



HAL
open science

Propriétés Techno-Fonctionnelles et Biologiques de la bêta-Lactoglobuline modifiée par la réaction de Maillard

François Chevalier

► **To cite this version:**

François Chevalier. Propriétés Techno-Fonctionnelles et Biologiques de la bêta-Lactoglobuline modifiée par la réaction de Maillard. Alimentation et Nutrition. Université de Bordeaux 1, 2001. Français. NNT: . tel-02506731

HAL Id: tel-02506731

<https://hal.science/tel-02506731>

Submitted on 12 Mar 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° d'ordre : 2422

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ BORDEAUX I

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DU VIVANT,
GEOSCIENCES, SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

par **François CHEVALIER**

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPÉCIALITÉ : Sciences des Aliments et Nutrition

PROPRIETES TECHNO-FONCTIONNELLES ET BIOLOGIQUES DE LA BETA-LACTOGLOBULINE MODIFIEE PAR LA REACTION DE MAILLARD

Soutenue le : 24 octobre 2001

Après avis de :

MM. Bernard Colas, Professeur
Josef Korolczuk, Directeur de recherche

Rapporteurs

Devant la commission d'examen formée de :

MM. Paul Higueret, Professeur, ISTAB – Université de Bordeaux I
Bernard Colas, Professeur, CNRS Biocatalyse, Université de Nantes
Josef Korolczuk, Directeur de recherche, INRA LGPTA - Villeneuve d'Ascq
Jean-Louis Azanza, Professeur, ISTAB – Université de Bordeaux I
Jean-Marc Chobert, Directeur de recherche, INRA LEIMA - Nantes
Thomas Haertlé, Directeur de recherche, INRA LEIMA - Nantes

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur

N° d'ordre : 2422

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ BORDEAUX I

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DU VIVANT,
GEOSCIENCES, SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

par **François CHEVALIER**

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPÉCIALITÉ : Sciences des Aliments et Nutrition

PROPRIETES TECHNO-FONCTIONNELLES ET BIOLOGIQUES DE LA BETA-LACTOGLOBULINE MODIFIEE PAR LA REACTION DE MAILLARD

Soutenue le : 24 octobre 2001

Après avis de :

MM. Bernard Colas, Professeur
Josef Korolczuk, Directeur de recherche

Rapporteurs

Devant la commission d'examen formée de :

MM. Paul Higuieret, Professeur, ISTAB – Université de Bordeaux I
Bernard Colas, Professeur, CNRS Biocatalyse, Université de Nantes
Josef Korolczuk, Directeur de recherche, INRA LGPTA - Villeneuve d'Ascq
Jean-Louis Azanza, Professeur, ISTAB – Université de Bordeaux I
Jean-Marc Chobert, Directeur de recherche, INRA LEIMA - Nantes
Thomas Haertlé, Directeur de recherche, INRA LEIMA - Nantes

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur

- 2001 -

Avant propos

Ce travail a été réalisé à l'INRA de Nantes au Laboratoire d'Etude des Interactions des Molécules Alimentaires, au sein du groupe « Gustation, Biochimie, Biologie et Technologie des Protéines ».

Le sujet de ce travail s'insère dans l'une des thématiques principales étudiées : modification des protéines laitières (glycation, estérification) et recherche des propriétés fonctionnelles et biologiques des protéines et peptides.

Cette thèse a été financée par une bourse de recherche du Ministère de l'Education Nationale, de la Recherche et de la Technologie (MENRT).

Au terme de ce travail, une partie des résultats a fait l'objet de publications, de chapitres d'ouvrage et de communications :

Publication dans des revues à comité de lecture :

- Chevalier F., Chobert J.-M., Dalgarrondo M., Haertlé T. (2001a) Characterization of the Maillard reaction products of β -lactoglobulin glucosylated in mild conditions. *Journal of Food Biochemistry* 25, 33-55.
- Chevalier F., Chobert J.-M., Mollé D., Haertlé T. (2001b) Maillard glycation of β -lactoglobulin with several sugars: comparative study of the properties of the obtained polymers and of the substituted sites. *Le Lait* 81 (5), 651-666.
- Chevalier F., Chobert J.-M., Popineau Y., Nicolas M. G., Haertlé T. (2001c) Improvement of the functional properties of β -lactoglobulin glycated through the Maillard reaction is related to the sugar nature. *International Dairy Journal* 11 (3), 19-26.
- Chevalier F., Chobert J.-M., Genot C., Haertlé T. (2001d) Scavenging of free radicals, anti-microbial and cytotoxic activities of the Maillard reaction products of β -lactoglobulin glycated with several sugars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 5031-5038.
- Chevalier F., Chobert J.-M., Dalgarrondo M., Choiset Y., Haertlé T. (2002) Maillard glycation of β -lactoglobulin induces conformation changes. *Nahrung* 46 (2), *Accepted*.

Chapitre d'ouvrage :

- Chevalier F., Chobert J.-M., Haertlé T. Interfacial properties of glycated β -lactoglobulin. *In "Recent Advances in Agricultural and Food Chemistry", Research Signpost (Ed.), Kerala, Inde Accepted*.

Communication à un congrès :

- Chobert J.-M., Chevalier F., Haertlé T. (30 March-2 April 2000). Glycation leads to polymerization and tryptic resistance of β -lactoglobulin. *Milk Protein Conference, Vinstra (Norway)*.

Remerciements

Je remercie *M. P. Higuieret*, professeur à l'ISTAB – Université de Bordeaux I qui m'a fait l'honneur de présider ce jury de thèse ; *MM. B. Colas*, professeur à l'UPRES Biocatalyse de l'Université de Nantes, *J. Korolczuk*, directeur de recherche à l'INRA de Villeneuve d'Ascq et *J. L. Azanza*, professeur à l'ISTAB – Université de Bordeaux I, pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail et pour avoir accepté de le juger.

Cette thèse a été réalisée au sein du Laboratoire d'Etude des Interactions des Molécules Alimentaires de l'INRA de Nantes. Au terme de ce travail, je remercie *MM. J. P. Dumont* et *J. M. Chobert* qui se sont succédé à la direction du LEIMA et qui ont accepté de m'accueillir au laboratoire.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à *M. J. M. Chobert* qui m'a guidé tout au long de ces trois années de recherche. Merci pour ta constante disponibilité, ta confiance, ta patience et pour tout le temps que tu as consacré à m'écouter et à corriger mes travaux.

J'adresse tous mes remerciements à *M. T. Haertlé*, directeur de recherche à l'INRA de Nantes et responsable du groupe « Gustation, Biochimie, Biologie et Technologie des Protéines », qui a su m'orienter dans mes recherches par ses précieux conseils.

Je ne pense pas que ce travail aurait pu être réalisé sans ses conseils techniques, ses compétences pratiques, sa disponibilité à toute épreuve et à toute heure et sa constante bonne humeur. Merci infiniment *Mlle M. Dalgarrondo* pour m'avoir autant aidé au cours de ces trois années.

Un grand merci à *Mme M. G. Nicolas* pour son aide lors de la mesure de stabilité thermique et lors de la mise au point des tests antibactériens.

Mes remerciements s'adressent aussi à *M. Y. Choiset* pour la réalisation des expériences de calorimétrie, à *M. D. Mollé* pour sa compétence en spectrométrie de masse, à *M. Y. Popineau* pour ses conseils lors des analyses des propriétés moussantes et à *MM. M. Anton* et *M. Le Denmat* pour leur aide et leurs conseils lors des analyses des propriétés émulsifiantes.

Je remercie vivement *Mme C. Genot*, chargée de recherche à l'INRA de Nantes et *M. G. Kanski*, chercheur à l'Université de Yaoundé au Cameroun, pour leur aide lors des analyses des propriétés antiradicalaires.

J'exprime toute ma reconnaissance à *M. X. Dousset* et à *Mlle P. Kabadjova*, chercheurs à l'ENITIAA de Nantes, à *M. O. Reboul*, chercheur à la Faculté dentaire de Nantes, pour les souches bactériennes qu'ils m'ont gracieusement données.

Tous mes remerciements à *Mme T. Gaborit* pour la mise à disposition de la hotte à flux laminaire utilisée pour les cultures cellulaires.

Merci à *M. B. Ochirkuyag*, chercheur à l'Université d'Oulan-Bator en Mongolie, ancien thésard et « post-doc » du laboratoire, pour son amitié, sa bonne humeur et ses nombreux conseils en biochimie.

Un immense merci à *Mmes* J. Sémur et L. Chevrel, respectivement comptable et secrétaire du laboratoire, pour leur patience et leur gentillesse.

Merci à M. J. C. Gaudin, chargé de recherche à l'INRA de Nantes, pour m'avoir accepté dans son bureau pendant plus de deux ans.

Un grand merci aux autres thésards (L. Breuils, V. Martinet, M. Atanassova, A. Pantev, K. El-Zahar et L. Le Thuau) pour leur amitié. Bonne chance pour la suite de votre thèse !

Je remercie aussi tous les autres membres du LEIMA que je n'ai pas eu l'occasion de citer pour leur bonne humeur et leur soutien.

Enfin, Céline, je te dédis ce travail, une manière de te remercier pour ton soutien, tes encouragements et toutes les longues heures consacrées à corriger et à relire ce mémoire.

SOMMAIRE

TABLE DES MATIERES

Avant propos	2
Remerciements	3
SOMMAIRE	5
TABLE DES MATIERES	6
LISTE DES FIGURES	12
LISTE DES TABLEAUX	18
INTRODUCTION GENERALE, BIBLIOGRAPHIE	20
A - Modification des protéines alimentaires	21
1 - Choix de la protéine à modifier	21
1.1 - Le lait et l'alimentation	21
1.2 - Composition du lait	23
1.3 - La bêta-lactoglobuline (BLG)	25
1.3.1 - Structure primaire	25
1.3.2 - Structure secondaire	26
1.3.3 - Structure tertiaire	26
1.3.4 - Structure quaternaire	28
2 - Choix de la méthode de modification	29
2.1 - Objectif des modifications	29
2.1.1 - Propriétés technologiques	29
2.1.2 - Propriétés nutritionnelles et organoleptiques	29
2.2 - Les différents types de modification	30
2.2.1 - Modification chimique	30
2.2.2 - Modification physique	30
2.2.3 - Modification enzymatique	30
2.2.4 - Modification génétique	30
2.3 - La modification des protéines par fixation de sucres	31

2.3.1 - Les glycoprotéines	31
2.3.1.1 - Rôle <i>in vivo</i>	31
2.3.1.2 - Utilisation en agro-alimentaire	32
2.3.2 - Modification chimique ou glycation	32
B - La réaction de Maillard	34
1 - La réaction chimique	34
2 - Influence des conditions physico-chimiques sur la réaction de Maillard	36
3 - Implication de la réaction de Maillard en agro-alimentaire	36
3.1 - Effets bénéfiques de la réaction de Maillard	37
3.1.1 - Génération d'arômes et de coloration	37
3.1.2 - Propriétés antioxydantes	37
3.1.3 - Propriétés antibiotiques	37
3.1.4 - Propriétés antiallergènes	38
3.1.5 - Propriétés antimutagènes	38
3.2 - Effets néfastes de la réaction de Maillard	38
3.2.1 - Réduction de la valeur nutritionnelle	39
3.2.2 - Génération de composés toxiques	39
3.3 - Conséquences de la réaction de Maillard sur les propriétés techno-fonctionnelles des protéines	39
4 - Implications de la réaction de Maillard en médecine	40
5 - Lactosylation des protéines laitières	40
5.1 - Lactosylation du lait lors de son chauffage	41
5.2 - Lactosylation de la BLG	42
5.2.1 - Identification des sites de lactosylation de la BLG	43
5.2.2 - Modification structurale de la BLG lactosylée	43
C - Organisation du mémoire	44

CHAPITRE 1 : PREPARATION ET CARACTERISATION DES PROTEINES MODIFIEES	45
A – Introduction	46
1 - Choix de la méthodologie de modification	46
2 - Caractérisation physico-chimique	46
3 - Caractérisation structurale	47
4 - Caractérisation des polymères	47
B - Matériel et Méthodes	48
1 - Modification de la BLG, préparation des échantillons	48
1.1 - Cinétique de glycation avec le glucose	48
1.2 - Glycation avec différents sucres	49
2 - Caractérisation physico-chimique	49
2.1 - Spectres d'absorption	49
2.2 - Dosage OPA	49
2.3 - Composition en acides aminés	50
2.4 - Isoélectrofocalisation	50
2.5 - Hydrolyse trypsique et analyse par HPLC	50
2.5.1 – Cinétique de modification de la BLG par le glucose	50
2.5.2 – BLG modifiée par les différents sucres	51
2.6 - Electrospray ionization - mass spectrometry (ESI-MS)	52
3 - Caractérisation structurale	52
3.1 - Dichroïsme circulaire	52
3.2 - Microcalorimétrie	53
3.3 - Hydrolyse pepsique	53
4 - Comportement vis-à-vis de l'association – polymérisation	54
4.1 - Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de tricine et de SDS	54
4.2 - Chromatographie de filtration sur gel	55

4.3 - Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE)	56
C – Résultats	58
1 - Caractérisation physico-chimique	58
1.1- Influence du temps de chauffage	58
1.1.1 - Mise en évidence de composés colorés	58
1.1.2 - Estimation du taux de glycation	60
1.1.2.1 - Dosage OPA	60
1.1.2.2 - Détermination de la composition en acides aminés	61
1.1.3 - Modification du point isoélectrique	62
1.1.4 - Modification de la sensibilité à l'hydrolyse trypsique	63
1.2 - Influence du sucre utilisé	65
1.2.1 - Mise en évidence de composés colorés	65
1.2.2 - Estimation du taux de glycation	67
1.2.3 - Modification du point isoélectrique	68
2 - Caractérisation structurale	70
2.1 - Modification des acides aminés	70
2.1.1 - Détermination de la composition en acides aminés	70
2.1.2 - Identification des sites de modification par analyse des hydrolysats tryptiques	71
2.1.2.1 - Analyse par spectrométrie de masse	71
2.1.2.2 - Evolution des différents peptides	75
2.2 - Modification de la structure secondaire Analyse par dichroïsme circulaire dans la région UV-lointain	78
2.3 - Modification des structures tertiaire et quaternaire, conformation, structure tridimensionnelle	78
2.3.1 - Analyse par dichroïsme circulaire dans la région UV-proche	78
2.3.2 - Analyse par microcalorimétrie	81
2.3.3 - Analyse par hydrolyse pepsique	83

3 - Comportement vis-à-vis de l'association – polymérisation	85
3.1 - Séparation par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE)	85
3.2 - Séparation par perméation sur gel suivie d'une SDS-PAGE	88
D - Conclusion	92
1 - Caractérisation physico-chimique	92
2 - Caractérisation structurale	93
3 - Comportement vis-à-vis de l'association – polymérisation	93
 CHAPITRE 2 : ETUDE DES PROPRIETES TECHNO-FONCTIONNELLES DES PROTEINES MODIFIEES	 95
A - Introduction	96
1 - La solubilité	96
2 - Propriétés émulsifiantes des protéines	96
3 - Propriétés moussantes	97
4 - Etude des propriétés techno-fonctionnelles de la BLG modifiée	98
B - Matériel et Méthodes	99
1 - Mesure de la solubilité en fonction du pH	99
2 - Mesure de la stabilité thermique	99
3 - Estimation des propriétés émulsifiantes	99
4 - Estimation des propriétés moussantes	100

