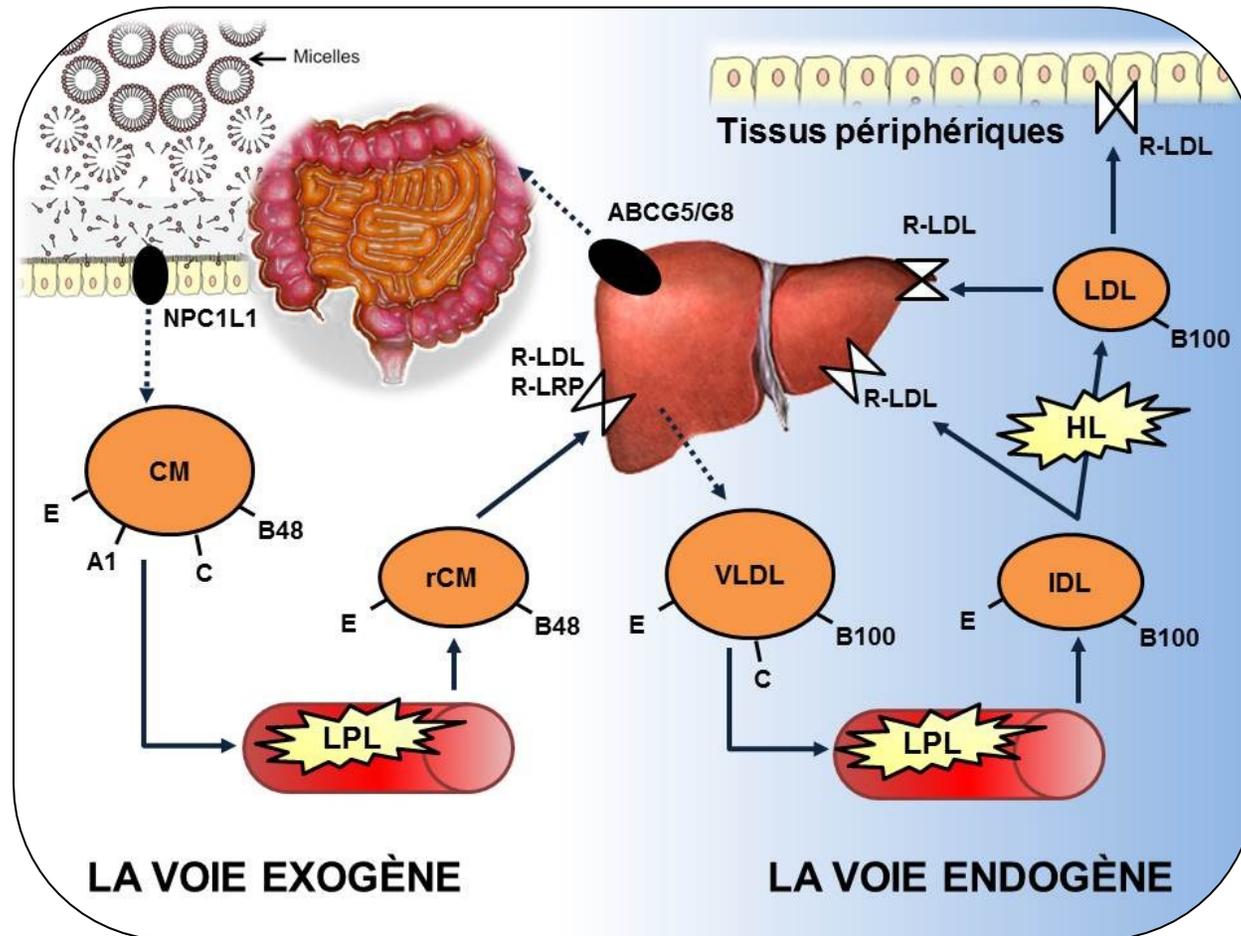


Figure 19 : Représentation simplifiée du métabolisme des lipoprotéines par la voie exogène et endogène. **ABCG5/G8**, *ATP binding cassette G5/G8*; **CM**, chylomicron; **IDL**, lipoprotéine de densité intermédiaire; **LCAT**, *lécithine-cholestérol-transférase*; **LDL**, lipoprotéine de faible densité; **LH**, lipase hépatique; **LPL**, lipoprotéines lipase; **NPC1L1**, récepteur *Nieman-Pick C1-Like 1*; **rCM**, résidu de chylomicron; **R-LDL**, récepteur LDL; **SR-B1**, récepteur HDL; **VLDL**, lipoprotéine de très faible densité. Figure inspirée de [93, 94].

1.2.2.3 Le transport inverse du cholestérol

Le rôle des particules de HDL est de nettoyer les tissus périphériques de l'excès de cholestérol et de le réacheminer vers le foie afin qu'il soit éliminé, expliquant l'importance de cette voie dans la prévention de l'athérosclérose [94]. Les particules HDL sont sécrétées soit par le foie ou par les intestins sous forme de particules naissantes porteuses d'apoA-I (c.-à-d. particules pré- β -HDL). Ces particules s'enrichissent de FC et de PL en interagissant avec les transporteurs ABCA1 à la surface des cellules des différents tissus périphériques (Figure 18) [98]. Les FC ainsi captés y sont estérifiés grâce à l'enzyme lécithine-cholestérol-transférase (LCAT), stimulée par l'apoA-I à la surface des particules de HDL, pour former de particules de HDL matures (c.-à-d. HDL₃ et HDL₂) [93].

Comme représentés à la Figure 20, les CE en excès peuvent retourner vers le foie pour y être éliminés par la bile via deux voies différentes. En effet, les CE véhiculés par les HDL peuvent être transférés aux particules riches en TG (c.-à-d. les particules de VLDL et IDL) grâce à l'action de la protéine de transfert des esters de cholestérol (CETP), et ce, en échange de TG. Les particules de HDL peuvent aussi apporter directement les CE au foie en interagissant avec des récepteurs spécifiques aux particules de HDL (c.-à-d. les SR-B1) pour ensuite être recyclées. En effet, les particules de HDL servent aussi de réservoir d'apoE et d'apoC pour les particules de CM et de VLDL tel qu'exposé précédemment [94]. À l'intérieur du foie, les CE sont hydrolysés en cholestérol libre et en acides gras libres et peuvent être éliminés directement dans la bile via les transporteurs hépatiques ABCG5/G8 ou être transformés en acide biliaire.

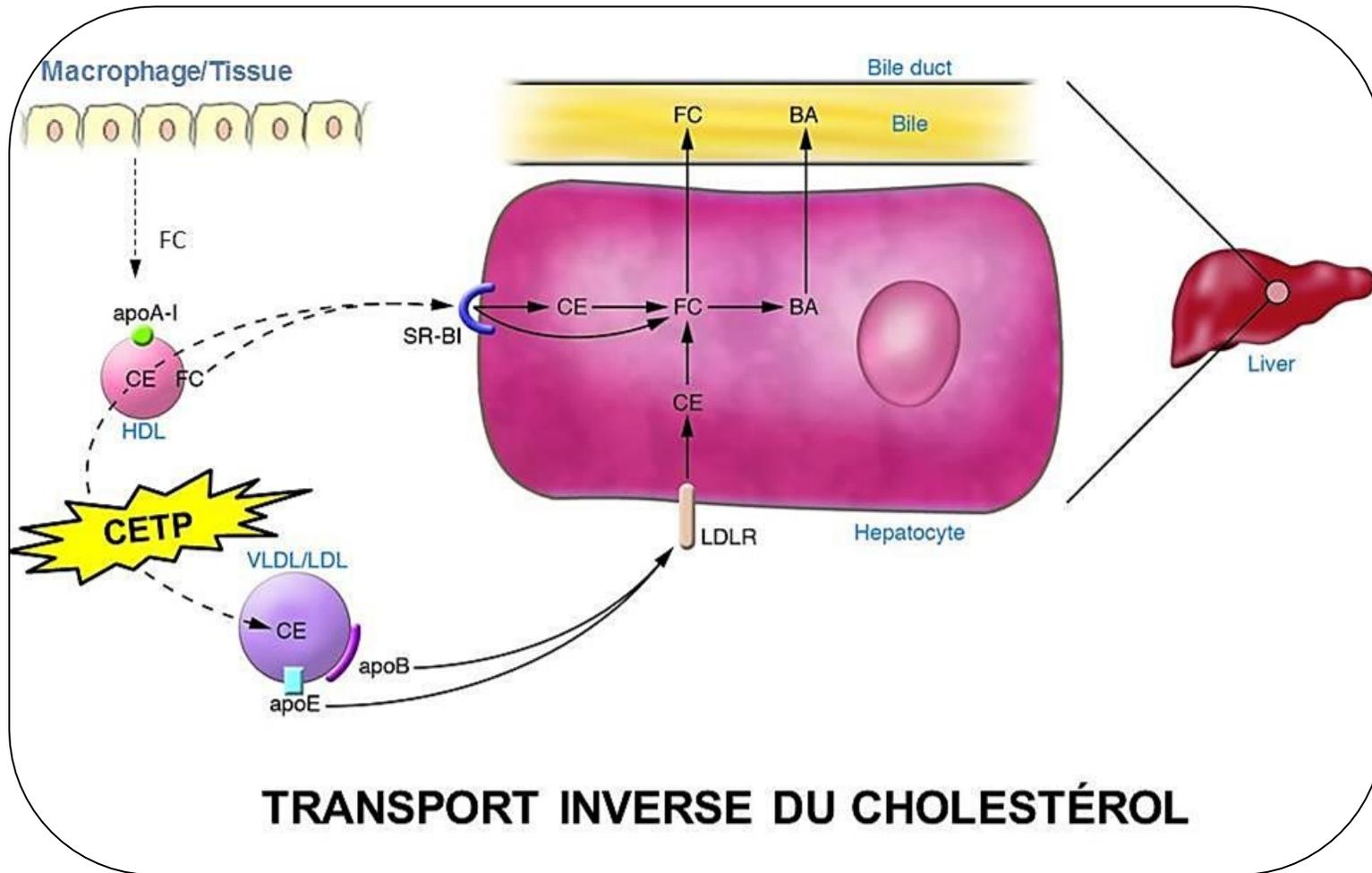


Figure 20 : Schéma simplifié de la voie du transport inverse du cholestérol. **Apo**, apolipoprotéine; **BA**, acide biliaire; **CE**, esters de cholestérol; **CETP**, protéine de transfert des esters de cholestérol; **FC**, cholestérol libre; **HDL**, lipoprotéine de haute densité; **LDL**, lipoprotéine de faible densité; **R-LDL**, récepteur LDL; **SR-B1**, récepteur HDL; **VLDL**, lipoprotéine de très faible densité. Figure tirée de [99] et adapté selon [93, 94].

1.2.3 Marqueurs d'absorption, de synthèse et de clairance du cholestérol

Les stérols sont des substances cireuses insolubles retrouvées dans les plantes, les levures, les champignons et les mollusques. Leur structure générale, telle que présentée à la Figure 21, est constituée d'un noyau stérane (c.-à-d. trois cyclohexanes et un cyclopentane reliés en eux) sur lequel vient se greffer un groupement hydroxyle. Le groupement hydroxyle, en raison de sa nature polaire, permet aux stérols de s'incorporer au niveau des bicouches lipidiques telles que les membranes cellulaires. Le stérol le plus abondant chez l'humain est le cholestérol, mais l'alimentation apporte naturellement plus de 40 autres formes de stérols [100]. Par exemple, les phytostérols retrouvés dans les plantes sont des analogues structuraux du cholestérol à l'exception de leur chaîne latérale en position C24 (Figure 21). Contrairement au cholestérol, les phytostérols ne peuvent être synthétisés par l'humain et leur présence dans l'organisme est strictement dépendante de l'alimentation [101]. Les sitostérols, les campestérols et les stigmastérols sont les phytostérols les plus abondants et leur apport quotidien est compris entre 150 et 350 mg [100]. Malgré leur analogie structurale, seulement une très faible proportion des phytostérols est absorbée en raison de la spécificité du processus d'internalisation du cholestérol. En effet, pour être absorbé adéquatement, le cholestérol doit dans un premier temps être estérifié à l'intérieur des entérocytes par la ACAT pour ensuite passer dans la circulation lymphatique sous forme de particules de CM. Or, il semble que les phytostérols soient un mauvais substrat pour cette enzyme. Ainsi, les phytostérols n'ayant pu être absorbés passent du cytoplasme vers la lumière intestinale grâce à l'action des protéines de transport ABCG5/G8. De retour dans l'intestin, ces derniers sont éliminés dans les fèces (Figure 18) [102]. À titre d'exemple, le β -sitostérol, qui représente le principal phytostérol de l'alimentation, se retrouve dans le plasma sanguin ainsi que dans les tissus à des concentrations de 800 à 1000 fois moins importantes que le cholestérol [101]. Ce dernier serait absorbé aussi pauvrement qu'à moins de 5 % [95].

Plusieurs méthodes, directes et indirectes, ont été développées dans le but d'étudier l'absorption intestinale du cholestérol. Anciennement, des isotopes radioactifs ou, plus récemment, des isotopes stables (p. ex. ^{13}C) étaient utilisés comme mesure analytique directe et précise de l'absorption du cholestérol alimentaire. Plus récemment, des méthodes mieux adaptées à l'étude chez l'humain ont été proposées et validées, telles que l'utilisation de marqueurs naturellement présents dans l'organisme à l'état de trace [103]. Ainsi, la concentration plasmatique en phytostérols a été proposée comme un moyen non invasif, peu onéreux et simple d'estimer les niveaux d'absorption du cholestérol. En effet, malgré leur faible quantité, les niveaux de phytostérols (c.-à-d. le campestérol et le β -sitostérol) se sont avérés capables de refléter de façon significative l'absorption intestinale du cholestérol [103]. Les mêmes auteurs ont proposé l'utilisation des niveaux plasmatiques de stérols précurseurs du cholestérol comme une façon simple d'évaluer la synthèse de ce dernier. Ainsi, les niveaux de lathostérol, un précurseur de la synthèse du cholestérol, ont démontré leur

capacité à refléter significativement la synthèse de ce dernier [103, 104]. En résumé, les niveaux plasmatiques de campestérol, de β -sitostérol comme ceux de lathostérol peuvent servir de marqueurs indirects de l'efficacité de l'absorption et de la synthèse du cholestérol respectivement. Le ratio des marqueurs indirects de synthèse sur ceux d'absorption s'est d'ailleurs révélé être un bon indicateur du métabolisme du cholestérol [105].

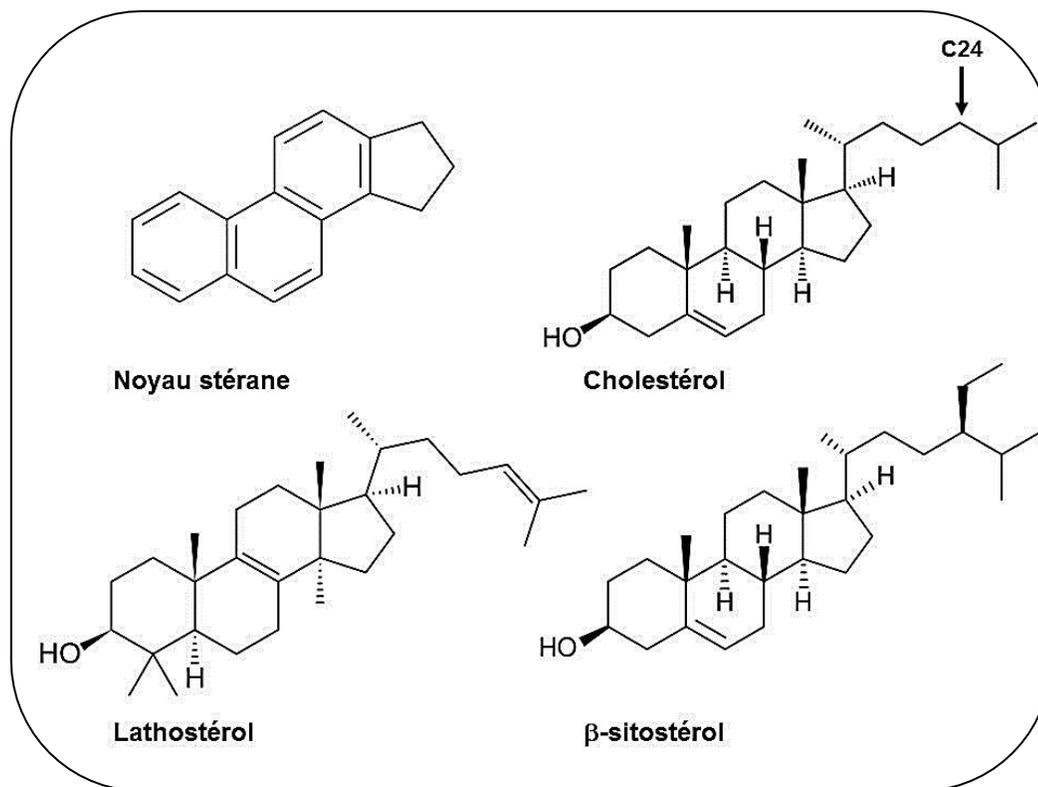


Figure 21 : Structure chimique de divers stérols retrouvés chez l'humain : le cholestérol, le lathostérol et le β -sitostérol.

Nouvellement, un autre marqueur d'intérêt du métabolisme du cholestérol a été proposé, soit les niveaux plasmatiques de proprotéines convertases PCSK9 (*Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin type 9*). Principalement synthétisée par le foie, la protéine PCSK9, membre de la famille des sérines protéases, se fixe aux R-LDL et favorise leur dégradation. Ces récepteurs, en reconnaissant la portion N-terminale de l'apoB-100 et permet de capter les CE contenus dans les lipoprotéines circulantes. Ainsi, une augmentation de la sécrétion de cette protéase provoque une dégradation accrue des R-LDL et donc une réduction de la clairance des CE véhiculés par les particules porteuses d'apoB-100. Cette diminution de clairance induit une

augmentation des quantités de cholestérol véhiculées par les particules de LDL (c.-à-d. LDL-C) [106]. La Figure 22 schématise ce qui est connu du mécanisme par lequel la PCSK9 accroît la dégradation des R-LDL. Il semble que la PCSK9 sécrétée par les cellules hépatiques puisse agir de façon endogène en favorisant la dégradation des R-LDL durant leur processus de sécrétion à même les cellules hépatiques. Elle agit aussi de façon endogène (c.-à-d. dans la circulation) en se fixant aux R-LDL des cellules hépatiques [107].

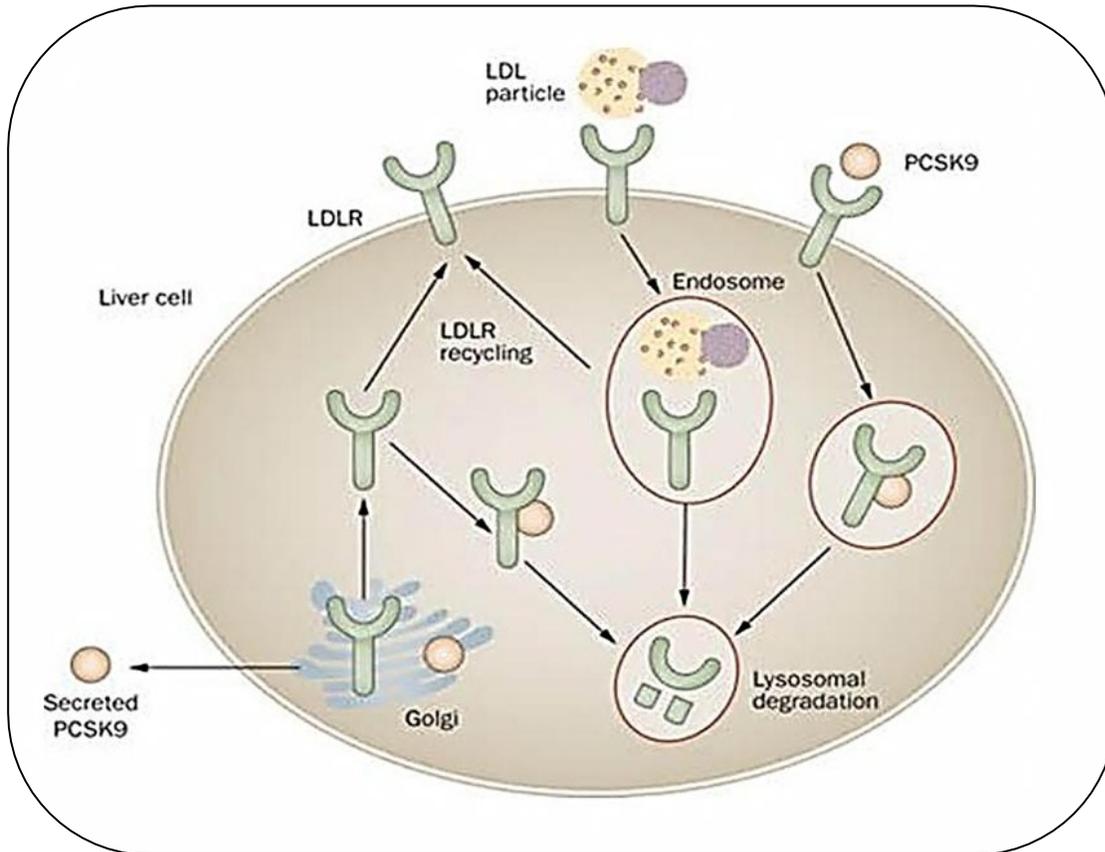


Figure 22 : Mécanisme endogène et exogène d'action de la proprotéine convertase PCSK9 sur les récepteurs de LDL des cellules hépatiques (R-LDL). Figure tirée de [107].

1.3 Lipides et maladies cardiovasculaires

1.3.1 Marqueurs de risques

La dyslipidémie constitue un des principaux risques majeurs de CVD. Celle-ci peut résulter d'un niveau trop élevé de cholestérol dans les particules de LDL (LDL-C), ou encore d'un faible niveau de cholestérol véhiculé par les particules de HDL (HDL-C) [106]. Outre ces mesures conventionnelles, différentes études cliniques ont pu démontrer que le niveau de lipoprotéines porteuses d'apoB-100 (c.-à-d. les VLDL, IDL et LDL) contribuerait au développement ainsi qu'à la progression des lésions athérosclérotiques [108]. À ce titre, elles représenteraient un marqueur beaucoup plus précis et sensible du risque d'évènements coronariens que les niveaux de LDL-C ou de cholestérol véhiculé par les particules non-HDL (c.-à-d. non-HDL-C) [109, 110]. En effet, la mesure du niveau plasmatique d'apoB (c.-à-d. l'apoB-100) permet de donner une information sur le nombre de particules présentes en circulation (c.-à-d. les VLDL, IDL et LDL) plutôt que sur la quantité de cholestérol qu'elles véhiculent. En effet, chaque particule ne possède qu'une seule molécule d'apoB permettant une évaluation précise de leur nombre. Ainsi, cette mesure a l'avantage de prendre en considération l'abondance des particules petites et denses, ces dernières étant reconnues comme les plus athérogéniques [110]. Dans le même ordre d'idée, selon Ingelsson et coll. [111], les rapports de cholestérol total sur HDL-C (c.-à-d. total-C/HDL-C) ou encore celui de LDL-C/HDL-C prédirait de façon aussi efficace le risque de CVD que les mesures des niveaux plasmatiques d'apoB et d'apoA-I (c.-à-d. l'apolipoprotéine retrouvée sur les HDL). De plus, puisque l'oxydation des particules de LDL en raison du stress oxydatif et de l'inflammation joue un rôle prépondérant dans le développement des CVD comme discuté au point 1.2.2.2 [112], la mesure du niveau plasmatique de certains marqueurs d'inflammation comme celui de la protéine C-réactive (CRP) s'est avérée capable de prédire les risques de CVD chez certains groupes de patients. Quoiqu'une réduction des niveaux plasmatiques de CRP ne soit pas directement associée à une diminution du risque de CVD, cette mesure peut s'avérer un outil permettant de mieux évaluer les risques et d'ajuster les méthodes préventives chez les patients à risque intermédiaire [93].

Par contre, malgré les différentes mesures discutées dans le dernier paragraphe, l'ensemble solide et incontestable de données cliniques confirmant l'impact positif d'une réduction des taux plasmatiques du C-LDL dans la prévention et traitement de l'athérosclérose en font la cible principale des interventions thérapeutiques [113]. Ainsi, une réduction du nombre de LDL-C reste la cible de référence pour le diagnostic et le traitement de la dyslipidémie dans la prévention des CVD chez l'adulte.

1.3.2 Facteurs alimentaires pouvant influencer la cholestérolémie

Quoique le cholestérol alimentaire ne participe qu'à 10 % de la cholestérolémie d'un individu, une absorption supplémentaire de cholestérol est reconnue comme capable d'élever le niveau de total-C chez plusieurs individus [71, 95]. D'ailleurs, en inhibant en quasi-totalité l'absorption intestinale de cholestérol lors d'une intervention clinique, il s'est avéré possible de diminuer les niveaux plasmatiques de total-C et de LDL-C de 36–37 %, soit de façon comparable aux inhibiteurs de la HMG-CoA réductase (c.-à-d. les statines) [114].

Il existe maintenant une multitude d'évidences supportant l'impact d'une réduction de l'absorption intestinale du cholestérol par le biais de l'alimentation sur ses niveaux plasmatiques. D'ailleurs, un mode de vie sain ainsi qu'une bonne alimentation restent le fondement même des interventions cliniques de prévention, et ce, malgré toutes les avancées faites en préventions et dans le traitement des CVD [115]. Parmi les facteurs alimentaires pouvant affecter la cholestérolémie, les phytostérols sont parmi les plus étudiés.

Bien que leur mécanisme d'action ne soit pas encore totalement élucidé, l'hypothèse la plus plausible repose sur leur capacité à réduire l'absorption intestinale du cholestérol alimentaire et endogène (c.-à-d. l'acide biliaire) en déplaçant de façon compétitive ce dernier des micelles mixtes [93, 101]. Puisque les phytostérols sont plus polaires que le cholestérol, l'affinité de ces derniers pour les micelles est supérieure. Ainsi, c'est potentiellement en diminuant la solubilité du cholestérol sous forme micellaire que les phytostérols engendrent une diminution du total-C et du LDL-C en circulation sans effet apparent sur les niveaux de TG et de HDL-C [116]. Plusieurs facteurs viennent influencer la réponse interindividuelle face à la consommation de phytostérols tels que la nature de la matrice alimentaire dans laquelle ils sont incorporés, la fréquence de leur administration et la dose administrée. Par contre, aux doses quotidiennes recommandées (c.-à-d. 2 à 3 g/jour) et combiné à une saine diète, une diminution moyenne de 4 à 11 % du cholestérol total et de 7 à 15 % des LDL-C est généralement observée chez l'humain [101].

De la même façon que les phytostérols, certaines molécules alimentaires présentant une forte affinité pour le cholestérol ont la capacité de limiter son absorption en diminuant sa solubilité sous forme micellaire. À ce titre, comme exposé précédemment (sous-section 1.1.5.2), la SM retrouvée en grande quantité dans la MFGM possède la capacité de fixer fermement le cholestérol sur une grande portion du petit intestin [71]. Les très longues chaînes saturées de la SM seraient un facteur critique expliquant les fortes interactions préférentielles créées avec le cholestérol [72]. Pourtant, jusqu'à présent, peu d'études cliniques contrôlées se sont concentrées sur l'impact bien particulier des SM de la MFGM du babeurre sur l'absorption du cholestérol.

1.4 L'hypertension artérielle

Selon des statistiques récentes, un peu plus de 33 % de la population américaine adulte âgée de plus de 20 ans serait atteinte d'hypertension (c.-à-d. pression artérielle systolique (SBP) >140 mm Hg ou pression artérielle diastolique (DBP) >90 mm Hg). Chez la population canadienne, l'incidence d'hypertension serait un peu moins élevée avec 19 %. De plus, il semble qu'un peu plus de 37 % des Américains et de 20 % des Canadiens âgés de plus de 20 ans souffrent de préhypertension (c.-à-d. SBP comprise entre 120–139 mm Hg ou DBP comprise entre 80–89 mm Hg) [117, 118]. Dans plus de 90 % des cas, cette hypertension est dite essentielle (c.-à-d. sans cause précisément identifiée) et associée de près à des déficiences au niveau du style de vie ou de l'alimentation [119]. Il semble que l'hypertension artérielle soit le facteur de risque de CVD le plus facilement modifiable par l'alimentation [120].

1.4.1 Voie de régulation de l'hypertension artérielle

Les effets antihypertensifs d'hydrolysats de β -LG et α -LA ainsi que des CN (c.-à-d. les α_{s1} , α_{s2} , β , κ et γ) ont fait l'objet d'une multitude de publications et ont démontré leur potentiel à inhiber des enzymes clés de la régularisation de la pression sanguine périphérique [73, 121-123]. En effet, la pression artérielle est régulée par divers systèmes métaboliques parmi lesquels le système rénine-angiotensine-aldostérone (RAS) semble être un des mécanismes prédominants de régulation de la pression sanguine [119]. De façon simplifiée, comme présenté à la Figure 23, ce système endocrinien et enzymatique de régulation débute par la sécrétion hépatique d'angiotensinogène. Voyageant dans la circulation sanguine jusqu'aux reins, cette dernière y est clivée par la rénine pour former de l'angiotensine-I, un décapeptide. À son tour, ce peptide inactif est hydrolysé par l'enzyme ACE (c.-à-d. *Angiotensin I-Converting Enzyme*) afin de produire un octapeptide vasoconstricteur, l'angiotensine II [61]. En plus d'avoir un effet de vasoconstriction directement au niveau de la paroi des artéioles, cette dernière stimule la production rénale d'aldostérone. Cette hormone minéralocorticoïde contribue à l'accroissement de la pression artérielle en entraînant une absorption accrue de sodium et d'eau au niveau des tubules rénaux [119].

Dans ce système schématisé à la Figure 23, on considère l'existence de deux étapes limitantes et donc, de deux cibles d'action possible pour les peptides hypotenseurs. En effet, ces derniers peuvent inactiver la conversion de l'angiotensinogène en angiotensine-I, empêchant ainsi la cascade de réactions menant à l'augmentation de la pression artérielle. Les peptides hypotenseurs peuvent aussi inhiber l'enzyme ACE responsable de la conversion de l'angiotensine-I en angiotensine II et de l'inhibition de la bradykinine, un

nanopeptide vasodilatateur important [61]. D'ailleurs, la grande majorité des peptides antihypertensifs ont pour cible d'action l'inhibition de l'enzyme ACE [121]. Par contre, il est important de noter qu'une proportion substantielle de l'angiotensinogène et de l'angiotensine-I sont converties en angiotensine II par des voies alternatives n'impliquant pas l'enzyme ACE [124]. Ainsi, quoique les inhibiteurs de cette enzyme soient l'objet de la plupart des publications au sujet des peptides antihypertensifs, l'inhibition directe de la rénine a été proposée comme une cible plus efficace du contrôle de la tension artérielle [124].

Outre les différentes mesures généralement utilisées pour mesurer l'activité de l'enzyme ACE, récemment, la mesure des niveaux circulants de cette enzyme s'est avérée fortement corrélée à son activité [125]. Lors de cette même étude, les auteurs ont rapporté que les niveaux plasmatiques de l'enzyme ACE augmentaient significativement avec le nombre de facteurs de risque de CVD. En ce sens, la mesure des niveaux plasmatiques de l'enzyme ACE représente une façon simple d'évaluer l'activité inhibitrice de peptides alimentaires.

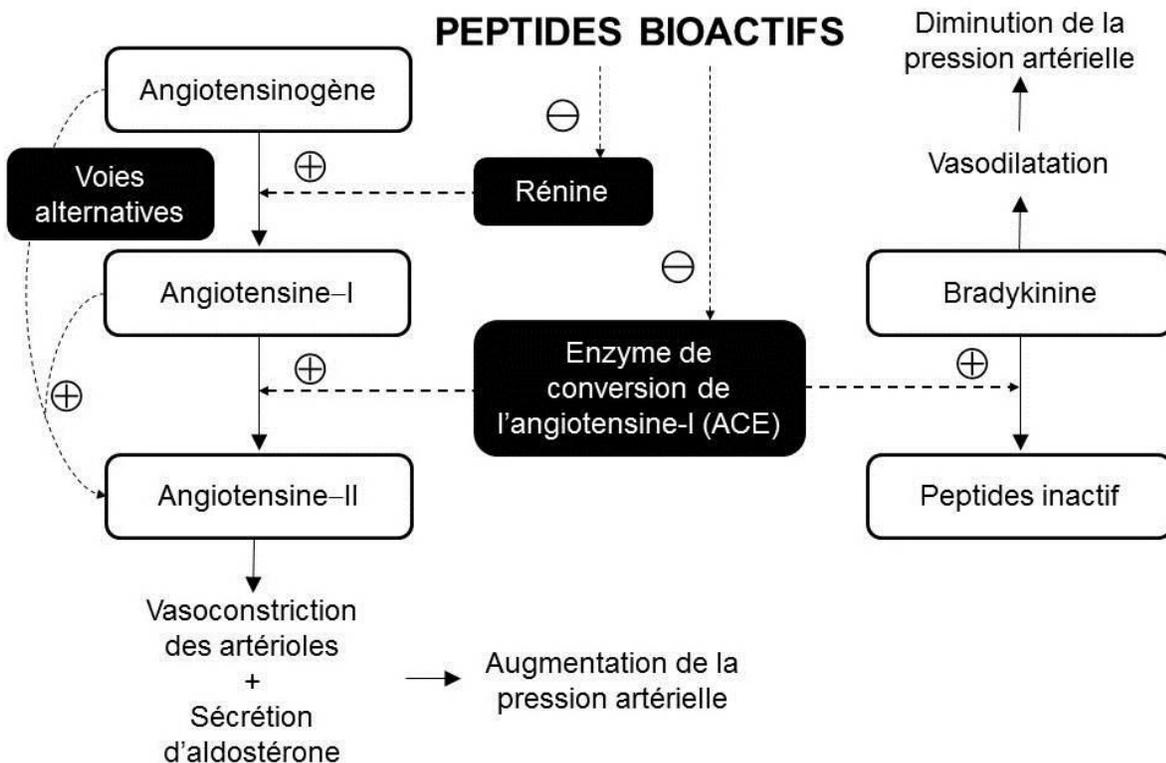


Figure 23 : Schématisation du système rénine-angiotensine-aldostérone (RAS) et bradykinine illustrant les cibles pour les peptides antihypertensifs. Figure inspirée de [126].

1.4.2 Les peptides des protéines majeures du lait et l'hypertension

Les protéines majeures du lait sont reconnues pour être une bonne source de peptides inhibiteurs de l'enzyme ACE ainsi que de peptides hypotenseurs. Parmi ces derniers, les plus étudiés sont certainement les peptides IPP (c.-à-d. Ile-Pro-Pro) et VPP (c.-à-d. Val-Pro-Pro) aussi connus sous le nom de lactotriptides [117]. Quoiqu'il n'existe pas de consensus quant à la structure chimique des peptides bioactifs et de leur mode d'action sur l'enzyme ACE, il semble que les trois acides aminés présents en position C-terminale de ces peptides bioactifs soient principalement responsables de l'activité d'inhibition; possiblement en se fixant au site actif de cette enzyme. De plus, la présence d'acides aminés hydrophobes (p. ex. des résidus Trp, Tyr, Phe et Pro) en position C-terminale, la présence d'acides aminés chargés (c.-à-d. des résidus Arg et Lys) ainsi que la petite taille des séquences peptidiques semblent tous être des facteurs associés à une activité d'inhibition de l'enzyme ACE [121].

Bien que les peptides laitiers présentant une activité inhibitrice de l'enzyme ACE aient été largement étudiés, il est important de noter que plusieurs peptides présentant cette activité inhibitrice *in vitro* n'ont aucun effet antihypertensif chez l'animal ou chez l'humain. Pour cette raison, il importe, en plus de vérifier l'activité inhibitrice de l'enzyme ACE, de confirmer les résultats *in vitro* par des mesures de tensions artérielles chez des modèles vivants. Ainsi, comme présentées de façon non exhaustive au Tableau 7, plusieurs études réalisées chez des rats spontanément hypertensifs (SHR) ont permis de démontrer le potentiel hypotenseur de peptides laitiers (c.-à-d. la capacité à diminuer la pression artérielle systolique, SBP). Par contre, il est important de considérer que les effets rapportés chez l'humain sont beaucoup plus modestes que ceux obtenus chez le SHR et souvent contradictoires [127].

En effet, dans une récente méta-analyse englobant 15 études cliniques ($n = 826$) portant sur l'impact des peptides d'origine alimentaire sur la pression sanguine, ces derniers se sont avérés capables de réduire en moyenne de 5,13 mm Hg et de 2,42 mm Hg la SBP et la DBP, respectivement. Les auteurs ont rapporté un effet plus marqué chez les patients présentant une hypertension sévère [128]. Dans cette méta-analyse, 13 études sur 15 portaient spécifiquement sur l'impact de peptides laitiers et plus de la moitié sur l'influence des peptides VPP et IPP. Suivant une stratification sur les lactotriptides, les auteurs ont rapporté une réduction moyenne de 4,59 mm Hg et de 2,20 mm Hg de la SBP et la DBP respectivement, soit des résultats similaires à ceux obtenus par Xu et coll. [129]. En effet, lors de cette autre méta-analyse portant sur 12 études cliniques ($n = 623$), des réductions de 4,8 mm Hg et de 2,2 mm Hg pour la SBP et la DBP respectivement ont été observées. Bien que la plupart des études cliniques sur le sujet visaient à étudier l'effet hypotenseur des lactotriptides consommés sur une longue période (c.-à-d. > quatre semaines), des réductions significatives

de la SBP ont déjà été rapportées après une période aussi courte que huit heures suivant l'ingestion de lactotriptides [130].

Tableau 7 : Peptides hypotenseurs du lait bovin chez des modèles de rats SHR.

Source	Séquence peptidique	Variation de la SBP (mmHg)	Dose administrée (mg/kg de poids corporel)
Caséines :			
α_{s1} , β et κ	YP	-27,4	1
α_{s1}	TTMPLW	-13,6	100
α_{s1}	FFVAPFPEVFGK	-13	
α_{s1}	YKVPQL	-12,5	1
β	AVPYPQR	-10,0	100
β	FP	-27	8
β	VPP	-20,0 à -32,1	1,6
β	VYP	-21	8
β et κ	IPP	-15,1 à -28,3	1
β	VYPFPG	-22	8
β	KVLPVP	-32,2	1
β	FFVAPFPEVFGK	-13	100
β	IASGQP	-22,5	6,7-7,1
Protéine sérique :			
α -LA	YGLF	-17	10
β -LG	IPA	-31	8
Lactoferrine	RPYL	-18,9	10
Lactoferrine	LIWKL	-25,3	10
Lactoferrine	LNNSRAP	-15,3	10

LA, lactalbumine; **LG**, lactoglobuline. Adapté de [121, 131, 132].

Il est important de noter qu'il existe une grande variabilité entre les résultats obtenus des différentes études cliniques et donc, de la prudence s'impose lors de l'interprétation des résultats. Par exemple, Cicero et coll. [133] ont rapporté l'importance de considérer l'ethnie des sujets lors de l'analyse statistique des résultats obtenus de telles méta-analyses. En effet, dans leur étude ($n = 1691$), les auteurs ont rapporté des réductions bien plus modestes après une moyenne de sept semaines chez les Caucasiens (c.-à-d. -1,17 mm Hg pour la SBP) lorsque comparées aux sujets asiatiques (c.-à-d. -6,93 mm Hg pour la SBP). De plus, les auteurs n'ont rapporté aucune influence de la pression artérielle de départ (c.-à-d. une pression normale, légèrement élevée

ou élevée) ni de la durée d'administration des lactotriptides sur les réductions enregistrées. Ces observations sont en contradiction avec les résultats obtenus des méta-analyses de Xu et coll. [129] et celle de Boelsma et coll. [134]. En effet, ces dernières rapportent un accroissement des réductions observées selon la durée, atteignant un maximum après 8–12 semaines, ainsi qu'une réduction plus importante chez les sujets hypertendus. On observe aussi de grandes variations au niveau des effets hypotenseurs rapportés dans la littérature, allant de l'absence de réduction significative à des réductions aussi importantes que 16 mm Hg pour la SBP [127].

De plus, il n'existe aucune certitude concernant les mécanismes exacts derrière l'effet hypotenseur des lactotriptides. Même si l'inhibition de l'enzyme ACE a souvent été proposée comme principal mécanisme d'action de ces peptides laitiers, aucun résultat concluant ne permet de confirmer cette hypothèse de façon solide jusqu'à présent [127]. D'autres mécanismes d'action tels que la présence de peptides opioïdes provoquant une relaxation directe des muscles lisses vasculaires ont été proposés. De plus, la présence de peptides affectant le relargage de substances vasoactives (c.-à-d. la bradikinine, l'oxyde nitrique, l'endothéline, les eicosanoïdes, etc.) et la présence de peptides antioxydants ont aussi été soulevées comme mécanismes potentiels dans la littérature [134-136]. Récemment, la consommation d'un lait fermenté enrichi en lactotriptide s'est avérée capable non seulement de diminuer la SBP de 16 mm Hg, mais aussi d'améliorer les dysfonctions endothéliales liées à l'hypertension en accroissant la sensibilité aux vasodilatateurs chez des rats SHR [137].

En outre, quoique l'effet hypotenseur provoqué par les peptides alimentaires soit souvent limité, par exemple entre 5–10 mm Hg pour la SBP et la DPB selon Chen et coll. [138], il semble que toute réduction, aussi petite soit-elle, est importante [137]. En effet, des réductions de la SBP et de la DPB de l'ordre de 9 mm Hg et de 5 mm Hg respectivement, permettraient de réduire le risque de cardiopathies coronariennes (CHD) de 20–25 % et celui d'accident vasculaire cérébral de 35–40 % [120]. Par contre, jusqu'à présent, aucune étude clinique portant sur les lactotriptides n'a pu démontrer d'effet significatif chez les sujets normotendus.

1.5 Oxydation, stress oxydatif et antioxydants

L'oxydation est un mécanisme par lequel des radicaux libres, plus spécifiquement les espèces oxygénées réactives (ROS), sont formés en réaction avec l'oxygène, ce dernier venant arracher un électron à la substance oxydée. Le métabolisme normal de toute cellule d'organismes vivants en présence d'oxygène produit des ROS [139]. Ces radicaux libres sont des substances qui contiennent un ou plusieurs électrons non-appariés, les rendant instables et très réactifs (Figure 24) [140]. Les ROS sont produits en cascade

suivant la formation initiale d'anions superoxydes ($O_2^{\cdot-}$), lesquels réagissent ensuite pour former des ROS secondaires tels que le radical hydroxyle ($\cdot OH$) et le radical peroxyde ($ROO\cdot$). Puisque les ROS produisent un stress au niveau cellulaire et que le stress génère à son tour des radicaux libres, l'organisme possède des mécanismes de défense lui permettant de retirer rapidement ces radicaux instables. Ainsi, des enzymes telles que la catalase, la superoxyde dismutase, la glutathion réductase et peroxydase, l'ascorbate peroxydase ou encore le glutathion réduit (GSH), le sélénium et les vitamines C et E présentes dans l'organisme servent de molécules antioxydantes endogènes. Ces dernières permettent d'inactiver les oxydants en présence grâce à la formation de produits biologiquement inertes [84, 140].

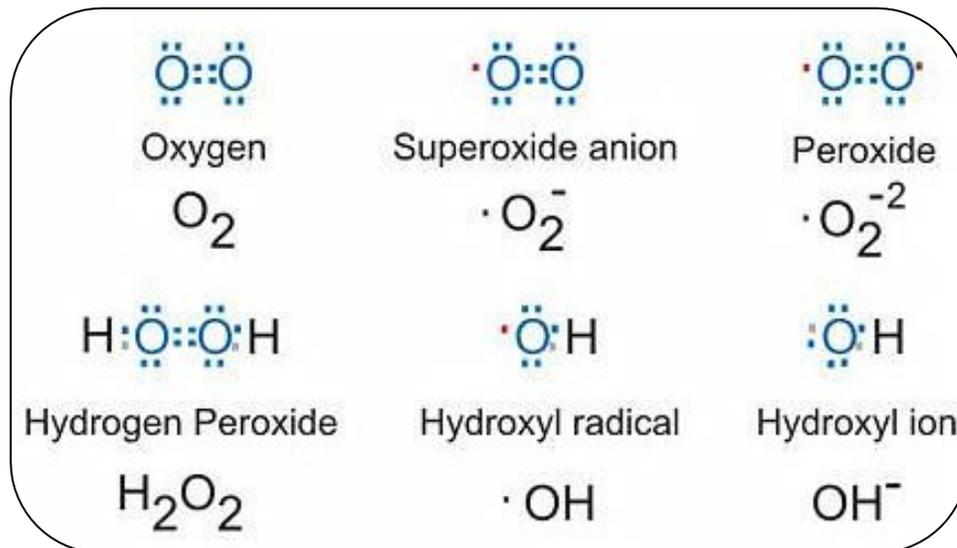


Figure 24 : Illustration de différentes espèces oxygénées réactives (ROS) communes. [Disponible sur] : <http://www.biotek.com/resources/articles/reactive-oxygen-species.html> (consulté le 19 octobre 2012).

Le stress oxydatif peut se définir comme un état où les capacités antioxydantes naturelles des cellules (c.-à-d. les antioxydants endogènes présents dans l'organisme) sont surpassées par la présence excessive de ROS. Ainsi, le stress oxydatif se manifeste lorsque les radicaux libres sont produits à un niveau plus important que ne peuvent les neutraliser les cellules [140]. Les ROS peuvent alors s'attaquer aux protéines, aux lipides ainsi qu'à l'ADN des cellules causant divers dommages. Le stress oxydatif est reconnu comme un facteur physiologique favorisant le développement de maladies chroniques et dégénératives [141]. Par exemple, les

radicaux libres produits par les macrophages lors du processus de formation de la plaque d'athérosclérose favorisent l'inflammation, la formation de cellules spumeuses et la formation de plaque instable comme discuté précédemment (c.-à-d. la sous-section 1.2.2.2).

1.5.1 Méthode de mesure de la capacité antioxydante *in vitro*

En raison de la complexité des matrices alimentaires, de la difficulté à mesurer la capacité antioxydante de leurs constituants de façon isolée et considérant les multiples interactions possibles entre eux, les méthodes visant à mesurer la capacité antioxydante totale (TAC) sont de plus en plus utilisées [142]. Ainsi, plusieurs méthodes visant à mesurer la TAC des aliments sont maintenant disponibles et largement discutées dans la littérature [142-148]. Parmi les méthodes les plus utilisées, on retrouve la méthode TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*), la méthode TRAP (*Total Radical Absorption Potentials*), la méthode FRAP (*Ferric Reducing/Antioxidant Power*) et la méthode ORAC (*Oxygen Radical Absorption Capacity*). Toutes ces méthodes peuvent être classées en deux catégories distinctes : les méthodes se basant sur les réactions impliquant le transfert d'atomes d'hydrogène (c.-à-d. ORAC et TRAP) et celles se basant sur les réactions impliquant le transfert d'électrons (c.-à-d. TEAC et FRAP) [149]. Les méthodes de la première catégorie sont basées sur la réaction de compétition entre un antioxydant et un substrat oxydable servant de sonde. Elles utilisent une molécule synthétique afin de générer des radicaux libres *in vitro* (Figure 25 : équation 1 et 2) [142, 149]. La deuxième classe est plutôt basée sur l'efficacité d'inhibition d'un antioxydant lors d'une réaction de réduction avec un oxydant telle que le Fe (III). Dans ces méthodes, l'oxydant sert aussi de sonde permettant de suivre la réponse par un changement de coloration (Figure 25 : équation 3) [142, 149].

Toutes les méthodes de mesure de la TAC ici discutées visent à mesurer la capacité d'un antioxydant à neutraliser des radicaux libres (c.-à-d. la *scavenging ability*). Puisque chacune d'entre elles utilise une source de radicaux et une mécanistique bien précises, il est simpliste d'affirmer que ces méthodes mesurent la réelle TAC. En effet, les réactions d'oxydation impliquent plusieurs types de radicaux (c.-à-d. les $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2\cdot^-$, $\text{ONOO}\cdot$, etc.) ainsi que différents mécanismes d'actions [149]. Par contre, les méthodes se basant sur l'action de radicaux peroxydes (c.-à-d. les $\text{ROO}\cdot$) sont les plus représentatives des réactions physiologiques puisque ces derniers représentent la principale source de radicaux au niveau du corps humain.

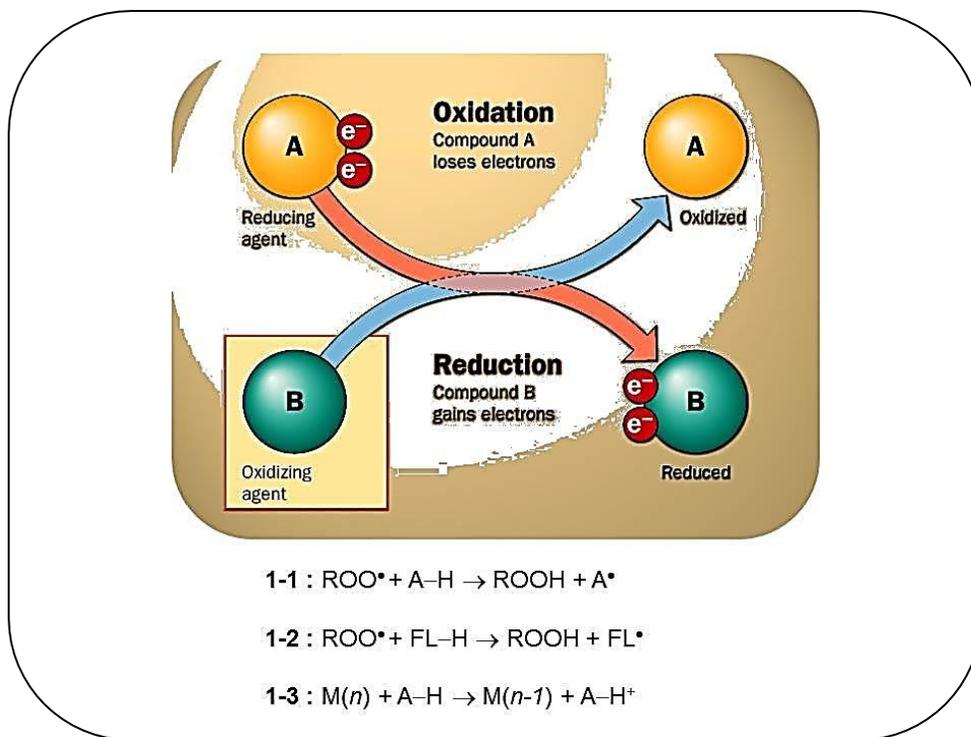


Figure 25 : Équations des réactions antioxydantes. A–H, antioxydant, FL–H, substrat oxydable et sonde; M(n), oxydant métallique. [Disponible sur] : <http://bhavanajagat.com/tag/oxidation-reduction-or-redox-reactions> (consulté le 11 novembre 2012).

Même si ces méthodes sont utiles pour comparer la TAC de différents aliments, il est important de noter qu'elles ne sont pas nécessairement représentatives des réactions se produisant au niveau du corps humain. De plus, ces méthodes *in vitro* ne tiennent aucunement compte de la bioactivité, de l'absorption et du métabolisme des antioxydants [150]. Finalement, en considérant les divers modes d'action possible pour les antioxydants, il semble préférable de combiner différentes méthodes de mesure afin d'évaluer la capacité antioxydante *in vitro*. Le Tableau 8 présente les avantages et désavantages des méthodes de mesure de la TAC les plus utilisées.

Tableau 8 : Comparaison des différentes méthodes de mesure de la TAC.

	Avantages	Inconvénients
ORAC	<ul style="list-style-type: none"> – Utilise des radicaux peroxydes – Valeurs standardisées – Considère le degré et le temps d'inhibition des réactions avec l'antioxydant – Plus sensible que FRAP et TEAC 	<ul style="list-style-type: none"> – Variabilité – Équipement dispendieux (fluorimètre) – Réaction sensible au pH – Moins rapide que FRAP et TEAC
TRAP	<ul style="list-style-type: none"> – Utilise des radicaux peroxydes 	<ul style="list-style-type: none"> – Mesure basée seulement sur la période d'inhibition de l'antioxydant étudié – Moins sensible que la méthode ORAC
TEAC	<ul style="list-style-type: none"> – Facile d'utilisation et économique – Radicaux stables à différents pH 	<ul style="list-style-type: none"> – Variabilité – Étape supplémentaire pour générer des radicaux ABTS*+ – Radicaux sans signification biologique et instables dans le temps – Valeurs non standardisées – Mesure la capacité antioxydante à un temps donné
FRAP	<ul style="list-style-type: none"> – Bonne reproductivité – Rapide, facile d'utilisation et économique 	<ul style="list-style-type: none"> – Utilise une réaction et une mécanistique sans signification biologique (réduction ferrique) – Valeurs non standardisées – Mesure la capacité antioxydante à un temps donné

FRAP, *Ferric Reducing/Antioxidant Power*; **ORAC**, *Oxygen Radical Absorption Capacity*; **TEAC**, *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*; **TRAP**, *Total Radical Absorption Potentials*. Adapté de [142-148].

1.5.1.1 La méthode ORAC

Développée par Cao et coll. en 1993 [151], la méthode ORAC permet une mesure de la capacité antioxydante face aux réactions en chaîne d'oxydation provoquées par des radicaux peroxydes au niveau des constituants hydrophiles et lipophiles. De façon simplifiée, cette méthode mesure l'inhibition apportée par une molécule (c.-à-d. un antioxydant) contre l'oxydation de la fluorescéine par des radicaux peroxydes générés par un azo-initiateur (c.-à-d. l'AAPH). La capacité antioxydante est ensuite exprimée en utilisant l'aire sous la courbe (AUC) de cinétique de la réaction amenée jusqu'à complétion. Cette dernière est ensuite comparée à celle obtenue pour différentes concentrations d'un antioxydant standard : le Trolox (c.-à-d. un équivalent soluble de la vitamine E). Les résultats sont finalement exprimés en équivalent Trolox [149]. Cette méthode a l'avantage d'être la seule considérant la combinaison de la période de protection (c.-à-d. la *lag phase*), comme le permet la méthode TRAP, et du pourcentage d'inhibition, comme pour les méthodes TEAC et FRAP [148]. Ainsi, la méthode ORAC, en unissant la quantification utilisée par les autres méthodes en une seule valeur, s'est imposée comme la méthode de choix pour la quantification de la TAC *in vitro* [149]. De plus, cette méthode permet de mesurer la capacité antioxydante de composés purs, de matrices alimentaires complexes ainsi que de tissus animaux et d'échantillons sanguins [152]. La Figure 26 présente la façon dont est utilisée l'aire sous la courbe pour mesurer la TAC.

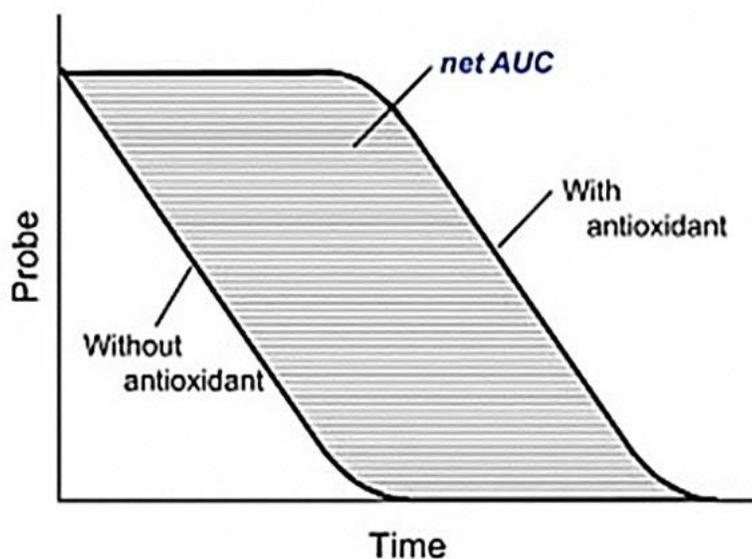


Figure 26 : Courbe de la cinétique obtenue par la méthode ORAC. La zone hachurée correspond à l'aire sous la courbe de la réaction avec et sans antioxydant. Figure tirée de [153].

1.5.2 Mécanismes d'action des antioxydants alimentaires

L'alimentation, en apportant des antioxydants d'origine exogène, permet de limiter le stress oxydatif et l'inflammation associés à diverses maladies chroniques. Ainsi, parmi les mécanismes pouvant expliquer l'effet positif des antioxydants d'origine exogène, on reconnaît la capacité de ces derniers à capter les radicaux libres présents dans le corps humain par le transfert d'électrons ou d'atome d'hydrogène (Figure 25). Ce faisant, ces antioxydants exogènes permettent de limiter les dommages au niveau cellulaire (c.-à-d. les protéines, lipides et l'ADN) [154]. La capacité de chélation d'ions métalliques, la capacité à inhiber les enzymes oxydantes ou encore la capacité à faciliter l'action d'enzymes à titre de cofacteur sont d'autres exemples de mécanismes impliqués dans les propriétés bénéfiques des antioxydants d'origine alimentaire [149].

Plusieurs hydrolysats protéiques possèdent une activité antioxydante, tout comme certains acides aminés spécifiques (p. ex. les résidus Trp, Tyr, His, Lys, Pro, Cys et Met) [84]. La nature des résidus d'acide aminé ainsi que leur position dans la séquence peptidique s'avèrent toutes deux déterminantes pour la bioactivité des peptides antioxydants. De plus, cette dernière est aussi modulée par différents facteurs qui influencent l'absorption des séquences peptidiques, tels que le poids moléculaire (p. ex. les peptides sont souvent de petite taille), l'hydrophobicité, la charge ainsi que la solubilité [76].

Ainsi, des modèles statistiques ont permis d'associer la capacité antioxydante de séquences peptidiques à une présence élevée de résidus His ainsi que de résidus d'acide aminé de nature hydrophobe (c.-à-d. les résidus Val, Ala, Leu, Ile, Met, Cys, Phe, Tyr et Trp). D'ailleurs la grande majorité des peptides ayant démontré une capacité antioxydante *in vitro* possédaient un résidu de nature hydrophobe en position N-terminale [155]. Cette caractéristique est importante pour la bioactivité des peptides puisqu'elle permet à ceux-ci d'interagir avec les membranes cellulaires, principalement de nature lipidique. Les résidus His, grâce à leur cycle imidazole, peuvent quant à eux capter les radicaux libres et chélater des ions métalliques [126]. Les résidus d'acides aminés aromatiques (c.-à-d. les résidus Phe, Tyr et Trp) s'avèrent aussi déterminants au niveau de la capacité antioxydante. En effet, grâce à la facilité avec laquelle leur anneau aromatique s'oxyde pour former des radicaux stables et peu réactifs, les résidus aromatiques permettent de rompre les réactions en chaîne d'oxydation. D'ailleurs, selon certains auteurs, les résidus Tyr et Trp seraient les deux acides aminés ayant la plus grande contribution au niveau de la capacité antioxydante de séquences peptidiques [18]. Finalement, la présence de résidus Cys, de par la capacité de leur groupement sulfhydryle à donner un atome hydrogène ainsi qu'en raison de leur implication dans la biosynthèse du GSH [126], participent aussi à la capacité antioxydante de certains peptides [156].

En résumé, il est important de comprendre que le mécanisme d'action (p. ex. la chélation d'ion métallique, le don d'atome d'hydrogène ou le transfert d'électron, l'induction de l'expression génique de protéine protectrice ou l'activation d'enzyme antioxydante) des différents peptides antioxydants retrouvés dans les aliments réside dans une combinaison complexe : des propriétés de chaque résidu d'acide aminé et leur position dans la séquence peptidique, de la polarité de chaque séquence peptidique, de leur susceptibilité à l'hydrolyse enzymatique, ainsi que leur distribution dans la matrice alimentaire [155].

1.5.3 Les peptides antioxydants des protéines majeures du lait

Plusieurs hydrolysats protéiques d'origine laitière, grâce à la présence de séquences peptidiques spécifiques, possèdent une activité antioxydante [84]. La capacité antioxydante *in vitro* des peptides laitiers provenant de fragment de l' α_1 -, la β - et la κ -CN, ainsi que de la β -Lg a été discuté dans la littérature [157] (Tableau 9). Phelan et coll. [158] ont démontré le potentiel antioxydant de huit différents hydrolysats de CN à des concentrations de 0,05% (v/v) sur des lymphocytes T humains (c.-à-d. cellule T Jurkat). Certains des hydrolysats testés exerçaient une activité antioxydante sur les cellules humaines en augmentant la teneur en GSH ainsi que l'activité de la catalase, deux molécules antioxydantes endogènes importantes à la désintoxication des cellules. Récemment, chez le rat, la consommation de 50 mg/jour de concentrés de protéines sériques (WPC) sur une période de 30 jours a permis de réduire non seulement les niveaux plasmatiques de cholestérol, mais aussi la TAC des tissus du foie lorsque comparée à un traitement contrôle [159]. Chez l'humain ($n = 21$), la consommation sur une période de 21 jours de lait de chèvre fermenté et de lait de chèvre non-fermenté (150 g) a été associée à une augmentation significative de l'activité antioxydante totale du sérum sanguin (exprimée en mmol/L de Trolox), à un accroissement des niveaux de GSH, ainsi qu'à une diminution significative des particules de LDL oxydées. Contrairement au lait non-fermenté, celui ayant subi une fermentation a permis une diminution significativement plus grande des niveaux de LDL oxydées en plus de prolonger significativement la période de protection des particules plasmatiques non-HDL contre l'oxydation par des ions cuivriques (c.-à-d. la *lag phase*). Quoique les auteurs aient principalement associé les effets observés à l'activité antioxydante de la souche probiotique utilisée (c.-à-d. *Lactobacillus fermentum* Me-3), ces derniers ont tout de même soulevé l'implication potentielle des composantes protéiques des deux breuvages dans les effets antioxydants bénéfiques observés. Ainsi, jusqu'à présent, très peu de données portant sur la capacité antioxydante des peptides laitiers *in vivo* sont disponibles dans la littérature. De plus, aucune recherche jusqu'à maintenant ne s'est intéressée au potentiel antioxydant des composantes protéiques spécifiques à la MFGM bovine.

Tableau 9 : Peptides antioxydants (*in vitro*) provenant du lait bovin.

Source	Séquence peptidique ¹
Protéine sérique :	
β -LG	WYSLAMAASDI MHIRL YVEEL LQKW LDTDYKK
Caséines :	
β	AVPYPQR VKEAMPK KVLVPVEK VLPVPEK
α_{s1}	YFYPEL FYPEL YPEL PEL EL
κ	ARHPPHLSFM
α_{s1} , β et κ	Caséinophosphopeptides

¹Le code à une lettre est utilisé pour désigner les résidus. Basé sur [79, 160-163]

CHAPITRE 2

-Problématique, hypothèse et objectifs-

2.1 Problématique

Des propriétés santé ont été associées à divers composés mineurs constituant la MFGM, dont par exemple, l'effet bénéfique des PL sur la santé cardiovasculaire. Par contre, la grande majorité des travaux réalisés jusqu'à aujourd'hui ont porté leur effort sur l'isolement et la purification des composantes de la MFGM du babeurre. Ainsi, l'impact sur la bioactivité de l'ensemble des constituants, des traitements technologiques, ainsi que celui de la digestion, restent inconnus. De plus, l'étude du potentiel clinique des composantes véhiculées par le babeurre sur la santé cardiovasculaire n'a que très peu été discutée dans la littérature, et ce, malgré toutes les connaissances disponibles concernant les bienfaits santé des constituants de la MFGM.

Le but de ce projet de recherche était donc d'évaluer le potentiel nutraceutique des constituants du babeurre, et ce, grâce à des modèles *in vitro* et clinique. Plus spécifiquement, l'objectif principal était de déterminer leur pouvoir hypocholestérolémiant, antihypertensif ainsi qu'antioxydant.

2.2 L'hypothèse générale

Le babeurre, principalement en raison de son contenu élevé en constituants de MFGM, représente une source non négligeable de molécules bioactives ayant un impact sur la santé cardiovasculaire et pouvant conserver ou exprimer leur activité à la suite du processus de digestion gastro-intestinale.

2.2.1 Hypothèses spécifiques

- Le babeurre permet de diminuer la solubilité micellaire du cholestérol, principalement en raison de son contenu en lipides polaires provenant de la MFGM.
- La consommation de babeurre permet, par son contenu en lipides polaires, d'améliorer le bilan lipidique en diminuant l'absorption intestinale du cholestérol.
- La consommation de babeurre permet, par la libération de séquences peptidiques spécifiques aux protéines de la MFGM, de diminuer la tension artérielle.

- L'hydrolyse de concentrés de babeurre permet la libération de séquences peptidiques spécifiques aux protéines de la MFGM ayant un potentiel antioxydant *in vitro* supérieur à ceux obtenus d'hydrolysats de concentrés de lactosérum et de lait écrémé.
- Les traitements technologiques (c.-à-d. séparation membranaire, traitements thermiques et homogénéisation) affectent la bioactivité des constituants du babeurre.

2.3 Objectifs spécifiques

Premier objectif

Évaluer le potentiel hypocholestérolémiant, *in vitro*, de concentrés de babeures frais obtenus de crèmes crues ou pasteurisées.

Deuxième objectif

- a) Évaluer l'influence de la consommation de babeurre sur les niveaux plasmatiques de lipides et de marqueurs de l'homéostasie du cholestérol chez des sujets présentant une hypercholestérolémie modérée.
- b) Étudier l'influence de la consommation de babeurre sur la pression artérielle ainsi que sur les niveaux plasmatiques de marqueurs biologiques du système rénine-angiotensine-aldostérone chez les sujets normotendus ayant participé à l'étude clinique présentée en a).