C - Résultats	102
1 - Mesure de la solubilité en fonction du pH	102
2 - Mesure de la stabilité thermique	102
3 - Estimation des propriétés émulsifiantes	108
4 - Estimation des propriétés moussantes	109
D - Conclusion	112
1 - Mesure de la solubilité en fonction du pH	112
2 - Mesure de la stabilité thermique	113
3 - Estimation des propriétés émulsifiantes	113
4 - Estimation des propriétés moussantes	114
CHAPITRE 3 : ETUDE DES PROPRIETES BIOLOGIQUES DES PROTEINES MODIFIEES	115
A - Introduction	116
1 - Peptides du lait à activités biologiques	116
2 - La glycation pour générer de nouvelles activités biologiques	116
B - Matériel et Méthodes	119
1 - Hydrolyse de la BLG	119
2 - Séparation des hydrolysats par HPLC en phase inversée	119
3 - Tests d'activité antiradicalaire	120
4 - Tests d'activité antibactérienne	121
5 - Tests d'activité cytotoxique	123

C - Résultats	124
1 - Susceptibilité à l'hydrolyse pepsique et trypsique de la BLG native ou modifiée par la réaction de Maillard	124
2 - Tests d'activité antiradicalaire : évaluation de l'activité antioxydante de la BLG native ou modifiée par la réaction de Maillard	125
3 - Tests d'activité antibactérienne	132
3.1 - Diffusion en surface	132
3.2 - Diffusion dans la masse	132
3.3 - Homogénéisation en milieu liquide	132
4 - Tests d'activité cytotoxique	134
D - Conclusion	137
1 - Susceptibilité à l'hydrolyse pepsique et trypsique de la BLG native ou modifiée par la réaction de Maillard	137
2 - Tests d'activité antiradicalaire	137
3 - Tests d'activité antibactérienne	138
4 - Tests d'activité cytotoxique	138
 CONCLUSION GENERALE	
140	
 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	144

LISTE DES FIGURES

- Fig. 1 :** Diversité des produits issus du lait (présentation non exhaustive) et techniques de séparation de ces différents composants, d'après Cayot et Lorient (1998a). 22
- Fig. 2 :** Séquence de la BLG variant A : d'après Jamieson et al. (1987) et Alexander et al. (1989). 25
- Fig. 3 :** Représentation schématique de la disposition des structures secondaires de la BLG, d'après Papiz et al. (1986). 26
- Fig. 4 :** Structure tertiaire de la BLG, d'après Papiz et al. (1986). 27
- Fig. 5 :** Formation de l'ion immonium par réaction de l'amine primaire de la protéine sur le carbonyle du sucre réducteur (Friedman, 1996). 32
- Fig. 6 :** Réduction de l'ion immonium par alkylation réductrice (Cayot et al., 1999). 33
- Fig. 7 :** Réarrangement d'Amadori pendant la phase initiale de la réaction de Maillard (Friedman, 1996). 33
- Fig. 8 :** Voies de dégradation du composé d'Amadori (O'Brien et Morrissey, 1989 ; Chuyen 1998). 35
- Fig. 9 :** Formation de furosine et de pyridosine par hydrolyse acide de ϵ -fructose-lysine (O'Brien et Morrissey, 1989). 41
- Fig. 10 :** Stage initial de la réaction de Maillard dans le lait conduisant à la formation de lactulosyllysine (R = protéine) d'après Friedman, 1996 ; van Boekel, 1998. 42
- Fig. 11 :** Spectres d'absorption de la BLG chauffée sans glucose (**A**), du glucose chauffé ou non chauffé (**B**), et de la BLG chauffée avec du glucose (**C**) jusqu'à 264 heures. 59

- Fig. 12** : Estimation par le dosage OPA du taux de modification de la BLG chauffée seule ou en présence de glucose. 60
- Fig. 13** : Estimation par la détermination de la composition en lysine du taux de modification de la BLG chauffée seule ou avec du glucose. 61
- Fig. 14** : Isoélectrofocalisation de la BLG native (1) ou chauffée en présence de glucose pendant 24 (2), 48 (3), 72 (4), 96 (5), 168 (6) et 264 heures (7) à 60°C. 63
- Fig. 15** : Profil d'éluion par HPLC en phase inversée d'hydrolysats trypsiques de BLG native ou modifiée par le glucose pendant différentes périodes. 64
- Fig. 16** : Spectres d'absorption de la BLG native ou chauffée 3 jours à 60°C (A), chauffée en présence de ribose ou de rhamnose (B), et chauffée en présence de glucose, de galactose ou de lactose (C). 66
- Fig. 17** : Estimation par la méthode OPA du taux de modification de la BLG chauffée pendant 3 jours à 60°C en présence de différents sucres. 67
- Fig. 18** : Isoélectrofocalisation de la BLG native (1), chauffée seule (2), ou en présence d'arabinose (3), de galactose (4), de glucose (5), de lactose (6), de rhamnose (7) ou de ribose (8) pendant 72 heures à 60°C. 68
- Fig. 19** : Identification par spectrométrie de masse des peptides issus de l'hydrolyse trypsique de la BLG native ou modifiée par l'arabinose, séparés par HPLC en phase inversée. 72
- Fig. 20** : Identification par spectrométrie de masse des peptides issus de l'hydrolyse trypsique de la BLG modifiée par le glucose ou le lactose, séparés par HPLC en phase inversée. 73
- Fig. 21** : Evolution au cours du chauffage de certains peptides issus de l'hydrolyse trypsique de la BLG modifiée par le glucose. 76

- Fig. 22** : Localisation dans la structure tridimensionnelle de la BLG d'acides aminés préférentiellement substitués ou non-substitués lors de la modification par le glucose. 77
- Fig. 23** : Spectres de dichroïsme circulaire dans la région UV-lointain de la BLG native (**A** : ligne continue ; **B** à **H** : ligne discontinue), de la BLG chauffée (**B**), et de la BLG modifiée par l'arabinose (**C**), le galactose (**D**), le glucose (**E**), le lactose (**F**), le rhamnose (**G**) ou le ribose (**H**). 79
- Fig. 24** : Spectres de dichroïsme circulaire dans la région UV-proche de la BLG native (**A** : ligne continue ; **B** à **H** : ligne discontinue), de la BLG chauffée (**B**), et de la BLG modifiée par l'arabinose (**C**), le galactose (**D**), le glucose (**E**), le lactose (**F**), le rhamnose (**G**) ou le ribose (**H**). 80
- Fig. 25** : Courbes de dénaturation de la BLG native, chauffée ou modifiée par différents sucres. 82
- Fig. 26** : Evolution de l'hydrolyse pepsique de la BLG native, chauffée ou modifiée par différents sucres et de la SAB. 83
- Fig. 27** : Tricine SDS-PAGE de la BLG. 85
- Fig. 28** : Mécanisme envisagé pour la formation de protéines polymérisées par un composé d'Amadori formé à partir de glucose et de résidus ϵ -lysyle. 87
- Fig. 29** : Profils d'élution par chromatographie de filtration sur gel de BLG native, chauffée ou modifiée avec différents sucres. 88
- Fig. 30** : SDS-PAGE de la BLG native, chauffée ou après glycation en conditions réductrices (droite) ou non réductrices (gauche). 90
- Fig. 31** : Courbes expérimentales d'une mousse obtenue avec l'échantillon de BLG chauffée. 101

- Fig. 32** : Solubilité en fonction du pH de la BLG native ou chauffée 72 heures à 60°C (A), de la BLG modifiée par l'arabinose ou le ribose (B) et de la BLG modifiée par le glucose, le galactose, le rhamnose ou le lactose (C). 103
- Fig. 33** : Stabilité thermique de la BLG native ou chauffée (A), modifiée par le ribose ou l'arabinose (B), et modifiée par le galactose, le glucose, le lactose ou le rhamnose (C) à pH 5 (—) et à pH 7 (- - -). 104
- Fig. 34** : Stabilité thermique à 80°C et pH 5 de la BLG native ou chauffée (A), modifiée par le ribose ou l'arabinose (B) et modifiée par le galactose, le glucose, le lactose ou le rhamnose (C). 106
- Fig. 35** : Stabilité thermique à pH 4 de la BLG modifiée par l'arabinose ou le ribose (A) ; stabilité thermique à pH 4,5 de la BLG modifiée par le galactose, le glucose, le lactose ou le rhamnose (B). 107
- Fig. 36** : Propriétés émulsifiantes de la BLG native, chauffée ou modifiée par différents sucres, déterminées par la mesure du diamètre moyen de la distribution de taille des gouttelettes d'huile ($d_{3,2}$) de l'émulsion. 108
- Fig. 37** : Propriétés moussantes de la BLG modifiée par le glucose (■), ou le ribose (●) déterminées par le volume de liquide dans la mousse et le volume de mousse. 111
- Fig. 38** : Mesure par absorption à 515 nm de la disparition du DPPH seul (blanc) ou en présence de BLG native ou modifiée par le rhamnose ou le ribose, ou en présence d'acide gallique. 126
- Fig. 39** : Activité antiradicalaire de la BLG native, chauffée ou modifiée par l'arabinose, le galactose, le glucose, le lactose, le rhamnose ou le ribose et de la SAB, non hydrolysées, hydrolysées par la pepsine et hydrolysées par la trypsine. 127

- Fig. 40** : Activité antiradicalaire de la BLG modifiée par l'arabinose, le galactose, le glucose, le lactose, le rhamnose ou le ribose en fonction du nombre de groupes NH₂ réactifs de la BLG. 129
- Fig. 41** : Croissance en milieu liquide d'Escherichia coli HB 101 seule (Témoin) ou en présence de BLG native ou chauffée (**A**), ou en présence de BLG modifiée par le lactose, le glucose ou le ribose (**B**). 133
- Fig. 42** : Activité cytotoxique contre les lignées COS-7 et HL-60 de la BLG native (**A**), chauffée (**B**) ou modifiée par le glucose (**C**) ou le ribose (**D**) et de la SAB (**E**) non hydrolysées, hydrolysées par la pepsine et hydrolysées par la trypsine. 135

LISTE DES TABLEAUX

Tab. 1 : Composition moyenne de 1 litre de lait de vache	23
Tab. 2 : Composition moyenne en protéines de 1 litre de lait de vache	24
Tab. 3 : Réactivité des sites de glycation de la BLG pour le lactose en milieu sec (Morgan et al., 1998)	43
Tab. 4 : Gradient d'élution utilisé pour la séparation par HPLC en phase inversée des peptides issus de l'hydrolyse par la trypsine de la BLG native ou modifiée par le glucose au cours d'une cinétique.	51
Tab. 5 : Gradient d'élution utilisé pour la séparation par HPLC en phase inversée des peptides issus de l'hydrolyse par la trypsine de la BLG native ou modifiée par les différents sucres.	52
Tab. 6 : Gradient d'élution utilisé pour la séparation par HPLC en phase inversée des peptides issus de l'hydrolyse par la pepsine de la BLG native ou modifiée par les différents sucres.	54
Tab. 7 : Gel de concentration à 4% (P/V) en acrylamide.	54
Tab. 8 : Gel de séparation à 10% (P/V) en acrylamide.	54
Tab. 9 : Tampon de migration à l'anode.	54
Tab. 10 : Tampon de migration à la cathode.	55
Tab. 11 : Tampon de charge 2X.	55
Tab. 12 : Tampon de coloration.	55

Tab. 13 : Tampon de décoloration.	55
Tab. 14 : Gel de concentration à 4 % (P/V) de polyacrylamide.	56
Tab. 15 : Gel de séparation à 12 % (P/V) de polyacrylamide.	57
Tab. 16 : Tampon de migration.	57
Tab. 17 : Tampon de charge 2X avec β -mercaptoéthanol.	57
Tab. 18 : Tampon de charge 2X sans β -mercaptoéthanol.	57
Tab. 19 : Analyse des acides aminés de la BLG modifiée par le glucose pendant différentes périodes (de 24 à 264 heures).	70
Tab. 20 : Identification des peptides issus de l'hydrolyse de la BLG native ou modifiée par différents sucres.	74
Tab. 21 : Propriétés moussantes de la BLG native, chauffée ou modifiée par différents sucres.	110
Tab. 22 : Activité biologique des peptides issus de la protéolyse des protéines laitières (Meisel, 1997, 1998).	117
Tab. 23 : Gradient d'élution utilisé pour la séparation par HPLC en phase inversée des peptides issus de l'hydrolyse par la trypsine et par la pepsine de la BLG native ou modifiée par les différents sucres.	120
Tab. 24 : Souches bactériennes utilisées lors des tests d'activités antimicrobiennes.	121
Tab. 25 : Comparaison de la susceptibilité à l'hydrolyse pepsique et trypsique de la BLG native, chauffée ou modifiée par différents sucres et de la SAB.	124
Tab. 26 : Activité antiradicalaire des protéines et de leurs hydrolysats pepsiques et trypsiques mesurée par la détermination de leurs IC.10 et IC.50.	128

**INTRODUCTION GENERALE
BIBLIOGRAPHIE**

A - Modification des protéines alimentaires

Les fortes contraintes industrielles actuelles conduisent à l'obtention de protéines aux propriétés de plus en plus performantes. Formation de gel, stabilisation d'émulsion ou de mousse, modification de la viscosité, coagulation... telles sont certaines des principales propriétés techno-fonctionnelles recherchées par l'industrie agro-alimentaire.

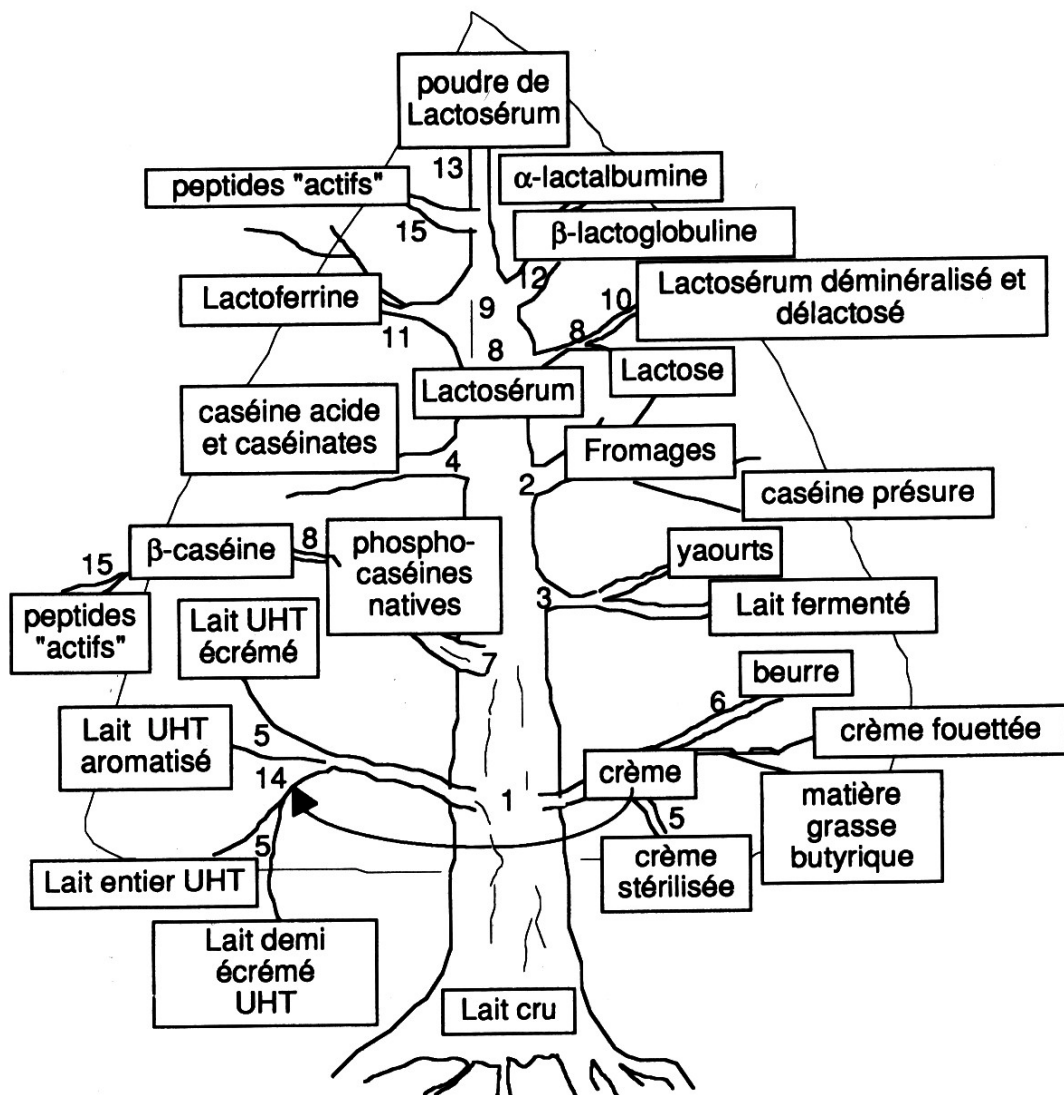
L'orientation de la demande du consommateur vers des aliments fonctionnels, c'est-à-dire possédant des composants physiologiquement actifs aux effets bénéfiques pour la santé, au-delà de la simple nutrition de base, conduit les industriels à rechercher des protéines aux propriétés multifonctionnelles combinant techno-fonctionnalité et activités biologiques. La modification des protéines visant à leur conférer de telles propriétés reste encore une voie peu exploitée.