Troisième objectif

Étudier le potentiel antioxydant, *in vitro*, d'hydrolysats de concentrés de babeurre et de lactosérum frais.

Les quatre prochains chapitres de cette thèse, rédigés sous forme d'articles scientifiques en langue anglaise, présentent l'ensemble des travaux réalisés afin d'atteindre les trois grands objectifs de ce projet doctoral. L'ensemble des références citées dans les prochains chapitres est disponible dans la section « Bibliographie » du présent document.

-Transition contextuelle-

Le prochain chapitre décrit les travaux réalisés en vue de répondre au premier objectif de cette thèse, lequel visait à évaluer le potentiel hypocholestérolémiant, *in vitro*, de concentrés de babeurres frais obtenus de crèmes crues ou pasteurisées. Notre première hypothèse de recherche était que *le babeurre permettait de diminuer la solubilité micellaire du cholestérol, principalement en raison de son contenu en lipides polaires provenant de la MFGM*. Notre deuxième hypothèse de recherche était que *les traitements technologiques (c.-à-d. dans le cas présent, la pasteurisation et la microfiltration) affectent la bioactivité des constituants du babeurre*.

Afin de valider ces hypothèses, le potentiel hypocholestérolémiant de différentes fractions de microfiltration provenant de babeurre de crèmes crues et pasteurisées, ainsi que celui de leurs produits de digestion (*in vitro*), a été analysé par l'étude de leur potentiel d'insolubilisation du cholestérol sous forme micellaire. Ce modèle *in vitro* permet d'évaluer la capacité d'une substance à limiter l'absorption du cholestérol au niveau intestinal.

CHAPITRE 3

-Effect of cream pasteurization, microfiltration and enzymatic proteolysis on *in vitro* cholesterol-lowering activity of buttermilk solids-

Les travaux présents dans ce chapitre visaient à répondre au premier objectif de cette thèse

Les résultats présentés dans ce chapitre ont été publiés comme suit :

Conway, V., S.F. Gauthier, and Y. Pouliot.

Effect of cream pasteurization, microfiltration and enzymatic proteolysis on *in vitro* cholesterol-lowering activity
of buttermilk solids.

Dairy Science and Technology 90 (2010) 449–460.

-Résumé-

Les lipides et protéines du babeurre sont associés à différentes activités biologiques bénéfiques pour la santé. Le but de cette étude était de mesurer l'effet de la pasteurisation de la crème, de la microfiltration (MF) et de la protéolyse enzymatique sur la composition chimique et le potentiel des solides du babeurre à diminuer la solubilité micellaire du cholestérol *in vitro*. Des babeurres issus de crèmes crues ou pasteurisées ont été fractionnés à l'aide d'une membrane de 0,5 µm ou hydrolysés à l'aide de pepsine ou de pepsine suivie de trypsine. L'activité hypocholestérolémiante des produits ainsi obtenus a été mesurée en termes de solubilité micellaire du cholestérol *in vitro*. Une réduction de 57,1 % par rapport au témoin a été obtenue en présence du babeurre issu de crèmes crues, tandis que l'impact du babeurre issu de crèmes pasteurisées était plus faible (réduction de 17,0 %). Ces résultats suggèrent la présence, dans le babeurre issu de crèmes crues, de composants inhibant fortement la solubilité micellaire du cholestérol *in vitro*. Les rétentats et perméats des babeurres issus des crèmes crues ou pasteurisées ont eu des effets moins importants sur la solubilité micellaire du cholestérol. L'hydrolyse enzymatique du babeurre issu de crèmes pasteurisées a permis de rétablir, au moins en partie, l'activité hypocholestérolémiante perdue.

-Abstract-

The lipids and proteins of buttermilk solids have been associated with several potential health benefits. In this work, the effect of cream pasteurization, microfiltration (MF) and enzymatic proteolysis on the chemical composition and cholesterol-lowering activity of buttermilk solids was studied. Buttermilk was made from pasteurized or unpasteurized cream and fractionated using a 0.5- μm MF membrane or treated with pepsin or pepsin followed by trypsin. The cholesterol-lowering activity of the products obtained was measured as micellar solubility of cholesterol *in vitro*. This value was reduced significantly by 57.1 % of the control in the presence of raw-cream buttermilk, while buttermilk from pasteurized cream had a much lower impact (reduction of 17.0 %). These results suggest a strong inhibitory effect of components in raw-cream buttermilk on *in vitro* micellar solubility of cholesterol. MF retentate and permeate of buttermilks made from either cream had smaller effects on micellar solubility. Enzymatic hydrolysis of buttermilk made from pasteurized cream seemed to restore the lost cholesterol-lowering activity.

3.1 Introduction

Buttermilk is the liquid by-product resulting from the churning of cream in butter manufacture. Fragments of the milk fat globule membrane (MFGM) end up in the buttermilk along with most of the water-soluble cream components such as lactose, minerals and milk proteins. MFGM fragments are believed to be partly responsible for the distinctive characteristics of buttermilk as a functional ingredient [36]. Although its overall composition is similar to skim milk, buttermilk is known for its relatively high concentration of MFGM polar lipids. The phospholipid content of buttermilk can reach up to seven times that of whole milk [164]. Mainly composed of phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylcholine (PC), sphingomyelin (SM), phosphatidylinositol (PI), phosphatidylserine (PS), glucosylceramide (GluCer) and lactosylceramide (LacCer), MFGM phospholipids have been associated recently with numerous health benefits such as protective effects against cancer, stress, Alzheimer's disease and gastrointestinal pathogens as well as hypercholesterolaemia as reviewed in [9, 11, 12]. For example, SM, which represents approximately 25 % of the MFGM phospholipids, has been shown to reduce intestinal absorption of cholesterol in rats. Other hypotheses for the hypocholesterolaemic effects of SM are based on its strong chemical affinity for cholesterol and its incomplete digestion, giving this phospholipid the capacity to bind cholesterol throughout the small intestine [71]. Nagaoka et al. [78] have suggested that decreasing the micellar solubility of cholesterol can suppress its absorption and therefore plays an important role in hypocholesterolaemia. In spite of growing interest and knowledge regarding health benefits of MFGM components, most of the published work has focused on purified MFGM molecules and has not considered the bioactivity of MFGM fragments as a whole, for example, in complex mixtures of membrane proteins and polar lipids in a dairy matrix such as buttermilk. Moreover, the impact of different buttermilk processing technologies and enzymatic hydrolysis has not yet been studied. It is known that heat processing of cream modifies the composition and structure of MFGM to a considerable extent [12, 56]. Heat treatment denatures whey and MFGM proteins, resulting in the formation of various complexes with caseins [48, 55, 56, 165]. These heat-induced interactions are likely to modify the bioactivity and functional properties of MFGM. The objective of this work was to compare the composition and *in vitro* cholesterol-lowering activity of buttermilk solids obtained from raw and pasteurized cream and hence the potential impact of processing on their *in vivo* reduction of cholesterol micellar solubility. Buttermilk fractions obtained by microfiltration (MF) or by sequential hydrolysis with pepsin and trypsin were also examined.

3.2 Materials and methods

3.2.1 Processing conditions

Fresh raw cream was purchased from a local dairy (Natreil, QC, Canada) in 100-kg batches. Each batch was divided into two portions upon reception, one of which was pasteurized (Pasteurizer Actini, Evian-Les-Bains, France) without delay at 85 °C for 20 s and rapidly cooled to 10 °C, while the other was placed at 10 °C. Both portions were kept overnight at 10 °C and processed the following day in a rotary churn at 13 °C and 26 rpm until buttermilk was expelled. The buttermilk was passed through a stainless steel filter to remove butter particles and then skimmed at 37 °C using a milk separator (Alpha-Laval, Lund, Sweden). A sample was removed and cooled rapidly and the rest was microfiltered with co-current recirculation of permeate using a Bactocatch™ module (Tetra Pak, Lund, Sweden) containing 0.5-µm ceramic membrane (Membralox P35-37, Pall Corporation, Mississauga, ON, Canada). MF was done until the retentate volume was reduced threefold. The retentate was restored with tap water to its initial volume and re-filtered until reduced fourfold in volume (diafiltration, in effect). Pressure and temperature were maintained constant at 4 °C. All samples (buttermilk, MF permeate and retentate) were freeze dried and the recovered powders were stored frozen (−35 °C). The above processing procedure was done on four batches of cream ($n = 4$). The MF membrane was cleaned after each batch by rinsing with deionized water followed by circulation of alkaline cleaner (1.5 % (v/v) Ultrasil 25, EcoLab, St. Paul, MN, USA) containing 200 ppm of chlorine for 45 min at 75 °C. The system was then rinsed with warm deionized water (50–60 °C) until the normal water pH was reached and acid detergent (0.3 % (v/v) Ultrasil 76, EcoLab) was then circulated for 30 min at 50 °C. The system was then rinsed with deionized water until the normal water pH was reached. The cleaning procedure was repeated until the initial water flux was restored.

3.2.2 Chemical analysis

All chemical analyses were performed in triplicate. Moisture and ash contents were determined gravimetrically by drying at 100 °C for 4 h in a drying oven followed by incineration in a muffle furnace at 550 °C for 24 h. Protein content was determined by the Dumas combustion method [166] using an FP-528 Leco apparatus (Leco Corp., St. Joseph, MI, USA). The calibration standard curve was prepared using ammonium sulphate (99.99% pure, w/w, Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) and nitrogen content was converted to protein using the milk conversion factor (6.38). Differences in buttermilk MFGM protein distribution among MF retentate and permeate (pasteurized and unpasteurized) were assessed by sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) using a 12.5 % polyacrylamide gel under reducing conditions as described elsewhere [167]. Relative protein distribution in the samples was obtained by densitometry using Quantity One

software from BioRad. Individual proteins were identified using a pre-stained SDS-PAGE MW broad range standard (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, USA). The protein bands were assigned according to Mather [45]. Lipids were extracted using a gravimetric extraction method [168], then weighed and diluted in 2:1 chloroform:methanol mixture to a final lipid concentration of $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. All lipid samples were stored at $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ until further analysis. Differences in buttermilk phospholipid distribution among MF retentate and permeate (pasteurized and unpasteurized) were assessed using high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detector (HPLC-ELSD) as described by Morin et al. [169]. The various phospholipid peaks were assigned using phospholipid standards, according to the work of Rombaut and Dewettinck [10]. For comparative purpose, the relative proportion of each phospholipid was estimated by determining its individual peak area compared to the total surface area of the chromatogram.

3.2.3 Measurement of the *in vitro* micellar solubility of cholesterol

The *in vitro* micellar solubility of cholesterol in the presence of whole buttermilk solids, MF permeate, MF retentate, peptic hydrolysate and peptic/tryptic hydrolysate (see below) was measured in triplicate according to the method of Ikeda et al. [170] with some modifications. Micellar solution (10 mL) was prepared in $15 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ sodium phosphate buffer (pH 7.4) containing $6.6 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ sodium taurocholate, $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ cholesterol, $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ oleic acid, $0.65 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PC, $132 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl and 200 mg of freeze-dried sample. The mixture was sonicated at $37 \text{ }^\circ\text{C}$, incubated at the same temperature for 24 h and then centrifuged at $10\,000 \times g$ (Beckman Coulter Optima MAX ultracentrifuge, TLA 100.3 rotor, Fullerton, CA, USA) at $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Cholesterol was extracted from the supernatant using hexane after 1 h of saponification with $0.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KOH at $60 \text{ }^\circ\text{C}$ and determined using a colorimetric method with *o*-phthaldialdehyde in a mixture of acetic and sulphuric acids (2:1) as proposed by Zlatkis and Zak [171]. Absorbance was measured at 550 nm against a blank consisting of *o*-phthaldialdehyde in the same acidic mixture. Results were expressed relative to a cholesterol reference made without the 200 mg of sample.

3.2.4 *In vitro* enzymatic hydrolysis of buttermilk

The four replicate batches of buttermilk solids obtained from raw or pasteurized cream were pooled for the purpose of this experiment (to make the samples more representative). The conditions selected for peptic hydrolysis were based on the physiological parameters described in the user's manual for the TNO dynamic gastrointestinal simulator (TIM) developed by Minekus et al. [172], with some modifications. The following procedure was done in triplicate. Buttermilk solution (1000 g) was prepared at 5 % protein (w/w) in gastric salts mixture ($52 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, $15 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl, $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ CaCl₂ and $7 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaHCO₃) and stirred overnight at $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Peptic hydrolysis was then done at $37 \text{ }^\circ\text{C}$ and pH 2.0 (adjusted with $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl) for 2 h

with stirring. Porcine pepsin (EC 3.4.23.1, 2500–3500 U·mg⁻¹ protein, Sigma-Aldrich) was used at an enzyme to substrate mass ratio of 1:100. Samples were removed before and after hydrolysis. The pH was then adjusted to 8.0 with 1 mol·L⁻¹ NaOH and bovine trypsin (EC 3.4.21.4, Type I, 10 000 BAEE·U·mg⁻¹ protein, Sigma-Aldrich) was added at an enzyme to substrate mass ratio of 1:250. After 3 h of tryptic hydrolysis, the enzymes were removed using an ultrafiltration (UF) system equipped with a 30 kg·mol⁻¹ molecular weight cut-off (MWCO) polyethersulphone membrane (Prep/scale™-TFF 0.0929 m² cartridge, Millipore Corp., Bedford, MA, USA). Pressure and temperature were maintained constant at 14 MPa and 37 °C until the retentate was concentrated fivefold. Tap water (37 °C) was then added to restore the initial volume. The filtration was then continued until the retentate was re-concentrated fourfold (diafiltration). The pooled UF permeate thus represents the completed (peptic and tryptic) hydrolysis. All samples were freeze dried and kept at -35 °C until further analysis.

3.2.5 Statistical analysis

Treatment effects were subjected to two way analysis of variance using a general linear model procedure of SAS 9.1.3 Service Pack 2 software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). All values are displayed as mean ± standard error of the mean (SEM) and considered statistically different if $P < 0.05$.

3.3 Results

3.3.1 Effect of cream pasteurization and MF fractionation on buttermilk composition

The ash, protein and lipid contents of all samples, expressed as % of dry matter, are presented in Figure 27. The slightly higher ash content of MF permeate is likely due to the diafiltration step. As expected, protein and lipid contents are concentrated in MF retentate. Pasteurizing the cream had a greater impact on lipid content than on the other components: 7.4 % in buttermilk solids and 18.2 % in MF retentate, compared to 6.2 % and 13.5 %, respectively, in the corresponding products from raw cream ($P = 0.0131$). There were no significant differences between the four replicate batches of buttermilks for ash, protein or lipid contents (Table 1). MF fractionation also induced a highly significant difference ($P < 0.0001$) in protein contents and significant interactions were observed between buttermilks and MF fractions as well as between MF permeates and MF retentates. Significant interactions were also observed between heat treatment and MF fractions for ash and lipid contents but not for protein content.

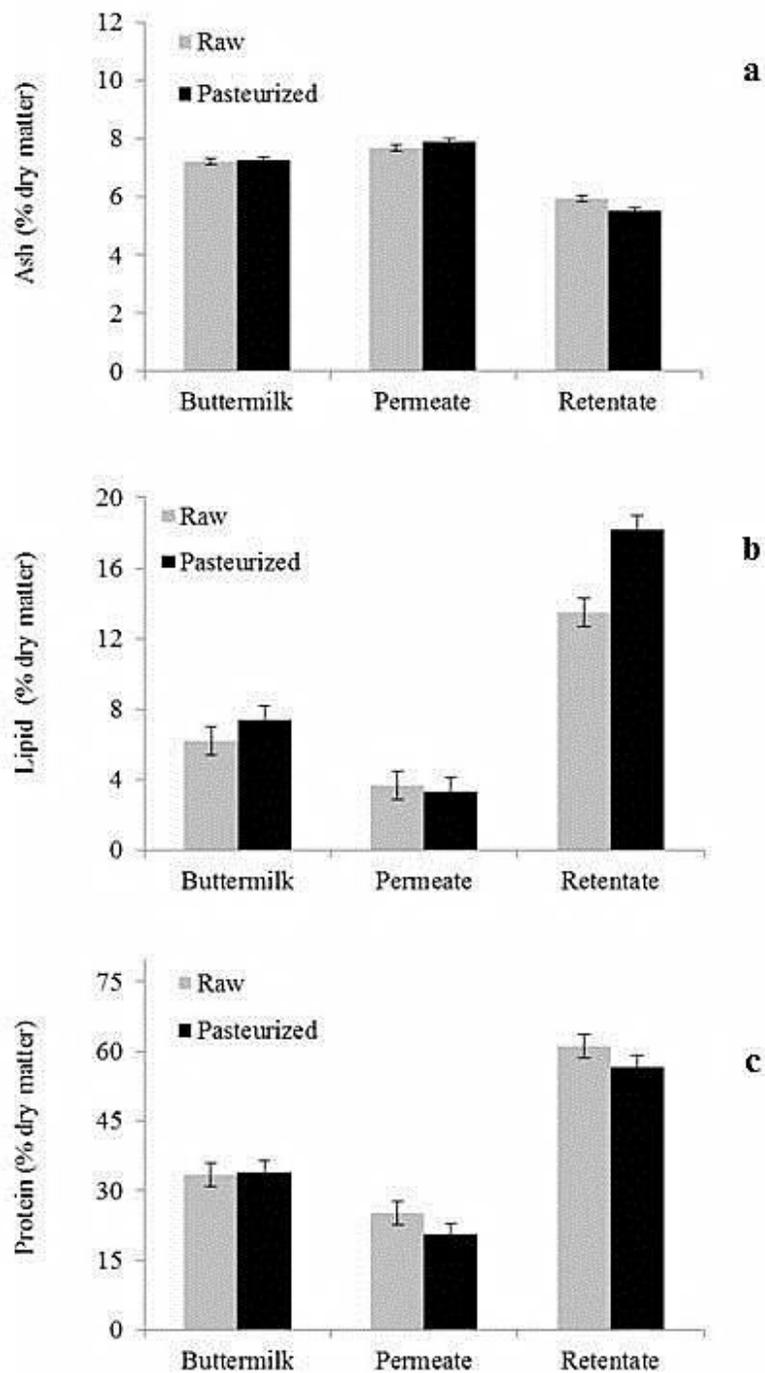


Figure 27 : Effect of cream pasteurization on the ash (a), protein (b) and lipid (c) contents (% dry matter) of buttermilk and its MF fractions (mean \pm SEM, $n = 4$).

Table 1 : Statistical significance of heat treatment (of the cream) and of microfiltration on the ash, protein and lipid contents of buttermilk.

Comparison	Significance (<i>P</i> value) ^a		
	Ash	Protein	Lipid
Replicate batches	N.S.	N.S.	N.S.
Heat treatment	N.S.	N.S.	0.0131
Fractionation (MF)	<0.0001	<0.0001	<0.0001
(Buttermilk) × (Permeate & Retentate)	<0.0001	0.0128	0.0028
(Permeate) × (Retentate)	<0.0001	<0.0001	<0.0001
(Heat treatment) × (Fractionation)	0.0023	N.S.	0.0183
(Buttermilk) × (Heat treatment) × (Permeate & Retentate)	N.S.	N.S.	N.S.
(Heat treatment) × (Permeate) × (Retentate)	0.0007	N.S.	0.0060

^a*P* values > 0.05 were considered non-significant (N.S.).

Table 2 : Relative proportions (%)^a of phospholipids^b measured in buttermilk solids obtained from raw or pasteurized cream and in the fractions obtained by microfiltration (MF permeate and MF retentate).

Fraction	GluCer	LacCer	PE	PI	PS	PC	SM
<i>From raw cream</i>							
Buttermilk	0.7	4.3	36.6	6.9	2.5	33.4	12.1
MF Permeate	0.3	9.0	29.0	6.7	1.4	37.6	11.5
MF Retentate	0.4	6.7	36.7	6.1	2.7	32.0	11.7
<i>From pasteurized cream</i>							
Buttermilk	0.6	1.6	39.9	7.1	3.6	30.7	13.0
MF Permeate	0.1	2.6	30.4	7.5	2.4	38.8	13.5
MF Retentate	0.2	1.2	33.6	7.1	2.5	32.5	13.6
SEM (<i>n</i> = 4)	0.2	0.9	1.9	0.4	0.4	1.3	0.5
Comparison	Significance (<i>P</i> value)^c						
Replicate batches	N.S.	0.0446	N.S.	0.0008	N.S.	N.S.	0.0103
Heat treatment	N.S.	<0.0001	N.S.	0.0248	N.S.	N.S.	0.0015
Fractionation (MF)	N.S.	N.S.	0.0045	N.S.	N.S.	0.0008	N.S.
– (Buttermilk) × (Permeate & Retentate)	N.S.	N.S.	0.0097	N.S.	N.S.	0.0324	N.S.
– (Permeate) × (Retentate)	N.S.	N.S.	0.0113	N.S.	N.S.	0.0005	N.S.
(Heat treatment) × (MF fractions)	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.

^aIndividual peak area relative to the total HPLC-ELSD chromatogram surface area. ^bGluCer = glucosylceramide; LacCer = lactosylceramide; PE = phosphatidylethanolamine; PI = phosphatidylinositol; PS = phosphatidylserine; PC = phosphatidylcholine; SM = sphingomyelin. ^c*P* value > 0.05 were considered non-significant (N.S.).

The phospholipid (PL) relative proportions (glycerophospholipids and sphingolipids) of samples are shown in Table 2. At 29–40 % and 32–39 %, PE and PC were the most abundant phospholipids, followed by SM (12–14 %), PI (6–8 %), LacCer (1–9 %), PS (1–4 %) and GluCer (0.1–0.7 %). Overall, PE, PC and SM accounted for more than 70 % of the buttermilk phospholipids. As shown in Table 2, the batch effect and the heat treatment effect were both significant for LacCer, PI and SM, making it difficult to reach a clear conclusion about the effect of heat treatment on these specific phospholipids. As proposed by Morin et al. [173], processing might have induced an aggregation of some phospholipids resulting in decreased solubility in extraction solvent. However, MF fractionation clearly affected the PE and PC contents significantly but in the opposite manner, PE content increasing in MF retentates, while PC increased in MF permeates, in both cases regardless of cream processing. No significant interaction between cream heat treatment and MF fractionation of the buttermilks was observed.

Figure 28 presents the SDS-PAGE pattern of the buttermilks, MF permeates and MF retentates. Five different bands were associated with MFGM proteins, three with milk caseins (α -, β - and κ -CN) and two with the major whey proteins, β -lactoglobulin (β -LG) and α -lactalbumin (α -LA). MFGM proteins were present in all six samples tested. Densitometry measurements (data not shown) revealed that the most intense MFGM bands were observed for the two MF retentates (lanes 5 and 6). The whey protein bands (β -LG and α -LA) were more intense in the MF retentate from pasteurized cream (lane 6) compared to raw cream (lane 5).

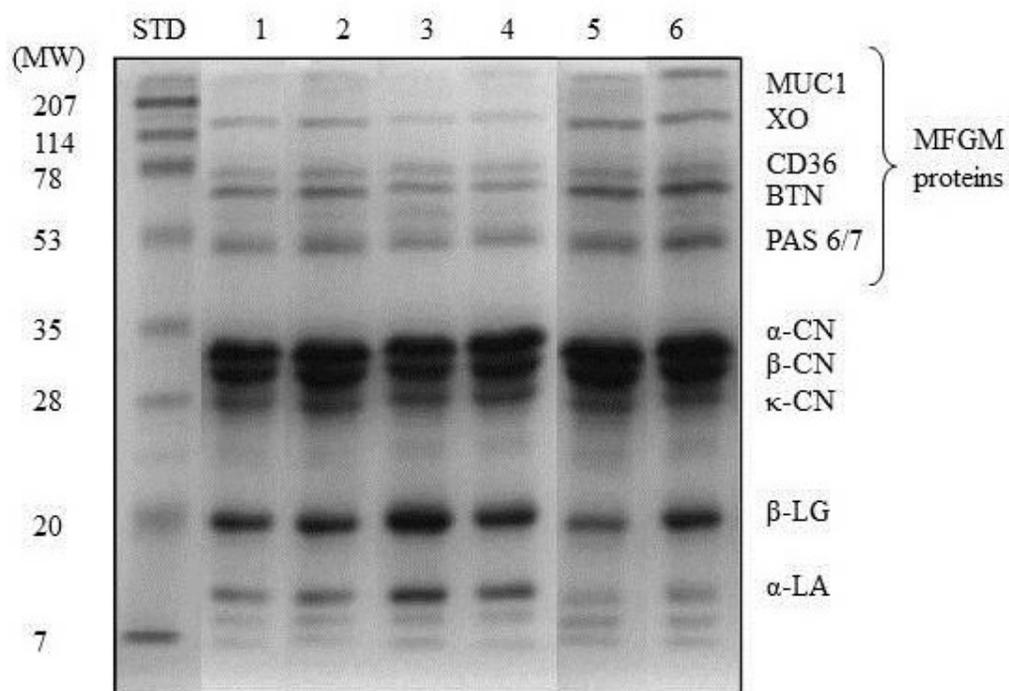


Figure 28 : SDS-PAGE (under reducing conditions) profiles of proteins in buttermilk made from raw or pasteurized cream. STD = molecular weight (MW) standard; 1 = buttermilk from raw cream; 2 = buttermilk from pasteurized cream; 3 = MF permeate (raw); 4 = MF permeate (pasteurized); 5 = MF retentate (raw); 6 = MF retentate (pasteurized). Protein bands are : MUC1 = mutin 1; XO = xanthine oxidase; CD36 = cluster of differentiation; BTN = butyrophilin; PAS 6/7 = periodic acid Schiff 6/7; α -CN = α -casein; β -CN = β -casein; κ -CN = κ -casein; β -LG = β -lactoglobulin; α -LA = α -lactalbumin.

3.3.2 Effect of cream pasteurization and MF fractionation on the *in vitro* cholesterol micellar solubility

The effects of cream pasteurization and MF fractionation on the cholesterol micellar solubility in the presence of buttermilk solids are presented in Table 3. The greatest reduction of *in vitro* cholesterol solubility (57.1 %) was obtained in the presence of buttermilk solids obtained from raw cream. Pasteurization of the cream led to a higher *in vitro* cholesterol micellar solubility (83.0 %) in the presence of buttermilk solids compared to buttermilk solids obtained from raw cream (42.9 %). MF fractionation of buttermilk from raw or pasteurized cream had the same effects. As shown in Table 3, the effect of heat treatment is highly significant ($P = 0.001$) and that of MF fractionation is also significant ($P = 0.0121$), while the significance of the interaction between

whole buttermilks and MF fractions was in between ($P = 0.0038$). No significant MF permeate \times MF retentate or heat treatment \times MF fraction interaction was observed.

Table 3 : Cholesterol micellar solubility determined *in vitro* in the presence of buttermilk solids and MF fractions made from raw or pasteurized cream.

Fraction	Cholesterol micellar solubility^a (%)
<i>From raw cream</i>	
Buttermilk	42.9
MF Permeate	73.2
MF Retentate	67.2
<i>From pasteurized cream</i>	
Buttermilk	83.0
MF Permeate	93.7
MF Retentate	93.5
SEM ($n = 4$)	3.3
Comparison	Significance (P value)^b
Replicate batches	N.S.
Heat treatment	0.0010
Fractionation (MF)	0.0121
– (Buttermilk) \times (Permeate & Retentate)	0.0038
– (Permeate) \times (Retentate)	N.S.
(Heat treatment) \times (MF fractions)	N.S.

^aRelative to micellar cholesterol solution without buttermilk product. ^b P value > 0.05 were considered non-significant (N.S.).

3.3.3 Effect of proteolysis on the cholesterol micellar solubility in the presence of buttermilk solids obtained from raw and pasteurized cream

The effects of proteolysis by pepsin and trypsin on the ability of buttermilk solids to reduce the cholesterol micellar solubility are shown in Table 4. First, a large increase in micellar solubility in the presence of nonhydrolysed buttermilk from both raw and pasteurized cream was noted in comparison with the values in Table 3. This is likely due to the use of the gastric salts mixture, which appears to have increased the solubility of cholesterol. Nevertheless, the effects of the treatments are still apparent. Pasteurization still had a negative impact on the cholesterol micellar solubility *in vitro* in non-hydrolysed buttermilk. Though no significantly (Table 4), cholesterol solubility seems to increase slightly in the presence of the product hydrolysed in the case of buttermilk from raw cream, while the reverse seems to be observed in the case of buttermilk from pasteurized cream

The fact that cream pasteurization increased the *in vitro* micellar solubility of cholesterol in the presence of the resulting buttermilk product thus appeared attenuated by enzymatic hydrolysis using gastrointestinal enzymes. A highly significant ($P = 0.0009$) interaction was observed between heat treatment and proteolysis.

Table 4 : Effect of enzymatic hydrolysis of buttermilk solids obtained from raw or pasteurized cream on the *in vitro* cholesterol micellar solubility.

Sample	Cholesterol micellar solubility^d (%)
<i>From raw cream</i>	
Non-hydrolyzed ^a	70.9
Peptic hydrolysate ^b	73.5
UF permeate ^c	84.5
<i>From pasteurized cream</i>	
Non-hydrolyzed	99.0
Peptic hydrolysate	88.8
UF permeate	82.5
SEM (<i>n</i> = 3)	2.8
Comparison	Significance (<i>P</i> value)^e
Replicate batches	N.S.
Heat treatment	<0.0001
Fractionation (MF)	N.S.
– (Buttermilk) × (Permeate & Retentate)	N.S.
– (Permeate) × (Retentate)	N.S.
(Proteolysis) × (MF fractions)	0.0009

^aFreeze-dried low-fat buttermilk in gastric salts solution before the addition of pepsin. ^bAfter 2 h of treatment with pepsin. ^cUsing 10 kg·mol⁻¹ MWCO membrane after hydrolysis with pepsin (2 h) and trypsin (3 h). ^dRelative to micellar cholesterol solution without buttermilk product. ^e*P* value > 0.05 were considered non-significant (N.S.).

3.4 Discussion

An interesting finding of this study is that significantly lower *in vitro* cholesterol micellar solubility was found in all buttermilk products obtained from raw cream compared to pasteurized ones. However, the effect of cream pasteurization on the cholesterol-lowering activity is difficult to explain in terms of product composition alone since the samples with and without pasteurization did not have the same protein and lipid compositions.

The relative proportions of the various phospholipids in the buttermilk made from raw cream are in agreement with data reported previously [10, 174]. The relative proportion of SM, known for its hypocholesterolaemic activity [7, 8, 71, 92], was increased significantly ($P = 0.0015$) in buttermilk from pasteurized cream, confirming earlier data obtained by Morin et al. [169]. However, in spite of this increase, the effect of pasteurization was to increase the *in vitro* cholesterol micellar solubility of buttermilk solids. This may be due to modifications of the MFGM composition following heat treatment. It is well known that heat induced complexes can be formed between whey proteins (β -LG and α -LA) and MFGM via thiol/disulphide interchange [12, 55, 57]. In fact, it has been reported that a new membrane can result from these new interactions and modify the functional properties of buttermilk [53]. It is possible that adsorption of such proteins interferes with cholesterol fixation by MFGM phospholipids, primarily SM, which is located on the outside of the MFGM along with PC [11]. However, the compositional data reported in the present study did not provide evidence of a direct contribution of phospholipids such as SM to the cholesterol-lowering activity of buttermilk.

Our results also provide evidence that MF fractionation decreases the cholesterol-lowering activity of buttermilk solids. Although MF retentates were enriched in total lipids and proteins (MFGM and milk proteins) compared to other samples (Figures 27 and 28), buttermilk from raw cream was significantly more effective than the corresponding MF retentate at reducing the micellar solubility of cholesterol *in vitro* (Table 3).

This phenomenon may also result from process-related alterations of the MFGM composition. It has been reported that processing steps such as mechanical agitation, pumping, stirring and homogenization indeed affect the structure and composition of the MFGM [36, 175, 176]. The limited cholesterol-lowering activity observed for fractionated buttermilk (MF permeates and MF retentates) may arise from all the recirculation involved in the MF/DF process, which can induce protein aggregation at fragmented MFGM surfaces and decrease the availability of cholesterol-binding sites.

Our results show that the pasteurized fractions recovered their cholesterol-lowering activity after the 5-h sequential digestion with pepsin and trypsin, reducing the effect of pasteurization to insignificance. This result supports the hypothesis that the negative impact of pasteurization on micellar cholesterol solubility reduction capacity of the buttermilk fractions would be due to proteins adsorbed at the surface of MFGM fragments. It

can be further hypothesized that following proteolysis by gastric and pancreatic enzymes, the cholesterol-binding sites of MFGM fragments were once again available and the cholesterol-lowering activity of the pasteurized fractions was recovered.

Comparing samples that do not have the same lipid and protein compositions and the absence of *in vivo* results may be considered as some limitation of the present study. However, this preliminary study aimed at comparing the response of various types of buttermilk fractions as such and at assessing the impact of processing on the *in vitro* cholesterol-lowering capacity of buttermilk products when exposed to the same amount of freeze-dried samples. Nevertheless, this preliminary study generated relevant data for further *in vivo* study in our laboratory.

3.5 Conclusion

Overall, our results show that buttermilk made from raw cream revealed a lower cholesterol micellar solubilization than buttermilk made from pasteurized cream, based on *in vitro* measurement. We also demonstrated that processing steps such as pasteurization or MF fractionation may limit the capacity of raw-cream buttermilk to reduce *in vitro* micellar solubility of cholesterol. Also, hydrolysis by digestive proteases was effective in reversing the negative impact of pasteurization on the cholesterol-lowering activity of buttermilk. Although *in vivo* studies will be necessary to validate the potential of buttermilk to reduce intestinal absorption of cholesterol, the results of this preliminary study point to new attributes for increasing the commercial value of buttermilk.

3.6 Acknowledgements

This work has been supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and Dairy Farmers of Canada. The authors wish to thank Johanne Marin for her technical skill in implementing the cholesterol micellar solubility measurement method.

-Transition contextuelle-

Le prochain chapitre décrit les travaux réalisés en vue de répondre à la première partie (a) du deuxième objectif de cette thèse, laquelle visait à évaluer l'influence de la consommation de babeurre sur les niveaux plasmatiques de lipides et de marqueurs de l'homéostasie du cholestérol chez des sujets présentant une hypercholestérolémie modérée. L'hypothèse posée était que *la consommation de babeurre permettait, par son contenu en lipides polaires, d'améliorer le bilan lipidique en diminuant l'absorption intestinale du cholestérol.*

Pour valider cette hypothèse de recherche, une étude randomisée en chassé-croisé à double insu a été réalisée à l'Institut sur la Nutrition et les Aliments Fonctionnels (INAF) de Québec. Lors de cette étude d'une période totale de huit semaines, 34 sujets, hommes et femmes, devaient consommer de façon aléatoire 45 g/jour de babeurre et de placebo sous forme de poudre chocolatée prête à réhydrater. Des analyses sanguines, avant et après chaque période de traitement, ont permis d'évaluer le bilan lipidique ainsi que celui de différents marqueurs indirects de l'absorption, de la synthèse et de la clairance du cholestérol, suivant la consommation de babeurre.

CHAPITRE 4

-Impact of buttermilk consumption on plasma lipids and surrogate markers of cholesterol homeostasis in men and women-

Les travaux présents dans ce chapitre visaient à répondre au deuxième objectif

Les résultats présentés dans ce chapitre ont été acceptés publication comme suit :

Conway, V., P. Couture, C. Richard, S.F. Gauthier, Y. Pouliot and B. Lamarche.

Impact of buttermilk consumption on plasma lipids and surrogate markers of cholesterol homeostasis in men and women.

Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.numecd.2013.03.003>.

-Résumé-

Contexte de recherche et But:

Les sphingolipides (SL) sont d'importants constituants de la membrane du globule de gras laitier (MFGM). Ces derniers ont démontré des propriétés hypocholestérolémiantes dans le cadre de plusieurs études *in vivo*. Par contre, des preuves cliniques de la capacité des SL à moduler la cholestérolémie restent jusqu'à aujourd'hui manquantes. Le but de cette recherche était d'étudier pour la première fois l'influence de la consommation de babeurre sur les niveaux plasmatiques de lipides et de marqueurs de l'homéostasie du cholestérol (C) chez l'humain.

Méthodes et Résultats:

Trente-quatre hommes et femmes présentant des niveaux de départ de LDL-C sériques <5,0 mmol/L (LDL-C moyen = 3,8 mmol/L) ont participé à cette étude randomisée en chassé-croisé à double insu. Les sujets ont consommé de façon aléatoire 45 g/jour de babeurre et 45 g/jour de placebo, chaque traitement s'échelonnant sur une période de quatre semaines. Les niveaux de lipides sanguins et ceux de marqueurs de l'homéostasie du cholestérol ont été mesurés à la suite de chacune des deux diètes et ont été comparés par l'utilisation de modèles mixtes pour mesures répétées. La consommation de babeurre a provoqué une diminution significative des concentrations plasmatiques de cholestérol (-3,1 %, $P = 0,019$), de LDL-C (-3,1 %, $P = 0,057$) et triglycérides (-10,7 %, $P = 0,007$). Les concentrations plasmatiques de lathostérol ont augmenté de façon significative suivant la consommation de babeurre (+12,2 %, $P = 0,001$). Toutefois, des analyses multivariées ont démontré que seuls les changements plasmatiques de β -sitostérol prédisaient de façon significative les changements de LDL-C observés à la suite de la consommation de babeurre ($P = 0,002$).

Conclusion :

Cette étude suggère que la consommation de babeurre peut réduire la cholestérolémie chez les hommes et femmes, principalement en réduisant l'absorption intestinale du cholestérol.

Cette étude clinique est enregistrée au clinicaltrials.gov comme suit : NCT01248026

-Abstract-

Background and Aims:

Sphingolipids (SL) are important components of the milk fat globule membrane (MFGM) found in buttermilk. Studies in animal models suggest that dietary SL may have cholesterol-lowering properties. Data in human are lacking. The aim of this study was to investigate the impact of buttermilk consumption on plasma lipids and surrogate markers of cholesterol (C) homeostasis in humans.

Methods and Results:

Men and women ($n = 34$) with serum LDL-C < 5.0 mmol/L at screening (mean LDL-C = 3.8 mmol/L) were recruited in this double-blinded randomized crossover placebo controlled study. Their diets were supplemented with 45 g/d of buttermilk and with 45 g/d of a macro/micronutrient matched placebo (4 weeks each in random order). Serum lipid concentrations and surrogate markers of cholesterol homeostasis were measured post diet and compared using mixed models for repeated measures. Consumption of buttermilk led to reduction in serum cholesterol (-3.1% , $P = 0.019$), LDL-C (-3.1% , $P = 0.057$) and triacylglycerol (-10.7% , $P = 0.007$). Buttermilk consumption increased plasma lathosterol concentrations ($+12.1\%$, $P = 0.001$), but multiple regression analysis indicated that variations in β -sitosterol concentrations ($P = 0.002$) were the only significant predictor of the LDL-C response to buttermilk consumption.

Conclusion:

Buttermilk consumption may be associated with reduced cholesterol concentrations in men and women, primarily through inhibition of intestinal absorption of cholesterol.

This trial is registered at clinicaltrials.gov as NCT0124802

4.1 Introduction

The role of low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) in the pathogenesis of coronary heart disease (CHD) and the clinical benefit of lowering LDL-C concentrations have both been well established [177, 178]. Cholesterol homeostasis and hence plasma LDL-C concentrations are maintained by a fine-tuned balance between intestinal cholesterol absorption, endogenous cholesterol synthesis and cholesterol clearance [68]. While the liver has long been recognized as a key organ regulating plasma cholesterol concentrations, the role played by the intestine in whole body cholesterol homeostasis is being increasingly recognized. There is now convincing evidence that diet-induced reduction in intestinal cholesterol absorption has a significant impact on plasma cholesterol and LDL-C concentrations. One good example of this is the introduction of phytosterols into regularly consumed foods, which consumption has been associated with significant and clinically meaningful reduction in LDL-C concentrations [101]. This is important because in low risk patients, most clinical guidelines advocate the use of non-pharmacological approaches as the first mean to lowering LDL-C concentrations [179].

Cholesterol is a highly hydrophobic molecule and for that reason, its absorption is almost entirely dependent on its solubility in bile acid micelles within the intestine [180]. Recent *in vitro* studies from our laboratory have shown that buttermilk, the by-product of butter manufacturing resulting from the churning of cream, inhibits cholesterol micellar solubility [181]. This phenomenon is likely due to the presence of polar lipids from the milk fat globule membrane (MFGM). Fragments of the MFGM end up in buttermilk along with most of the water-soluble cream components such as lactose, minerals and milk proteins. Most of the research so far has focused on phospholipids purified from MFGM, thereby overlooking the complex and entire MFGM mixture of bioactive proteins and polar lipids found in buttermilk. To the best of our knowledge, no study has yet documented the impact of whole buttermilk on plasma cholesterol concentrations in humans, with considerations for potential underlying mechanism. The objective of this study was to investigate the impact of buttermilk consumption on LDL-C concentration as well as on surrogate markers of cholesterol homeostasis in men and women with serum LDL-C <5.0 mmol/L. We have used plasma phytosterols concentrations as a surrogate of intestinal cholesterol absorption, plasma lathosterol concentrations as a surrogate of endogenous cholesterol synthesis, and plasma protein convertase subtilisin kexin-9 (PCSK9) concentrations as a surrogate of LDL clearance [105, 106, 182]. We hypothesized that buttermilk consumption reduces LDL-C concentrations, and that this occurs primarily through inhibited intestinal cholesterol absorption.

4.2 Methods

4.2.1 Population sample

Men and women were recruited in the Quebec City area via newspaper, radio and electronic news letters. Recruitment took place at the Institute of Nutraceuticals and Functional Foods (INAF) between January 2011 and April 2011. To be included in the study, participants had to be 18–65 years of age with a body mass index (BMI) ≤ 35 kg/m². Subjects had to have serum LDL-C concentrations below 5.0 mmol/L with a 10-years calculated Framingham risk below 10% (5). Only participants with a stable body weight for at least 6 months prior to the study were eligible. Subjects were excluded if they had a previous history of CHD, type 2 diabetes, monogenic dyslipidemia, were using medications for hyperlipidemia or hypertension or had endocrine disorders. Among pre-menopausal women, only those with a regular menstrual cycle for the last 3 months (25–35 days) were eligible. All post-menopausal women were included, irrespective of their hormone supplementation status, as long as it remained stable throughout the study. Individuals with extreme nutritional habits such as vegetarianism, with alcohol consumption >2 drinks/day and elite athletes were not eligible. Smokers and women using contraceptive agents were not excluded from the study. Follicular-stimulating hormone (FSH) measurements were conducted if needed to confirm the postmenopausal status (FSH <20 IU/L or FSH >25 IU/L). Participants provided their informed consent for the study. The study protocol was approved by The Clinical Research Ethics Committees of Laval University.

4.2.2 Study design

The study was carried out as a double-blind, randomized, placebo controlled crossover study according to which participants were subjected to 2 consecutive treatments of 4 weeks each, in a random order. For the total duration of the study (8 weeks), participants were requested to maintain their usual diet, medication, weight, alcohol consumption, and smoking and physical activity habits, except for the 3 days preceding blood sampling, during which they were asked to remain sedentary. Vitamins and natural health product supplementation were strictly forbidden during the entire experimental period. Consumption of tea and coffee was allowed with a limit of 2 cups/day as long it remained constant throughout the study. Participants with any deviation to these recommendations were excluded from analysis.

4.2.3 Buttermilk and placebo formulations

The 2 test formulations, artificially chocolate flavored buttermilk and placebo, were designed to provide the equivalent of 2 servings of low fat milk (45 g/day of skim milk solids). The buttermilk powder was purchased

from Westland Milk Products (Hokitika, New Zealand) and was fully characterized and formulated in ready-to-use pouches (Table 5). Each pouch contained 22.5 g of formulated buttermilk or placebo that subjects had to mix with 250 mL of water using a shaker provided by the study center. Sucralose was used to improve taste and acceptability. The placebo was formulated using dairy ingredients (calcium caseinate- DVM International, Veghel, Netherlands; whey protein isolate - Davisco Food International Inc., Eden Prairie, MN; whey protein permeate - Agropur, Longueuil, Canada; butter powder - Kerry Inc., Beloit, WI) in order to match the macro/micronutrient composition of buttermilk with the exception of its MFGM components. This allowed us to specifically study the impact of MFGM minor proteins and phospholipids on study outcomes.

Participants were asked to consume 2 pouches every day, just before breakfast and dinner, for a total consumption of 45 g/day of buttermilk or placebo, which corresponded to 5% to 10% of their daily energy intake based on a 2500 kcal/day diet. Participants received specific instruction on how to introduce the test formulations in their diet by substituting specific food items. Subjects were asked to restrain and to maintain their intake of dairy product to a maximum of 2 servings/day. Usual food intake was assessed using a validated in-house food-frequency questionnaire (FFQ) [183] along with a questionnaire specific to dairy foods on three occasions during the study: 1- at study entry, 2- after the first treatment and 3- after the second treatment. The first evaluation was used as a teaching tool on how to integrate the supplements into the subject's nutritional habits. The 2nd and 3rd evaluations were used to generate nutritional profiles during each treatment and to adjust recommendations, when necessary, for any variations that may have occurred between treatments. Data from these questionnaires were analyzed using the Nutrient Data System software based on a mix of Canadian and FDA-produced nutrient databases.

4.2.4 Compliance

Compliance was measured by counting the pouches returned by subjects to the research staff. A check list provided to all participants was also used for tracking unused products. Compliance $\geq 85\%$ was defined as acceptable to include participants' data into the study analyses. Subjects had to notify the physician in charge of the clinical aspects of the study before initiating any new medication.

4.2.5 Risk factor assessment

Blood samples were taken at screening as well as on two consecutive days at week 4 of each treatment. For each subject and for all study outcomes described below, the average of the two post-treatment values was used. Total cholesterol (Total-C), triacylglycerol (TG), and HDL-C concentrations in serum were measured using commercial reagents on a Modular P chemistry analyzer (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

Serum LDL-C concentrations were obtained by calculation using the Friedewald equation. Plasma apolipoprotein-B (apoB-100 and apoB-48) concentrations were measured with ELISA kits (Alerchek Inc., Springvale, ME). Plasma concentrations of C-reactive protein were measured using a commercial high sensitivity ELISA kit (BioCheck Inc., Foster City, CA).

Plasma concentrations of lathosterol, β -sitosterol and campesterol after each treatment were quantified using gas chromatography (GC) as described previously [184]. Since non-cholesterol sterols are transported in plasma by lipoproteins, their concentrations have also been expressed relative to plasma total cholesterol concentrations (10^2 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ C of the same GC run) to correct for the differing number of lipoprotein acceptor particles [103]. Total plasma PCSK9 levels were measured by a commercially available ELISA kit (CircuLex Co., Ltd, Ina, Nagano, Japan).

4.2.6 Anthropometric measures

Anthropometric measures including waist and hip circumferences were taken at the beginning and at the end of each test diet according to standardized procedures [185].

4.2.7 Statistical analysis

The study has been designed to have adequate power to test the main hypothesis that consumption of 45g/day of buttermilk leads to significant reduction in plasma LDL-C concentrations. Sample size estimation was performed to allow the detection of a minimum of 5% reduction in plasma LDL-C concentrations. A SD of 0.39 mmol/L for the LDL-C change in response to dietary modifications has been used for sample size calculations [186]. At a mean baseline LDL-C concentration of 4.0 mmol/L, the required number of participants completing the study for optimal statistical power was $n = 32$ ($\alpha = 0.05$ two-tailed, power = 90%). The anticipated dropout rate was 10%.

All data were analysed for statistical differences using the PROC MIXED procedure for repeated measures in SAS 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC). Normal distribution and homogeneity of variance were checked before further analysis. Variables with a skewed distribution were \log_{10} transformed. The impact of buttermilk on serum lipid concentrations and surrogate markers of cholesterol homeostasis was adjusted for sex through multivariate modeling. The impact of treatment sequence was investigated using appropriate interaction terms in the MIXED model; no significant interaction was noted for any of the outcome measures. The impact of baseline values (at screening) on the response to buttermilk was also investigated using individual and interaction terms in the MIXED model. When interaction terms were significant, subgroups were created using

the median values for the selected variable to present the interaction graphically. Univariate correlation analysis and multivariate stepwise regression models were used to investigate associations among outcome measures. Data are presented as means \pm SDs and as percentages of change compared to the placebo unless stated otherwise. *P* values <0.05 were considered statistically significant.

4.3 Results

4.3.1 Participants

Of the 40 subjects who met the eligibility criteria and who were recruited to start the study, 6 individuals did not complete both treatments and were excluded from further analysis (Figure 29). The adherence to the test diets was very good, with a self-reported compliance level over 97%. None of the subjects were excluded based on their lack of compliance. The characteristics at screening of subject included in the analyses are presented in Table 6. Among the 34 subjects (15 men and 19 women), body weight remained stable throughout the 8 week study period and no change was observed in hip and waist circumference measures.

4.3.2 Plasma lipids and lipoproteins

As shown in Table 7, buttermilk supplementation significantly reduced serum levels of total-C (-3.1% , $P = 0.019$) and TG (-10.7% , $P = 0.007$) compared with placebo. The reduction in serum LDL-C concentrations (-3.1% , $P = 0.057$) was borderline significant. However, there was a significant interaction between LDL-C values at screening and treatment on the LDL-C response (P for interaction = 0.028). Figure 30 illustrates the individual changes (%) in LDL-C concentrations (buttermilk vs. placebo) according to LDL-C values at screening, $<$ or $>$ the median 3.7 mmol/L. Figure 31 illustrates how LDL-C status at screening modified the LDL-C response to buttermilk. Serum LDL-C concentrations were significantly reduced after buttermilk consumption among subjects with baseline LDL-C >3.7 mmol/L (-5.6% , $P = 0.004$) but not among those with baseline LDL-C <3.7 mmol/L ($+0.3\%$, $P = 0.890$). Buttermilk consumption had no impact on serum HDL-C concentrations (Table 7). There was no apparent interaction between BMI (or waist circumference) and treatment on any of the study outcomes (not shown).

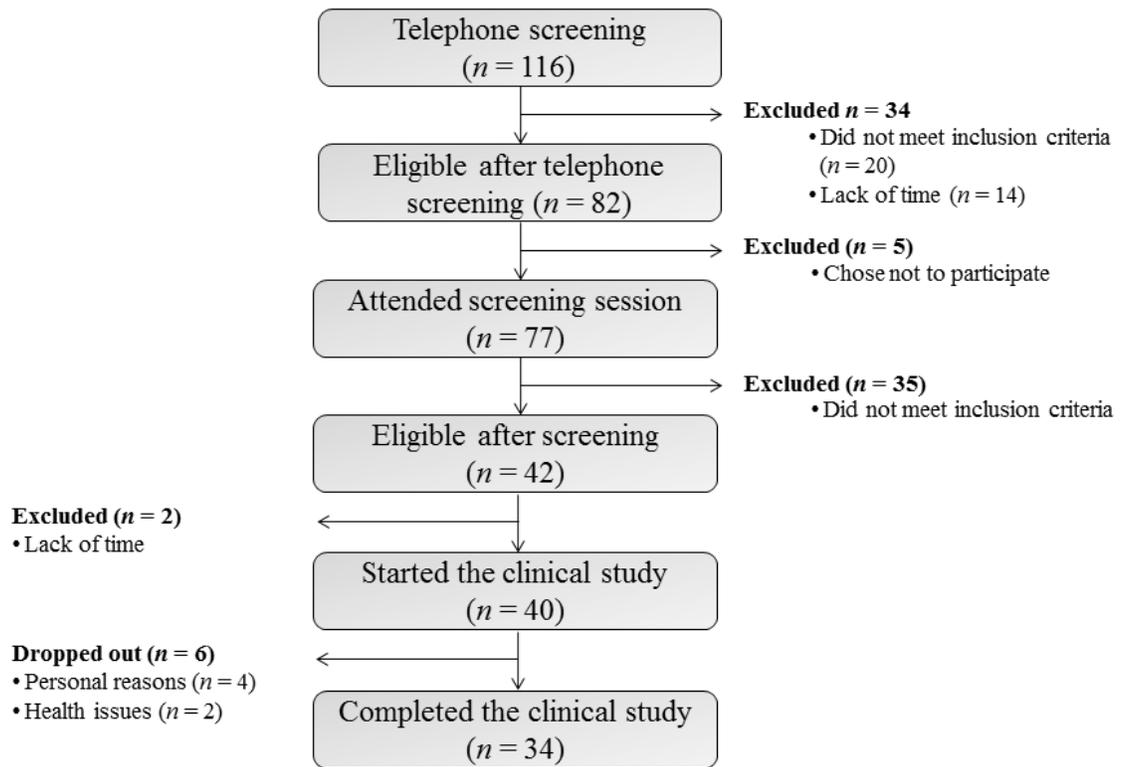


Figure 29 : Flow of patients through the clinical study. Of the 2 patients who chose to stop the study for medical issues, health problems were not linked to the treatments.

Table 5 : Composition of the ready-to-use buttermilk and placebo pouches (22.5 g)^a.

	Placebo		Buttermilk	
	Mean	SD	Mean	SD
Energy, kcal	89.6		88.9	
Lactose, g	11.5	± 0.5	11.4	± 0.5
Total proteins, g	6.5	± 0.4	6.4	± 0.5
Total fat, g	2.0	± 0.2	2.0	± 0.2
SFA, g	1.15		1.04	
MUFA, g	0.49		0.42	
PUFA, g	0.07		0.06	
Total phosphospholipids, mg	17.30		93.75	
<i>Phosphatidylcholine, mg</i>	9.61		28.65	
<i>Phosphatidylinositol, mg</i>	3.05		11.88	
<i>Phosphatidylethanolamine, mg</i>	2.27		31.91	
<i>Sphingomyelin, mg</i>	1.97		11.81	
<i>Phosphatidylserine, mg</i>	0.40		9.51	
<i>trans-fat, g</i>	0.04		0.05	
w-6, g	0.04		0.03	
w-3, g	0.01		0.02	
Ashes, g	1.8	± 0.2	2.0	± 0.0
Calcium, ppm	6445	± 67.0	8227	± 67.5
Water, g	0.7	± 0.2	0.7	± 0.0

^aLactose, total proteins, total fat, ashes and water values are presented as means and standard deviations ($n = 3$).

Table 6 : Baseline characteristics of the study participants at screening ($n = 34$)^a.

Subject characteristics	Mean ± SD
Sex, males/females	15/19
Age, years	49.4 ± 12.8
Weight, kg	70.5 ± 12.8
BMI, kg/m ²	25.2 ± 4.4
Waist circumference, cm	87.5 ± 10.3
Systolic blood pressure, mm Hg	111.2 ± 11.0
Diastolic blood pressure, mm Hg	66.4 ± 7.3
Total-C, mmol/L	5.88 ± 0.93
LDL-C, mmol/L	3.75 ± 0.69
HDL-C, mmol/L	1.57 ± 0.48
C/HDL-C, ratio	3.99 ± 1.0
Triacylglycerols, mmol/L	1.21 ± 0.59

^aBMI, body mass index; C, Cholesterol.

4.3.3 Cholesterol homeostasis markers

As shown in Table 7, buttermilk consumption did not significantly affect surrogate markers (mg/L) of intestinal cholesterol absorption (i.e. campesterol -2.0% ; $P = 0.527$ and β -sitosterol -7.3% ; $P = 0.096$). Figure 31 illustrates how baseline LDL-C influenced the response of plasma markers of cholesterol absorption to buttermilk consumption. The change in plasma concentrations of phytosterols (-9.3% , $P = 0.009$) and β -sitosterol (-11.2% , $P = 0.004$) were significantly reduced with buttermilk consumption compared with placebo only in subjects with high baseline LDL-C values. Buttermilk consumption compared with placebo significantly increased plasma lathosterol concentrations ($+12.1\%$; $P = 0.001$), a surrogate marker of endogenous cholesterol synthesis. Baseline LDL-C did not modify the plasma lathosterol, campesterol and PCSK9 response to buttermilk (P for interaction = 0.783, 0.067 and 0.732 respectively).

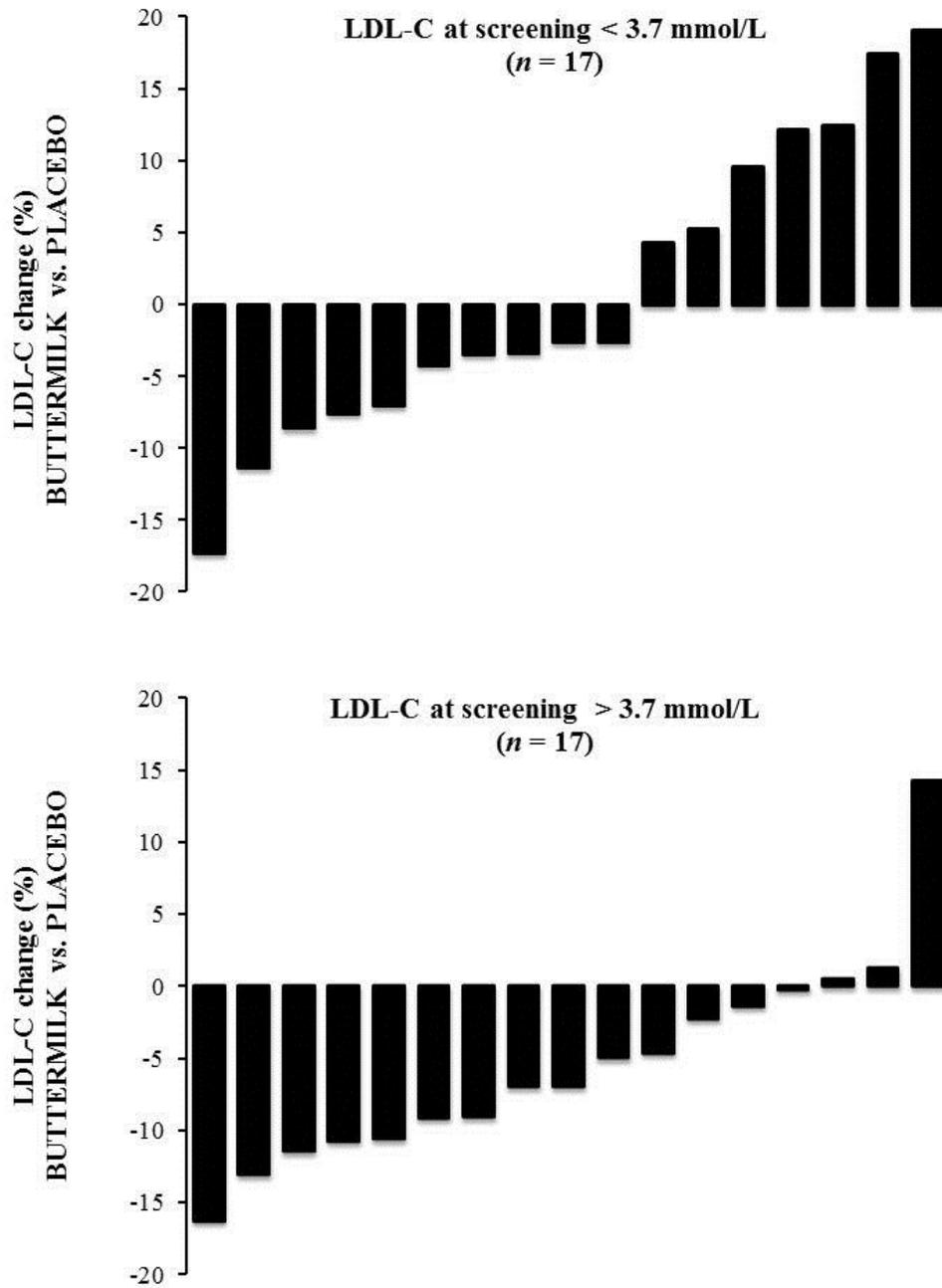


Figure 30 : Individual changes in LDL-C concentrations with Buttermilk expressed as % change from the placebo phase in subjects with LDL-C < or > 3.7 mmol/L, the median LDL-C at screening. There are 17 subjects in each group.

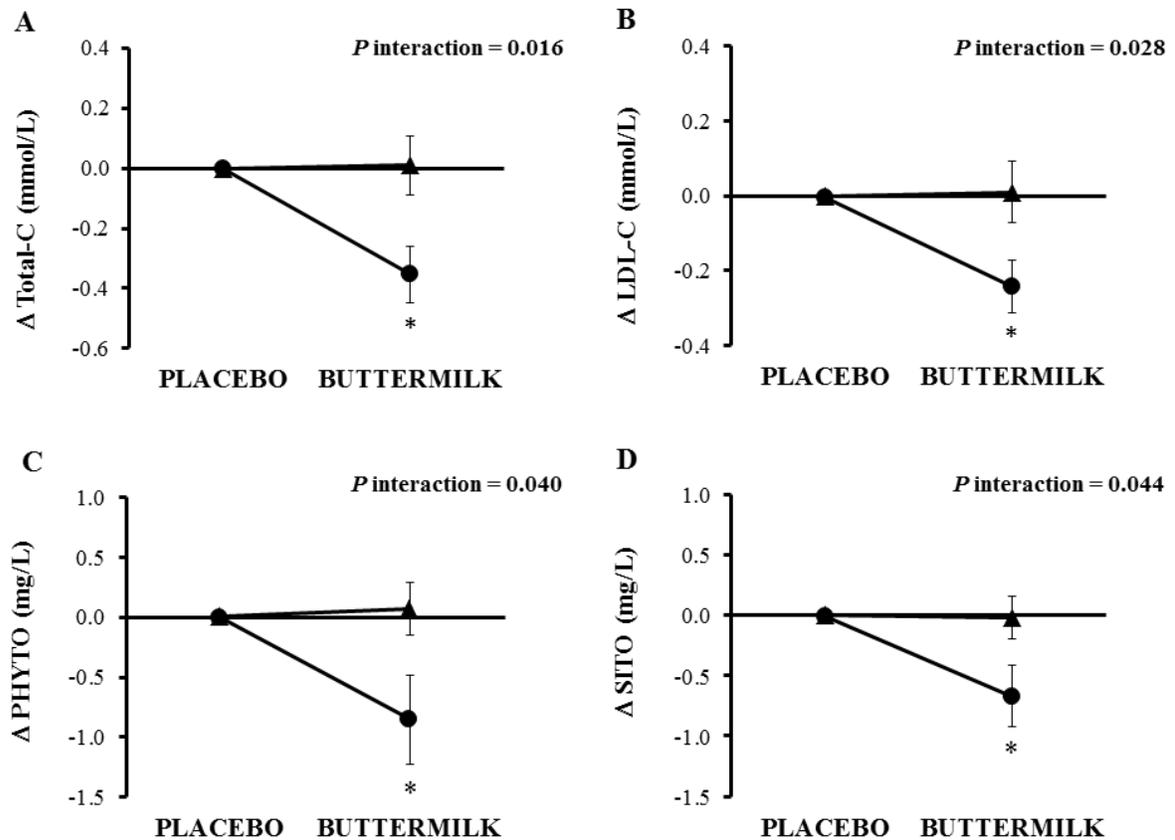


Figure 31 : (A) Total-C, (B) LDL- C, (C) Phytosterol and (D) β -sitosterol response to buttermilk treatment compared with placebo (Δ) according to baseline LDL-C values. The P values for interaction were obtained from the MIXED model using each variable as a continuous variable. The median baseline value of LDL-C (3.72 mmol/L) was used to categorize individuals with high or low levels and to present interactions graphically. * Values are significantly different from those of the placebo treatment within each LDL group ($P < 0.05$). Baseline LDL-C : \blacktriangle : <3.7 mmol/L, \bullet : >3.7 mmol/L. Values are means \pm SEM.

Changes (%) in plasma phytosterol, β -sitosterol and PCSK9 concentrations with buttermilk vs. placebo were positively correlated with concomitant change (%) in total-C and LDL-C concentrations (Table 8). There was no such correlation between the change (%) in plasma lathosterol or campesterol concentrations and the change (%) in total-C and LDL-C levels (Table 8). In multiple stepwise regression analysis, variations (%) in β -sitosterol concentrations with buttermilk treatment were the only significant predictor of the reduction (%) in serum LDL-C ($R^2 = 27\%$, $P = 0.002$) and total-C concentrations ($R^2 = 42\%$, $P < 0.001$, results not shown). There was no correlation between the change in TG and the change in LDL-C with buttermilk (not shown).

Table 7 : Effect of buttermilk consumption on serum lipid concentration and surrogate markers of cholesterol homeostasis in men and women with mild hypercholesterolemia ($n = 34$)^a.