1 - Choix de la protéine à modifier

Les protéines laitières sont des protéines peu onéreuses, d'obtention aisée et produites en grande quantité. Elles ont été et sont encore actuellement très étudiées. Leur séquence, leur conformation et leur polymorphisme sont très bien connus, ce qui en fait un modèle théorique de choix.

1.1 - Le lait et l'alimentation

Le lait de vache, aliment de base pour la nutrition du veau, est produit en grande quantité par les pays industrialisés pour la nutrition humaine sous sa forme naturelle (lait entier cru) ou ses nombreuses formes transformées comme le schématise la figure 1 (lait demi-écrémé, écrémé, concentré, en poudre, crème, crème glacée, beurre, dessert lacté, fromage, yaourt, protéines...).



- | | |
|--|---|
| 1 : écrémage | 9 : agrégation thermique + CaCl_2 |
| 2 : emprésurage et coagulation | 10 : électrodialyse |
| 3 :ensemencement et acidification | 11 : chromatographie |
| 4 : acidification minérale ou lactique | 12 : chauffage (55°C , 30 min, pH 3,8) |
| 5 : pasteurisation ou traitement UHT | 13 : séchage |
| 6 : barattage | 14 : homogénéisation |
| 7 : microfiltration | 15 : hydrolyses enzymatiques |
| 8 : ultrafiltration | |

Figure 1 : Diversité des produits issus du lait (présentation non exhaustive) et techniques de séparation de ces différents composants, d'après Cayot et Lorient (1998a).

1.2 - Composition du lait (Tab. 1)

Le lait est un aliment naturellement très riche en eau (905 g/l), présentant un bon équilibre glucides – lipides – protides pour une valeur calorique d'environ 650 kcal/kg. La composition du lait varie en fonction de la race de la vache, de son mode d'alimentation et de la saison. Les glucides du lait (49 g/l) sont essentiellement composés de lactose (99%) mais renferment des traces d'autres sucres comme le glucose ou le galactose.

La matière grasse du lait (35 g/l) est composée à 98% de glycérides dispersés dans des globules gras. Elle renferme 1% de phospholipides ; le reste est constitué de carotène (précurseur de la vitamine A) et de stérol (précurseur de la vitamine D). La matière azotée (34,5 g/l) est constituée de 95% de protéines et de 5% d'azote non protéique dont principalement de l'urée, des acides aminés, de la créatine et de l'ammoniac. Le pH du lait est environ de 6,5.

Composants	Quantité (g/l)
eau	905
glucide	49
lactose	49,0
matières grasses	35
lipides	34,0
phospholipides	0,5
composés liposolubles	0,5
matière azotée	34,5
caséines	27,0
protéines du lactosérum	6,0
azote non protéique	1,5
matières minérales	9
TOTAL	1032,5
Matière sèche totale	127,5

Tableau 1 : Composition moyenne de 1 litre de lait de vache.
D'après Fox, 1989 ; Ribadeau Dumas et Grappin, 1989 ; Cayot et Lorient, 1998a .

Les protéines du lait de vache peuvent être séparées en deux classes par abaissement du pH à 4,6 (point isoélectrique des caséines). On obtient alors une fraction insoluble à pH 4,6, la fraction caséique, et une fraction soluble à ce pH, la fraction lactosérique.

La composition protéique du lait est décrite dans le tableau 2.

Composants	Quantité		
	(g/l) *	% relatif	% total
Caséines	27	100	81,8
Caséine α_{S1}	10,0	37,0	30,3
Caséine α_{S2}	2,6	9,6	7,9
Caséine β	9,3	34,4	28,2
Caséine κ	3,3	12,2	10,0
autres	1,8	6,8	5,4
Protéines du lactosérum	6	100	18,2
β -lactoglobuline	3,2	53,3	9,7
α -lactalbumine	1,2	20,0	3,7
Immunoglobulines	0,8	13,3	2,4
Sérum albumine	0,4	6,7	1,2
autres	0,4	6,7	1,2
TOTAL	33		100

Tableau 2 : Composition moyenne en protéines de 1 litre de lait de vache d'après Ribadeau Dumas et Grappin, 1989.

- La fraction caséique (ou caséines) correspond à environ 81% de la composition moyenne totale en protéines d'un litre de lait de vache. Elle est composée principalement des caséines α_{S1} , α_{S2} , β et κ . Ces caséines forment dans le lait des agrégats très stables appelés micelles. Ce sont des particules d'un diamètre moyen de 100 nm et stabilisées par des ions Ca^{2+} . Ces petites particules donnent sa couleur blanche opaque au lait.
- La fraction lactosérique est composée de protéines globulaires ayant une structure tertiaire compacte et se présentant dans le lait sous formes monomériques ou oligomériques. Elle représente environ 18% de la composition moyenne totale en protéines d'un litre de lait de vache. Les protéines lactosériques ne participent pas à la coagulation enzymatique du lait par la présure lors de la fabrication du fromage. Longtemps considéré comme un déchet, le lactosérum fait l'objet depuis plusieurs années de nombreuses recherches de valorisation. Les protéines du lactosérum sont constituées de 53,3% de bêta-lactoglobuline et de 20% d'alpha-lactalbumine. Les autres protéines présentes sont les immunoglobulines (13,3%), la sérum albumine (6,7%) et de nombreuses enzymes (lysozyme, lactoperoxydase, phosphatase alcaline, catalase...). La proportion d'immunoglobulines dans le lait s'accroît énormément lors du vêlage (80 g/l) ; on parle alors de colostrum. Contrairement aux immunoglobulines et à la sérum albumine qui proviennent du sang, la bêta-lactoglobuline et l'alpha-lactalbumine sont synthétisées dans la mamelle.

1.3 - La bêta-lactoglobuline (BLG)

C'est la protéine majeure du lactosérum. Isolée pour la première fois par Palmer en 1934, elle est présente en grande quantité chez les ruminants et les porcins. Elle serait vraisemblablement absente du lait de femme bien que des réactions immunochimiques entre des protéines du lactosérum humain et un sérum anti-BLG bovin aient été observées (Brignon *et al.*, 1985). La BLG est sécrétée par les cellules épithéliales de la glande mammaire dans le lait bovin à une concentration d'environ 3 g/l. Le gène codant la protéine est localisé chez la vache sur le chromosome 11 (Hayes et Petit, 1993).

Grâce à son abondance et à ses nombreuses méthodes de purification, la BLG a été largement étudiée et est couramment utilisée comme modèle pour des études structurales des protéines globulaires. Sa séquence et sa conformation tridimensionnelle sont bien connues.

1.3.1 - Structure primaire

Le monomère de BLG, composé de 162 résidus d'acides aminés, a une masse moléculaire d'environ 18300 Da qui varie légèrement selon les variants génétiques. Il existe au moins 11 variants de la BLG (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, W) dont deux dominants (A et B). La plupart de ces variants ne diffèrent que par la substitution d'un ou deux acides aminés (Godovac-Zimmermann *et al.*, 1996). La structure primaire de la BLG renferme cinq résidus de cystéine, dont quatre sont impliqués dans la formation de ponts disulfure (Cys66-Cys160 et Cys106-Cys119). La cystéine libre en position 121 intervient dans la polymérisation et la réactivité de la molécule. La structure primaire de la BLG variant A avec ses deux ponts disulfure est représentée sur la figure 2.

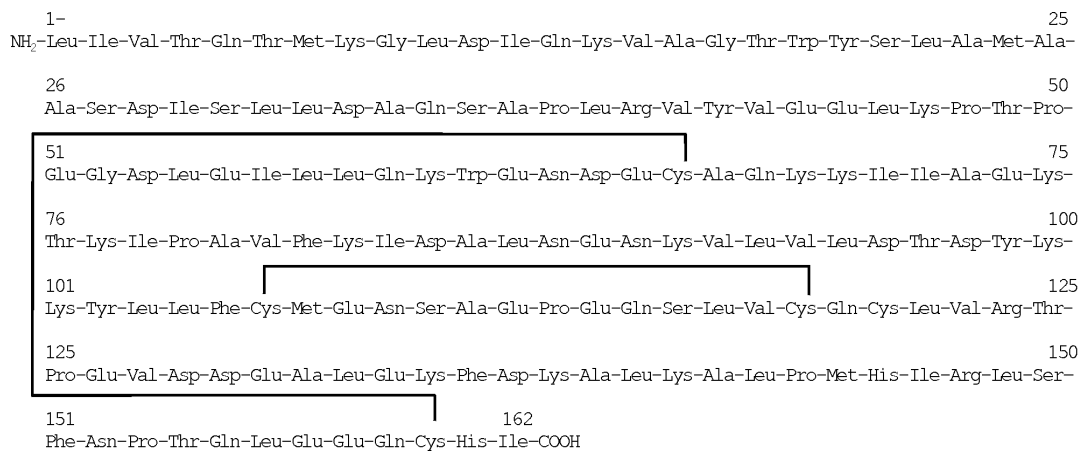


Figure 2 : Séquence de la BLG variant A : d'après Jamieson *et al.* (1987) et Alexander *et al.* (1989).

1.3.2 - Structure secondaire

La BLG présente un haut degré de structuration ; elle renferme une très forte proportion de feuillets β (environ 50%). 6 à 15% de la molécule sont sous la forme d'hélices α , le reste étant sous forme de structure désordonnée. Brownlow *et al.* (1997) ont obtenu par cristallographie 51,2% de feuillets β et 6,8% d'hélices α . Des études de dichroïsme circulaire (Qi *et al.*, 1997) ont montré 50% de feuillets β et 10% d'hélices α .

1.3.3 - Structure tertiaire

La structure tertiaire de la BLG est constituée par neuf feuillets β antiparallèles correspondant aux séquences 16-27, 39-44, 47-58, 62-76, 80-84, 89-97, 102-109, 115-124 et 145-150 nommés par ordre alphabétique de A à I (Fig. 3).

Huit des neuf feuillets β forment un calice hydrophobe à l'intérieur de la protéine globulaire, bordé par une hélice α en position N-terminale (3-10). Une autre hélice α est située en position 130-140.

La structure tertiaire obtenue à partir de données de diffraction des rayons X sur un échantillon cristallisé (Fig. 4; Papiz *et al.*, 1986) montre que le monomère de BLG aurait la forme d'un cône flasque ou d'un calice.

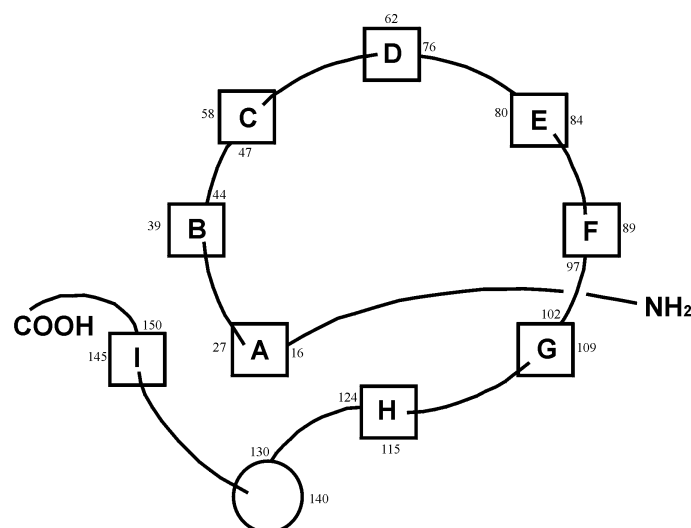


Figure 3 : Représentation schématique de la disposition des structures secondaires de la BLG, d'après Papiz *et al.*, 1986.

Cette structure très ordonnée confère à la BLG une forte résistance à l'action de la pepsine (une enzyme digestive de l'estomac) en milieu aqueux (Reddy *et al.*, 1988; Dalgalarondo *et al.*, 1995; Guo *et al.*, 1995).

Sa très forte ressemblance structurale avec des protéines comme la "Retinol Binding Protein" (RBP) ou la "Mouse Urinary Protein" (MUP) a conduit à rattacher la BLG à la famille des lipocalines (Sivaprasadarao *et al.*, 1993; Flower, 1996; Monaco et Zanotti, 1992) qui inclut également la "von Ebner's-Gland Protein" (VEGP), la "Bilin Binding Protein" (BBP), l'"Insecticyanin" (ICYAN) et la "Fatty Acid Binding Protein" (FABP). A l'image de ces protéines, le rôle biologique de la BLG dans le lait pourrait être de transporter de petites molécules hydrophobes (Pérez et Calvo, 1995).

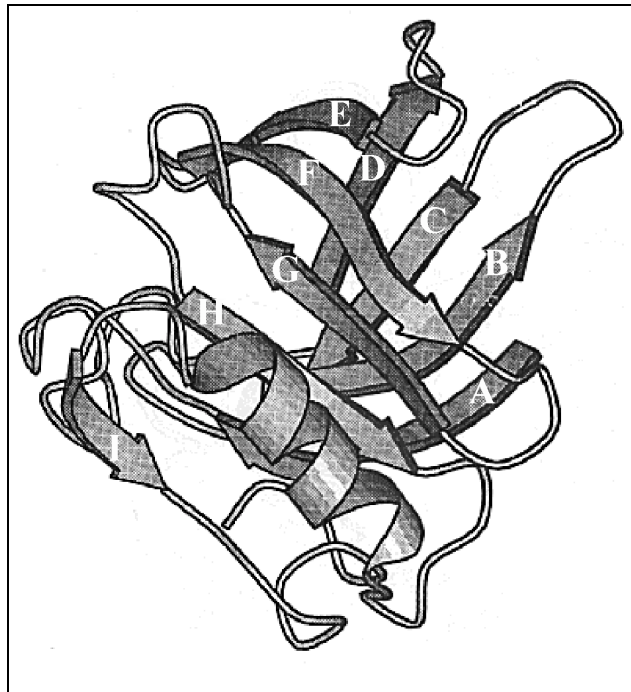


Figure 4 : Structure tertiaire de la BLG, d'après Papiz *et al.*, 1986.

De nombreuses études ont été dédiées à la faculté de la BLG à lier de petites molécules hydrophobes. Ces études d'interaction protéine - ligands ont montré que la BLG était capable de lier des composés aromatiques (Farrell *et al.*, 1987; O'Neill et Kinsella, 1987; Pelletier *et al.*, 1998), des rétinoïdes (Dufour et Haertlé, 1991; Cho *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1997a), de la vitamine D et du cholestérol (Wang *et al.*, 1997b),...