	Placebo ^b		Buttermilk ^b		Difference ^c	<i>P</i> ^d
	Mean	SD	Mean	SD		
Total-C, mmol/L	5.92 ± 0.94		5.74 ± 0.81		-3.1 %	0.019
LDL-C, mmol/L	3.71 ± 0.71		3.59 ± 0.64		-3.1 %	0.057
Apolipoprotéine B100, mg/dL	114.8 ± 56.5		117.3 ± 51.1		2.2 %	0.647
HDL-C, mmol/L	1.62 ± 0.47		1.62 ± 0.43		-0.2 %	0.932
C/HDL-C ratio	3.91 ± 1.07		3.77 ± 0.96		-3.7 %	0.049
Triacylglycerols, mmol/L	1.30 ± 0.60		1.16 ± 0.47		-10.7 %	0.007
Apolipoprotéine B48, mg/dL	6.66 ± 3.20		5.80 ± 2.42		-12.9 %	0.195
C-reactive protein, mg/L ^e	1.49 ± 1.77		1.53 ± 1.81		2.8 %	0.457
Lathosterol/C, 102 mmol/mmol C ^e	0.49 ± 0.17		0.57 ± 0.22		16.0 %	< 0.001
Phytosterols/C, 102 mmol/mmol C ^{e, f}	1.20 ± 0.58		1.18 ± 0.54		-1.1 %	0.799
Campesterol/C, 102 mmol/mmol C	0.41 ± 0.20		0.42 ± 0.19		2.8 %	0.356
β-sitosterol/C, 102 mmol/mmol C ^e	0.79 ± 0.40		0.76 ± 0.36		-3.1 %	0.334
Lathosterol, mg/L ^e	2.89 ± 1.14		3.24 ± 1.38		12.1 %	0.001
Phytosterols, mg/L ^{e, f}	7.18 ± 3.98		6.79 ± 3.36		-5.5 %	0.252
Campesterol, mg/L	2.47 ± 1.38		2.42 ± 1.22		-2.0 %	0.527
β-sitosterol, mg/L ^e	4.70 ± 2.68		4.36 ± 2.22		-7.3 %	0.096
PCSK9, ng/mL	274.2 ± 71.4		267.6 ± 72.9		-2.4 %	0.375

^aC, cholesterol; PCSK9, protein convertase subtilisin/kenin-9. ^bValues are means ± SD. ^cValues are expressed as percentage of change compared to placebo. ^d*P* values from the main effect of diet in the MIXED model (SAS Institut. Cary. NC). *P* values were obtained using the PROC MIXED procedures. The model was adjusted for sex. ^eAnalysis were performed on log-transformed values. ^fCampesterol + β-sitosterol.

Table 8 : Univariate correlations between the percentage of changes in surrogate makers of cholesterol homeostasis and the percentage of changes in total serum cholesterol and LDL-C concentrations with buttermilk ($n = 34$)^a.

Surrogate marker (%Δ)	%Δ Total-C		%Δ LDL-C	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
Lathosterol	0.2098	0.234	0.0652	0.714
Phytosterol	0.4560	0.007	0.3586	0.037
Campesterol	0.2735	0.118	0.1756	0.321
β -sitosterol	0.5615	<0.001	0.4533	0.007
PCSK9	0.3984	0.020	0.3389	0.050

^aSpearman correlations were carried out between the change (%Δ) in total cholesterol (C) and LDL-C and the change (%Δ) in surrogate makers of cholesterol homeostasis, buttermilk vs. placebo.

4.4 Discussion

This study indicates that short-term buttermilk consumption significantly reduces serum total-C and TG concentrations in men and women. The 3.1 % reduction in serum LDL-C concentrations with buttermilk did not quite reach statistical significance in the entire study sample ($P = 0.057$), but was highly significant among subjects with higher LDL-C concentration at screening (-5.6% , $P = 0.004$). Plasma lathosterol concentrations were increased after buttermilk consumption but the magnitude of the change in this estimate of endogenous cholesterol synthesis did not correlate with the LDL-C response to buttermilk. Only changes (%) in surrogate markers of intestinal cholesterol absorption (plasma phytosterols and β -sitosterol) were correlated to the total-C and LDL-C response to buttermilk in multivariate analyses.

To the best of our knowledge, this is the first study to have investigated the impact of buttermilk consumption on lipid levels in humans, with considerations for potential underlying mechanism. Ohlsson et al. have investigated the acute [187] and chronic [188] impact of sphingolipids (SL)-enriched buttermilk supplementation on blood lipids in healthy human subjects and have reported no significant effect on fasting and postprandial plasma lipids concentrations. These two previous studies had smaller sample sizes and involved subjects with relatively normal LDL-C concentrations, thereby limiting the ability to observe significant effects. Furthermore, Thompson et al. [189] have studied the impact of cultured buttermilk consumption on lipid levels in a small group of healthy subjects and reported no noticeable lipids-lowering effect. However, cultured buttermilk represents the product of cow's milk fermentation and thus, does not possess the composition specificities of fresh buttermilk (i.e. MFGM polar lipids).

Our data have shown that the cholesterol-lowering property of buttermilk in humans appeared to be more important among individuals with higher serum LDL-C concentrations. The impact of baseline LDL-C on diet-induced LDL-C changes has been discussed previously [190]. The LDL-C response to buttermilk consumption (-0.24 mmol/L for the "high" LDL-C group) was close in magnitude to the cholesterol-lowering effectiveness of plant sterol therapy, generally associated with an LDL-C reduction of 0.27 to 0.35 mmol/L [191]. However, the effect of buttermilk may differ from the effect of plant sterol therapy by its ability to reduce serum TG levels as well. Indeed, plant sterols inhibit intestinal cholesterol absorption with no apparent effect on TG [101]. In the present study, supplementation with buttermilk reduced plasma concentrations of apoB-48 by approximately 13 % but this change was not statistically significant. The absence of a correlation between the reduction in plasma TG and in LDL-C with buttermilk suggests that different mechanisms may be at play. However, the TG-lowering effect associated with buttermilk consumption and its underlying mechanisms definitely deserves further research.

Although not statistically significant when considering the whole study group, plasma phytosterols concentrations were significantly reduced in subjects with high baseline LDL-C levels, i.e. in subjects showing a significant LDL-C reduction after buttermilk consumption. Multiple regression analyses have also shown that variations in plasma β -sitosterol concentrations were the only multivariate predictor of the buttermilk-induced changes in serum LDL-C and total-C levels. This suggests that buttermilk consumption may reduce serum cholesterol primarily through inhibition of intestinal cholesterol absorption. *APOE*3*Leiden mice, when fed with a Western-type diet supplemented with SL, showed significant reductions in plasma cholesterol and TG levels [192]. Supplementing the western diet with SL also impaired fatty acid (FA) absorption, probably through ionic interactions between SL and FA [192]. Authors have not discussed the possibility that SL-binding properties may also be the underlying mechanism leading to impaired cholesterol and TG absorption in the intestinal tract. SM and phosphatidylcholine, which represent respectively 25 % and 35 % of the bovine MFGM lipids [11] have a high binding affinity with cholesterol, thereby inhibiting intestinal cholesterol absorption in rats [72]. Furthermore, the slow rate of hydrolysis of SM in the gastrointestinal tract and its incomplete digestion may enhance its capacity to bind cholesterol throughout the small intestine [71]. This phenomenon may obstruct the hydrolysis and processing of other lipids, including micelle formation, which are essential for cholesterol absorption, thus reducing intestinal uptake [7]. In recent studies, buttermilk has been associated with a significant reduction in the micellar solubility of cholesterol *in vitro*, thereby providing further support to the thesis that buttermilk constituents may impair intestinal absorption of cholesterol [181, 193, 194].

PCSK9 plays a determining role in cholesterol metabolism by regulating the intracellular degradation of LDL receptors [106]. Stable isotope studies in humans have shown that plasma PCSK9 is a significant correlate of the LDL fractional catabolic rate [195], and therefore can be used as a surrogate of LDL clearance [106]. Buttermilk consumption did not lead to a significant change in plasma PCSK9 concentrations compared to placebo. However, the magnitude of the variation in plasma PCSK9 with buttermilk was positively correlated with changes in serum total-C and LDL-C concentrations. Therefore, it is possible that part of the LDL-C lowering effect of buttermilk could be attributed to an increased clearance of cholesterol. However, it is also possible that the reduction in LDL-C with buttermilk in itself may have downregulated PCSK9 expression. Indeed, buttermilk consumption resulted in increased plasma lathosterol concentrations, suggestive of an up-regulated endogenous cholesterol synthesis. These data are consistent with studies in animals having shown an increased expression in genes involved in hepatic cholesterol uptake and in hepatic cholesterol synthesis in *APOE*3*Leiden mice supplemented with SL [192]. It is also possible that circulating products resulting from the digestion of buttermilk may directly affect cholesterol synthesis and clearance pathways. However, we propose that the apparent increase in endogenous cholesterol synthesis and possibly the apparent increase in LDL clearance associated with the cholesterol response to buttermilk consumption may rather reflect feedback

mechanisms compensating for the reduction in the body's cholesterol pool, which may be due in part to the magnitude of the buttermilk-induced inhibition of intestinal cholesterol absorption.

This study has strengths and limitations. One of its strengths resides in the fine characterization of the buttermilk and placebo fed to the subjects. This allowed us to ensure that the cholesterol and TG-lowering effects observed were attributed specifically to components of buttermilk, primarily MFGM. The repeated measurements at screening and at the end of both treatments also increased our capacity to detect very small changes in outcome measures. Cholesterol absorption, synthesis and clearance were estimated using surrogate markers and additional studies using stable isotopes should be used to confirm the findings of the present study. Indeed, although the validity of indirect markers of cholesterol homeostasis have been established [105, 182, 196] these markers do not provide a measure of absolute amount of cholesterol absorbed and synthesized.

4.5 Conclusion

In summary, the reduction in total-C and LDL-C concentrations following buttermilk consumption may be more important among subjects with high baseline LDL, and appears to be primarily attributable to inhibition of intestinal cholesterol uptake. Data from animal models suggest that the unique phospholipid content of buttermilk may be responsible for this effect. The apparent increase in estimated cholesterol synthesis with buttermilk is believed to be a compensatory feedback response, which had no incidence on serum cholesterol concentrations. Consumption of buttermilk may also affect LDL clearance directly or indirectly and this deserves further investigation. The TG-lowering effect of buttermilk is of interest and also deserves further research. From a clinical perspective, buttermilk may be considered as a natural, well-tolerated and low cost dietary product for improving lipid profiles in low risk patients.

4.6 Acknowledgements

We are grateful to the nurses and the laboratory staff of the Institute of Nutraceuticals and Functional Food for their technical assistance and the expert care provided to the participants. We also express our gratitude to the participants, without whom the study would not have been possible. We also thank Yvan Chouinard in helping with fatty acids laboratory analyses. We are thankful to Pharmalab Inc in helping us with the formulation and packaging of the ready-to-used test products (buttermilk and placebo) consumed in the present study.

The authors' responsibilities were as follows—Benoît Lamarche, Patrick Couture, Sylvie Gauthier and Yves Pouliot have designed and obtained funding for this study; Amélie Charest: coordinated the clinical study; Valérie Conway: characterized and designed the test products, performed statistical analyses with the precious help of Caroline Richard, analyzed the data and wrote the present manuscript. Valérie Conway was supported by the Alexander Graham Bell Canada Graduate Scholarships from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. Benoît Lamarche is a member of and Scientific Advisory Board for the Dairy farmers of Canada. Benoît Lamarche, Patrick Couture, Yves Pouliot and Sylvie Gauthier received a grant from the Dairy Research Cluster for this research (Dairy Farmers of Canada, Agriculture and Agri-Food Canada, Canadian Dairy Commission). Other authors report non conflict of interest in relation with this study.

-Transition contextuelle-

Le prochain chapitre décrit les travaux réalisés en vue de répondre à la seconde partie (b) du deuxième objectif de cette thèse, laquelle visait à étudier l'influence de la consommation de babeurre sur la pression artérielle ainsi que sur les niveaux plasmatiques de marqueurs biologiques du système rénine-angiotensine-aldostérone chez des sujets normotendus. L'hypothèse posée était que *la consommation de babeurre permettait, par la libération de séquences peptidiques spécifiques aux protéines de la MFGM, de diminuer la tension artérielle.*

Pour valider cette hypothèse de recherche, des analyses sanguines ainsi que des mesures de tensions artérielles ont été effectuées chez les 34 sujets normotendus ayant participé à l'étude clinique décrite de façon complète au Chapitre 4 du présent document. Des mesures des niveaux circulants d'aldostérone, d'angiotensine-II et d'enzyme de conversion de l'angiotensine-I (ACE) ont permis d'étudier le mécanisme par lequel la consommation de babeurre pouvait moduler la tension artérielle.

CHAPITRE 5

-Impact of buttermilk consumption on blood pressure in moderately hypercholesterolemic men and women-

Les travaux présents dans ce chapitre visaient à répondre au troisième objectif

Les résultats présentés dans ce chapitre ont été soumis pour une courte communication comme suit :

Conway, V., P. Couture, S.F. Gauthier, Y. Pouliot, and B. Lamarche.

Impact of buttermilk consumption on blood pressure in moderately hypercholesterolemic men and women.

Nutrition (NUT-D-13-00237) 2013.

-Résumé-

Objectifs:

La membrane du globule de gras laitier (MFGM), retrouvée en grande quantité dans le babeurre, est une source unique de composés bioactifs. Dans la littérature, plusieurs activités biologiques ont été associées aux protéines de la MFGM telles que des capacités hypocholestérolémiantes, antivirales, antibactériennes et anti-cancer. Toutefois, jusqu'à présent aucune donnée clinique concernant la bioactivité des protéines de la MFGM n'est disponible. De plus, aucune étude ne s'est intéressée au potentiel antihypertensif des protéines de la MFGM. Le but de cette étude était d'évaluer l'impact de la consommation de babeurre sur la tension artérielle ainsi que sur des marqueurs biologique du système rénine-angiotensine-aldostérone chez l'humain.

Méthodes :

Des hommes et femmes (N = 34) présentant des niveaux de LDL-C inférieurs à 5 mmol/L (LDL-C moyen = 3,8 mmol/L) ainsi qu'une tension artérielle normale (<140 mm Hg) ont été recrutés pour cette étude randomisée en chassé-croisé à double insu. Les sujets ont consommé de façon aléatoire 45 g/jour de babeurre et 45 g/jour de placebo, chaque traitement s'échelonnant sur une période de 4 semaines.

Résultats:

La consommation de babeurre a permis de réduire de façon significative la tension artérielle systolique (SPB, $P = 0,009$), la tension artérielle moyenne (MAP, $P = 0,015$) ainsi que les niveaux plasmatiques d'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE, $P = 0,003$) lorsque comparés au placebo, sans impact sur les niveaux plasmatiques d'angiotensine II et d'aldostérone.

Conclusion:

La consommation de babeurre à court terme permet de réduire la pression artérielle chez des sujets normotendus.

-Abstract-

Objectives:

Milk fat globule membrane (MFGM) found in buttermilk is rich in unique bioactive proteins. Several studies suggest that MFGM proteins possess biological activities such as cholesterol-lowering, anti-viral, anti-bacterial and anti-cancer properties, but data in humans are lacking. Furthermore, no study has yet investigated the antihypertensive potential of MFGM proteins. The aim of our study was to investigate the impact of buttermilk consumption on blood pressure and on the markers of the renin-angiotensin-aldosterone (RAS) system in humans.

Methods:

Men and women (N = 34) with plasma LDL-C below 5 mmol/L (mean LDL-C = 3.8 mmol/L) and normal blood pressure (<140 mm Hg) were recruited in this randomized, double-blinded, placebo controlled, crossover study. Their diets were supplemented with 45 g/d of buttermilk and with 45 g/d of a macro/micronutrient matched placebo (4-wks for each diet).

Results:

Buttermilk consumption significantly reduced systolic blood pressure (SPB, $P = 0.009$), mean arterial blood pressure (MAP, $P = 0.015$), and plasma levels of the angiotensin I-converting enzyme (ACE, $P = 0.003$) compared to placebo, but had no impact on plasma concentrations of angiotensin II and aldosterone.

Conclusion:

Short-term buttermilk consumption reduces blood pressure in normotensive subjects.

5.1 Introduction

Hypertension is a major risk factor for cardiovascular disease (CVD) and renal dysfunction, and is a leading cause of death worldwide associated with 7.1 million deaths per year [197]. A healthy diet is an important element in the primary prevention and management of hypertension [119]. The development of dairy based functional foods for blood pressure (BP) management has been of major interest in the past years. Milk peptides have proved their ability to lower BP in many clinical trials, and have been extensively reviewed [128, 129, 133, 134]. Indeed, small milk peptides with hydrophobic and aromatic amino acid residues have been targeted for the development of functional foods inhibiting the angiotensin-converting enzyme (ACE) activity - a key enzyme involved in BP regulation. Milk fat globule membrane (MFGM) components, found in larger quantity in buttermilk, have been of growing interest over the past years because of their unique nutritional properties [11]. However, no study has yet investigated the antihypertensive potential of MFGM proteins from buttermilk. The aim of our study was to investigate for the first time the impact of buttermilk consumption on blood pressure and on the markers of the renin-angiotensin-aldosterone (RAS) system in normotensive patients.

5.2 Methods

5.2.1 Subjects

Men and women were recruited in Quebec City at the Institute of Nutrition and Functional Foods (INAF) between January and April 2011. Subjects had to be aged 18-65 yrs, with body mass index (BMI) ≤ 35 kg/m², plasma LDL-C concentrations < 5 mmol/L, a 10-y calculated Framingham risk < 10 % [179], normal blood pressure ($< 140/90$ mm Hg) [197], and weight stable. Subjects with a previous history of CVD, Type 2 diabetes, monogenic dyslipidemia, endocrine disorders, using medications for hyperlipidemia or hypertension, practicing extreme nutritional habits (i.e. vegetarianism, alcohol consumption > 2 drinks/d), and elite athletes were not eligible.

5.2.2 Study design

We used a randomized, double-blinded, placebo controlled, crossover study design according to which participants were randomly subjected to two consecutive 4-week treatments with buttermilk or placebo [198]. During the study period, subjects were instructed to maintain their usual diet, medication, weight, alcohol consumption, tea/coffee consumption (with a limit of 2 cups/day) and smoking habits. The use of vitamins and natural health product supplements was strictly forbidden throughout the trial. Any deviation from those recommendations would lead to exclusion from the study.

The study protocol was approved by The Clinical Research Ethics Committee of Laval University, and informed consent was obtained from all participants included (registered at clinicaltrials.gov as NCT01248026).

5.2.3 Study products and diet instructions

The buttermilk and placebo formulations were artificially flavored with chocolate, and provided the equivalent of 2 servings of low fat milk (45 g/d of skim milk solids) with 22.5 g ready for use. Sucralose was added to both formulations, to improve taste and acceptability. The placebo product was formulated using dairy ingredients to match the buttermilk composition, with the exception of the presumed active components (i.e. MFGM components). The presence of MFGM components in buttermilk was confirmed by SDS-PAGE and HPLC for minor proteins and phospholipids, respectively (results not showed).

Participants were instructed to mix one pouch of chocolate flavored buttermilk or a placebo with 250 mL of water, that they consumed just before breakfast and dinner each day, for a total consumption of 45 g/d of

buttermilk or a placebo. Subjects were also required to restrain their dairy consumption to a maximum of 2 servings per day.

5.2.4 Biochemical assessments

Blood samples were taken at screening and on two consecutive days at the end of each 4-wks test period (i.e. wk-4 and wk-8). The average of the two post-treatment values was used in all analyses. Plasma levels of ACE were measured with ELISA kits (Quantikine; R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN; CV <10 %). Plasma concentrations of angiotensin-II (ANG) and aldosterone (ALDOS) were assessed using ELISA kits (Enzo Life Sciences, Inc., Plymouth Meeting, PA; both CV ≤18 %).

5.2.5 Anthropometric and blood pressure assessments

Anthropometric measures were taken at the beginning and at the end of each test period according to standardized procedures. Blood pressure was measured on the right arm using an automated mercury sphygmomanometer after a 10 min rest in a seated position. Systolic blood pressure (SBP) and diastolic blood pressure (DBP) measures were analysed using the mean of 3 readings at 3 min intervals. Mean arterial pressure (MAP) was calculated as:

$$\text{MAP} = [(2 \times \text{DBP}) + \text{SBP}] / 3$$

5.2.6 Statistical analysis

Data are reported as mean (\pm SD). Mixed models for repeated measures in SAS 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC) were used to assess the impact of buttermilk on the study outcomes. Changes in the study outcomes (buttermilk vs. placebo) were analysed in models adjusted for genders and values on the placebo. There was no tx*seq interaction on any of the outcomes assessed. Significance was accepted at $P < 0.05$.

5.3 Results

5.3.1 Subjects

Of the 40 subjects enrolled in the study, 6 individuals did not complete the intervention and were excluded from statistical analysis. No change in body weight and in hip and waist circumferences was recorded during the duration of the trial, and there were no side effects associated with the consumption of buttermilk compared with a placebo. Self-reported compliance was > 97 % for both treatments. There was no difference in Na intake between the two dietary phases (not shown).

SBP and MAP both decreased significantly following buttermilk treatments when compared to a placebo (Table 9). The mean reduction in SBP and MAP were -2.6 mm Hg (-2.3 %, $P = 0.009$) and -1.7 mm Hg (-2.1 %, $P = 0.015$) respectively. The reduction in DBP did not reach statistical (-1.2 mm Hg) significance (-1.8 %, $P = 0.069$).

Plasma concentration of ACE, angiotensin II and aldosterone were analyzed as markers of the RAS system (Table 9). Buttermilk consumption was associated with a significant reduction of -18.7 ng/mL in the plasma levels of ACE compared to a placebo (-10.9 %, $P = 0.003$), but had no impact on angiotensin II ($P = 0.126$) and aldosterone ($P = 0.780$). No significant correlation was found between the change (%) in plasma concentrations of ACE, angiotensin II and aldosterone and the changes (%) in SBP, DBP and MAP.

Table 9 : Effect of buttermilk consumption on blood pressure and on biomarkers of the RAS system in 34 normotensive men and women^a.

	Placebo^b	Buttermilk^b	Difference^c	P^d
	Mean ± SD	Mean ± SD		
Systolic blood pressure, mm Hg	110.9 ± 11.2	108.3 ± 11.6	-2.3%	0.009
Diastolic blood pressure, mm Hg	65.6 ± 8.6	64.4 ± 8.3	-1.8%	0.069
Mean arterial pressure, mm Hg	80.7 ± 8.8	79.0 ± 8.9	-2.1%	0.015
ACE level, ng/mL ^e	157.5 ± 48.0	138.8 ± 42.1	-10.9%	0.003
Angiotensin-II level, pg/mL	29.3 ± 51.1	27.8 ± 46.5	-5.1%	0.126
Aldosterone level, pg/mL ^e	224.6 ± 154.2	226.6 ± 129.0	+0.9%	0.780

^a RAS, Renin-Angiotensin-Aldosterone; ACE, Angiotensin I Converting Enzyme. ^b Values are means ± SD. ^c Values are expressed as percentages of change compared to placebo. ^d P values were obtained using the PROC MIXED procedure in SAS, comparing c-values after the buttermilk diet to those after the placebo diet. The model was adjusted for gender ratios and values at screening. ^e Analyses were performed on log-transformed values.

5.4 Discussion

The mild but significant reduction in SBP (-2.6 mm Hg, $P = 0.009$) after 4 weeks of buttermilk consumption in subjects with normal blood pressure was similar in magnitude to changes that are observed after the consumption of peptides from dairy proteins [129, 133]. Indeed, a meta-analysis of available studies showed that supplementation with lactotriptides reduces SBP by an average of -3.7 mm Hg over a mean duration of approximately 7 weeks, with effects being slightly greater among Asians (-6.9 mm Hg) than among Caucasian subjects (-1.2 mm Hg) [133]. Study duration appears to influence the magnitude of the impact of milk tripeptide supplementation on blood pressure. Indeed, Xu *et al.* reported in their meta-analysis a reduction in SBP of 1.3, 2.2 and 3.3 mm Hg after 2, 4 and 8-wks of supplementation with milk tripeptide [129]. It is therefore possible that longer supplementation with buttermilk might also lead to more important reductions in blood pressure. This needs to be verified in future studies.

We observed a significant reduction in the plasma concentration of ACE ($P = 0.003$) after 4-wks of supplementation with buttermilk compared to placebo, while there was no change in the plasma levels of aldosterone and angiotensin-II levels. This is of interest because elevated levels of soluble ACE have been associated with an increased risk of coronary heart disease (CHD) [199] and to an enhanced ACE activity (U) [125]. We presume that the blood pressure lowering effects of MFGM components present in buttermilk most likely do not only involve ACE-inhibition. Indeed, direct relaxation of vascular muscles as well as opioid action and antioxidant activities have been proposed as alternative mechanisms underlying the blood pressure lowering effects of milk peptides [136]. In our previous work, we also demonstrated the antioxidant capacity of specific peptides of buttermilk compared to milk and whey hydrolysates [200].

Some [201], but not all [202, 203] studies have shown that individuals with a higher baseline SBP tend to respond more favorably to antihypertensive treatments than normotensive individuals. Further studies are required to validate if patients with much higher blood pressures at baseline would show greater benefits from buttermilk consumption. Up to now, no clinical trial studying milk peptides have showed significant changes in blood pressure in normotensives subject [134].

The short duration of the study and the use of a sphygmomanometer to measure blood pressure - as opposed to ambulatory blood pressure measures - are two important limitations of this study. The data are restricted to normal blood pressure subjects, and further studies are required to replicate these data in hypertensive populations. This study represents a secondary analysis of a trial designed to investigate the impact of buttermilk supplementation on plasma lipids levels [198]. Although the blood pressure lowering effect seen in

the present study is most likely due to the MFGM components found in buttermilk, other minor compounds of buttermilk may have contributed to these effects.

5.5 Conclusion

In conclusion, data from this randomized trial reports for the first time that short-term supplementation with buttermilk (45 g/d) - possibly through its high MFGM content and their impact on the ACE system - lowers systolic blood pressure in normotensive individuals. Combined with the buttermilk-induced reduction in plasma levels of total-C, LDL-C and triglycerides seen in the same subjects [198], these data indicate that buttermilk consumption may represent a safe and healthy way to manage CVD risk. Further studies are required to validate these observations.

5.6 Acknowledgements

We are grateful to all the nurses, laboratory staff, and participants at the Institute of Nutraceuticals and Functional Food. We are also thankful to Pharmalab Inc. for helping us with the formulation and packaging of the ready-to-use test products (buttermilk and placebo) consumed in the present study. This project was funded by a grant from the AAFC/Dairy Research Cluster. Patrick Couture and Benoît Lamarche have received funding in the past from the Dairy Farmers of Canada. Patrick Couture and Benoît Lamarche also have received funding from Dairy Australia and Agriculture and Agri-Food Canada. BL has received funding from Danone and he is the Chair of the *Expert Scientific Advisory Committee* (ESAC) that reviews funding applications as part of the funding program of the Dairy Farmers of Canada. Sylvie Gauthier and Yves Pouliot have received funding from the Dairy Farmers of Canada.

-Transition contextuelle-

Le prochain chapitre décrit les travaux réalisés en vue de répondre au troisième objectif de cette thèse, lequel visait à étudier le potentiel antioxydant (*in vitro*) d'hydrolysats de concentrés de babeurre frais et de lactosérum frais. Ce projet de recherche, réalisé parallèlement à l'étude clinique discutée au Chapitre 4 et 5, visait spécifiquement la valorisation de nouveaux ingrédients à base de babeurre pour l'industrie laitière, principalement l'industrie fromagère. Ces nouveaux ingrédients laitiers étaient obtenus par l'application de divers traitements technologiques sur des concentrés de babeurre frais, de lactosérum frais et de mélanges de concentrés de babeurre et de lactosérum (c.-à-d. 25 % de babeurre /75 % de lactosérum, 50 % de babeurre /50 % de lactosérum et 75 % de babeurre /25 % de lactosérum). À noter que les résultats obtenus pour les différents ratios ne sont pas présentés dans l'article scientifique faisant l'objet du prochain chapitre.

Notre première hypothèse de recherche était que *l'hydrolyse de concentrés de babeurre permettait la libération de séquences peptidiques spécifiques aux protéines de la MFGM ayant un potentiel antioxydant in vitro supérieur à ceux obtenus d'hydrolysats de concentrés de lactosérum et de lait écrémé*. Notre deuxième hypothèse de recherche était que *les traitements technologiques nécessaires à la formation de complexes protéiques (c.-à-d. la combinaison du chauffage, de l'acidification et de l'homogénéisation) affectaient la bioactivité des constituants du babeurre*.

Afin de valider ces hypothèses, le potentiel antioxydant *in vitro* de concentrés d'ultrafiltration de babeurre et de lactosérum frais, ainsi que celui de leurs produits de digestion (*in vitro*), a été analysé par l'étude de leur potentiel à capter des radicaux libres (c.-à-d. méthode ORAC) ainsi qu'à chélater des ions métalliques (c.-à-d. des ions ferriques). Ces modèles *in vitro* nous permettaient d'évaluer les deux principaux mécanismes d'action des peptides antioxydants d'origine alimentaire. L'impact de la dénaturation nécessaire à la formation de différents complexes protéiques a été évalué par ces deux mêmes modèles d'étude du potentiel antioxydant *in vitro*. Finalement, en raison de sa composition quasi identique au babeurre à l'exception des composés mineurs de la MFGM, le lait écrémé a été utilisé lors de cette étude comme témoin et comparé aux hydrolysats de concentrés de babeurre et au lactosérum frais.

CHAPITRE 6

-Antioxidant activities of buttermilk proteins, whey proteins and their enzymatic hydrolyzates-

Les travaux présents dans ce chapitre visaient à répondre au quatrième objectif de cette thèse

Les résultats présentés dans ce chapitre ont été publiés comme suit :

Conway, V., S.F. Gauthier, and Y. Pouliot.

Antioxidant activities of buttermilk proteins, whey proteins and their enzymatic hydrolyzates.

Journal of Agricultural and Food Chemistry 61 (2013) 364–372.

-Résumé-

La capacité de concentrés d'ultrafiltration de babeurre et de lactosérum à neutraliser les radicaux libres (ORAC) ainsi qu'à chélater des ions métalliques (MCC) ont été comparés à celle du lait écrémé. Dans le cadre de cette étude, les échantillons ont aussi subi une dénaturation thermique ainsi qu'une hydrolyse séquentielle par la pepsine (2 h) et la trypsine (3 h).

Lors de cette étude, la capacité de chélation des métaux la plus élevée a été obtenue pour le lait écrémé. Les valeurs ORAC observées pour les différents échantillons variaient entre 554,4 et 1319,6 μmol équivalent Trolox par gramme de protéine; les valeurs les plus élevées étant obtenues pour les hydrolysats de babeurre. Une séparation des composantes peptidiques des hydrolysats de babeurre par utilisation de la focalisation isoélectrique en phase liquide a provoqué une diminution des valeurs ORAC préalablement obtenues pour les hydrolysats de babeurre non fractionnés. Finalement, l'analyse par LC-MS des constituants protéiques des hydrolysats de lait écrémé, de babeurre, ainsi que ceux des fractions IEF, a permis d'observer que les peptides en provenance des protéines mineures de la membrane du globule de gras (MFGM), principalement la butyrophiline (BTN), seraient possiblement responsables du potentiel antioxydant supérieur obtenu pour le babeurre.

Ces résultats suggèrent que des hydrolysats des protéines de babeurre pourraient être utilisés comme source naturelle d'antioxydants.

-Abstract-

The oxygen radical absorbance capacities (ORAC) and metal chelating capacities (MCC) of protein concentrates prepared from buttermilk and cheese whey by ultrafiltration were compared with those of skim milk. Samples were also heat-denatured and hydrolyzed by pepsin for 2 h followed by trypsin for 3 h.

The highest MCC was obtained for hydrolyzed skim milk protein. ORAC values ranged from 554.4 to 1319.6 μmol Trolox equivalents per g of protein, with the highest value obtained for hydrolyzed buttermilk protein. Liquid-phase isoelectric focusing (IEF) of this hydrolysate yielded peptide fractions with lower ORAC values. LC-MS analysis of the hydrolyzed skim milk and buttermilk proteins and IEF fractions of the latter showed that peptides derived from milk fat globule membrane proteins, primarily butyrophilin (BTN), could be responsible for the superior antioxidant activity of buttermilk.

These results suggest overall that hydrolyzed buttermilk protein could be used as a source of natural antioxidants.

6.1 Introduction

Buttermilk, the by-product of the butter-making process, has an overall composition and appearance very similar to that of skim milk. Its principal difference from skim milk is that of being richer in milk fat globule membrane (MFGM) components. For this reason, buttermilk solids have attracted attention as a source of high added-value ingredients over the past decade [9, 11, 181, 204]. Despite this growing interest in buttermilk components such as MFGM proteins, their actual potential as ingredients with health benefits remains uncertain.

The antioxidant properties of peptides released during enzymatic hydrolysis of major milk proteins are well recognized [157]. Consisting generally of 3–20 amino acid residues, these antioxidant peptides can inhibit lipid or protein oxidation by any of several mechanisms [20], of which the best known are scavenging of free radicals and chelation of pro-oxidative metal ions [205].

The aim of the present study was to evaluate the antioxidant activity of buttermilk and cheese whey proteins hydrolyzed sequentially with pepsin then trypsin, and of peptides obtained from such hydrolyzates using liquid-phase isoelectric focusing (IEF). Skim milk was used as a control. The hydrolyzates were first concentrated using a pilot-scale ultrafiltration unit, and the impact of thermal denaturing on the antioxidant activity was studied. Antioxidant activity was determined using two different chemical assays, namely the oxygen radical absorbance capacity–fluorescein (ORAC_{FL}) method, used to evaluate free radical scavenging activity, and ferrous ion binding measurements to assess the transition metal ion chelating capacity (MCC). Finally, potentially antioxidant peptides were identified using liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS).

6.2 Materials and methods

6.2.1 Dairy products and reagents

Fresh buttermilk and fresh whey (the latter from Mozzarella cheese production) were obtained from a local dairy (L'Ancêtre, Bécancour, Canada). Skim milk powder was purchased at a local retail outlet. Porcine pepsin (EC 3.4.23.1, 2500–3500 U/mg protein), bovine trypsin (EC 3.4.21.4, Type I, 10,000 BAEE U/mg protein), *o*-phthaldialdehyde (OPA), 2,2'-azobis (2-methylpropionamide)-dihydrochloride (AAPH), 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman -2-carboxylic acid (Trolox), ferrous chloride, 3-(2-pyridyl)-5,6 bis (4-phenyl-sulfonic acid)-1,2,3-triazine (Ferozine) and Na₂EDTA were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, Canada). The Lactose/D-Galactose test kit was obtained from R-Biopharm (Darmstadt, Germany). All SDS-PAGE reagents were purchased from Bio-Rad (Mississauga, Canada).

6.2.2 Preparation of buttermilk and cheese whey concentrates

Fresh buttermilk and cheese whey were skimmed at 37 °C using a milk separator (Alpha-Laval, Lund, Sweden). Cheese whey was then microfiltered (MF) with co-current recirculation of permeate using a Bactocatch™ module (TetraPak, Lund, Sweden) containing a 1.4 μm ceramic membrane (Membralox, Mississauga, Canada). Microfiltered cheese whey and skim buttermilk were then concentrated to 9.4% (w/v) protein using a spiral wound UF membrane (MWCO 5 kDa, Koch Filtration Systems, Wilmington, MA). Part of the UF retentate was freeze-dried and the resulting powders were stored frozen (–35 °C) until further analysis, while the other part was frozen (–35 °C) until the denaturing step. The above processing procedure was repeated on two separate batches of buttermilk and whey, and the replicates were pooled to minimize the batch effect.

6.2.3 Denaturing of the dairy proteins

The pH of UF-concentrated buttermilk and whey (both dissolved at 9.4% w/v in 2.0 L of distilled water) was adjusted to 4.6 with 6 N HCl and the solutions were then heated to 90 °C with constant stirring for 30 min. The heat-treated suspensions were then passed five times at 65.5 MPa through an Emulsiflex-C50 device (Avestin, Canada) to homogenize the denatured proteins and then freeze-dried. The powders thus obtained were stored frozen (–35 °C). The denaturing procedure was performed three times, and the replicates were pooled to minimize the batch effect.

6.2.4 *In vitro* enzymatic hydrolysis

The procedure described in Conway et al. [181] was used. Briefly, 1 kg batches of protein solution (5% w/w in gastric salts solution) containing pepsin (enzyme to substrate mass ratio of 1:100) were stirred at constant speed for 2 h at 37 °C and pH 2.0 (adjusted with 1 N HCl). The pH was then adjusted to 8.0 with 1 N NaOH, and trypsin (enzyme to substrate mass ratio of 1:250) was added for an additional 3 h of hydrolysis. The enzymes and non-hydrolyzed proteins in the final hydrolyzates (5 h) were removed by UF (30 kDa MWCO) followed by diafiltration. All hydrolyzates were freeze-dried and kept at –35 °C for further analysis.

6.2.5 Fractionation of the buttermilk hydrolyzate by isoelectric focusing

UF-processed hydrolyzed buttermilk protein (49.9% w/w protein) was further fractionated using a Rotofor® liquid-phase IEF cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) as described by Groleau et al. [206], with some modifications. The protein hydrolyzate was dissolved in distilled water (1.25% w/v) at room temperature with constant stirring for 30 min. Each run (3.5 h) was carried out at constant power (12 W) and temperature (4 °C). In the course of each run, twenty peptide fractions were collected. These were pooled into three pH ranges, namely F1 (pH < 4.0), F2 (pH 4.0–8.0) and F3 (pH > 8.0). The pooled fractions were freeze-dried and stored frozen (–35 °C). The procedure was repeated until sufficient powder was obtained to perform further analysis. The protein contents of F1, F2 and F3 were found to be 51.6, 65.3 and 38.5% (w/w), respectively.

6.2.6 Chemical analyses

Moisture and ash contents were determined gravimetrically by drying at 100 °C for 5 h in a drying oven, followed by incineration in an ashing oven at 550 °C for 18 h. Nitrogen content based on the Dumas combustion method [166] was determined using a FP-528 Leco apparatus (Leco Corp., St Joseph, MI) with an EDTA sulfate (99.99% pure, w/w) standard curve. Nitrogen was expressed as protein using a conversion factor of 6.38. Lipids were extracted by the Mojonnier gravimetric extraction method [168], and the lactose content was measured using an enzymatic method [207]. The degree of protein hydrolysis (DH) was based on α -amino group titration using the *o*-phthaldialdehyde spectrophotometric method [208]. Samples were removed before adding enzyme (0 h) and at the end of the peptic (2 h) and tryptic (5 h) treatments. These analyses were performed in triplicate ($n = 3$).

SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) protein profiles before and during digestion were obtained using 12.5% polyacrylamide gel under reducing conditions as described elsewhere

[167]. Individual proteins were identified using a pre-stained SDS-PAGE MW broad-range standard from Bio-Rad. The protein bands were assigned according to Mather [45].

6.2.7 Free radical scavenging activity (ORAC_{FL})

The ORAC assay with fluorescein was performed according to a method described elsewhere [154]. Briefly, the assay was performed in duplicate on a BMG Fluostar Galaxy micro-plate reader (Durham, NC) equipped with an incubator and an injection pump, at excitation and emission wavelengths of 485 and 520 nm respectively. The procedure was conducted at 37 °C and pH 7.0 using Trolox as the standard. Micro-plate wells each contained 200 μ L of fluorescein solution (0.036 mg/L), 20 μ L of diluted sample (13 μ g/ μ L) and AAPH (8.6 mg/L) as peroxy generator. Fluorescence was recorded for 35 cycles of 210 s each. Results are expressed as μ M Trolox equivalents (TE) per gram of protein. Three independent assays were performed for each sample ($n = 3$).

6.2.8 Metal ion chelating capacity

Metal ion chelating capacity (MCC) was measured using ferrous ion binding capacity of our samples based on the method described by Dinis et al. [209]. Briefly, 20 μ L of 1.2 mM ferrous chloride (FeCl₂) was added to 200 μ L of sample at different protein concentrations (1, 2 and 4 mg/mL) and the reaction was initiated by adding 20 μ L of 2.4 mM ferrozine (i.e. a reducing agent). All solutions were prepared in Milli-Q water and Na₂EDTA was used as the standard. The mixture was first shaken vigorously for 10 min and then left to stand at room temperature for 10 min. As ferrozine-ferrous ion complexes form a stable magenta color that can be measured at 562 nm, the absorbance decrease was measured at 562 nm with a Multiskan model 1500 micro-plate reader (Thermolabsystem, Waltham, MA). The metal chelating capacity (%), more precisely the inhibition of ferrozine-ferrous ion complex formation (%), was calculated using the equation

$$[(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

where A_0 is the absorbance of the negative control and A_1 is the absorbance of the sample (or standard positive control). The negative control did not contain complex-forming molecules.

6.2.9 LC-MS analysis

The peptide contents of the hydrolyzed proteins and their IEF fractions were analyzed using a Quad Agilent Series 1100 LC-MS (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) consisting of a vacuum degasser (G1322A), binary pump (G1312A), autosampler (G1329A), thermostat controlled column compartment (G1315A) and a diode

array detector (G1315A) monitoring at 214 nm and 280 nm. The C18 column used was a Luna 5 μm (2 mm i.d. \times 250 mm, Phenomenex, Torrance, CA) maintained at 40 °C. Data processing was carried out using Chem Station software (version B.01.03 SR1, Agilent Technologies, Santa Clara, CA).

Elution was performed under the following conditions : injection volume 5 μL ; flow rate 0.2 mL/min; solvent A, water/acetonitrile/trifluoroacetic acid (TFA) (99:1:0.1, v/v); solvent B, acetonitrile/water/TFA (90:10:0.11, v/v). Samples were rehydrated in solvent A (20 mg/mL) and eluted with a linear gradient from 0 to 40% of solvent B over 90 min, followed by a 35 min linear gradient of 40 to 100% of solvent B.

The flow was split prior to the detector and electrospray mass spectrometry was performed in the positive ion mode using a direct infusion method at a rate of 0.5 mL/min. Peptides eluted from the HPLC were mixed with propionic acid (2%). Nitrogen was used as the nebulizer and drying gas at a rate of 9.0 L/min, 350 °C and 20 psi. The capillary voltage was kept at 4000 V. Mass spectra were acquired over the mass/charge (m/z) range 200–1600. Peptide tools software (version 8.03, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) was used to interpret MS spectra.

6.2.10 Statistical analysis

Statistical differences were revealed based on two-way factorial ANOVA using the MIXED procedure of SAS 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC). Different variances were modeled on each level of “SAMPLE” in order to meet the model assumptions for “DH-SAMPLES” and “MCC-SAMPLES”. When a significant effect was found, post-hoc multiple comparisons were made using the step-down Bonferroni correction. A P value < 0.05 was considered statistically significant.

6.3 Results and discussion

6.3.1 Protein concentrate composition and hydrolyzate characterization

The protein, lactose, lipid and ash contents of the protein concentrates and of skim milk are expressed in Table 10 as % dry matter, along with degree of hydrolysis by pepsin followed by trypsin. Buttermilk concentrates (BC) differed from cheese whey concentrates (WC) and skim milk (SM) in lipid content (13–15 %). Buttermilk protein (native and denatured) showed low final (5 h) degrees of hydrolysis compared to all other samples. It is known that most MFGM proteins are glycosylated. This particularity has been reported to hinder hydrolysis by pepsin [210, 211]. Even though denaturing a protein usually increases its susceptibility to proteolysis, the heat-denatured buttermilk protein concentrate (DBC) gave the lowest final degree of hydrolysis (6.4 %). This may be associated with increased milk fat globule size following heat treatment [212] resulting from interactions of whey proteins and caseins with denatured MFGM proteins [53]. Indeed, it is a known fact that larger fat particles are digested more slowly [213]. We can presume that skim milk proteins aggregated at the MFGM surface have increased the hindrance of enzymatic hydrolysis of MFGM proteins.

The SDS-PAGE profiles of the concentrates before (0 h) and during treatment with pepsin followed by trypsin show that buttermilk protein (heat-denatured or not) contained the most MFGM protein, while whey concentrate (WC) contained the most β -LG and α -LA but no caseins (Figure 32). After peptic digestion, MFGM-derived proteins and caseins were hydrolyzed in all samples, while β -LG appeared to resist the action of pepsin, except in the denatured concentrates (BDC and DWC), in which the β -LG band (~18 kDa) disappeared. It is known that following heat treatment, whey proteins lose their globular conformation, which increases their susceptibility to hydrolysis [214]. At the end of tryptic digestion, all proteins were hydrolyzed to peptides smaller than 7 kDa, except in WC, in which a faint β -LG band remained visible.

Table 10 : Sample composition and degree of hydrolysis (DH) during treatment with pepsin (2 h) followed by trypsin (5 h).

sample ^c	dry matter (%) ^a				DH (%) ^{a,b}	
	protein	lactose	lipid	ash	2 h	5 h
BC	54.6 ± 0.2	28.0 ± 0.3	14.9 ± 0.3	6.0 ± 0.0	1.7 ± 0.1 d	7.5 ± 0.1 c
DBC	54.4 ± 0.1	19.9 ± 0.3	13.4 ± 0.4	6.0 ± 0.0	2.5 ± 0.1 c	6.4 ± 0.3 d
WC	74.5 ± 0.2	10.2 ± 0.3	7.8 ± 0.1	1.7 ± 0.0	2.0 ± 0.3 cd	8.2 ± 0.5 c
DWC	75.9 ± 0.1	8.6 ± 0.0	6.9 ± 1.5	1.7 ± 0.0	10.1 ± 0.5 a	17.1 ± 0.6 a
SM	37.2 ± 0.0	54.2 ± 0.6	1.0 ± 0.0	8.4 ± 0.1	3.2 ± 0.3 b	10.1 ± 0.2 b

^a Data are mean ± SD of three independent experiments ($n = 3$). ^b Different letters within a column indicate significant difference ($P < 0.05$). ^c BC, buttermilk concentrate; DBC, denatured buttermilk concentrate; WC, whey concentrate; DWC, denatured whey concentrate; SM, skim milk.

6.3.2 Effect of enzymatic hydrolysis on free radical scavenging ability

Table 11 presents the free radical scavenging activity (ORAC_{FL}) of the dairy protein concentrates and skim milk proteins before and after hydrolysis with pepsin followed by trypsin. Hydrolysis increased the free radical scavenging activity in all cases. The highest ORAC_{FL} values were obtained after the 5 h treatment, with values ranging from 554.4 to 1319.6 $\mu\text{mol TE/g}$ of protein. It is plausible that unfolding of the protein structure exposed amino acids previously unavailable within the native protein structure, resulting in an overall increase of the antioxidant activity [205]. The observed increase in free radical scavenging activity was significant ($P < 0.05$).

Buttermilk concentrates gave the highest ORAC_{FL} scores following the 5 h treatment, with values of 1319.6 and 1052.0 $\mu\text{mol TE per g}$ of protein respectively for native (BC) and heat-denatured protein (DBC). Although denaturing had a negative impact on radical scavenging activity, the final hydrolyzate was still more active than all other samples. The MFGM proteins occurring as minor components of buttermilk are most likely responsible for this characteristic. As confirmed by SDS-PAGE (Figure 32), buttermilk contained larger amounts of MFGM proteins than did the other dairy products. Britten et al. have reported that MFGM proteins account for up to 19 % of the total protein in buttermilk [23], which suggests that 'minor' may be an inappropriate qualifier. Chen et al. have suggested the contribution of these proteins to the antioxidant capacity of milk [215]. These authors reported a significant increase in the free radical scavenging activity of milk in proportion with the milk fat and thus MFGM substance content. Furthermore, buttermilk is well known for its high content of polar lipids compared to skim milk (2.03 % versus 0.28 %, on a dry matter basis) [11]. These polar lipids may also play a role in the superior antioxidant activity found in buttermilk concentrates. Gavella et al. [216] have reported the protective action of gangliosides against reactive oxygen species. The authors attributed this phenomenon mainly to the ability of gangliosides to chelate iron. In a similar manner, MFGM phospholipids with long polyunsaturated fatty acids are known for their cation-binding capacity [217]

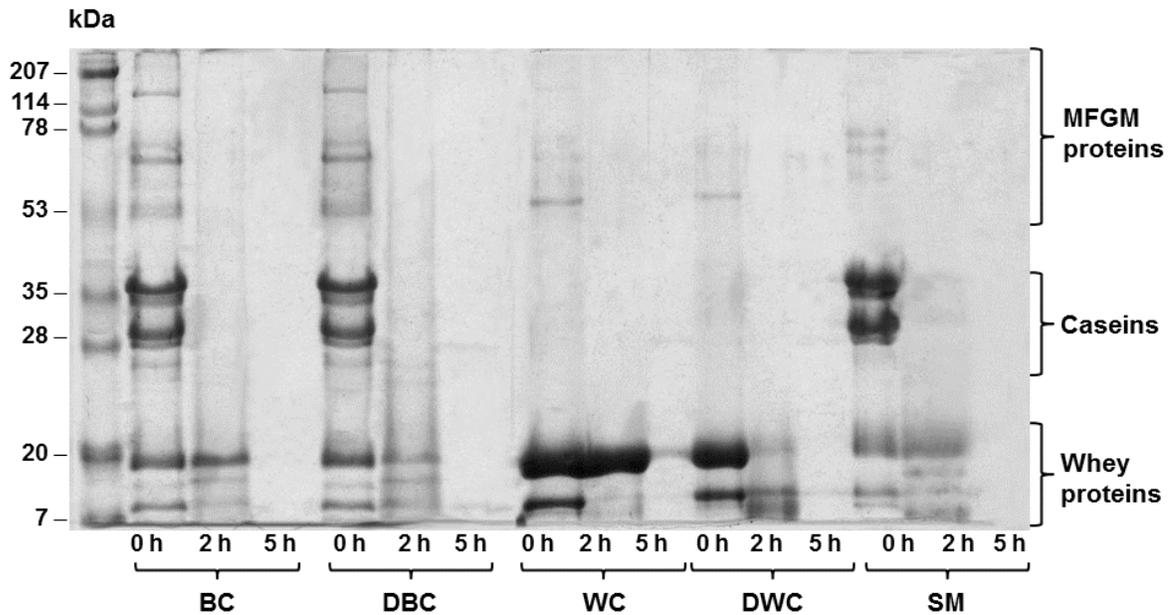


Figure 32 : SDS-PAGE analysis of dairy protein concentrates before (0 h) and during hydrolysis with pepsin (2 h) followed by trypsin (5 h). MFGM, milk fat globule membrane; BC, buttermilk concentrate; DBC, denatured buttermilk concentrate; WC, whey concentrate; DWC, denatured whey concentrate; SM, skim milk.

No significant difference between the scavenging activities of enzyme-hydrolyzed whey concentrate and skim milk was observed in this experiment, based on the ORAC_{FL} assay. This suggests that peptides originating from major whey proteins (α -lactalbumin and β -lactoglobulin) were most likely responsible for the antioxidant activity of these samples, since the casein content of skim milk (about 80 %) did not improve its scavenging activity to any significant degree. The antioxidant activity of bovine whey protein peptides has been reported previously [84].

Our results also revealed a greater impact of denaturing on the free radical scavenging activity of cheese whey protein concentrate, which yielded the lowest ORAC_{FL} values (554.4 μ mol TE/g of protein) following the 5 h sequential hydrolysis. This decrease may result from thermally induced polymerization. It is well known that heated whey proteins form homopolymers or heteropolymers through hydrophobic interactions and/or thiol/disulfide exchanges [50]. Interactions of this type likely affected the nature of the peptides released upon digestion and the ability of denatured whey protein to scavenge free radicals. In fact, protein hydrolyzates display different antioxidant activities depending on peptide size, amino acid sequence, and the presence of amino acids that are capable of involvement in oxidative reactions [84]. We also note that denatured whey protein (DWC) gave the highest degree of hydrolysis (Table 10). As reported elsewhere, extensive proteolysis is known to decrease antioxidant activity [156].

Table 11 : Free radical scavenging activity^a before (0 h) and during treatment with pepsin (2 h) followed by trypsin (5 h).

sample ^b	ORAC _{FL} (μmol TE/g of protein)		
	0 h	2 h ^c	5 h ^c
BC	4.6 ± 4.3	900.5 ± 34.5 a	1319.6 ± 46.7 a
DBC	6.1 ± 0.8	476.5 ± 48.7 b	1052.0 ± 42.6 b
WC	< LD ^d	336.8 ± 24.3 cd	782.5 ± 34.8 c
DWC	3.7 ± 0.2	356.9 ± 30.5 bcd	554.4 ± 14.5 d
SM	< LD	458.6 ± 35.7 b	811.7 ± 8.0 c

^a Radical scavenging activity data (ORAC_{FL} values) are means ± SD of three independent experiments ($n = 3$). ^b BC, buttermilk concentrate; DBC, denatured buttermilk concentrate; WC, whey concentrate; DWC, denatured whey concentrate; SM, skim milk. ^c Means with different letters within a column indicate significant difference ($P < 0.05$). ^d ORAC_{FL} values below the limit of detection.

6.3.3 Metal chelating capacity (MCC) of enzymatic hydrolysates

As shown in Table 12, all of the dairy proteins subjected to the 5 h hydrolytic treatment had ferrous ion reducing capacity as expressed in MCC. At both 4 mg and 2 mg/mL, hydrolyzed skim milk protein (HSM) showed the highest chelating capacity. At 1 mg/mL, no significant difference was noted between the ferrous ion binding capacities of hydrolyzed skim milk protein (HSM), buttermilk protein concentrate (HBC) and denatured buttermilk protein concentrate (HDBC). The lowest iron-binding capacity was observed for hydrolyzed denatured whey protein concentrate (HDWC). Our results suggest that casein peptides were largely responsible for the iron-chelating capacity of our samples. Casein-derived peptides, more specifically phosphopeptides, have been reported to possess capacity for binding minerals such as ferric (Fe^{3+}) ion [80]. Indeed, the polar side-chains of certain amino acid residues (C, S, W or Y) have been associated with the ability of phosphopeptides to interact with metals [218].

Denaturing the protein using heat did not have a significant effect on the iron-binding ability of the final hydrolyzate in the case of buttermilk proteins or whey proteins at any of the concentrations tested, except for the decrease at the highest concentration tested in the case of whey protein (Table 12). The ferrous ion binding capacity of our hydrolysates seems to be associated with casein and hence the presence of phosphopeptides. Since the strong negative charge borne by phosphopeptides interferes with their hydrolysis [80], we reason that it also interferes with the aggregation of peptides and thus the loss of chelating capacity.

Overall, our results suggest that peptides released specifically from buttermilk proteins by pepsin and trypsin provide anti-oxidation capacity mainly by acting as free radical scavengers (Table 11) rather than by chelating metals such as iron (Table 12).

Table 12 : Metal-chelating capacity (MCC) of dairy proteins hydrolyzed by pepsin and trypsin tested at different concentrations and compared to a standard (Na₂EDTA).

Sample ^c	Metal chelating capacity (MCC %) ^{a,b,c}		
	1 mg/ml	2 mg/ml	4 mg/ml
HBC	16.4 ± 3.2 b	30.4 ± 4.1 c	46.7 ± 4.7 c
HDBC	12.5 ± 9.0 bc	24.7 ± 10.0 c	41.9 ± 7.5 cd
HWC	1.0 ± 1.9 c	5.4 ± 1.6 d	27.8 ± 3.6 d
HDWC	1.5 ± 1.0 c	3.0 ± 2.1 d	18.7 ± 6.2 e
HSM	25.5 ± 4.4 b	42.3 ± 6.2 b	63.6 ± 4.1 b
EDTA	100.0 ± 0.1 a	99.9 ± 0.2 a	99.9 ± 0.1 a

^a Data are mean ± SD of three independent experiments (*n* = 4). ^b Different letters within a column indicate significant difference (*P* < 0.05). ^c Metal chelating capacity was measured by the ferrous ion binding capacity of samples. HBC, hydrolyzed buttermilk concentrate; HDBC, hydrolyzed denatured buttermilk concentrate; HWC, hydrolyzed whey concentrate; HDWC, hydrolyzed denatured whey concentrate; HSM, hydrolyzed skim milk.

6.3.4 Fractionation and identification of potential antioxidant peptides

Since the greatest free-radical-scavenging activity was observed in the case of hydrolyzed buttermilk protein concentrate (Table 11), this material was selected for further separation into three peptide fractions by liquid-phase IEF. Table 12 presents the ORAC_{FL} values for these fractions compared to the hydrolyzed protein concentrate. Our results suggest that the components responsible for the free radical scavenging activity are found mainly in the neutral fraction (F2, pH 4.0–8.0). These results are consistent with published studies, in which amino acid residues with hydrophobic or uncharged side chains are associated frequently with antioxidant activity of peptides. However, fractionation reduces the overall ability to scavenge free radicals. This observation suggests the presence of a wide range of antioxidant peptides contained in hydrolyzed buttermilk protein, and possibly the presence of synergistic interactions between peptides.

Table 13 : Free radical scavenging activity^a of hydrolyzed buttermilk concentrate (HBC) and its liquid-phase IEF fractions (F1–F3).

sample	ORAC _{FL} ^b ($\mu\text{mol TE/g}$ of protein)
HBC ^c	1319.6 \pm 46.7 a
F1	555.1 \pm 38.0 c
F2	752.1 \pm 23.4 b
F3	476.6 \pm 52.4 c

^a Radical scavenging activity (ORAC_{FL} values) are means \pm SD of three independent experiments ($n = 3$); ^b Means with different letters within the column indicate significant difference ($P < 0.05$). ^c Value reported in Table 11.

Based on the ORAC_{FL} value obtained for the neutral fraction (F2) and on the RP-HPLC profiles obtained at 214 nm (Figure 32) and 280 nm (Figure 33) for hydrolyzed skim milk protein and for buttermilk protein and its IEF fractions, we selected the peaks that were largest in both F2 and hydrolyzed buttermilk protein or found only in the latter. For subsequent identification of potentially antioxidant buttermilk-protein-derived peptides, a scale was established for scoring peptide sequences based on the presence and position of certain amino acid residues, based on a literature review and summarized in Table 14. Peptide peaks scoring >5.0 were selected and are shown in Table 15 as potentially antioxidant sequences in buttermilk protein hydrolyzate.

Table 15 shows that several of the potentially antioxidant peptides identified by LC-MS were derived from MFGM proteins. In fact, these minor dairy proteins are composed of a very diverse group of proteins represented predominantly by butyrophilin (BTN), xanthine dehydrogenase/oxidase (XO), cluster of differentiation (CD36), periodic acid Schiff III (PAS III), adipophilin (ADPH), fatty-acid binding protein (FABP) and periodic acid Schiff 6/7 (PAS 6/7). BTN represents 20–43 % of bovine MFGM proteins [45] and is known as the most abundant MFGM protein, followed by XO, which accounts for up to 20 % [12].

Table 14 : Scale used to attribute antioxidant scores to peptides based on the presence and position of certain amino acid residues^a within the amino acid sequence.

peptide characteristics	points ^b added to the antioxidant score
W within the amino acid sequence	5
Y within the amino acid sequence	2
Short sequence length (2–10 residues)	2
H, K, P, F, V or I within the sequence	1
Y, W, V or L residues at N-terminus	0.5
W, Y and M residues at C-terminus	0.5

^a The single-letter amino acid code is used. ^b Relative values is based on the literature.

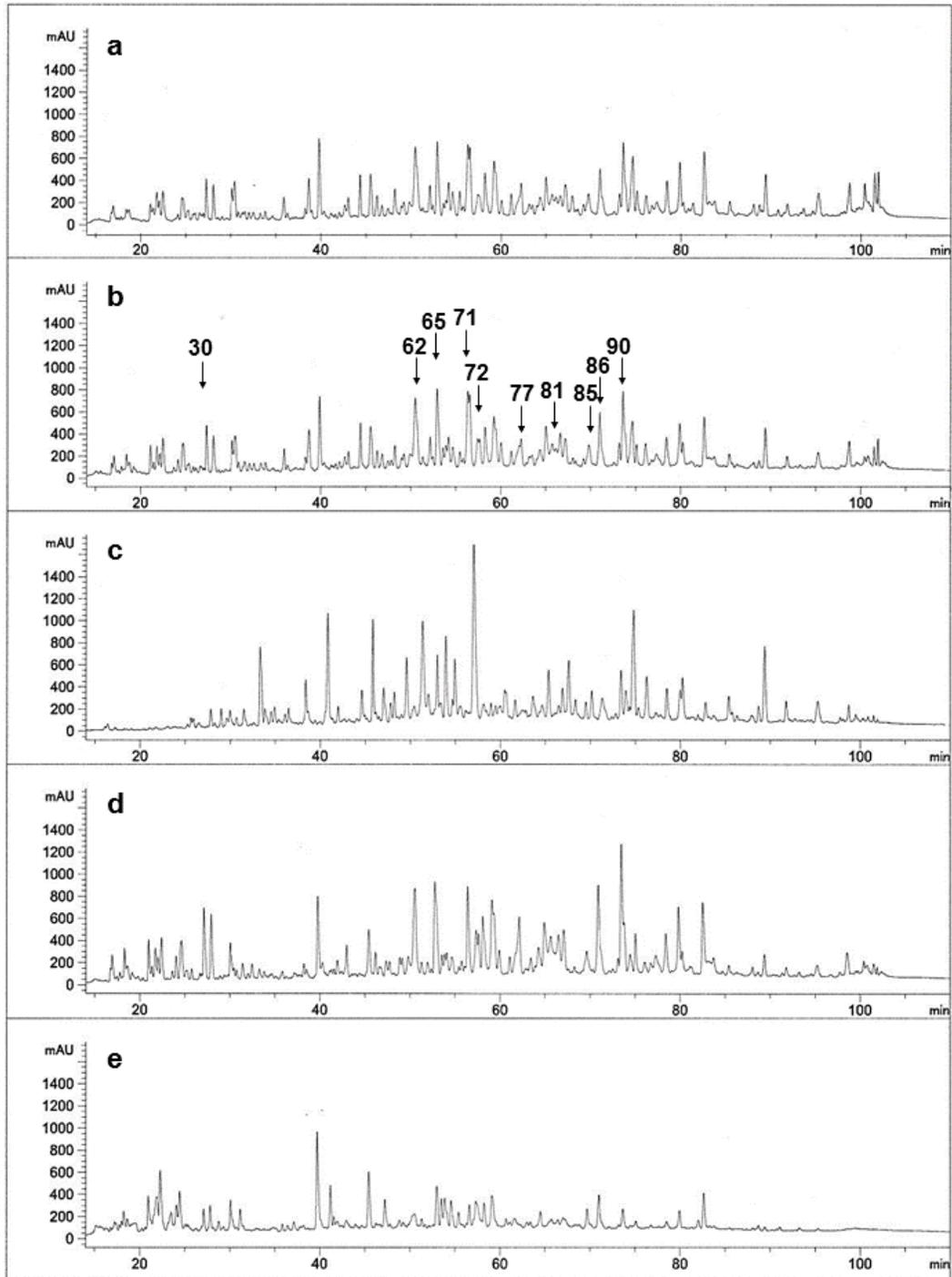


Figure 33 : RP-HPLC elution profiles (absorbance measured at 214 nm) of hydrolyzed (2 h pepsin followed by 3 h trypsin treatment) skim milk proteins (a), hydrolyzed buttermilk protein concentrate (b), and of peptide fractions obtained by liquid-phase isoelectric focusing of hydrolyzed buttermilk protein concentrate (c = F1; d = F2; e = F3).

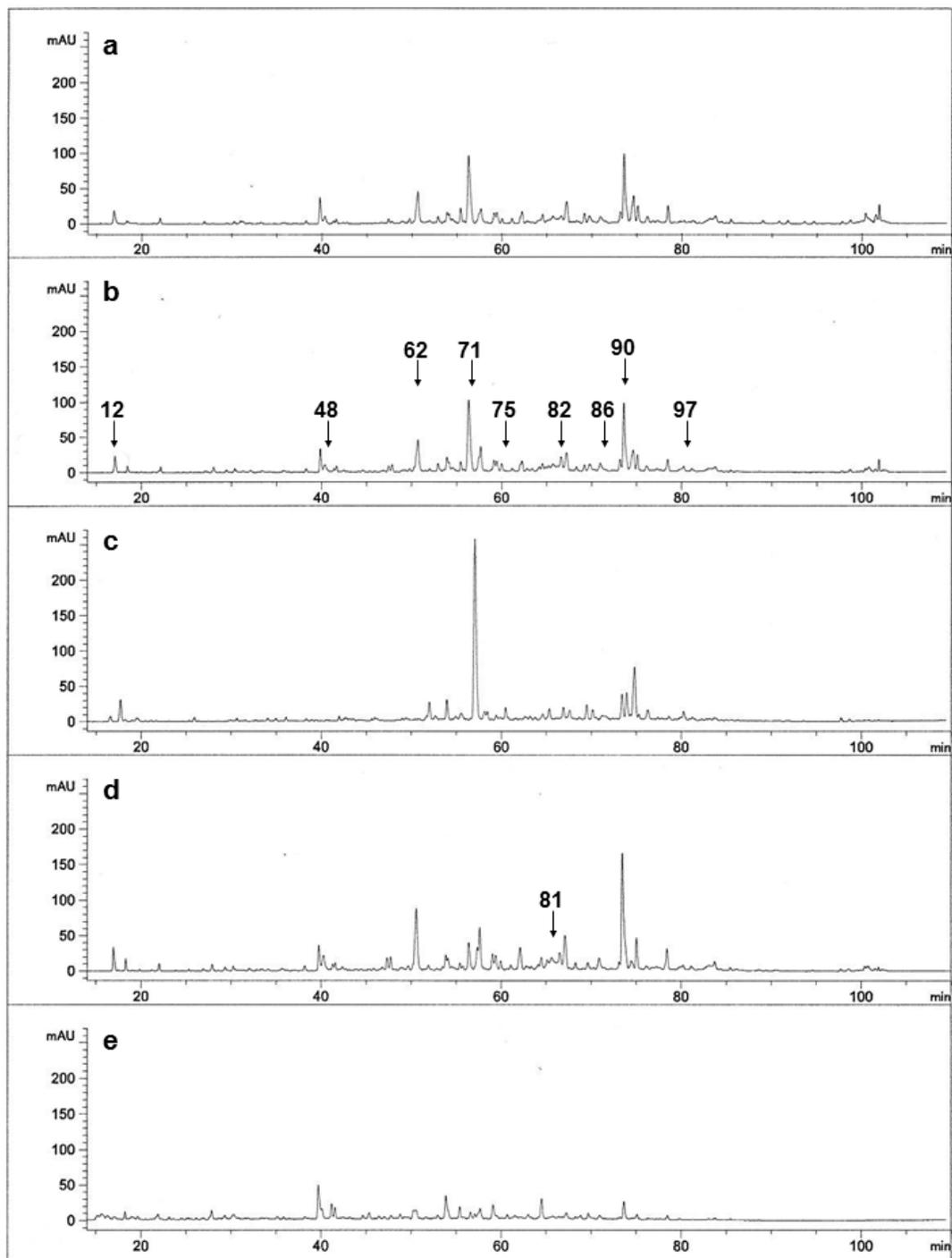


Figure 34 : RP-HPLC elution profiles (absorbance measured at 280 nm) of hydrolyzed (2 h pepsin followed by 3 h trypsin treatment) skim milk proteins (a), hydrolyzed buttermilk protein concentrate (b), and of peptide fractions obtained by liquid-phase isoelectric focusing of hydrolyzed buttermilk protein concentrate (c = F1; d = F2; e = F3).