Bien que la BLG soit capable de se lier à de nombreuses molécules *in vitro*, sa fonction biologique dans le lait n'est pas encore connue. Sa résistance aux enzymes digestives conduit à penser que son rôle dans le lait pourrait être de transporter de petites molécules hydrophobes à travers la paroi intestinale (McAlpine et Sawyer, 1990 ; Pérez et Calvo, 1995; Wu *et al.*, 1999).

1.3.4 - Structure quaternaire

L'état d'association des monomères de BLG en solution dépend fortement du pH. La BLG est monomérique à pH acide ($\text{pH} < 2$) et à pH alcalin ($\text{pH} > 9$). Au pH physiologique ($\text{pH} 6,5$), elle est présente sous forme dimérique. Une forme octamérique est observée à $\text{pH} 4,65$ (Pessen *et al.*, 1985). L'association sous forme de dimères serait réalisée par un emboîtement spécifique du haut du calice d'une unité avec le bas du calice d'une autre unité (Monaco *et al.*, 1987).

Outre son action sur l'état d'association des monomères de BLG, le pH agit sur la conformation de la protéine et provoque des transitions structurales réversibles ou non. Entre $\text{pH} 6,5$ et $\text{pH} 7,5$, la transition dite de 'Tanford' (Tanford *et al.*, 1959) a pour conséquence la modification réversible de l'exposition de certains résidus d'acides aminés aromatiques et l'augmentation de la réactivité du groupe thiol libre. A un pH supérieur à $7,5$, les ensembles bi-unitaires se dissocient en monomères ; à $\text{pH} 9,0$ cette dissociation devient irréversible (Pessen *et al.*, 1985).

L'abondance de cette protéine peu coûteuse, facilement purifiable et de structure parfaitement connue, nous a conduits à la choisir comme modèle lors de nos études de modifications.

2 - Choix de la méthode de modification

2.1 - Objectif des modifications

L'industrie agro-alimentaire subit des contraintes technologiques de plus en plus importantes nécessitant l'emploi d'ingrédients aux propriétés bien définies et correspondant parfaitement aux besoins et aux attentes du consommateur. La modification des protéines permet l'acquisition d'une ou de plusieurs fonctions jusque-là inexistantes, ou insuffisamment exprimées pour permettre leur utilisation et leur valorisation.

2.1.1 - Propriétés technologiques

L'utilisation en agro-alimentaire de protéines modifiées a principalement pour but de répondre à des contraintes techno-fonctionnelles telles que :

- stabiliser des mousses ou des émulsions ;
- former un gel ;
- modifier la viscosité ou la solubilité d'une préparation.

2.1.2 - Propriétés nutritionnelles et organoleptiques

Les protéines modifiées peuvent aussi avoir pour rôle d'améliorer des propriétés nutritionnelles ou organoleptiques telles que :

- équilibrer la teneur en acides aminés essentiels ;
- améliorer la digestibilité ;
- modifier la saveur ou la couleur.

L'orientation de la demande sociétale vers des aliments fonctionnels nécessite la recherche de protéines présentant de nouvelles propriétés « biologiques » telles que :

- inhiber le développement de bactéries ou de champignons pathogènes ;
- empêcher ou ralentir l'oxydation ;
- induire l'activation ou l'inactivation d'enzymes ayant une fonction physiologique.

2.2 - Les différents types de modification

Afin de résoudre ces problèmes, de nombreuses méthodes de modification des protéines existent et peuvent être utilisées pour conférer aux protéines des propriétés technologiques et/ou biologiques désirées.

2.2.1 - Modification chimique

La modification chimique des protéines s'effectue en particulier sur les groupes réactifs des chaînes latérales des acides aminés tels que les groupes amines primaires (acétylation, succinylation, carbamylation, guanidination, alkylation, glycation...), les groupes carboxyliques (amidation, estérification, phosphorylation...) ou les groupes thiols (oxydation). Ces modifications ont été entreprises jusque-là pour améliorer certaines propriétés techno-fonctionnelles (Cheftel *et al.*, 1985 ; Kinsella et Whitehead, 1989). Ce domaine étant très vaste, nous nous limiterons à l'étude des modifications chimiques par fixation de sucres (cf. 2.3).

2.2.2 - Modification physique

Des modifications du milieu environnant telles que le chauffage, la congélation, la variation du pH, de la force ionique, de la polarité de l'environnement ou de la pression ont été réalisées pour changer la structure, les propriétés d'agrégation, la solubilité des protéines (Cayot et Lorient, 1998b).

2.2.3 - Modification enzymatique

Les enzymes sont parfois utilisées pour améliorer la solubilité des protéines ou pour générer la présence de peptides et d'acides aminés libres (Chobert *et al.*, 1987 et 1988 ; Haque et Mozzafar, 1992).

2.2.4 - Modification génétique

Depuis près de 20 ans et avec l'apparition des techniques de biologie moléculaire, une nouvelle voie de modification des protéines est largement exploitée. En modifiant spécifiquement un gène codant une protéine, il est possible de substituer, ajouter ou supprimer certains acides aminés de cette protéine et ainsi de modifier ou de générer les fonctions technologiques et/ou biologiques souhaitées.

2.3 - La modification des protéines par fixation de sucres : glycosylation - glycation

2.3.1 - Les glycoprotéines

Phénomène naturel, la glycosylation des protéines correspond à la fixation enzymatique d'un sucre ou d'un dérivé sucré sur un résidu séryle ou thréonyle (O-glycosylation) ou sur un résidu asparagyle (N-glycosylation) lors des modifications post-traductionnelles des protéines (Lodish *et al.*, 1988).

- Les glucides O-liés sont synthétisés dans l'appareil de Golgi ou dans le réticulum endoplasmique rugueux à partir de glucides nucléotidiques. Les glucides sont ajoutés un par un, chaque transfert est catalysé par une glycosyl-transférase.
- Les oligosaccharides N-liés sont synthétisés à partir d'un précurseur commun, contenant trois molécules de glucose, neuf de mannose et deux de N-acétylglucosamine. L'oligosaccharide modifié est ensuite transféré en bloc par une oligosaccharide transférase aux séquences tripeptidiques Asn-X-Ser ou Asn-X-Thr (où X est un acide aminé quelconque) du polypeptide naissant.

2.3.1.1 - Rôle *in vivo*

Les protéines ayant fixé un ou plusieurs groupes glucidiques par glycosylation sont dites « glycosylées ». Ces glucides exercent des fonctions variées.

Chez les lectines, protéines formant le glycocalix cellulaire, les sucres sont responsables de la spécificité membranaire des cellules (Drickamer, 1988). Formant un marquage endogène de cellules cancéreuses, ils permettent de suivre l'évolution maligne de tumeurs (Didier *et al.*, 1994 ; Chevalier, 1994). Les lectines ont également été utilisées pour réduire les effets secondaires de drogues car elles permettent le ciblage spécifique du type de cellule nécessitant le traitement (Yamasaki *et al.*, 2000).

En plus de leur fonction de spécificité cellulaire également rencontrée chez de nombreuses hormones (gonadotrophine, thyroglobuline, ...) et dans le typage des hématies (A, B, O, AB), les sucres liés stabilisent les protéines de sécrétion et les protéines membranaires en formation. Ils peuvent aussi remplir des fonctions de protection contre le froid ('antifreeze glycoprotein', Feeney et Yeh, 1978).

2.3.1.2 - Utilisation en agro-alimentaire

Les glycoprotéines présentent d'excellentes propriétés technofonctionnelles et sont d'un usage courant dans l'industrie agro-alimentaire.

Les glycoprotéines du blanc d'œuf sont utilisées en particulier pour la formation de mousses ; leur capacité moussante est attribuée à une stabilisation de l'eau par les sucres autour des bulles de gaz retardant à la fois le drainage et la coagulation (Kinsella, 1981).

2.3.2 - Modification chimique ou glycation

Les glycoprotéines naturelles présentant d'excellentes propriétés techno-fonctionnelles, le greffage chimique de sucres (glycation) sur des protéines qui en sont dépourvues peut permettre l'induction de telles propriétés. Deux techniques principales existent : l'alkylation réductrice et la réaction de Maillard.

Ces deux réactions chimiques (Fig. 5) commencent par l'attaque nucléophile du doublet d'électrons libres de la fonction amine primaire de la protéine (1) sur le groupe carbonyle du sucre réducteur (2). L'aminoalcool néoformé (3) se déshydrate alors spontanément pour former l'imine (4), aussi appelée « base de Schiff », et son ion immonium (5).

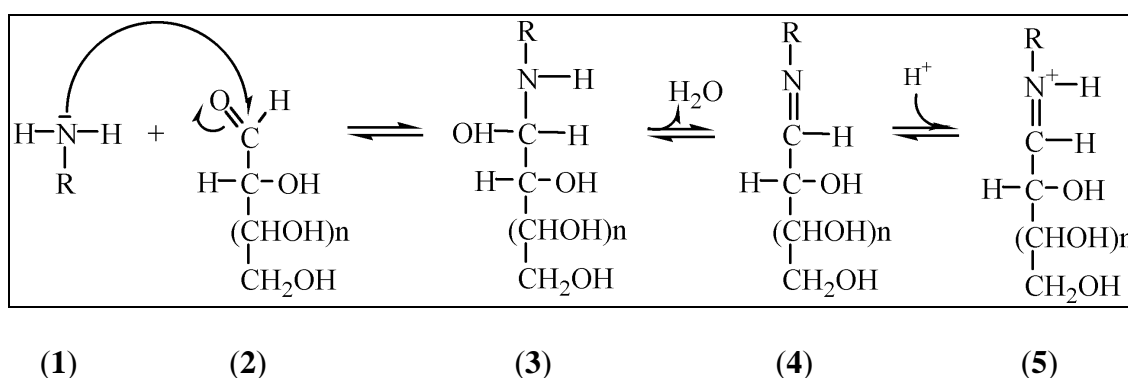


Figure 5 : Formation de l'ion immonium par réaction de l'amine primaire de la protéine sur le carbonyle du sucre réducteur (Friedman, 1996).

L'alkylation réductrice et la réaction de Maillard diffèrent pour les étapes suivantes :

- Dans le cas de l'alkylation réductrice (Fig. 6), l'ion immonium (5) est hydrogéné par un réducteur nucléophile. La réaction consiste à ajouter au milieu réactionnel un composé appelé « hydrure métallique » tel que l'hydrure de lithium (LiH), le borohydrure de sodium (NaBH₄) ou l'aluminohydrure de lithium (LiAlH₄). Ces composés sont des donneurs d'ion hydrure H⁻ capable de réduire la double liaison formée entre le carbone de

la fonction carbonyle du sucre réducteur et l'azote de la fonction amine primaire de la protéine (6). Il existe une alternative à l'utilisation d'un donneur d'hydrure pour l'alkylation réductrice : une méthode électrochimique, la « glycitolation », (Cayot *et al.*, 1999) permet de réduire l'imine par l'action d'électrons au niveau de la cathode.

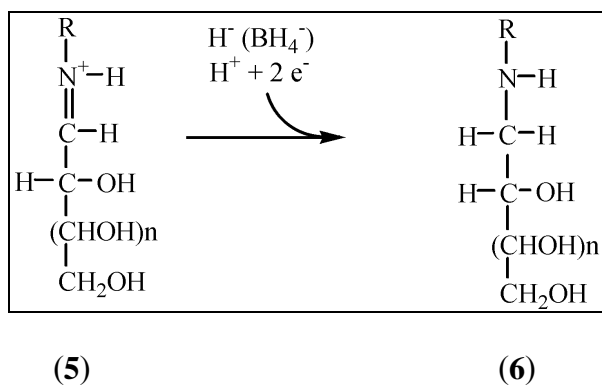


Figure 6 : Réduction de l'ion immonium par alkylation réductrice (Cayot *et al.*, 1999).

- Dans le cas de la réaction de Maillard, l'ion immonium (5) subit un réarrangement (7) conduisant à la formation d'un composé (8) appelé le « composé d'Amadori » (Fig. 7). Celui-ci est le premier composé stable de la réaction de Maillard. Il subit ensuite un grand nombre de réarrangements créant une multitude de sous-produits.

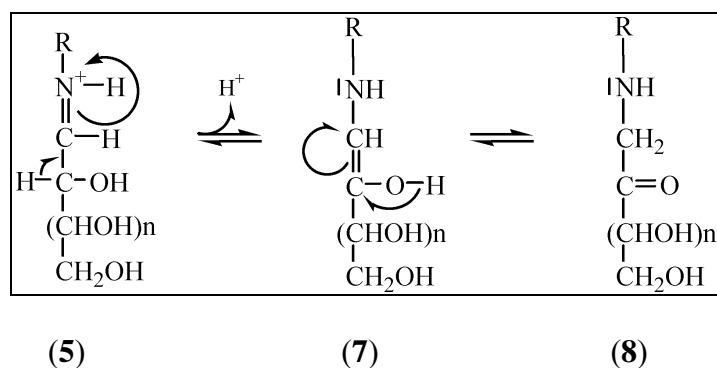


Figure 7 : Réarrangement d'Amadori pendant la phase initiale de la réaction de Maillard (Friedman, 1996).

Lors de notre étude, nous avons choisi d'utiliser la réaction de Maillard comme technique de fixation de sucres à la protéine (BLG). Cette méthode de modification présente l'avantage de limiter l'utilisation de composés toxiques tels que le donneur d'hydrure nécessaire pour l'alkylation réductrice et d'éviter le maniement d'un appareillage lourd comme c'est le cas pour l'électro-modification.

B - La réaction de Maillard

1 - La réaction chimique

Découverte au début du XX^{ème} siècle (1912) par le biochimiste français Louis Maillard qui fut le premier à décrire la formation de pigments bruns lors de la réaction entre des acides aminés et des sucres réducteurs (Maillard, 1912), la réaction de Maillard est également appelée réaction « amino-carbonyl », réaction « de brunissement non-enzymatique » et réaction « sucre-amine ». Elle est rencontrée fréquemment dans la fabrication, le traitement et la conservation de denrées alimentaires et durant la cuisson des aliments (Chuyen, 1998).

La réaction de Maillard intervient entre un composé aminé et un composé carbonyle :

- les composés aminés comprennent les acides aminés, les amines, les peptides, les protéines...
- les composés carbonyles comprennent les aldéhydes, les cétones, les sucres réducteurs...

Du fait de sa présence et de ses multiples conséquences en agro-alimentaire et en médecine, la réaction de Maillard fait l'objet de nombreuses recherches visant à mieux connaître ses sous-produits et à maîtriser leur formation. Cette réaction est communément divisée en trois parties : les stades primaires, les stades avancés et les stades finaux (Fig. 8).

Le stade primaire de la réaction consiste en la condensation d'un groupe aminé (1) et d'un groupe carbonyle (2), entraînant la formation du composé d'Amadori (8).

Dans les étapes avancées, le composé d'Amadori subit de nombreuses dégradations. Les composés 7 et 10 donnent lieu à deux voies de dégradation aboutissant à la formation de composés polymériques. Ces composés sont appelés « mélanoïdes » lorsque la fonction amine est portée par un acide aminé libre, « protéines modifiées » et « Advanced Glycation End Products – AGE » lorsque la fonction amine est portée respectivement par une protéine *in vitro* ou *in vivo* (O'Brien et Morrissey, 1989).

Bien que cette réaction soit étudiée depuis bientôt 90 ans, et malgré le grand nombre de composés intermédiaires isolés et identifiés (Friedman, 1996 ; Chuyen, 1998), il n'est toujours pas possible d'en présenter un schéma complet du fait de sa complexité (Ledl et Schleicher, 1990).

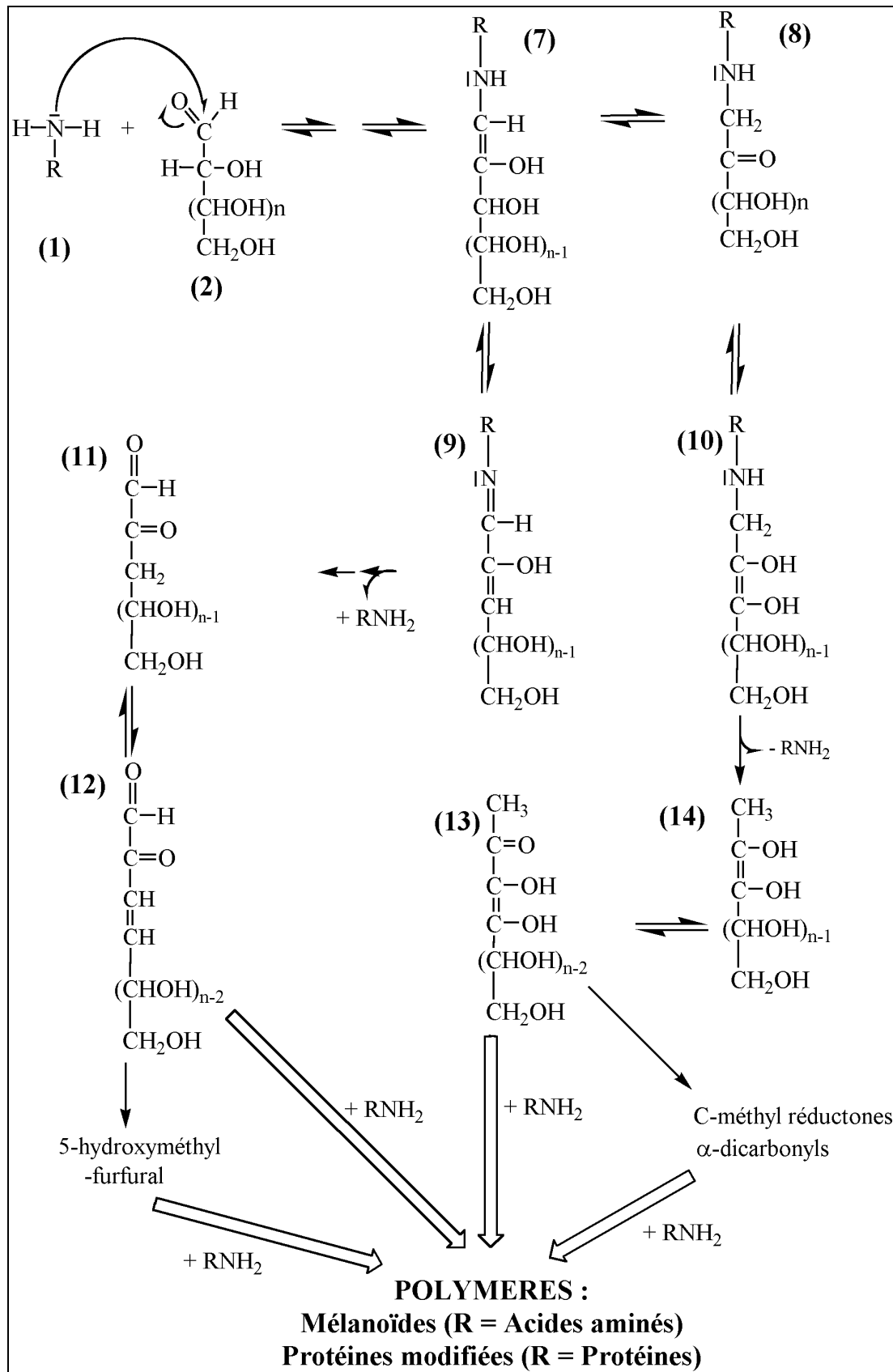


Figure 8 : Voies de dégradation du composé d'Amadori (O'Brien et Morrissey, 1989 ; Chuyen 1998).

2 - Influence des conditions physico-chimiques sur la réaction de Maillard

Les composés modifiés par la réaction de Maillard sont sujets à de larges variations en fonction des conditions réactionnelles. Le temps de réaction, le degré d'humidité, la température, la concentration des réactifs et le pH jouent un rôle décisif. Ces facteurs sont responsables des différences d'arôme, de goût et d'apparence entre, par exemple, la viande bouillie et la viande rôtie (Ledl et Schleicher, 1990).

Lea et Hannan (1949) ont mesuré la perte des groupes amines libres d'un mélange caséine-glucose : la réaction est 10 fois plus rapide à pH 7,0 qu'à pH 3,0 ; 9 000 fois plus rapide à 70°C qu'à 10°C et 40 000 fois plus rapide à 80°C qu'à 0°C ; un degré d'humidité de 15% est optimal pour la réaction réalisée dans un état « sec ». Seuls les sucres réducteurs peuvent donner lieu à la réaction de Maillard, les pentoses étant plus réactifs que les hexoses et les monosaccharides plus réactifs que les disaccharides (Hurrell et Carpenter, 1977a ; O'Brien et Morrissey, 1989 ; Ames, 1990).

La nature du composé aminé influence aussi la vitesse de la réaction. La lysine est plus réactive que les autres acides aminés à cause de la présence d'une fonction amine primaire sur sa chaîne latérale (Hurrell et Carpenter, 1977a). Dans un système protéique, la concentration en lysine est étroitement rattachée à la tendance à brunir. Ainsi, les protéines laitières, naturellement riches en lysine, réagissent plus rapidement que les protéines ayant une faible teneur en lysine comme les protéines de soja (Wolf *et al.*, 1978 ; O'Brien et Morrissey, 1989). Le temps de réaction est un facteur déterminant lors du stockage des aliments. Alonzo et Zapico (1995) ont étudié l'effet du stockage sur le contenu en sucres et en lysines libres de différentes denrées alimentaires pour nourrisson ayant une durée normale de conservation de deux ans. Après un an de stockage à 25°C, la quantité de lysine non modifiée est divisée au moins par deux dans chaque type d'échantillons, révélant la présence de réactions de Maillard.

3 - Implication de la réaction de Maillard en agro-alimentaire

La réaction de Maillard est rencontrée très fréquemment dans les systèmes alimentaires qui réunissent tous les facteurs propices à cette réaction : présence de mélanges protéine – sucre, chauffage, cuisson, stockage...

Si certaines conséquences de la réaction sont recherchées, d'autres ne le sont pas et peuvent poser des problèmes alimentaires. Afin d'appréhender les propriétés des Produits de la

Réaction de Maillard (PRM), de nombreux auteurs ont étudié des systèmes « modèles » composés d'un acide aminé et d'un sucre réducteur. Ce système simplifié a l'avantage de limiter la quantité de produits formés, mais présente l'inconvénient d'être plus éloigné des systèmes alimentaires comprenant plusieurs protéines et sucres.

3.1 - Effets bénéfiques de la réaction de Maillard

3.1.1 - Génération d'arômes et de coloration

Le chauffage lors de la cuisson ou du rôtissage des aliments nécessite des températures de l'ordre de 100 à 250°C. Ces hautes températures sont propices à la réaction de Maillard qui génère alors de nombreux arômes (Chuyen, 1998).

La réaction de Maillard tient en particulier un rôle prépondérant dans l'apparition d'arômes et de couleurs brunes lors de la fabrication du café (Tressl et Silwar, 1981), du chocolat (Hoskin, 1994), du pain (Danehy, 1986) et lors de nombreux autres processus rencontrés dans l'industrie agro-alimentaire.

3.1.2 - Propriétés antioxydantes

C'est l'une des propriétés biologiques majeures de la réaction de Maillard.

Des études réalisées sur des systèmes modèles composés de glucose et de glycine (Anese *et al.*, 1994), de xylose et de lysine (Yen et Hsieh, 1995) et de xylose et d'arginine (Beckel et Waller, 1983) ont démontré la présence de composés retardant l'oxydation des lipides.

Le mécanisme antioxydatif général des PRM n'est pas encore très clair. La faculté des mélanoides à donner des électrons et à chélater des métaux serait un facteur important contribuant à cette propriété des PRM.

La possibilité pour les PRM (en particulier le composé d'Amadori et les mélanoides) de capter les radicaux libres a aussi été observée (Hayase *et al.*, 1989 ; Yen et Hsieh, 1995). Les protéines lactières modifiées par la réaction de Maillard sont capables, elles aussi, de capter des radicaux libres (Nishino *et al.*, 2000).

3.1.3 - Propriétés antibiotiques

Des propriétés antibiotiques ont été observées dans des systèmes composés de xylose et d'arginine ou de glucose et d'histidine (Einarsson *et al.*, 1983; Einarsson, 1987a, b). Des expériences ont été réalisées sur de nombreuses espèces bactériennes présentes dans la nourriture. Sur les vingt espèces testées, de grandes différences d'inhibition de croissance ont

été obtenues. Les entérobactéries de l'espèce *Salmonella* ne sont pas inhibées alors que les bactéries Gram + *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus* sp et *Staphylococcus* sp le sont. Par contre, la bactérie *Bacillus cereus* ne semble pas inhibée.

L'évaluation du potentiel antibiotique révèle que les PRM formés à partir d'arginine sont plus puissants que ceux dérivés de l'histidine.

Les PRM ayant une action antibiotique sont supposés agir sur :

- la membrane cellulaire ;
- le matériel génétique ;
- les enzymes bactériennes.

3.1.4 - Propriétés antiallergènes

De nombreux aliments contiennent des allergènes portés par des protéines. Les sites responsables de cette allergénie peuvent être altérés par modification de la protéine par les sucres réducteurs (Friedman, 1996). Par exemple, les propriétés allergènes de l'inhibiteur trypsique de la graine de soja modifié par du glucose, du lactose ou du maltose sont diminuées de 60 à 80% par rapport à celles de l'inhibiteur non modifié (Oste *et al.*, 1990).

3.1.5 - Propriétés antimutagènes

Les PRM peuvent inactiver les composés mutagènes. Des amines hétérocycliques ont ainsi pu être inactivées par des produits issus de systèmes composés de lysine et de xylose chauffés à 100°C et à pH 9,0 pendant 1 heure (Yen et Hsieh, 1995). Un des mécanismes proposés pour cette activité serait une inactivation chimique des composés mutagènes, les produits de la réaction de Maillard réagissant avec eux pour conduire à des produits présentant des propriétés différentes (Friedman, 1996).

3.2 - Effets néfastes de la réaction de Maillard

La réaction de Maillard peut réduire de façon significative la valeur nutritionnelle de la nourriture par son action sur des acides aminés essentiels et par la production de composés anti-nutritionnels et toxiques (O'Brien et Morrissey, 1989).

La grande variété des produits issus de la réaction de Maillard peut par ailleurs conduire à la formation de composés présentant des propriétés antagonistes comme les composés mutagènes et les composés antimutagènes.

3.2.1 - Réduction de la valeur nutritionnelle

Par son action sur le groupe aminé libre des lysines, la réaction de Maillard engendre la destruction de cet acide aminé essentiel. Par ailleurs, cela a aussi pour conséquence une diminution de l'hydrolyse des protéines par la trypsine (Kato *et al.*, 1983 ; Darewicz *et al.*, 1998), une enzyme pancréatique reconnaissant, avec l'arginine, cet acide aminé comme site de coupure, conduisant ainsi à une moindre digestibilité.

3.2.2 - Génération de composés toxiques

La réaction de Maillard peut conduire à la formation de nombreux composés toxiques constitués en particulier d'amines hétérocycliques potentiellement mutagènes et carcinogènes (Friedman, 1996).

De nombreuses études utilisant le test de mutagénicité, dit test de « Ames », (Ames *et al.*, 1975 ; Maron et Ames, 1983) ont été réalisées sur des systèmes modèles composés d'un acide aminé et d'un sucre. Ces études ont révélé la présence de produits mutagènes dans des systèmes composés de ribose et de lysine (Gazzani *et al.*, 1987 ; Cuzzoni *et al.*, 1989), de glucose et de lysine (Shinohara *et al.*, 1980) ou de glucose et d'arginine (Powrie *et al.*, 1981). Des propriétés cytotoxiques ont été observées dans des systèmes composés de glucose et de lysine ou de fructose et de lysine (Jing et Kitts, 2000) ; des propriétés clastogéniques ont été mises en évidence dans des systèmes composés de ribose et de lysine (Vagnarelli *et al.*, 1991) ou de glucose et de lysine (Kitts *et al.*, 1993) révélant la présence de composés toxiques dans les produits issus de la réaction de Maillard.

3.3 - Conséquences de la réaction de Maillard sur les propriétés techno-fonctionnelles des protéines

La réaction de Maillard a été utilisée pour tenter d'améliorer les propriétés techno-fonctionnelles de protéines. Des protéines alimentaires comme la BLG et l'ovalbumine ont été modifiées afin de générer des propriétés technologiques proches de celles obtenues avec des protéines naturellement glycosylées.

Les propriétés émulsifiantes et la stabilité thermique de la BLG et de l'ovalbumine ont été améliorées par glycation avec du glucose-6-phosphate (Aoki *et al.*, 1997 ; Kato *et al.*, 1995) et de l'acide glucuronique (Aoki *et al.*, 1999).

4 - Implications de la réaction de Maillard en médecine

Depuis plusieurs années, la réaction de Maillard fait l'objet d'une attention particulière en recherche médicale car il semblerait qu'elle soit impliquée dans de nombreuses pathologies humaines. En effet, la présence de sucres réducteurs circulant (principalement du glucose) peut induire une réaction de Maillard avec les protéines renfermées dans les tissus.

La réaction de Maillard semble favorisée au cours du vieillissement et chez les diabétiques :

- Le vieillissement favoriserait la glycation dans le corps humain. Parmi les conséquences, on peut noter l'apparition de taches brunes sur la peau et une perte d'élasticité (réaction entre le glucose et le collagène ; Dyer *et al.*, 1993) ; la formation de la cataracte (réaction entre le glucose et le cristallin de l'œil ; Lee *et al.*, 1998). Cette réaction serait aussi impliquée dans des maladies dégénératives comme la maladie d'Alzheimer (réaction entre le glucose et les protéines des neurones ; Takeda *et al.*, 1996 ; Smith *et al.*, 1994). Cette action néfaste de la réaction de Maillard est en grande partie due à l'induction de pontages entre les protéines, créant ainsi des polymères dépourvus de leurs fonctions biologiques (Frye *et al.*, 1998 ; Pongor *et al.*, 1984).
- Cette réaction et ses conséquences observées au cours du vieillissement seraient accélérées chez les diabétiques (Brownlee *et al.*, 1986 ; Dyer *et al.*, 1993) à cause de la présence anormalement élevée de glucose circulant. Cela conduit aussi à une réaction plus importante que la normale entre le glucose et l'hémoglobine. Chez un sujet sain, environ 5 à 8% de l'hémoglobine sont modifiés par le glucose par la réaction de Maillard, alors que chez les diabétiques, un taux supérieur est rencontré (Rahbar *et al.*, 1969).

5 - Lactosylation des protéines lactières

Le lait est un aliment naturellement riche en sucres réducteurs (49 g/l ; Tab. 1) et en protéines (33 g/l ; Tab. 2), ce qui en fait un milieu favorable à la réaction de Maillard. On parle alors de « lactosylation » des protéines lactières.

Dans le lait, cette réaction est tout à fait indésirable car elle provoque une baisse de la valeur nutritive et l'apparition d'une couleur brune le rendant difficilement commercialisable.

Pour ces raisons, des tests ont été mis au point pour détecter la présence de PRM dans le lait, notamment après son traitement thermique de stérilisation en vue de sa conservation.

5.1 - Lactosylation du lait lors du chauffage

Turner *et al.* (1978) ont observé la fixation covalente de lactose (marqué au ^{14}C) sur les protéines du lait écrémé, stérilisé par ultra haute température (UHT). Dans ces expériences, les caséines incorporent davantage de lactose que les protéines du lactosérum. Ce phénomène ne peut pas être relié à la structure primaire des caséines car celles-ci sont moins riches en résidus lysyle que les protéines lactosériques. Cela serait plutôt dû à une meilleure accessibilité des résidus lysyle des caséines par rapport à ceux des protéines globulaires lactosériques.