BTN is the main source of the peptides identified by LC-MS in hydrolyzed buttermilk proteins (Table 15), accounting for 20 of 48. Moreover, antioxidant scores of these peptides range from 5.5 to 16.5, suggesting that this MFGM protein is likely the principal source of the antioxidant peptides in our buttermilk hydrolyzate. BTN fragments f396–412 (VGVFLDYESGDIFFFYNM), f316–334 (DSWPCVMGREAFSTGRHYW), f231–249 (LGLLTIGSIFFTWRLYKER) and f413–433 (TDGSHIYTFKASFSGPLRPF) all have antioxidant scores greater than 10.0 (10.0–16.5). Sequences of such length (17–21 residues) have been associated previously with antioxidant activity [20]. Meanwhile, CD36 f200–212, PAS 6/7 f259–278, PAS 6/7 f297–319 and XO f1060–1098 have antioxidant scores in the range of 10.0–16.0 (based on Table 14). All of these peptides are rich in amino acid residues associated with antioxidant activity (W, Y, H, K, P, F, V, I, L or M), sometimes bearing them (W, V, L F, K, M, or I) at the N- or C-terminal position. It has been suggested that large peptides may play the role of a physical barrier against oxidation initiators by forming a membrane protecting more oxidation labile compounds such as unsaturated fatty acids [20, 156]. Of course it is likely that these peptides are hydrolyzed by digestive enzymes in the gastrointestinal tract, thus releasing shorter potentially antioxidant peptides.

Among the other antioxidant peptides identified by LC-MS (Table 15), five were derived from α_{s2} -CN, four each from α_{s1} -CN and β -LG, and two from β -CN. Of the 48 peptide sequences listed in Table 6–6, 40 contain one or more W and/or Y residues in their sequence, which explains the high antioxidant scores attributed to them (Table 14). Twelve peptides possess a terminal W residue, 11 peptides have a C-terminal Y residue, 5 have an N-terminal V residue, and 5 have a M residue either in their sequence or at the C-terminal position. The presence of terminal Y and W residues has been associated with superior free radical scavenging ability [18], as has a C-terminal M residue [160]. In addition, peptide XO f998–1003 (CIIPTK) contains amino acid residues (K and I) that are highly correlated (i.e. $P < 0.001$) or (in the case of T) correlated (i.e. $P < 0.05$) with antioxidant activity, as reported previously [219].

Furthermore, this peptide contains a P residue, which has been described previously as one of the most important residues (along with H) in the lipoprotein peroxidation-inhibitory activity of peptides derived from soybean protein [220]. Finally, three of the peptide fragments listed in Table 15 have already been associated with biological activity relevant to cardiovascular health. Indeed, fragments α_{s1} -CN f194–199 (TTMPLW), β -LG f15–20 (VAGTWY), and β -LG f91–100 (VLVLDTDYK) are recognized as antihypertensive peptides [18, 221].

Although assay such as ORAC or metal chelating capacity can inform on the antioxidant potential of peptides, those *in vitro* methods do not necessarily reflect physiological conditions or mechanistic. Among the methods

available in literature, ORAC assay, by using free peroxy radical as well as physiological conditions, seems to be the preferred choice for *in vitro* antioxidant analysis and it represents the assay with the broader application possibilities [149]. Furthermore, since antioxidants have different mechanisms of action (i.e. radical chain inhibition, metal chelation, oxidative enzyme inhibition or antioxidant enzyme cofactors), it is preferable to use a combination of methods in the assessment of the antioxidant's capacity [149]. For this reason, we have chosen to study the free radical scavenging ability (i.e. a radical chain inhibition assay) as well as the metal chelating capacity of our samples. Since ferrous ions are the most effective pro-oxidants in food systems, we used the ferrous ion chelating ability of our sample to assess the metal chelating capacity. Moreover, due to the extreme diversity of buttermilk proteins, the peptides identified in the present study are not likely the only ones responsible for the antioxidant activity of the hydrolyzates. However, peptides such as those derived from BTN very likely make a substantial contribution to this activity.

To the best of our knowledge, this is the first study to highlight the strong free-radical-scavenging ability of hydrolyzed buttermilk proteins and the likely contribution of MFGM protein fragments to the antioxidant capacity of buttermilk. This study also shows the impact of thermal and enzymatic processing on the antioxidant activity of proteins obtained from buttermilk and whey, and suggests future industrial treatments for these products.

Table 15 : Potentially antioxidant peptides derived from buttermilk proteins, as identified by LC-MS.

Observed mass	Calculated mass ^a	protein fragment ^b	amino acid sequence ^c	antioxidant score ^d
305.13	305.14	BTN f242–243	TW	7.5
351.11	351.16	BTN f40–41	WF	8.5
	351.16	BTN f367–368	FW	8.5
351.16	351.16	BTN f40–41	WF	8.5
	351.16	BTN f367–368	FW	8.5
	351.18	PAS 6/7 f181–183	VAY	6.0
422.23	422.22	MUC1 f408–410	QIY	5.5
	422.22	PAS 6/7 f72–74	IQY	5.5
	422.22	PAS 6/7 f338–341	VAAY	6.0
	422.25	BTN f245–247	LYK	5.5
437.21	437.26	α_{s1} -CN f102–104	KKY	6.5
	437.23	α_{s2} -CN f78–80	YQK	5.5
		α_{s2} -CN f89–91	YQK	5.5
		α_{s2} -CN f171–173	YKQ	5.5
503.21	503.24	BTN f368–371	WAVE	8.5
514.22	514.24	α_{s1} -CN f91–94	YLGY	7.0
545.31	545.30	CD36 f52–55	NWVK	9.0
	545.32	β — LG f78–82	IPAVF	6.0
572.32	572.22	BTN f373–377	YNGY	7.0
607.26	607.31	XO f335–339	WFAGK	9.5
616.28	616.32	BTN f368–372	WAVEL	8.5
620.96	620.34	BTN f38–41	LRWF	8.5
673.37	673.34	β — CN f157–162	FPPQSV	6.0
	673.38	XO f998–1003	CIPTK	6.0
695.29	695.33	β — LG f15–20	VAGTWY	11
747.32	747.36	α_{s1} -CN f194–199	TTMPLW	8.5
842.43	842.36	BTN f119–126	GSDPHISM	5.5
865.30	865.38	α_{s1} -CN f157–164	DAYPSGAW	10.5

Observed mass	Calculated mass ^a	protein fragment ^b	amino acid sequence ^c	antioxidant score ^d
919.67	919.59	BTN f486–493	LHSKLIPL	6.5
978.79	978.57	CD36 f285–292	KGIPVYRF	9.0
1064.86	1064.58	β— LG F 92–100	VLVLDTDYK	7.5
1099.54	1102.61	XO f290–292	TLTLSFFFK	6.0
	1100.63	BTN f264–271	LEELKWKR	9.5
1156.95	1156.59	αs2-CN f171–179	YQKFALPQY	10
	1156.62	β— CN f193–202	YQEPVLGPVR	8.5
1199.52	1199.49	BTN f410–419	YNMTDGSHIY	9.0
1395.21	1395.76	BTN f269–280	WKRATLHAVDVT	9.5
1490.13	1490.91	BTN f228–241	LVVLGLLTIGSIFF	6.5
1564.60	1564.72	CD36 f200–212	FYPYNNTADGIYK	10.0
2015.66	2014.90	BTN f396–412	VGVFLDYESGDIFFYNM	11.0
2285.49	2283.99	BTN f316–334	DSWPCVMGREAFTSGRHYW	16.5
2313.14	2312.30	BTN f231–249	LGLLTIGSIFFTWRLYKER	12.5
	2314.14	BTN f413–433	TDGSHIYTFKASFSGPLRPF	10.0
	2314.16	PAS 6/7 f259–278	KDNTIPNKQITASSYYKTWG	15.0
2594.87	2594.24	PAS 6/7 f297–319	FNAWTAQNTSASEWLQIDLGSQK	13.0
4123.17	4122.00	XO f1060–1098	IYISETSTNTVPNSSPTAASVSTDIYGQAV YEACQTILK	16.0

^a Monoisotopic mass (Da). ^b α_{s1}-CN is alpha_{s1}-casein; α_{s2}-CN is alpha_{s2}-casein; β-CN is beta-casein; β-LG is beta-lactoglobulin; BTN is butyrophilin; PAS III is periodic acid Shiff III; XO is xanthine dehydrogenase/oxidase; MUC1 is mutin 1; CD36 is cluster of differentiation; PAS 6/7 is periodic acid Shiff 6/7; ADPH is adipophilin. ^c The single-letter amino acid codes are used. ^d The antioxidant score was attributed as described in Table 7–5.

6.4 Conclusion

In conclusion, this study confirms the superior potential of buttermilk proteins for free radical scavenging, compared to whey proteins and skim milk proteins. It also shows the limited impact of processing on the free radical scavenging capacity of buttermilk proteins in comparison with whey and skim milk, and no impact on its ferrous ion sequestering capacity. This study thus provides useful information for increasing the commercial value of buttermilk as a multifunctional ingredient and suggests new ways to increase its recognition as a natural source of antioxidants capable of preventing oxidation processes in food systems.

6.5 Acknowledgements

We acknowledge Pascal Dubé for his precious help with ORAC_{FL} assays.

CHAPITRE 7

-Conclusion Générale-

Le but de cette thèse de doctorat était d'évaluer l'activité biologique des constituants du babeurre grâce à des modèles *in vitro* et clinique; l'objectif général étant d'évaluer leur impact sur certains facteurs de risque associés à la santé cardiovasculaire. Le babeurre représente la phase aqueuse libérée lors de la fabrication du beurre. Il consiste en un coproduit laitier singulièrement riche en PL ainsi qu'en protéines mineures provenant des fragments de la MFGM. Les constituants de la MFGM ont été associés à différentes activités biologiques, comme revue de façon exhaustive par Dewettinck et coll. (2008) [11]. Par contre, comme précisées par l'auteur, ces évidences demeuraient jusqu'à présent plutôt faibles. Au meilleur de nos connaissances, ce projet rapporte pour la première fois des résultats cliniques sur l'impact de la consommation de babeurre, non enrichi, non purifié ou modifié, sur certains facteurs de risques associés aux maladies cardiovasculaires (CVD).

L'hypothèse générale de ce projet doctoral était que *le babeurre, principalement en raison de son contenu élevé en constituants de MFGM, représente une source non négligeable de molécules bioactives ayant un impact sur la santé cardiovasculaire et pouvant conserver ou exprimer leur activité à la suite du processus de digestion gastro-intestinale.*

Afin de valider cette hypothèse générale, trois grands axes de recherche, ou objectifs spécifiques ont été identifiés. Ainsi, le premier volet du projet visait à évaluer le potentiel hypocholestérolémiant du babeurre par l'étude de sa capacité à influencer la solubilité micellaire du cholestérol *in vitro* (Chapitre 3). Lors de cette recherche, l'impact de la pasteurisation et de la concentration des constituants du babeurre par microfiltration a été évalué. Le deuxième volet consistait à mesurer cliniquement l'influence de la consommation de babeurre sur le profil lipidique ainsi que sur la tension artérielle. Pour ce faire, des sujets normotendus présentant une hypercholestérolémie modérée ont été recrutés afin de participer à une étude clinique réalisée en chassé-croisé à double insu (Chapitre 4 et 5). Finalement, le troisième volet de ce projet doctoral visait à comparer le potentiel antioxydant *in vitro* de babeurre frais et de lactosérum frais, préalablement concentrés par ultrafiltration, comparativement au lait écrémé (Chapitre 6). Dans ce volet, l'influence de différents traitements dénaturants, visant la formation de complexes entre les diverses protéines de babeurre, sur la capacité antioxydante *in vitro* a aussi été évaluée.

L'ensemble des travaux réalisés dans le cadre de ce projet de recherche a permis de valider notre hypothèse générale. En effet, le babeurre s'est effectivement avéré capable de modifier positivement le bilan lipidique chez des patients modérément hypercholestérolémiques. De plus, sa consommation a permis de diminuer significativement la tension artérielle, principalement en affectant les niveaux plasmatiques de l'enzyme de conversion de l'angiotensine-I (ACE). Finalement, des hydrolysats de concentrés de babeurre se sont avérés posséder une capacité antioxydante plus élevée que ceux de concentrés de lactosérum et de lait écrémé dans un modèle d'étude *in vitro*. Quoique les composés spécifiquement responsables de ces bienfaits n'aient pu être identifiés précisément, il semble que les composés protéiques et lipidiques de la MFGM soient les principaux responsables.

7.1 Résultats et avancement des connaissances

Dans un premier temps, nous avons démontré que certains constituants du babeurre de crème crue permettaient de diminuer la solubilité micellaire du cholestérol alors que celui en provenance de crème pasteurisée n'avait que peu d'effet sur cette dernière. De plus, en tentant de fractionner et de concentrer les constituants de la MFGM, nous avons constaté une diminution de l'effet bénéfique précédemment obtenue pour le babeurre de crème crue. Ensuite, en digérant les différentes fractions de babeurre nous avons pu observer une amélioration du potentiel d'insolubilisation du cholestérol *in vitro* pour le babeurre de crème pasteurisée. Ainsi, les trois principales conclusions à retenir des résultats obtenus lors de cette étude visant à répondre au premier objectif de cette thèse sont que : 1) les constituants du babeurre de crème crue permettent de diminuer significativement la solubilité micellaire du cholestérol *in vitro*; 2) la pasteurisation de la crème réduit l'activité hypocholestérolémiante *in vitro* des constituants du babeurre; 3) le potentiel d'insolubilisation du cholestérol peut être partiellement rétabli suivant une digestion séquentielle par la pepsine et la trypsine. Ces résultats probants confirment les hypothèses de recherche selon lesquelles certains constituants du babeurre permettent de diminuer la solubilité micellaire du cholestérol, et que cette activité biologique est affectée par l'application d'un traitement thermique (Chapitre 3).

Ensuite, nous avons pu confirmer cette observation *in vitro* grâce à la mise en place d'une étude clinique randomisée en chassé-croisé. En effet, la consommation de babeurre (45 g/jour) sur une période de quatre semaines a permis de diminuer significativement les niveaux plasmatiques de cholestérol total et de triglycérides lorsque comparée à un placebo chez des sujets modérément hypercholestérolémiques. De plus, chez les sujets présentant initialement un niveau plus élevé de LDL-C (c.-à-d. > 3.7 mmol/L), non seulement les réductions enregistrées au niveau du cholestérol total et des triglycérides étaient augmentées, mais une

diminution significative des niveaux plasmatiques de LDL-C a aussi été enregistrée. Comme posée en hypothèse, la diminution de l'absorption intestinale du cholestérol s'est avérée être le principal mécanisme impliqué dans l'amélioration du bilan lipidique chez les patients à la suite de la consommation de babeurre (Chapitre 4). Lors de cette même étude clinique, nous avons aussi observé une diminution de la tension artérielle moyenne, de la tension artérielle systolique ainsi que des niveaux plasmatiques d'enzyme de conversion de l'angiotensine-I (Chapitre 5). Ainsi, les quatre principales conclusions à retenir des résultats obtenus lors de cette étude visant à répondre au deuxième objectif de cette thèse sont que : 1) la consommation de babeurre permet, après seulement quatre semaines, de diminuer significativement les niveaux plasmatiques de cholestérol total, les triglycérides et d'ACE en plus de diminuer la pression artérielle chez des patients normotendus; 2) les patients avec des niveaux plus élevés de LDL-C (c.-à-d. > 3.7 mmol/L) réagissent mieux au traitement par le babeurre; 3) une diminution des niveaux de LDL-C comparable à celle obtenue par les phytostérols est obtenue chez le patient avec des niveaux initiaux de LDL-C marginalement élevés (c.-à-d. > 3.7 mmol/L); 4) aucun effet secondaire significatif n'a été déclaré suivant la consommation de babeurre. Ces résultats confirment les hypothèses de recherche selon lesquelles la présence de composés spécifiques au babeurre (c.-à-d. des composés de la MFGM) permet de limiter l'absorption des composantes lipidiques et de moduler la tension artérielle. Quoique la nature exacte des molécules impliquée n'a pu être confirmée lors de l'étude clinique, il semble probable que les lipides polaires véhiculés spécifiquement par le babeurre (environ six fois plus que dans le placebo) soient impliqués dans l'amélioration du bilan lipidique. De plus, puisqu'une diminution des niveaux plasmatiques de l'enzyme ACE a été enregistrée et que ces derniers ont été récemment associés à une diminution de l'activité de cette enzyme [125], il semble probable que le mécanisme expliquant la réduction de la pression artérielle chez les sujets ayant participé à l'étude clinique soit une inhibition de l'enzyme ACE par des séquences peptidiques spécifiques au babeurre.

Finalement, des hydrolysats de concentrés de babeurre frais (UF) obtenus de crèmes pasteurisées se sont avérés être une source de peptides antioxydants, telle que mesurée par la méthode ORAC, lorsque comparé à ceux de lait écrémé et de concentrés de lactosérum frais (UF). La capacité antioxydante *in vitro* des hydrolysats de concentrés de babeurre obtenus suivant l'application d'une combinaison de traitements technologiques (c.-à-d. chauffage, acidification et homogénéisation) n'a que peu été affectée lorsque comparée à ceux obtenus de concentrés de lactosérum dans les mêmes conditions (Chapitre 6). Ainsi, les trois principales conclusions à retenir des résultats obtenus lors de cette étude visant à répondre au troisième objectif de cette thèse sont que : 1) la digestion séquentielle par la pepsine et la trypsine permet de libérer des composantes peptidiques spécifiques au babeurre ayant la capacité de neutraliser les radicaux libres *in vitro*; 2) les traitements dénaturants affectent peu la capacité des hydrolysats de babeurre à neutraliser les radicaux libres (*in vitro*), lorsque comparée à ceux du lait écrémé et du lactosérum; 3) des peptides provenant de la

butyrophiline (BTN), la principale protéine de la MFGM, semblent en partie responsables de la capacité antioxydante (*in vitro*) du babeurre. Ces résultats confirment l'hypothèse de recherche selon laquelle l'hydrolyse de concentrés de babeurre permet la libération de séquences peptidiques spécifiques aux protéines de la MFGM ayant un potentiel antioxydant *in vitro* supérieur à ceux obtenus d'hydrolysats de concentrés de lactosérum et de lait écrémé. Par contre, quoique l'hypothèse selon laquelle les traitements technologiques affectent la bioactivité des constituants du babeurre soit vérifiée dans cette étude, la diminution observée dans le cas de l'activité antioxydante est moins marquée que dans le cas de la solubilité micellaire (Chapitre 3).

7.2 Importance des résultats

Les résultats générés par ce projet de recherche sont d'importance pour l'industrie laitière puisqu'ils permettent de démontrer cliniquement le potentiel du babeurre en tant qu'aliment permettant de gérer ou d'améliorer la santé cardiovasculaire après seulement quatre semaines de consommation. Contrairement à la quasi-totalité des études réalisées jusqu'à présent au sujet du babeurre, ce projet a permis de démontrer l'efficacité de celui-ci lorsque consommé en tant qu'aliment, non sous forme de suppléments purifiés ou sous une quelconque forme enrichie. Ces observations nous poussent à recadrer la recherche au sujet du babeurre en tant que source de composés nutraceutiques vers une approche considérant la totalité de la matrice alimentaire comme ayant un rôle, plus ou moins important, dans les bénéfices apportés suivant sa consommation. Par exemple, comme démontré aux Chapitres 3 et 6, le fractionnement des composantes du babeurre dans le but d'isoler et d'accroître sa bioactivité a provoqué une perte de l'activité biologique lui étant associée.

De plus, les résultats obtenus lors de ce projet doctoral sont pour la plupart rapportés pour la première fois dans la littérature et viennent paver la voie à une toute nouvelle utilisation du babeurre par les industriels. En effet, ayant longtemps été considéré comme un sous-produit de l'industrie laitière au même titre que le lait écrémé, le babeurre ne s'avère pas être simplement un sous-produit de la production de beurre, mais un coproduit à haute valeur ajoutée. L'ensemble de ses constituants (lipidiques et protéiques) s'est en effet avéré capable d'améliorer le bilan lipidique, mais aussi de réduire la tension artérielle chez des patients normotendus, en plus d'être une source potentielle de peptides antioxydants pouvant être libérés par la simple action de la digestion gastro-intestinale.

Finalement, autres résultats d'intérêt pour les industriels du domaine laitiers, les différents traitements technologiques subits par le babeurre (p. ex. pasteurisation de la crème, séchage et réhydratation) se sont avérés n'avoir que peu d'influence sur sa bioactivité à la suite d'une digestion gastro-intestinale. Cette observation supporte la facilité avec laquelle les industriels peuvent utiliser le babeurre en tant qu'ingrédient pouvant, sans traitement particulier, être incorporé dans la formulation de différents produits alimentaires.

7.3 Perspectives futures

Les résultats présentés dans cette thèse supportent la valorisation du babeurre en tant qu'aliment pouvant faire partie d'une saine alimentation visant à maintenir une bonne santé cardiovasculaire. Ce dernier pourrait, en ce sens, représenter une alternative simple, sécuritaire et économique aux traitements médicamenteux en prévention primaire des maladies cardiovasculaires. Maintenant, la principale étape majeure à franchir pour l'industrie laitière est la formulation et la création d'aliments fonctionnels à base de babeurre (p. ex. fromage, yaourt, boisson aromatisée) ayant des caractéristiques organoleptiques acceptables pour le consommateur tout en apportant des bénéfices au niveau de la santé lorsque consommée dans le cadre d'une alimentation normale.

En raison de la multidisciplinarité des travaux présentés dans cette thèse de doctorat, différentes questions restent non résolues et pavent maintenant la voie à diverses avenues de recherche futures au sujet du babeurre. Par exemple, il serait d'intérêt d'examiner la nature exacte des séquences peptidiques responsables de la capacité antioxydante et de l'effet hypotenseur du babeurre. De plus, l'effet de la consommation de babeurre sur une période prolongée (c.-à-d. supérieure à quatre semaines) chez différents types de patients (p. ex. hypercholestérolémiques et/ou hypertendus) servirait à compléter les connaissances apportées par l'ensemble des résultats de cette thèse. L'évaluation clinique du potentiel antioxydant du babeurre de par sa capacité à limiter la vitesse d'oxydation ainsi que la quantité de particules de LDL oxydées véhiculées par le sang pourrait venir compléter les résultats obtenus au Chapitre 6. Finalement, puisque l'inflammation systémique est directement impliquée dans le développement et la progression des maladies cardiovasculaires et de leurs comorbidités [81], l'influence de la consommation de babeurre sur différents marqueurs d'inflammation tels que l'interleukine-6 (IL-6), IL-18 et le facteur de nécrose tumorale- α (TNF- α) permettraient d'élargir les connaissances actuelles sur le potentiel de babeurre à améliorer ou maintenir la santé cardiovasculaire.

-Bibliographie-

1. Santé Canada, *Produits nutraceutiques/aliments fonctionnels et les allégations relatives aux effets sur la santé liés aux aliments*, 1998, Programme des produits thérapeutiques et Direction des aliments de la Direction générale de la protection de la santé. 33 pages.
2. Cinnamon, B., *Résultats de l'Enquête sur les aliments fonctionnels et les produits de santé naturels - 2007*, 2009, Statistics Canada, Ministre de l'Industrie. 39 pages.
3. Canada, S. *Mortalité, liste sommaire des causes, numéro 84F0209XPB*. 2008 [cited 2012 31 juillet]; Available from: <http://www.statcan.gc.ca/pub/84f0209x/84f0209x2008000-fra.pdf>.
4. Friberg, J., et al., *Rising Rates of Hospital Admissions for Atrial Fibrillation*. *Epidemiology*, 2003. **14**(6): p. 666-672 10.1097/01.ede.0000091649.26364.c0.
5. Groupe AGÉCO. *Fabrication de produits et sous-produits du lait au Québec et au Canada, 2003 à 2010*. [cited 2012 31 juillet]; Available from: <http://www.groupeageco.ca/fr/pdf/stat/QCM3.pdf>.
6. Astaire J. C., et al., *Concentration of polar MFGM lipids from buttermilk by microfiltration and supercritical fluid extraction*. *J. Dairy Sci.*, 2003. **86**: p. 2297-2307.
7. Noh S. K. and Koo S. I., *Egg sphingomyelin lowers the lymphatic absorption of cholesterol and alpha-tocopherol in rats*. *J. Nutri.*, 2003. **133**: p. 3571-3576.
8. Noh S. K. and Koo S. I., *Milk sphingomyelin is more effective than egg sphingomyelin in inhibiting intestinal absorption of cholesterol and fat in rats*. *J. Nutri.*, 2004. **134**: p. 2611-2616.
9. Spitsberg V. L., *Invited Review: Bovine milk fat globule membrane as a potential nutraceutical*. *J. Dairy Sci.*, 2005. **88**: p. 2289-2294.
10. Rombaut R. and Dewettinck K., *Properties, analysis and purification of milk polar lipids*. *Int. Dairy J.*, 2006. **16**: p. 1362-1373.
11. Dewettinck, K., et al., *Nutritional and technological aspects of milk fat globule membrane material*. *Int. Dairy J.*, 2008. **18**(5): p. 436-457.
12. Singh, H., *The milk fat globule membrane—A biophysical system for food applications*. *Curr. Opin. in Colloid Interface Sci.*, 2006. **11**(2–3): p. 154-163.

13. Kamau, S.M., et al., *Functional Significance of Bioactive Peptides Derived from Milk Proteins*. Food Rev. Int., 2010. **26**(4): p. 386-401.
14. Shah N. P., *Effects of milk-derived bioactives: an overview*. Br. J. Nutr., 2000. **84**: p. S3-S10.
15. Kilara A. and Panyam D., *Peptides from milk proteins and their properties*. Crit. Rev. Food Sci., 2003. **43**: p. 603-633.
16. Ricci-Cabello, I., M. Olalla Herrera, and R. Artacho, *Possible role of milk-derived bioactive peptides in the treatment and prevention of metabolic syndrome*. Nutr. Rev., 2012. **70**(4): p. 241-255.
17. Phelan, M. and D. Kerins, *The potential role of milk-derived peptides in cardiovascular disease*. Food Funct., 2011. **2**(3-4): p. 153-167.
18. Hernández-Ledesma, B., I. Recio, and L. Amigo, *β -Lactoglobulin as source of bioactive peptides*. Amino Acids, 2008. **35**(2): p. 257-265.
19. Hartmann, R. and H. Meisel, *Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications*. Curr. Opin. Biotechnol., 2007. **18**(2): p. 163-169.
20. Möller, N., et al., *Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects*. Eur. J. Nutr., 2008. **47**(4): p. 171-182.
21. Clare, D.A. and H.E. Swaisgood, *Bioactive Milk Peptides: A Prospectus*. J. Dairy Sci., 2000. **83**(6): p. 1187-1195.
22. Chandan, R.C., *Nutritive and Health Attributes of Dairy Ingredients*, in *Dairy Ingredients for Food Processing*, 2011, Wiley-Blackwell. p. 387-419.
23. Britten, M., S. Lamothe, and G. Robitaille, *Effect of cream treatment on phospholipids and protein recovery in butter-making process*. International Journal of Food Science & Technology, 2008. **43**(4): p. 651-657.
24. Vanderghem, C., et al., *Milk fat globule membrane and buttermilks: from composition to valorization*. Biotechnol. Agron. Soc., 2010. **14**(3): p. 485-500.
25. Eigel, W.N., et al., *Nomenclature of Proteins of Cow's Milk: Fifth Revision1*. J. Dairy Sci., 1984. **67**(8): p. 1599-1631.

26. Walstra, P., *Dairy Technology: Principles of Milk Properties and Processes*, 1999, CRC Press. 752 pages.
27. Holt, C. and L. Sawyer, *Caseins as rheomorphic proteins: interpretation of primary and secondary structures of the α_{S1} , β - and κ -caseins*. J. Chem. Soc. Faraday T., 1993. **89**(15): p. 2683-2692.
28. Walstra, P., *On the Stability of Casein Micelles*. J. Dairy Sci., 1990. **73**(8): p. 1965-1979.
29. Amiot J., et al., *Composition, propriétés physicochimiques, valeur nutritive, qualité technologique et techniques d'analyse du lait*, in *Science et Technologie du Lait, Transformation du lait*, 2002, Presses Internationales Polytechnique. 600 pages.
30. Kontopidis, G., C. Holt, and L. Sawyer, *Invited Review: β -Lactoglobulin: Binding Properties, Structure, and Function*. J. Dairy Sci., 2004. **87**(4): p. 785-796.
31. Morin, P., *On the fractionation of buttermilk by microfiltration membranes*, Thesis, 2006, Université Laval. 155 pages.
32. Considine, T., et al., *Interactions of milk proteins during heat and high hydrostatic pressure treatments - A Review*. Innov. Food Sci. Emerg. Technol., 2007. **8**(1): p. 1-23.
33. deWit, J.N. and G. Klarenbeek, *Effects of Various Heat Treatments on Structure and Solubility of Whey Proteins*. J. Dairy Sci., 1984. **67**(11): p. 2701-2710.
34. Kailasapathy, K., *Chemical Composition, Physical and Functional Properties of Milk and Milk Ingredients*, in *Dairy Processing and Quality Assurance*, 2008, John Wiley & Sons. p. 75-103.
35. Lopez, C., *Milk fat globules enveloped by their biological membrane: Unique colloidal assemblies with a specific composition and structure*. Curr. Opin. Colloid Interface Sci., 2011. **16**(5): p. 391-404.
36. Ward, R.E., J.B. German, and M. Corredig, *Composition, Applications, Fractionation, Technological and Nutritional Significance of Milk Fat Globule Membrane Material*, in *Advanced Dairy Chemistry, Volume 2: Lipids*, 2006, Aspen Publishers. p. 213-244.
37. Heid, H.W. and T.W. Keenan, *Intracellular origin and secretion of milk fat globules*. Eur. J. Cell Biol., 2005. **84**(2-3): p. 245-258.

38. Keenan, T.W. and I.H. Mather, *Intracellular Origin of Milk Fat Globules and the Nature of the Milk Fat Globule Membrane*. *Advanced Dairy Chemistry, Volume 2: Lipids*, 2006, Aspen Publishers. p. 137-171.
39. Lopez, C., *Lipid domains in the milk fat globule membrane: Specific role of sphingomyelin*. *Lipid Technology*, 2010. **22**(8): p. 175-178.
40. Robenek, H., et al., *Butyrophilin controls milk fat globule secretion*. *P Natl. Acad. Sci.*, 2006. **103**(27): p. 10385-10390.
41. Fromm, H.J. and M.S. Hargrove, *Introduction to Biomolecules. Essentials of Biochemistry*, 2012, Springer Berlin Heidelberg. p. 5-34.
42. Voet, D., et al., *Biochimie*, 2005, De Boeck Supérieur. 1600 pages
43. Reinhardt, T.A. and J.D. Lippolis, *Bovine Milk Fat Globule Membrane Proteome*. *J. Dairy Res.*, 2006. **73**(04): p. 406-416.
44. Fong B. Y., Norris C. S., and MacGibbon A. K. H., *Protein and lipid composition of bovine milk-fat-globule membrane*. *Int. Dairy J.*, 2007. **17**: p. 275-288.
45. Mather, I.H., *A Review and Proposed Nomenclature for Major Proteins of the Milk-Fat Globule Membrane*. *J. Dairy Sci.*, 2000. **83**(2): p. 203-247.
46. Rasmussen and J. Trige, *Bioactivity of milk fat globule membrane proteins*. *Aust. J. Dairy Technol.*, 2009. **64**(1): p. 5.
47. Riccio, P., *The proteins of the milk fat globule membrane in the balance*. *Trends Food Sci. Tech.*, 2004. **15**(9): p. 458-461.
48. Corredig M. and Dalgleish D. G., *The mechanisms of the heat-induced interaction of whey proteins with casein micelles in milk*. *Int. Dairy J.*, 1999. **9**: p. 233-236.
49. Jang, H.D. and H.E. Swaisgood, *Disulfide Bond Formation Between Thermally Denatured β -Lactoglobulin and κ -Casein in Casein Micelles*. *J. Dairy Sci.*, 1990. **73**(4): p. 900-904.
50. Guyomarc'h, F., et al., *Heat-induced aggregation of whey proteins in the presence of κ -casein or sodium caseinate*. *Food Hydrocolloids*, 2009. **23**(4): p. 1103-1110.