Evangelisti *et al.* (1999) ont étudié le développement de la réaction de Maillard dans différents laits pasteurisés et stérilisés au cours du traitement UHT. L'évaluation de la quantité de lysines substituées, réalisée par dosage de la furosine (Fig. 9 ; O'Brien et Morrissey, 1989) a montré la présence de 5 à 154 milligrammes de lysines substituées par gramme de lysines. Ce taux de lysines substituées est encore inférieur à 350 mg/g de lysines totales, taux à partir duquel la lysine devient en quantité limitante dans le lait.

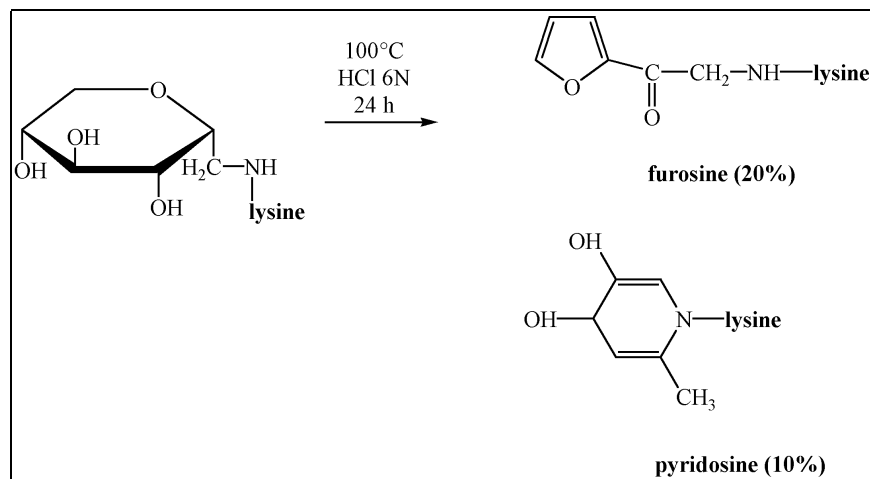


Figure 9 : Formation de furosine et de pyridosine par hydrolyse acide de ϵ -fructose-lysine (O'Brien et Morrissey, 1989).

Dans le lait, la lactulosyllysine (Fig. 10) est un composé intermédiaire obtenu par la réaction de Maillard lors de traitements thermiques. De nombreux autres produits peuvent aussi être formés lors de chauffages prolongés (van Boekel, 1998).

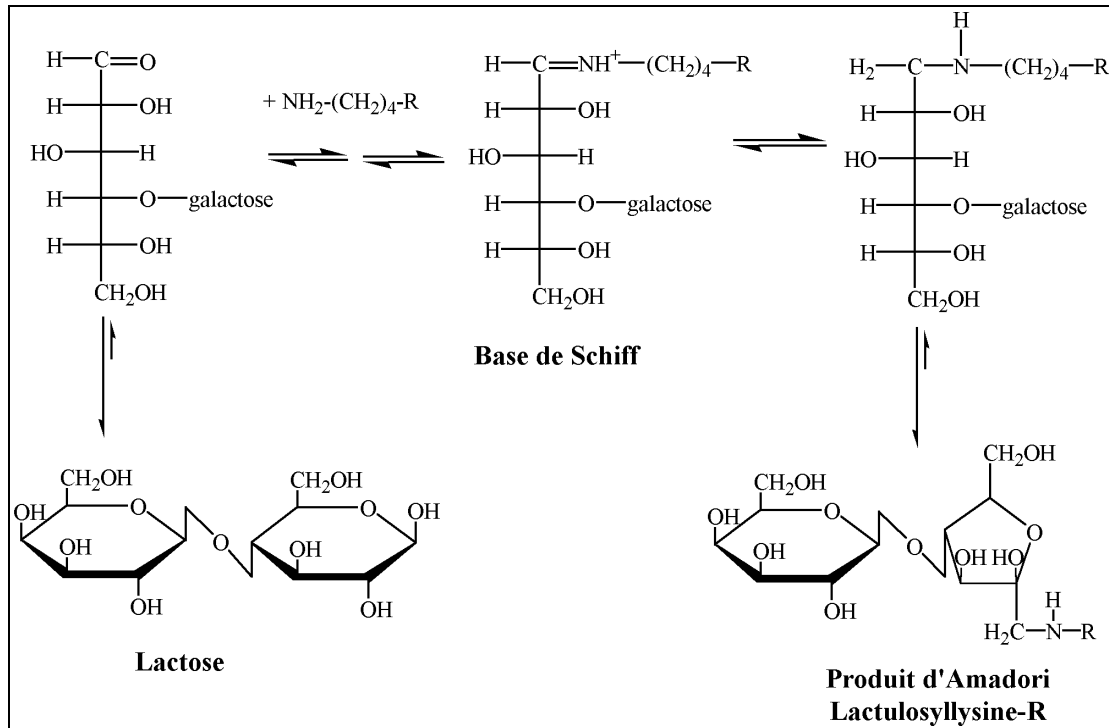


Figure 10 : Stage initial de la réaction de Maillard dans le lait conduisant à la formation de lactulosyllysine ($R = \text{protéine}$) d'après Friedman, 1996 ; van Boekel, 1998.

5.2 - Lactosylation de la BLG

Même si la BLG est moins lactosylée dans le lait que les caséines (Turner *et al.*, 1978), une perte de lysine due à la fixation covalente de lactose et de lactulose a été mise en évidence (Matsuda *et al.*, 1991 ; Otte *et al.*, 1998).

Récemment, la mise au point de techniques de spectrométrie de masse à électrospray (ESI-MS) a permis une détection directe des sucres fixés sur les protéines. Une augmentation de 324 Da de la masse moléculaire de la BLG est caractéristique de la fixation d'une unité de lactose.

Cette observation a été réalisée sur de la BLG purifiée à partir de lait chauffé à 63°C pendant 23 secondes (Maubois *et al.*, 1995), à partir de lait frais après purification douce à 40°C pendant 30 minutes (Burr *et al.*, 1996) ou à partir de poudre de lait (Jones *et al.*, 1998).

Des formes multi-lactosylées ont pu être observées par cette technique (Burr *et al.*, 1996 ; Léonil *et al.*, 1997 ; Morgan *et al.*, 1997 ; Fogliano *et al.*, 1998).

5.2.1 - Identification des sites de lactosylation de la BLG

L'hydrolyse trypsique des échantillons lactosylés de BLG, suivie d'une analyse en spectrométrie de masse a permis la réalisation d'une cartographie peptidique des protéines visant à localiser les sites de lactosylation (Mollé *et al.*, 1998). Ainsi, la lysine 47 (Léonil *et al.*, 1997) et la lysine 100 (Fogliano *et al.*, 1998) ont été identifiées comme sites préférentiels de lactosylation ; un chauffage doux conduit néanmoins à une hétérogénéité des glycoformes (Morgan *et al.*, 1997). Des études de cinétique de lactosylation en milieu « sec » ont permis de classer les sites de glycation par ordre de réactivité (Tab. 3). Les lysines 47 et 91 semblent lactosylées très rapidement (avant même le chauffage), alors que les lysines 8 et 141 nécessitent 10 heures de chauffage à 50°C avec 65% d'humidité relative.

Temps de réaction (heures)	Sites de glycation
0	Lysines 47, 91
2	N-terminal ; Lysines 15, 70, 100
6	Lysines 60, 69, 75, 77, 83, 135, 138
10	Lysines 8, 141

Tableau 3 : Réactivité des sites de glycation de la BLG pour le lactose en milieu sec (Morgan *et al.*, 1998).

5.2.2 - Modification structurale de la BLG lactosylée

Les conséquences structurales de la lactosylation de la BLG ont été étudiées. La formation de polymères de BLG a été mise en évidence par électrophorèse en présence de SDS et par chromatographie de filtration sur gel (Matsuda *et al.*, 1991 ; Bouhallab *et al.*, 1999 ; Morgan *et al.*, 1999 b, c), et par étude de leur sensibilité à l'hydrolyse pepsique (Morgan *et al.*, 1999 a-c). La comparaison entre la lactosylation en milieu "sec" et la lactosylation en milieu aqueux montre que l'absence d'eau diminue la dénaturation structurale de la BLG (Morgan *et al.*, 1999 a-c).

C - Organisation du mémoire

A la suite de cette introduction, le mémoire est organisé en trois chapitres :

Chapitre 1 : Préparation et caractérisation des protéines modifiées

Chapitre 2 : Etude des propriétés techno-fonctionnelles des protéines modifiées

Chapitre 3 : Etude des propriétés biologiques des protéines modifiées

CHAPITRE 1 :

PREPARATION ET CARACTERISATION DES PROTEINES MODIFIEES

Une partie des travaux présentés dans ce chapitre a fait l'objet de publications :

Chevalier F., Chobert J.-M., Dalgalarondo M., Haertlé T. (2001a) Characterization of the Maillard reaction products of β -lactoglobulin glucosylated in mild conditions. *Journal of Food Biochemistry* 25, 33-55.

Chevalier F., Chobert J.-M., Mollé D., Haertlé T. (2001b) Maillard glycation of β -lactoglobulin with several sugars: comparative study of the properties of the obtained polymers and of the substituted sites. *Le Lait* 81 (5), 651-666.

Chevalier F., Chobert J.-M., Dalgalarondo M., Choiset Y., Haertlé T. (2002) Maillard glycation of β -lactoglobulin induces conformation changes. *Nahrung* 46 (2), *Accepted*.

A - Introduction

1 - Choix de la méthodologie de modification

Pour modifier la BLG par la réaction de Maillard, une température de chauffage de 60°C a été choisie afin de limiter les phénomènes de dénaturation et d'agrégation rencontrés à partir de 65°C (Qi *et al.*, 1995).

2 - Caractérisation physico-chimique

Lors de la caractérisation physico-chimique des composés modifiés, deux facteurs ont principalement été étudiés :

- l'influence du temps de chauffage ;

- l'influence de la nature du sucre utilisé.

- L'influence du temps de chauffage sur l'évolution de la réaction de Maillard a été suivie en réalisant une cinétique de glycation de la BLG avec le glucose. Ces expériences visaient à déterminer la durée de chauffage permettant une modification modérée (environ 40% de modification) de la protéine par ce sucre. Cette durée a ensuite été utilisée pour étudier l'influence de la nature du sucre sur l'évolution de la réaction de Maillard.
- Les différents sucres utilisés pour étudier l'influence de leur nature chimique sur la modification de la BLG sont rencontrés fréquemment dans l'industrie agro-alimentaire. Nous avons en particulier choisi de travailler avec le lactose (sucre naturellement présent dans le lait), le glucose et le galactose (sucres composant le lactose). Le rhamnose, l'arabinose et le ribose ont été choisis pour leur présence dans de nombreux aliments. En outre, leur masse moléculaire plus faible et leur structure chimique différente de celles des hexoses communs, comme le glucose ou le galactose, a permis d'étudier l'effet de ces facteurs sur l'avancée de la réaction de Maillard.

La caractérisation physico-chimique des échantillons a été effectuée par :

- la recherche de l'apparition de composés colorés ;
- l'estimation du taux de modification ;
- la mise en évidence de la modification du point isoélectrique et de la sensibilité à l'hydrolyse trypsique.

3 - Caractérisation structurale

Une caractérisation structurale de la BLG modifiée par la réaction de Maillard a été réalisée par :

- identification des acides aminés modifiés (composition en acides aminés, analyse des hydrolysats trypsiques par spectrométrie de masse) ;
- dichroïsme circulaire ;
- microcalorimétrie ;
- mise en évidence de la modification de la sensibilité à l'hydrolyse pepsique.

4 - Caractérisation des polymères

La formation de polymères et la nature de leurs interactions ont été analysées par :

- électrophorèse en présence de SDS ;
- chromatographie de filtration sur gel.

Ces différentes étapes de caractérisation des échantillons modifiés (par le glucose en étude cinétique ou par les différents autres sucres pendant un temps déterminé) ont permis de mieux comprendre les mécanismes intervenant lors de la modification des propriétés technofonctionnelles (Chapitre 2) et biologiques (Chapitre 3).

B - Matériel et Méthodes

1 - Modification de la BLG, préparation des échantillons

La BLG variant A a été purifiée à partir du lait frais provenant de vaches homozygotes (Ferme expérimentale de l'INRA de Rennes) par la méthode de Maillart et Ribadeau Dumas (1988).

Les conditions de modification choisies ont été les suivantes :

- tampon phosphate 0,1 M de pH 6,5 (pH proche de la neutralité) ;
- concentration en BLG = 4 g/l ;
- rapport molaire protéine/sucre = 1/1000 (large excès de sucre).

Deux séries de modification ont été réalisées :

- cinétique de glycation avec le glucose ;
- glycation avec différents sucres.

1.1 - Cinétique de glycation avec le glucose

La BLG (0,217 mM ou 4 g/l) et le glucose (0,217 M) ont été dissous dans un tampon phosphate 0,1 M de pH 6,5. Après stérilisation sur un filtre d'acétate de cellulose de 0,2 μ m de diamètre des pores (Millipore), le mélange de BLG et de glucose a été placé dans un flacon hermétique avant le chauffage dans un bain-marie à 60°C pendant différentes périodes (0 à 264 h).

Toutes les manipulations ont été réalisées dans des conditions stériles et anaérobies, les solutions étant saturées avec de l'azote. A différents intervalles de temps, des fractions aliquotes ont été prélevées, dialysées contre de l'eau distillée, lyophilisées et les poudres ont été conservées à -20°C.

Remarque : un prélèvement de chaque échantillon a été effectué avant dialyse pour permettre l'étude du spectre d'absorption.

1.2 - Glycation avec différents sucres

La BLG (0,217 mM ou 4 g/l) et les différents sucres (0,217 M) ont été dissous dans un tampon phosphate 0,1 M de pH 6,5. Après stérilisation sur un filtre d'acétate de cellulose de 0,2 µm (Millipore), la solution de BLG et de sucre a été placée dans un flacon hermétique avant le chauffage dans un bain-marie à 60°C pendant 72 heures.

Toutes les manipulations ont été réalisées dans des conditions stériles et anaérobies, les solutions étant saturées avec de l'azote. Après le chauffage, les échantillons ont été dialysés contre de l'eau distillée, lyophilisés et conservés à -20°C.

Remarque : un prélèvement de chaque échantillon a été effectué avant dialyse pour permettre l'étude du spectre d'absorption.

La BLG non chauffée est appelée « BLG native ».

La BLG chauffée sans sucre est appelée « BLG chauffée ».

La BLG chauffée en présence de sucres est appelée « BLG-sucre ». Par exemple, lors de la modification par le lactose, l'échantillon est appelé « BLG-lactose ».

2 - Caractérisation physico-chimique

2.1 - Spectres d'absorption

Des spectres d'absorption ont été réalisés avec la BLG native, chauffée ou modifiée par les différents sucres. Le milieu réactionnel a été dilué au 1/10 (V/V) dans un tampon phosphate 0,1 M de pH 6,5. L'analyse a été réalisée entre 220 et 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre CARY 1/3 UV-Visible (Varian-Australia) avant la dialyse des solutions. Une solution de glucose (0,217 M) a été analysée dans les mêmes conditions.

2.2 - Dosage OPA

La quantité de groupes aminés libres a été estimée par la méthode utilisant l'orthophthaldialdéhyde (OPA), modifiée d'après Frister *et al.* (1988). Le réactif OPA était préparé extemporanément en mélangeant 40 mg d'OPA (préalablement dissous dans 1 ml de méthanol), 50 ml de tampon borate de sodium 0,1 M de pH 9,3, 100 mg de chlorure de N-diméthyl-2-mercaptoéthylammonium (DMMAC) et 1,25 ml de SDS 20% (P/V).

Le test était réalisé en mélangeant 50 µl de solution de protéines (à une concentration de 2 g/l dans un tampon phosphate 50 mM, de pH 7,8) avec 1 ml de réactif OPA.

L'absorption était lue à 340 nm après un délai minimum de 5 minutes. Une courbe de calibrage a été réalisée en utilisant de la leucine (0,25 à 2 mM) comme standard.

2.3 - Composition en acides aminés

La BLG native, chauffée ou modifiée par les sucres, a été hydrolysée avec de l'HCl 6 N (Pierce) pendant 24 heures à 110°C dans une station Pico-Tag (Waters). Les acides aminés ont ensuite été dérivés avec du phénylthiocyanate (PITC) d'après Bidlingmeyer *et al.* (1984) puis quantifiés par HPLC en phase inversée sur une colonne Pico-Tag C₁₈ (3,9 mm x 15 cm, Waters) d'après Dalgalarondo *et al.* (1990).

2.4 - Isoélectrofocalisation

L'isoélectrofocalisation (IEF) a été réalisée sur un gel prêt à l'emploi en utilisant une gamme de points isoélectriques allant de 3 à 6 (Servalyt Precotes).

Le gel était placé sur un support réfrigéré à 4°C. Les protéines dissoutes dans de l'eau distillée ont été déposées (20 µg) sur un papier buvard placé à la surface du gel.

- La cathode était mise en contact avec un papier imbibé de solutions d'arginine et de lysine, respectivement à 0,22 et 0,18 g pour 50 ml d'eau distillée.
- L'anode était mise en contact avec un papier imbibé de solution d'acide aspartique et d'acide glutamique, respectivement à 0,17 et 0,18 g pour 50 ml d'eau distillée.

La migration était effectuée à une puissance et une intensité constantes, respectivement de 9 W et 40 mA, et à un voltage maximum de 2000 V. Après 3 heures de migration, le gel était fixé dans une solution d'acide trichloracétique (20%, P/V) et coloré avec du Serva Blue W (Serva).

2.5 - Hydrolyse trypsique et analyse par HPLC

2.5.1 - Cinétique de modification de la BLG par le glucose

La BLG native ou modifiée par le glucose (1 mg/ml) a été dissoute dans un tampon Tris-HCl 0,1 M de pH 8. La trypsine, dissoute dans de l'HCl 10 mM, a été ajoutée au milieu réactionnel

avec un rapport enzyme/substrat (E/S) de 3% (P/P). Le mélange était incubé à 37°C pendant 24 heures. La réaction était stoppée par l'ajout d'HCl 0,5 N.

Les peptides tryptiques ont été séparés par HPLC en phase inversée sur une colonne Nucleosil 300-5 C₁₈ (4 mm x 250 mm) équilibrée avec du solvant A (0,115% TFA). L'éluion était réalisée à l'aide du gradient présenté dans le tableau 4.

Temps (min)	Solvant A (%)	Solvant B (%)
	0,115% TFA, 99,885% H ₂ O	80% acétonitrile, 19,9% H ₂ O, 0,1% TFA
0	100	0
9	83	17
45	62.5	37.5
52	55	45
62	25	75
65	0	100
66	100	0

Tableau 4 : Gradient d'éluion utilisé pour la séparation par HPLC en phase inversée des peptides issus de l'hydrolyse par la trypsine de la BLG native ou modifiée par le glucose au cours d'une cinétique.

La température de la colonne était maintenue à 60°C, le débit de la colonne était de 0,6 ml/min. La détection des peptides était réalisée à 214 et 280 nm.

2.5.2 - BLG modifiée par les différents sucres

La BLG native, chauffée ou modifiée par les différents sucres a été solubilisée (1 mg/ml) dans un tampon Tris-HCl 0,1 M de pH 8. La trypsine, solubilisée dans de l'HCl 10 mM (1 mg/ml), a été ajoutée au milieu réactionnel avec un rapport enzyme/substrat (E/S) de 0,5/100 (P/P). Le mélange était incubé à 37°C pendant 24 heures. La réaction était stoppée par l'ajout d'HCl 0,5 N.

Les peptides tryptiques ont été séparés sur une colonne Symmetry 300A C₁₈ (3,9 mm x 150 mm, Waters, USA), équilibrée avec 90% de solvant A (0,115% TFA) et 10% de solvant B (80% acétonitrile - 19,9% H₂O - 0,1% TFA). L'éluion était réalisée à l'aide du gradient présenté dans le tableau 5.

La température de la colonne et des solvants était maintenue à 30°C. Le débit était de 0,6 ml/min. Les pics ont été détectés à 214 nm et analysés par ESI-MS.

Temps (min)	Solvant A (%)	Solvant B (%)
	0,115% TFA, 99,885% H ₂ O	80% acétonitrile, 19,9% H ₂ O, 0,1% TFA
0	100	0
3	75	25
30	45	55
33	0	100
34	100	0

Tableau 5 : Gradient d'éluion utilisé pour la séparation par HPLC en phase inversée des peptides issus de l'hydrolyse par la trypsine de la BLG native ou modifiée par les différents sucres.

2.6 - Electrospray ionization - mass spectrometry (ESI-MS)

Les peptides tryptiques (voir paragraphe 2.5.2) ont été identifiés par RP-HPLC couplée à l'ESI-MS avec un spectrophotomètre de masse Perkin-Elmer Sciex (Thornhill, Ontario, Canada), Model API III⁺. Les peptides tryptiques ont été séparés par RP-HPLC sur une colonne Symmetry C₁₈ (2,1 mm x 150 mm, Waters, Milford, MA, USA) avec un débit de 0,25 ml/min. La détection des ions était effectuée en mode positif, la masse moléculaire était déterminée à partir du rapport masse/charge (m/z) avec le logiciel Biomultiview 1,2 (Software package Sciex).

3 - Caractérisation structurale

3.1 - Dichroïsme circulaire

Les spectres de dichroïsme circulaire ont été réalisés en utilisant un dichrographe Jobin Yvon CD 6 équipé d'une unité de lecture thermostatée. La cellule cylindrique utilisée a un trajet optique de 0,01 cm dans la région UV-lointain (185-260 nm) et de 1 cm dans la région UV-proche (250-320 nm). Une moyenne de cinq passages a été effectuée dans la région UV-

lointain, un seul passage a été effectué dans la région UV-proche. Tous les spectres ont été acquis à 25°C avec une concentration en protéines de 2 mg/ml dans un tampon glycine-HCl 10 mM de pH 2,5. La ligne de base correspondant au spectre du tampon seul a été soustraite de chaque spectre et les résultats ont été convertis en ellipticité molaire (Θ). La méthode de Provencher et Glockner (1981) a été utilisée pour estimer la quantité d'hélices α et de feuillets β de la BLG native ou chauffée.

3.2 - Microcalorimétrie

Les mesures de microcalorimétrie ont été réalisées à l'aide d'un microcalorimètre à balayage différentiel de haute sensibilité (MCS System, Microcal) dans une gamme de températures allant de 5 à 110°C. Les expériences ont été effectuées à une vitesse de 1 K/min et à une pression de 1,2 Atm.

Les échantillons étaient dissous à une concentration de 2 mg/ml dans un tampon Glycine-HCl 10 mM de pH 2,5.

3.3 - Hydrolyse pepsique

La BLG était dissoute à une concentration de 2 mg/ml dans un tampon Glycine-HCl 10 mM de pH 2,5. La pepsine porcine (Sigma), préalablement solubilisée dans de l'eau distillée (1 mg/ml), a été ajoutée au milieu réactionnel dans un rapport molaire E/S de 1/100. Le mélange était incubé à 37°C et, à différents temps, la réaction était arrêtée par l'addition du même volume de tampon Tris-HCl 2 M, de pH 8. L'hydrolysate était conservé à 4°C en attendant l'analyse HPLC.

Les peptides issus de l'hydrolyse pepsique ont été séparés sur une colonne Symmetry 300A C₁₈ (3,9 mm x 150 mm, Waters, USA), équilibrée avec 80% de solvant A (0,11% TFA) et 20% de solvant B (80% acétonitrile - 19,91% H₂O - 0,09% TFA). L'élution était réalisée à l'aide du gradient présenté dans le tableau 6.

La température de la colonne était maintenue à 30°C. Le débit était de 0,6 ml/min. Les pics ont été détectés à 214 nm. L'aire du pic correspondant à la forme non hydrolysée de la protéine a été calculée pour chaque échantillon. Tous les résultats sont rapportés à l'aire du pic de la protéine non hydrolysée qui correspond à 100%.

Temps (min)	Solvant A (%)	Solvant B (%)
	0,11% TFA, 99,89% H ₂ O	80% acétonitrile, 19,91% H ₂ O, 0,09% TFA
0	80	20
28	0	100
29	80	20

Tableau 6 : Gradient d'éluion utilisé pour la séparation par HPLC en phase inversée des peptides issus de l'hydrolyse par la pepsine de la BLG native ou modifiée par les différents sucres.

4 - Comportement vis-à-vis de l'association – polymérisation

4.1 - Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de tricine et de SDS

L'électrophorèse Tricine-SDS a été réalisée avec l'appareil « Mini Protean II gel electrophoresis » (Bio-Rad, USA) selon la méthode de Schägger and von Jagow (1987).

La composition des gels et des tampons est présentée sur les tableaux 7 à 13.

H ₂ O	3,25 ml
Acrylamide 38%, bis-acrylamide 2% (P/V)	0,50 ml
Tris 3M – SDS 0,3% (P/V) pH 8,45	1,25 ml
TEMED	5 µl
Persulfate d'ammonium 10% (P/V)	50 µl

Tableau 7 : Gel de concentration à 4% (P/V) en acrylamide.

H ₂ O	2,80 ml
Acrylamide 38%, bis-acrylamide 2% (P/V)	2,50 ml
Tris 3M – SDS 0,3% (P/V) pH 8,45	3,35 ml
Glycérol	1,35 ml
TEMED	10 µl
Persulfate d'ammonium 10% (P/V)	100 µl

Tableau 8 : Gel de séparation à 10% (P/V) en acrylamide.

Tris-HCl, pH 8,9	0,2 M
------------------	-------

Tableau 9 : Tampon de migration à l'anode.

Tris-HCl, pH 8,25	0,1 M
Tricine	0,1 M
SDS	0,1% (P/V)

Tableau 10 : Tampon de migration à la cathode.

Les échantillons de protéines étaient solubilisés dans de l'eau distillée à une concentration de 2 mg/ml puis dilués volume à volume avec le tampon de charge (Tab. 11). 10 µl de chaque échantillon ont ensuite été déposés dans des puits formés dans le gel de concentration (Tab. 7), puis la séparation s'effectuait à un voltage constant (30 V dans le gel de concentration et 60 V dans le gel de séparation ; Tab. 8) grâce aux tampons de migration (Tab. 9 et 10).

Tris-HCl, pH 6,8	0,1 M
SDS	8% (P/V)
Glycérol	24% (V/V)
bleu de bromophénol	Traces
β-mercaptoéthanol	4% (V/V)

Tableau 11 : Tampon de charge 2X.

Après migration, le gel d'acrylamide à 10% était coloré avec le tampon de coloration (Tab. 12), décoloré (Tab. 13) puis analysé.

Bleu de Coomassie R250	0,2% (P/V)
Ethanol	30% (V/V)
Acide acétique	5% (V/V)
H ₂ O	qsp 100%

Tableau 12 : Tampon de coloration.

Ethanol	30% (V/V)
Acide acétique	5% (V/V)
H ₂ O	qsp 100%

Tableau 13 : Tampon de décoloration.

4.2 - Chromatographie de filtration sur gel

La BLG native, chauffée ou modifiée par les sucres, était solubilisée à une concentration de 5 mg/ml dans un tampon Tris-HCl 0,1 M de pH 8 contenant 0,5 M de NaCl (tampon d'élution). Chaque échantillon, préalablement filtré sur une membrane de 0,22 µm de diamètre des pores (afin d'éliminer les agrégats insolubles), était injecté sur une colonne de filtration sur gel

Superdex 75 (domaine de séparation de 3 à 70 kDa) équilibrée avec du tampon d'éluion à un débit de 0,5 ml/min. La chromatographie était contrôlée par le système HPLC (BIOcad SPRINT System, Perkin-Elmer, USA) couplé à un logiciel BIOcad software (version 2.06).

Des fractions de 2 ml ont été collectées et l'absorption à 214 et 218 nm a été mesurée durant l'éluion de chaque échantillon. La masse moléculaire de chaque échantillon a été calculée par rapport au temps d'éluion de protéines standards commerciales (Gel Filtration Calibration Kit, Pharmacia, Sweden).

4.3 - Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE)

Les électrophorèses en présence de SDS ont été réalisées avec l'appareil « Mini Protean II gel electrophoresis » (Bio-Rad, USA) d'après la méthode de Laemmli (1970) en utilisant un gel à 12% d'acrylamide. La composition des gels et des tampons est présentée sur les tableaux 14 à 18.

Les échantillons de protéines ont été solubilisés dans de l'eau distillée à une concentration de 2 mg/ml puis dilués volume à volume avec le tampon de charge sans β -mercaptoéthanol (Tab. 18) ou avec β -mercaptoéthanol (Tab. 17). 10 μ l de chaque échantillon ont ensuite été déposés dans des puits formés dans le gel de concentration (Tab. 14), puis la séparation s'effectuait à intensité constante (10 mA dans le gel de concentration et 15 mA dans le gel de séparation ; Tab. 15) grâce au tampon de migration (Tab. 16).

	2 Plaques	1 Plaque
Acrylamide 38%, bis-acrylamide 2% (P/V)	0,4 ml	0,2 ml
Tris-HCl 0,5M, pH 6,8	0,6 ml	0,3 ml
SDS 10 % (P/V)	50 μ l	25 μ l
H ₂ O	4 ml	2 ml
TEMED	5 μ l	4 μ l
Persulfate d'ammonium 10% (P/V)	50 μ l	25 μ l

Tableau 14 : Gel de concentration à 4 % (P/V) de polyacrylamide.

Préparation et caractérisation des protéines modifiées

	2 Plaques	1 Plaque
Acrylamide 38%, bis-acrylamide 2% (P/V)	2,4 ml	1,2 ml
Tris-HCl 2M, pH 8,8	1,6 ml	0,8 ml
H ₂ O	4 ml	2 ml
SDS 10% (P/V)	80 µl	40 µl
TEMED	8 µl	5 µl
Persulfate d'ammonium 10% (P/V)	70 µl	40 µl

Tableau 15 : Gel de séparation à 12 % (P/V) de polyacrylamide.

Tris	15 g
SDS	2,5 g
Glycine	72 g
H ₂ O	qsp 2,5 l
pH	8,3

Tableau 16 : Tampon de migration.

Tris-HCl 0,5M, pH 6,8	1,75 ml
Glycérol	2,00 ml
SDS 10% (P/V)	2,50 ml
β-mercaptoéthanol	0,50 ml
Bleu de bromophénol	traces
H ₂ O	3,75 ml

Tableau 17 : Tampon de charge 2X avec β-mercaptoéthanol.

Tris-HCl 0,5M, pH 6,8	1,75 ml
Glycérol	2,00 ml
SDS 10% (P/V)	2,50 ml
Bleu de bromophénol	traces
H ₂ O	4,25 ml

Tableau 18 : Tampon de charge 2X sans β-mercaptoéthanol.

Après migration, le gel était coloré au nitrate d'argent d'après Nesterenko *et al.* (1994) puis analysé.

C - Résultats

1 - Caractérisation physico-chimique

1.1- Influence du temps de chauffage

1.1.1 - Mise en évidence de composés colorés

La présence de composés colorés est la conséquence la plus évidente de la réaction de Maillard. Les composés issus de cette réaction sont couramment et traditionnellement identifiés et quantifiés par mesure de l'absorption à 420 nm (Ashoor et Zent, 1984).