51. Dalgleish D. G., van Mourik L., and Corredig M., *Heat-induced interactions of whey proteins and casein micelles with different concentrations of alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin*. J. Agric. Food Chem., 1997. **45**: p. 4806-4813.
52. Singh H. and Latham J. M., *Heat stability of milk: Aggregation and dissociation of protein at ultra-high temperatures*. Int. Dairy J., 1993. **3**: p. 225-237.
53. Corredig, M. and D.G. Dalgleish, *Effect of Heating of Cream on the Properties of Milk Fat Globule Membrane Isolates*. J. Agric. Food Chem., 1998. **46**(7): p. 2533-2540.
54. Dalgleish, D. and J. Banks, *The formation of complexes between serum proteins and fat globules during heating of whole milk*. Milchwissenschaft, 1991. **46**.
55. Ye, A., et al., *Interactions of whey proteins with milk fat globule membrane proteins during heat treatment of whole milk*. Lait, 2004. **84**(3): p. 269-283.
56. Gassi J.-Y., Famelart M.-H., and Lopez C., *Heat treatment of cream affects the physiological properties of sweet buttermilk*. Dairy Sci. Technol., 2008. **88**: p. 369-385.
57. Ye, A., et al., *Characterization of protein components of natural and heat-treated milk fat globule membranes*. Int. Dairy J., 2002. **12**(4): p. 393-402.
58. Lopez, C., *Focus on the supramolecular structure of milk fat in dairy products*. Reprod. Nutr. Dev., 2005. **45**(4): p. 497-511.
59. Lopez, C. and V. Briard-Bion, *The composition, supramolecular organisation and thermal properties of milk fat: a new challenge for the quality of food products*. Lait, 2007. **87**(4-5): p. 317-336.
60. Sharma S. K. and Dalgleish D. G., *Interactions between milk serum proteins and synthetic fat globule membrane during heating of homogenized whole milk*. J. Agric. Food Chem., 1993. **41**: p. 1407-1412.
61. Ganong W. F., *Review of medical physiology*. 15th edition. a LANGE medical book, 1991, Appleton & Lange. 754 pages.
62. Campbell, N.A. and J.B. Reece, *Biology*, 7th edition 2005, Pearson, Benjamin, Cummings. 1231 pages.
63. Worthington, K. and V. Worthington. *Worthington Enzyme Manual*. 2011 [cited 2013 23 janvier]; Available from: <http://www.worthington-biochem.com/index/manual.html>.

64. Erickson, R.H. and Y.S. Kim, *Digestion and Absorption of Dietary Protein*. Annu. Rev. Med., 1990. **41**(1): p. 133-139.
65. McDonald, J.K., *An overview of protease specificity and catalytic mechanisms: aspects related to nomenclature and classification*. Histochem. J., 1985. **17**(7): p. 773-785.
66. Gilbert, E.R., E.A. Wong, and K.E. Webb, *Board-invited review: Peptide absorption and utilization: Implications for animal nutrition and health*. J. Anim. Sci., 2008. **86**(9): p. 2135-2155.
67. Webb, K.E., J.C. Matthews, and D.B. DiRienzo, *Peptide absorption: a review of current concepts and future perspectives*. J. Anim. Sci., 1992. **70**(10): p. 3248-57.
68. Ros, E., *Intestinal absorption of triglyceride and cholesterol. Dietary and pharmacological inhibition to reduce cardiovascular risk*. Atherosclerosis, 2000. **151**(2): p. 357-379.
69. Friedman, H.I. and B. Nylund, *Intestinal fat digestion, absorption, and transport. A review*. Am. J. Clin. Nutr., 1980. **33**.
70. Woollett L. A., et al., *Micellar solubilisation of cholesterol is essential for absorption in humans*. Gut, 2006. **55**: p. 197-204.
71. Eckhardt, E.R.M., et al., *Dietary sphingomyelin suppresses intestinal cholesterol absorption by decreasing thermodynamic activity of cholesterol monomers*. Gastroenterology, 2002. **122**(4): p. 948-956.
72. Nyberg, L., R.-D. Duan, and Å. Nilsson, *A mutual inhibitory effect on absorption of sphingomyelin and cholesterol*. J. Nutr. Biochem., 2000. **11**(5): p. 244-249.
73. Gobbetti, M., F. Minervini, and C.G. Rizzello, *Bioactive Peptides in Dairy Products*, in *Handbook of Food Products Manufacturing*, 2006, John Wiley & Sons, Inc. p. 489-517.
74. Mellander, O., *The physiological importance of the casein phosphopeptide calcium salts. II. Peroral calcium dosage of infants*. Acta Soc Med Ups, 1950. **55**(5-6): p. 247-55.
75. Gobbetti, M., et al., *Latent Bioactive Peptides in Milk Proteins: Proteolytic Activation and Significance in Dairy Processing*. Crit. Rev. Food Sci., 2002. **42**(3): p. 223-239.
76. Darewicz, M., et al., *The Preventive Potential of Milk and Colostrum Proteins and Protein Fragments*. Food Rev. Int., 2011. **27**(4): p. 357-388.

77. Pihlanto-Leppälä A., et al., *Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of whey proteins digests: concentration and characterization of active peptides*. J. Dairy Res., 2000. **67**: p. 53-57.
78. Nagaoka S., et al., *Identification of Novel Hypocholesterolemic peptides derived from bovine milk beta-Lactoglobulin*. Bioch. Bioph. Res. Com., 2001. **281**: p. 11-17.
79. Hernández-Ledesma B., et al., *Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from Alpha-Lactalbumin and Beta-Lactoglobuline. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS*. J. Agric. Food Chem., 2005. **53**: p. 588-593.
80. Silva, S.V. and F.X. Malcata, *Caseins as source of bioactive peptides*. Int. Dairy J., 2005. **15**(1): p. 1-15.
81. Cam, A. and E.G. de Mejia, *Role of dietary proteins and peptides in cardiovascular disease*. Mol. Nutr. Food Res., 2012. **56**(1): p. 53-66.
82. Nagaoka S., *Cholesterol-lowering proteins and peptides*, in *Nutraceutical proteins and peptides in health and disease*, 2006, Taylor & Francis Group. p. 41-67.
83. Meisel H., et al., *ACE inhibitory peptides*, in *Nutraceutical proteins and peptides in health and disease*, 2006, Taylor & Francis Group. p. 269-315.
84. Xiong, Y.L., *Antioxidant Peptides*, in *Bioactive Proteins and Peptides as Functional Foods and Nutraceuticals*, 2010, Wiley-Blackwell. p. 29-42.
85. MacGibbon A. K. H. and Taylor M. W., *Composition and structure of bovine milk lipids*, in *Advanced Dairy Chemistry, Volume 2: Lipids*, 2006, Aspen Publishers. p. 1-42.
86. El-Loly, M., *Composition, Properties and Nutritional Aspects of Milk Fat Globule Membrane - a Review*. Pol. J. Food Nutr. Sci., 2011. **61**(1): p. 7-32.
87. Vesper H., et al., *Sphingolipids in food and the emerging importance of sphingolipids to nutrition*. J. Nutr., 1999. **129**: p. 1239-1250.
88. Shahidi F., ed. *Nutraceutical and specialty lipids and their co-products*, in, *Nutraceutical science and technology*, 2006, Taylor & Francis. 563 pages.
89. Cohn, J., et al., *Dietary Phospholipids and Intestinal Cholesterol Absorption*. Nutrients, 2010. **2**(2): p. 116-127.

90. Ridgway N. D., *Interactions between metabolism and intracellular distribution of cholesterol and shingomyelin*. Biochim. Biophys. Acta, 2000. **1484**: p. 129-141.
91. Howard A. H. and Marks J., *Effect of milk product on serum-cholesterol*. The Lancet, 1979. **2**: p. 957.
92. Kobayashi T., et al., *A long-term feeding of sphingolipids affected the levels of plasma cholesterol and hepatic triacylglycerol but not tissue phospholipids and sphingolipids*. Nutr. Res., 1997. **17**: p. 111-114.
93. Kwiterovich, P.O., *Lipid, apolipoprotein, and lipoprotein metabolism: implications for the diagnosis and treatment of dyslipidemia*, in *The Johns Hopkins Textbook of Dyslipidemia*, 2009, Lippincott Williams & Wilkins. p. 1-21.
94. Choi, B.G., et al., *Lipoprotein Metabolism and Vascular Biology*, In *Therapeutic Lipidology*, 2007, Humana Press. p. 1-22.
95. Wilson, M.D. and L.L. Rudel, *Review of cholesterol absorption with emphasis on dietary and biliary cholesterol*. J. Lipid Res., 1994. **35**(6): p. 943-55.
96. Buhman, K.F., M. Accad, and R.V. Farese Jr, *Mammalian acyl-CoA:cholesterol acyltransferases*. BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids, 2000. **1529**(1-3): p. 142-154.
97. Miller, M.A., *Disorders of hypertriglyceridemia*, in *The Johns Hopkins Textbook of Dyslipidemia*, 2009, Lippincott Williams & Wilkins. p. 74-87.
98. Charlton-Menys, V. and P.N. Durrington, *Human cholesterol metabolism and therapeutic molecules*. Exp. Physiol., 2008. **93**(1): p. 27-42.
99. Rader, D.J., *Molecular regulation of HDL metabolism and function: implications for novel therapies*. J. Clin. Invest., 2006. **116**(12): p. 3090-3100.
100. Dayspring, T., *Phytosterolemia* *Therapeutic Lipidology*, 2007, Humana Press. p. 291-319.
101. Jones, P.J. and S.S. AbuMweis, *Phytosterols as functional food ingredients: linkages to cardiovascular disease and cancer*. Curr. Opin. Clin. Nutr., 2009. **12**(2): p. 147-151
10.1097/MCO.0b013e328326770f.
102. Brufau, G., M.A. Canela, and M. Rafecas, *Phytosterols: physiologic and metabolic aspects related to cholesterol-lowering properties*. Nutr. Res., 2008. **28**(4): p. 217-225.

103. Miettinen, T.A., R.S. Tilvis, and Y.A. Kesaniemi, *Serum plant sterols and cholesterol precursors reflect cholesterol absorption and synthesis in volunteers of a randomly selected male population*. Am. J. Epidemiol., 1990. **131**(1): p. 20-31.
104. Kempen, H.J., et al., *Serum lathosterol concentration is an indicator of whole-body cholesterol synthesis in humans*. J. Lipid Res., 1988. **29**(9): p. 1149-55.
105. Simonen, P., H. Gylling, and T.A. Miettinen, *The validity of serum squalene and non-cholesterol sterols as surrogate markers of cholesterol synthesis and absorption in type 2 diabetes*. Atherosclerosis, 2008. **197**(2): p. 883-888.
106. Seidah, N.G., *PCSK9 as a therapeutic target of dyslipidemia*. Expert Opin. Ther., 2009. **13**(1): p. 19-28.
107. Brautbar, A. and C.M. Ballantyne, *Pharmacological strategies for lowering LDL cholesterol: statins and beyond*. Nat. Rev. Cardiol., 2011. **8**(5): p. 253-265.
108. Alaupovic, P., [2] *Significance of apolipoproteins for structure, function, and classification of plasma lipoproteins*, in *Methods in Enzymology*, 1996, Academic Press. p. 32-60.
109. Sattar, N., et al., *Comparison of the Associations of Apolipoprotein B and Non-High-Density Lipoprotein Cholesterol With Other Cardiovascular Risk Factors in Patients With the Metabolic Syndrome in the Insulin Resistance Atherosclerosis Study*. Circulation, 2004. **110**(17): p. 2687-2693.
110. Bachorik, P.S., *Mesurement of lipids, lipoproteins, and apolipoproteins*, in *The Johns Hopkins Textbook of Dyslipidemia*, 2009, Lippincott Williams & Wilkins. p. 22-37.
111. Ingelsson E, S.E.J.C.J.H. and et al., *CLinical utility of different lipid measures for prediction of coronary heart disease in men and women*. JAMA, 2007. **298**(7): p. 776-785.
112. Rudkowska, I. and P.J.H. Jones, *Functional foods for the prevention and treatment of cardiovascular diseases: cholesterol and beyond*. Expert Rev. Cardiovasc. Ther., 2007. **5**(3): p. 477-490.
113. Genest, J., et al., *2009 Canadian Cardiovascular Society/Canadian guidelines for the diagnosis and treatment of dyslipidemia and prevention of cardiovascular disease in the adult – 2009 recommendations*. Can. J. Cardiol., 2009. **25**(10): p. 567-579.

114. Gylling, H. and T.A. Miettinen, *The effect of cholesterol absorption inhibition on low density lipoprotein cholesterol level*. *Atherosclerosis*, 1995. **117**(2): p. 305-308.
115. Lichtenstein, A.H., et al., *Diet and Lifestyle Recommendations Revision 2006*. *Circulation*, 2006. **114**(1): p. 82-96.
116. Acuff, R.V., et al., *The lipid lowering effect of plant sterol ester capsules in hypercholesterolemic subjects*. *Lipids Health Dis.*, 2007. **6**(11).
117. McGrane, M., et al., *Dairy Consumption, Blood Pressure, and Risk of Hypertension: An Evidence-Based Review of Recent Literature*. *Curr. Cardiovasc. Risk Rep.*, 2011. **5**(4): p. 287-298.
118. Wilkins, K., et al., *Blood pressure in Canadian adults*. *Health Reports*, 2010. **20**(1): p. 1-10.
119. Matsui, T. and M. Tanaka, *Antihypertensive Peptides and Their Underlying Mechanisms*, in *Bioactive proteins and peptides as functional foods and nutraceuticals* 2010, Wiley-Blackwell. p. 43-54.
120. Mensink, R.P., et al., *PASSCLAIM – Diet-related cardiovascular disease*. *Eur. J. Nutr.*, 2003. **42**(1): p. i6-i27.
121. Saito, T., *Antihypertensive Peptides Derived from Bovine Casein and Whey Proteins*, in *Bioactive Components of Milk*, 2008, Springer. p. 295-317.
122. Muro Urista, C., et al., *Review: Production and functionality of active peptides from milk*. *Food Sci. Technol. Int.*, 2011. **17**(4): p. 293-317.
123. Korhonen, H., *Milk-derived bioactive peptides: From science to applications*. *J. Funct. Foods*, 2009. **1**(2): p. 177-187.
124. Segall, L., A. Covic, and D.J.A. Goldsmith, *Direct renin inhibitors: the dawn of a new era, or just a variation on a theme?* *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2007. **22**(9): p. 2435-2439.
125. Ljungberg, L., et al., *The association between circulating angiotensin-converting enzyme and cardiovascular risk in the elderly: a cross-sectional study*. *J. Renin-Angio-Aldo. S.*, 2011. **12**(3): p. 281-289.
126. Udenigwe, C.C. and R.E. Aluko, *Food Protein-Derived Bioactive Peptides: Production, Processing, and Potential Health Benefits*. *J. Food Sci.*, 2012. **77**(1): p. R11-R24.

127. Jäkälä, P. and H. Vapaatalo, *Antihypertensive Peptides from Milk Proteins*. Pharmaceuticals, 2010. **3**(1): p. 251-272.
128. Pripp, A.H., *Effect of peptides derived from food proteins on blood pressure: a metaanalysis of randomized controlled trials*. Food Nutr. Res., 2008. **52**: p. 1-9.
129. Xu, J.-Y., et al., *Effect of milk tripeptides on blood pressure: A meta-analysis of randomized controlled trials*. Nutrition, 2008. **24**(10): p. 933-940.
130. van der Zander, K., et al., *Fermented lactotriptides-containing milk lowers daytime blood pressure in high normal-to-mild hypertensive subjects*. J. Hum. Hypertens., 2008. **22**(11): p. 804-806.
131. Wakasa, Y., et al., *The Hypocholesterolemic Activity of Transgenic Rice Seed Accumulating Lactostatin, a Bioactive Peptide Derived from Bovine Milk β -Lactoglobulin*. J. Agric. Food Chem., 2011. **59**(8): p. 3845-3850.
132. Ruiz-Giménez, P., et al., *Antihypertensive effect of a bovine lactoferrin pepsin hydrolysate: Identification of novel active peptides*. Food Chem., 2012. **131**(1): p. 266-273.
133. Cicero, A.F.G., et al., *Blood pressure lowering effect of lactotriptides assumed as functional foods: a meta-analysis of current available clinical trials*. J. Hum. Hypertens., 2011. **25**(7): p. 425-436.
134. Boelsma, E. and J. Kloek, *Lactotriptides and antihypertensive effects: a critical review*. Br. J. Nutr., 2009. **101**(06): p. 776-786.
135. Erdmann, K., B.W.Y. Cheung, and H. Schröder, *The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease*. J. Nutr. Biochem., 2008. **19**(10): p. 643-654.
136. López-Fandiño, R., J. Otte, and J. van Camp, *Physiological, chemical and technological aspects of milk-protein-derived peptides with antihypertensive and ACE-inhibitory activity*. Int. Dairy J., 2006. **16**(11): p. 1277-1293.
137. Ehlers, P.I., et al., *High blood pressure-lowering and vasoprotective effects of milk products in experimental hypertension*. Br. J. Nutr., 2011. **106**(09): p. 1353-1363.
138. Chen, Z.-Y., et al., *Anti-hypertensive Nutraceuticals and Functional Foods*. J. Agric. Food Chem., 2009. **57**(11): p. 4485-4499.

139. Diplock, A.T., et al., *Functional food science and defence against reactive oxidative species*. The Br. J Nutr., 1998. **80 Suppl 1**: p. S77-112.
140. Young, D. and Y. Mine, *Anti-inflammatory/Oxidative Stress Proteins and Peptides*, in *Bioactive Proteins and Peptides as Functional Foods and Nutraceuticals*, 2010, Wiley-Blackwell. p. 13-27.
141. Lee, S., et al., *Effects of interventions on oxidative stress and inflammation of cardiovascular diseases*. World J Cardiol., 2011. **3**(1): p. 18-24.
142. Ou, B., et al., *Analysis of Antioxidant Activities of Common Vegetables Employing Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assays: A Comparative Study*. J. Agric. Food Chem., 2002. **50**(11): p. 3122-3128.
143. Zulueta, A., M.J. Esteve, and A. Frígola, *ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products*. Food Chem., 2009. **114**(1): p. 310-316.
144. Frankel, E.N. and A.S. Meyer, *The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants*. J. Sci. Food Agr., 2000. **80**(13): p. 1925-1941.
145. Prior, R.L. and G. Cao, *In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods*. Free Radical Biol. Med., 1999. **27**(11–12): p. 1173-1181.
146. Čiž, M., et al., *Different methods for control and comparison of the antioxidant properties of vegetables*. Food Control, 2010. **21**(4): p. 518-523.
147. Thaipong, K., et al., *Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts*. J. Food Comp. Anal., 2006. **19**(6–7): p. 669-675.
148. Cao, G. and R.L. Prior, *Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum*. Clinical Chemist., 1998. **44**(6): p. 1309-1315.
149. Huang, D., B. Ou, and R.L. Prior, *The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays*. J. Agric. Food Chem., 2005. **53**(6): p. 1841-1856.
150. Mermelstein, N.H., *Determining antioxidant activity*. Food Technol., 2008. **11**: p. 63-66.
151. Cao, G., H.M. Alessio, and R.G. Cutler, *Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants*. Free Radical Biol. Med., 1993. **14**(3): p. 303-311.

152. Cao, G., et al., *Increases in human plasma antioxidant capacity after consumption of controlled diets high in fruit and vegetables*. Am. J. Clin. Nutr., 1998. **68**(5): p. 1081-7.
153. Niki, E., *Assessment of Antioxidant Capacity in vitro and in vivo*. Free Radical Biol. Med., 2010. **49**(4): p. 503-515.
154. Wu, X., et al., *Development of a database for total antioxidant capacity in foods: a preliminary study*. J. Food Comp. Anal., 2004. **17**(3-4): p. 407-422.
155. Power, O., P. Jakeman, and R.J. FitzGerald, *Antioxidative peptides: enzymatic production, in vitro and in vivo antioxidant activity and potential applications of milk-derived antioxidative peptides*. Amino Acids, 2013. **44**(3): p. 797-820.
156. Elias, R.J., S.S. Kellerby, and E.A. Decker, *Antioxidant Activity of Proteins and Peptides*. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 2008. **48**(5): p. 430-441.
157. Pihlanto, A., *Antioxidative peptides derived from milk proteins*. Int. Dairy J., 2006. **16**(11): p. 1306-1314.
158. Phelan, M., et al., *Potential bioactive effects of casein hydrolysates on human cultured cells*. Int. Dairy J., 2009. **19**(5): p. 279-285.
159. Gad, A.S., et al., *Antioxidant activity and hepatoprotective effects of whey protein and Spirulina in rats*. Nutrition, 2011. **27**(5): p. 582-589.
160. Hernández-Ledesma, B., et al., *ACE-Inhibitory and Radical-Scavenging Activity of Peptides Derived from β -Lactoglobulin f(19-25). Interactions with Ascorbic Acid*. J. Agric. Food Chem., 2007. **55**(9): p. 3392-3397.
161. Suetsuna, K., H. Ukeda, and H. Ochi, *Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein*. J. Nutr. Biochem., 2000. **11**(3): p. 128-131.
162. Rival, S.G., C.G. Boeriu, and H.J. Wichers, *Caseins and Casein Hydrolysates. 2. Antioxidative Properties and Relevance to Lipoxygenase Inhibition*. J. Agric. Food Chem., 2000. **49**(1): p. 295-302.
163. Kim, G.-N., H.-D. Jang, and C.-I. Kim, *Antioxidant capacity of caseinophosphopeptides prepared from sodium caseinate using Alcalase*. Food Chem., 2007. **104**(4): p. 1359-1365.

164. Sodini I., et al., *Compositional and functional properties of buttermilk: a comparison between sweet, sour, and whey buttermilk*. J. Dairy Sci., 2006. **89**: p. 525-536.
165. Donato L. and Guyomarc'h F., *Formation and properties of the whey protein/k-casein complexes in heated skim milk-A review*. Dairy Sci. Technol., 2009. **89**: p. 3-29.
166. Fédération International de Laiterie, *Lait et produits laitiers -Détermination de la teneur en azote - Méthode pratique par combustion selon le principe de Dumas*, Fédération International de Laiterie, 2002. 15 pages.
167. Laemmli U. K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**: p. 680-685.
168. Fédération International de Laiterie, *Lait écrémé, sérum et babeurre -Détermination de la teneur en matière grasse- Méthode gravimétrique (méthode de référence)*, Fédération International de Laiterie, 1996. 15 pages.
169. Morin P., Jiménez-Flores R., and Pouliot Y., *Effect of temperature and pore size on fractionation of fresh and reconstituted buttermilk by microfiltration*. J. Dairy Sci., 2004. **87**: p. 267-273.
170. Ikeda Ikuo, et al., *Inhibition of cholesterol absorption in rats by plant sterols*. J. Lipid Res., 1988. **29**: p. 1573-1582.
171. Zlatkis A. and Zak B., *Study of a new cholesterol reagent*. Anal. Biochem., 1969. **29**: p. 143-148.
172. Mikenus M., et al., *A multicompartamental dynamic computer-controlled model simulating the stomach and small intestine*. ATLA, 1995. **23**: p. 197-209.
173. Morin P., Jiménez-Flores R., and Pouliot Y., *Effect of processing on the composition and microstructure of buttermilk and its milk fat globule membranes*. Int. Dairy J., 2007. **17**: p. 1179-1187.
174. Rombaut R., Camp J. V., and Dewettinck K., *Analysis of phospho- and sphingolipids in dairy products by a new HPLC method*. J. Dairy Sci., 2005. **88**: p. 482-488.
175. Evers J. M., *The milkfat globule membrane-composition and structural changes post secretion by the mammary secretory cell*. Int. Dairy J., 2004. **14**: p. 661-674.

176. McPherson A. V. and Kitchen B. J., *Reviews of the progress of Dairy Science: The bovine milk fat globule membrane-its formation, composition, structure and behaviour in milk and dairy products*. J. Dairy Res., 1983. **50**: p. 107-133.
177. Ward, S., et al., *A systematic review and economic evaluation of statins for the prevention of coronary events*. Health Technol Assess., 2007. **11**(14): p. 1-160, iii-iv.
178. Clark, L.T., *Treating dyslipidemia with statins: The risk-benefit profile*. Am. Heart J., 2003. **145**(3): p. 387-396.
179. *Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) Final Report*. Circulation, 2002. **106**(25): p. 3143.
180. Dawson, P.A. and L.L. Rudel, *Intestinal cholesterol absorption*. Curr. Opin. Lipidol., 1999. **10**(4): p. 315-20.
181. Conway, V., S.F. Gauthier, and Y. Pouliot, *Effect of cream pasteurization, microfiltration and enzymatic proteolysis on in vitro cholesterol-lowering activity of buttermilk solids*. Dairy Sci. Technol., 2010. **90**(4): p. 449-460.
182. Nissinen, M.J., H. Gylling, and T.A. Miettinen, *Responses of surrogate markers of cholesterol absorption and synthesis to changes in cholesterol metabolism during various amounts of fat and cholesterol feeding among healthy men*. Br. J. Nutr., 2008. **99**(2): p. 370-8.
183. Goulet, J., et al., *Validity and reproducibility of an interviewer-administered food frequency questionnaire for healthy French-Canadian men and women*. Nutr. J., 2004. **3**(1): p. 13.
184. Labonté, M.-È., et al., *Comparison of the impact of trans fatty acids from ruminant and industrial sources on surrogate markers of cholesterol homeostasis in healthy men*. Mol. Nutr. Food Res., 2011. **55**(S2): p. S241-S247.
185. Lohman, T.G., A.F. Roche, and R. Martorell, *Anthropometric standardization reference manual*, 1988, Human Kinetics Books. 183 pages.
186. Motard-Bélanger, A., et al., *Study of the effect of trans fatty acids from ruminants on blood lipids and other risk factors for cardiovascular disease*. Am. J. Clin. Nutr., 2008. **87**(3): p. 593-599.

187. Ohlsson, L., et al., *Effects of a sphingolipid-enriched dairy formulation on postprandial lipid concentrations*. Eur. J. Clin. Nutr., 2010. **64**(11): p. 1344-1349.
188. Ohlsson, L., H. Burling, and Å. Nilsson, *Long term effects on human plasma lipoproteins of a formulation enriched in butter milk polar lipid*. Lipids Health Dis., 2009. **8**(1): p. 1-12.
189. Thompson, L.U., et al., *The effect of fermented and unfermented milks on serum cholesterol*. Am. J. Clin. Nutr., 1982. **36**(6): p. 1106-11.
190. Schaefer, E., et al., *Individual variability in lipoprotein cholesterol response to National Cholesterol Education Program Step 2 diets*. Am. J. Clin. Nutr., 1997. **65**(3): p. 823-830.
191. Gupta, A.K., et al., *Role of phytosterols in lipid-lowering: current perspectives*. QJM, 2011. **104**(4): p. 301-308.
192. Duivenvoorden, I., et al., *Dietary sphingolipids lower plasma cholesterol and triacylglycerol and prevent liver steatosis in APOE*3Leiden mice*. Am. J. Clin. Nutr., 2006. **84**(2): p. 312-321.
193. Feng, D., et al., *Generating Ceramide from Sphingomyelin by Alkaline Sphingomyelinase in the Gut Enhances Sphingomyelin-Induced Inhibition of Cholesterol Uptake in Caco-2 Cells*. Dig. Dis. Sci., 2010. **55**(12): p. 3377-3383.
194. Garmy, N., et al., *Interaction of cholesterol with sphingosine*. J. Lipid Res., 2005. **46**(1): p. 36-45.
195. Chan, D.C., et al., *Plasma Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9: A Marker of LDL Apolipoprotein B-100 Catabolism?* Clinical Chem., 2009. **55**(11): p. 2049-2052.
196. Matthan, N., et al., *Deuterium uptake and plasma cholesterol precursor levels correspond as methods for measurement of endogenous cholesterol synthesis in hypercholesterolemic women*. Lipids, 2000. **35**(9): p. 1037-1044.
197. Chobanian, A.V., et al., *Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure*. Hypertension, 2003. **42**(6): p. 1206-1252.
198. Conway, V., et al., *Impact of buttermilk consumption on plasma lipids and surrogate markers of cholesterol homeostasis in men and women*. Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis., 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.numecd.2013.03.003>.
199. Fleming, I., *Signaling by the Angiotensin-Converting Enzyme*. Circ. Res., 2006. **98**(7): p. 887-896.

200. Conway, V., S.F. Gauthier, and Y. Pouliot, *Antioxidant activities of buttermilk proteins, whey proteins and their enzymatic hydrolyzates*. J. Agric. Food Chem., 2012. **61**(2):364-72.
201. Sumner, D.J., et al., *Initial blood pressure as a predictor of the response to antihypertensive therapy*. Br. J. Clin. Pharmacol., 1988. **26**(6): p. 715-720.
202. Gill, J.S., et al., *Relation between initial blood pressure and its fall with treatment*. The Lancet, 1985. **325**(8428): p. 567-569.
203. Czernichow, S., et al., *The effects of blood pressure reduction and of different blood pressure-lowering regimens on major cardiovascular events according to baseline blood pressure: meta-analysis of randomized trials*. J. Hypertens., 2011. **29**(1): p. 4-16 10.1097/HJH.0b013e32834000be.
204. Fauquant, C., et al., *Membrane phospholipids and sterols in microfiltered milk fat globules*. Eur. J. Lipid Sci. Technol., 2007. **109**(12): p. 1167-1173.
205. Young, D., R. Tsao, and Y. Mine, *Nutraceuticals and Antioxidant Function*, in *Functional Foods, Nutraceuticals, and Degenerative Disease Prevention*, 2011, Wiley-Blackwell. p. 75-112.
206. Groleau, P.E., et al., *Fractionation of β -Lactoglobulin Tryptic Peptides by Ampholyte-Free Isoelectric Focusing*. J. Agric. Food Chem., 2001. **50**(3): p. 578-583.
207. Fédération International de Laiterie, *Laits secs, mélanges secs pour crème glacées et fromages fondus -Détermination de la teneur en lactose- (méthodes enzymatiques)*, Fédération International de Laiterie, 1991. 11 pages.
208. Church, F.C., et al., *Spectrophotometric Assay Using o-Phthaldialdehyde for Determination of Proteolysis in Milk and Isolated Milk Proteins*. J. Dairy Sci., 1983. **66**(6): p. 1219-1227.
209. Dinis, T.C., V.M. Maderia, and L.M. Almeida, *Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers*. Arch. Biochem. Biophys., 1994. **315**(1): p. 161-169.
210. Hamosh, M., et al., *Protective function of human milk: The milk fat globule*. Semin. Perinatol., 1999. **23**(3): p. 242-249.

211. Vanderghem, C., et al., *Study on the susceptibility of the bovine milk fat globule membrane proteins to enzymatic hydrolysis and organization of some of the proteins*. *Int. Dairy J.*, 2011. **21**(5): p. 312-318.
212. Raikos, V., et al., *The use of sedimentation field-flow fractionation in the size characterization of bovine milk fat globules as affected by heat treatment*. *Food Res. Int.*, 2009. **42**(5–6): p. 659-665.
213. Singh, H., A. Ye, and D. Horne, *Structuring food emulsions in the gastrointestinal tract to modify lipid digestion*. *Prog. Lipid Res.*, 2009. **48**(2): p. 92-100.
214. Guo, M.R., et al., *Susceptibility of β -Lactoglobulin and Sodium Caseinate to Proteolysis by Pepsin and Trypsin*. *J. Dairy Sci.*, 1995. **78**(11): p. 2336-2344.
215. Chen, J., et al., *Antioxidant capacity of bovine milk as assayed by spectrophotometric and amperometric methods*. *Int. Dairy J.*, 2003. **13**(12): p. 927-935.
216. Gavella, M., et al., *Antioxidant properties of ganglioside micelles*. *Free Radical Res.*, 2007. **41**(10): p. 1143-1150.
217. Jensen, R.G., A.M. Ferris, and C.J. Lammi-Keefe, *The Composition of Milk Fat*. *J. Dairy Sci.*, 1991. **74**(9): p. 3228-3243.
218. Bouhallab, S. and D. Bouglé, *Mineral-Binding Proteins and Peptides and Bioavailability of Trace Elements*, in *Nutraceutical Proteins and Peptides in Health and Disease*, 2005, CRC Press. p. 41-67.
219. Peña-Ramos, E.A., Y.L. Xiong, and G.E. Arteaga, *Fractionation and characterisation for antioxidant activity of hydrolysed whey protein*. *J. Sci. Food Agric.*, 2004. **84**(14): p. 1908-1918.
220. Chen, H.-M., et al., *Antioxidative Properties of Histidine-Containing Peptides Designed from Peptide Fragments Found in the Digests of a Soybean Protein*. *J. Agric. Food Chem.*, 1998. **46**(1): p. 49-53.
221. Hernández-Ledesma B., et al., *Identification of antioxydant and ACE-inhibitory peptides in fermented milk*. *J. Sci. Food Agric.*, 2005. **85**: p. 1041-1048.