La mesure spectrale de l'absorption entre 220 et 600 nm des solutions modifiées peut permettre une analyse globale des divers composés formés au cours de la réaction de Maillard. Cela permet aussi d'observer si la mesure à une longueur d'onde de 420 nm est correcte dans le cas du système BLG-glucose pour la quantification de composés colorés.

Les mesures ont été réalisées avec les échantillons suivants :

- la BLG chauffée seule à 60°C pendant 24, 48, 72, 96, 168 et 264 h (Fig. 11 A),
- le glucose non chauffé ou chauffé à 60°C pendant 264 h (Fig. 11 B),
- la BLG chauffée à 60°C en présence de glucose pendant les mêmes périodes que la BLG chauffée seule (Fig. 11 C).

La BLG native présente un spectre d'absorption caractéristique des protéines avec un maximum d'absorption à 280 nm, longueur d'onde correspondant à l'absorption des résidus d'acides aminés aromatiques. Au cours du chauffage (Fig. 11 A), l'absorption augmente progressivement entre 450 et 280 nm jusqu'à atteindre 0,1 unité de plus que la valeur obtenue avec la BLG native pour un chauffage de 264 heures. Lorsque la BLG est chauffée en présence de glucose (Fig. 11 C), le même phénomène se produit mais, cette fois-ci, deux épaulements à environ 330 et 370 nm (appelés « 1 » et « 2 ») sont clairement identifiés. Ces épaulements sont de plus en plus marqués au cours du chauffage.

D'après le spectre présenté sur la figure 11 C, la longueur d'onde à 420 nm ne semble pas caractéristique des composés colorés résultant du chauffage de la BLG en présence de glucose. Les différences les plus marquées sont plutôt observées pour les longueurs d'ondes inférieures à 400 nm.

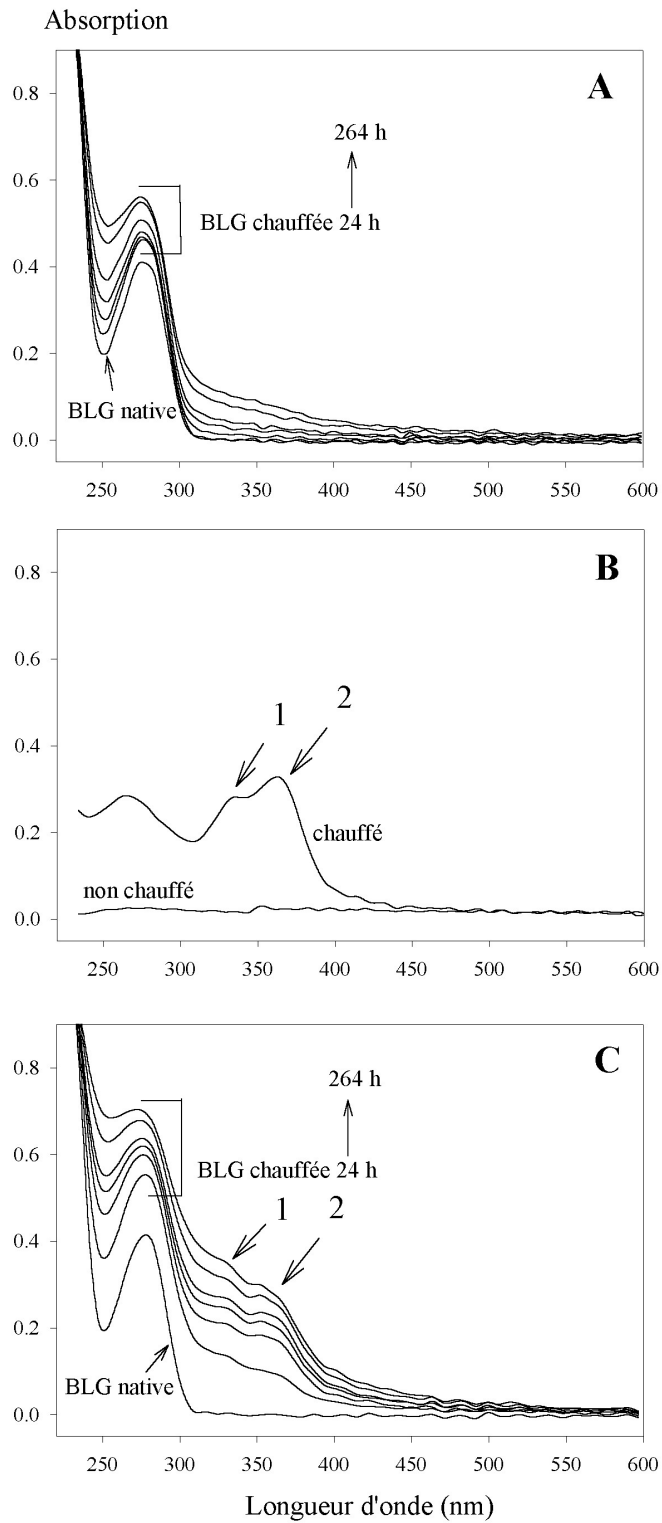


Figure 11 : Spectres d'absorption de la BLG chauffée sans glucose (A), du glucose chauffé ou non chauffé (B), et de la BLG chauffée avec du glucose (C) jusqu'à 264 heures. "1" et "2" sont des pics d'absorption apparaissant durant le chauffage en présence de glucose

Cependant, en comparant les spectres obtenus avec la BLG chauffée en présence de glucose à ceux du glucose chauffé en absence de protéine (Fig. 11 B), on s'aperçoit que ces deux épaulements sont situés aux mêmes longueurs d'ondes que deux des chromophores observés dans la solution de glucose chauffée (notés « 1 » et « 2 »).

Cela semble donc signifier qu'une part importante des chromophores observés lors de la glycation de la BLG par le glucose (Fig. 11 C) résulterait d'une réaction de condensation du glucose, indépendante de la réaction de Maillard.

Ces analyses spectrales montrent bien la complexité de l'étude des produits de la réaction de Maillard. Même dans un système relativement simple (comprenant une protéine et un sucre), de nombreux composés sont susceptibles d'être formés, issus de réactions variées, d'une part entre la protéine et le sucre, d'autre part entre les molécules de sucre ou bien encore entre les molécules de protéine.

1.1.2 - Estimation du taux de glycation

Deux techniques ont été utilisées pour estimer le taux de substitution des résidus lysyle de la BLG : le dosage OPA (qui dose les groupes NH_2) et la détermination de la composition en acides aminés (qui quantifie la plupart des acides aminés des protéines).

1.1.2.1 - Dosage OPA

La quantité de groupes NH_2 libres a été estimée pour les échantillons de BLG chauffée ou modifiée par le glucose à 60°C pendant différentes périodes (Fig. 12).

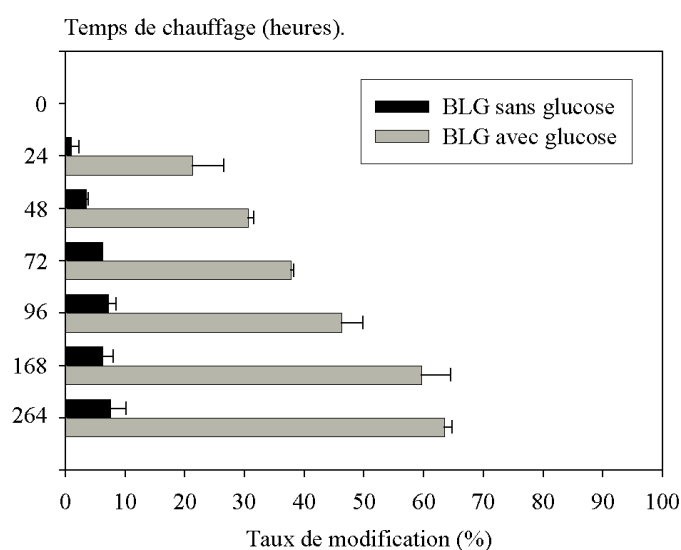


Figure 12 : Estimation par le dosage OPA du taux de modification de la BLG chauffée seule ou en présence de glucose.

Environ 80% des 16 groupes NH₂ (1 résidu N-terminal et 15 résidus lysyle) de la BLG native ont été détectés par le dosage OPA. Par définition, ce pourcentage correspond à un taux de modification de 0% ; tous les autres taux ont été calculés par rapport à ce pourcentage initial.

Après chauffage de la BLG en absence de sucre, une diminution du nombre de groupes NH₂ dosés apparaît au cours du temps. Il pourrait s'agir d'une modification de l'accessibilité des résidus NH₂ due au chauffage.

Après chauffage de la BLG en présence de glucose, une augmentation significative du taux de modification est observée dès 24 heures de chauffage, correspondant à environ 22% de modification. Il semble que ce taux se stabilise en fin de cinétique aux alentours de 65% de modification. Un taux moyen de glycation par le glucose (environ 38%) est atteint après 72 heures de chauffage à 60°C.

1.1.2.2 - Détermination de la composition en acides aminés

La composition en acides aminés permet de quantifier précisément les résidus lysyle non modifiés présents dans la BLG. Comme dans le cas du dosage OPA, cette technique a été utilisée avec les échantillons de BLG native, chauffée seule ou en présence de glucose, à 60°C, pendant différentes périodes (Fig. 13).

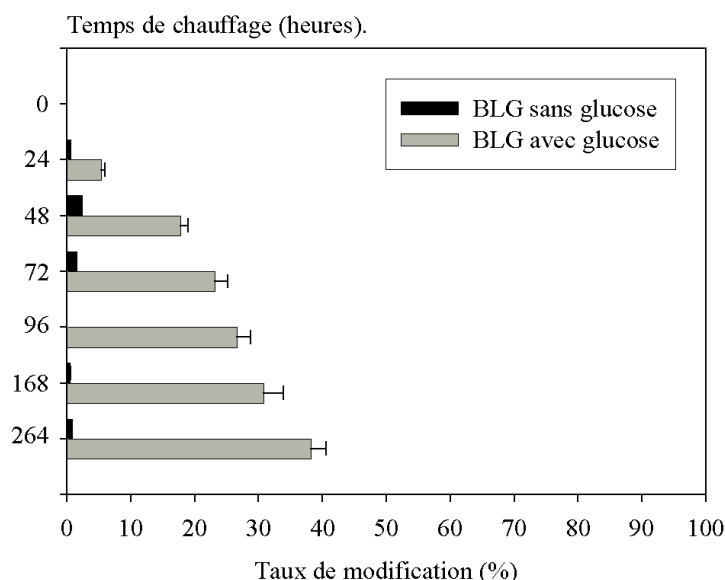


Figure 13 : Estimation par la détermination de la composition en lysine du taux de modification de la BLG chauffée seule ou avec du glucose.

En absence de traitement thermique, 100% des résidus lysyle (15 résidus) ont été détectés. Au cours du chauffage de la BLG en absence de sucre, aucune différence significative ne peut être observée.

Par contre, en présence de glucose, la quantité de résidus lysyle dosés diminue au cours du traitement thermique. Après 24 heures de chauffage, environ 5% des résidus lysyles sont modifiés ; après 264 heures, un taux de modification légèrement inférieur à 40% est obtenu. Ce taux de modification déterminé en fin de réaction est donc largement inférieur (environ 25% de moins) à celui mesuré en utilisant le dosage OPA.

La méthodologie utilisée pour le dosage des acides aminés peut expliquer cette différence. En effet, ce dosage nécessite une hydrolyse acide à 110°C afin de couper les liaisons peptidiques. Dans le cas des résidus lysyle ayant fixé un sucre, cette hydrolyse peut affecter la liaison entre le sucre et le résidu lysyle, conduisant à un résidu non-substitué. Ainsi, dans le cas de la BLG modifiée par le glucose pendant 264 heures, environ 25% des résidus lysyle substitués sembleraient avoir « perdu » le sucre fixé sur leur chaîne latérale lors de la réaction. Cela signifie aussi que 40% des résidus lysyle n'ont pas perdu le sucre fixé sur leur chaîne latérale. Ces résidus sont peut-être dans un stade plus avancé de la réaction de Maillard, avec une formule et une conformation très différentes de celles de l'acide aminé originel.

1.1.3 - Modification du point isoélectrique

La fixation d'un sucre sur la fonction amine primaire des protéines conduit à la formation de composés divers avec pour conséquence la perte de cette fonction. Les groupes NH_2 ont un pKa très alcalin (pKa du $\epsilon\text{-NH}_2$ des lysines = 10,0 ; pKa du NH_2 N-terminal = 8,0) ; leur perte conduit à une diminution du point isoélectrique (pI) de la protéine. Ce phénomène est d'autant plus marqué que la protéine est naturellement acide (pI = 5,1).

La diminution du pI étant proportionnelle au taux de modification de la protéine, l'analyse par isoélectrofocalisation des protéines modifiées par la réaction de Maillard permet d'évaluer la progression de cette réaction.

Les échantillons de BLG native ou modifiée en présence de glucose à 60°C pendant différentes périodes ont été analysés par isoélectrofocalisation dans une gamme de pH comprise entre 3 et 6 (Fig. 14).

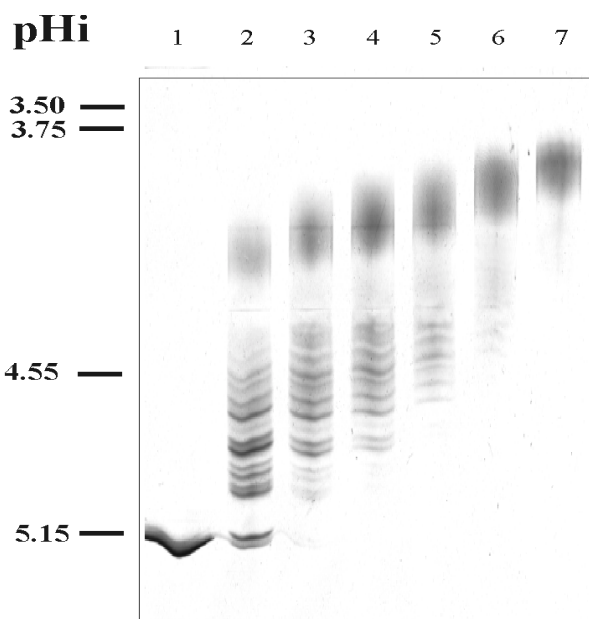


Figure 14 : Isoélectrofocalisation de la BLG native (1) ou chauffée en présence de glucose pendant 24 (2), 48 (3), 72 (4), 96 (5), 168 (6) et 264 heures (7) à 60°C.

Sur la piste 1, le pI de la BLG native est observé à environ 5,1.

Au cours de la modification, des bandes correspondant à des pI inférieurs apparaissent. La BLG modifiée pendant 24 heures semble être l'échantillon le plus hétérogène avec des pI variant de 5,1 à environ 4,2. Au cours du chauffage, le pI de l'échantillon est de moins en moins hétérogène et de plus en plus acide. Après 264 heures de modification, la protéine présente un pI assez homogène à environ 4,0.

1.1.4 - Modification de la sensibilité à l'hydrolyse trypsique

La trypsine est une enzyme protéolytique du pancréas qui hydrolyse les liaisons peptidiques Lys-X et Arg-X. La réaction de Maillard impliquant les résidus de lysine, une diminution de l'hydrolyse des protéines par la trypsine est caractéristique des protéines modifiées (Kato *et al.*, 1983 ; Darewicz *et al.*, 1998). Une estimation du taux de modification de cet acide aminé peut donc être réalisée après hydrolyse trypsique.

La BLG native ou modifiée par le glucose à 60°C pendant différentes périodes a été hydrolysée par la trypsine puis les hydrolysats ont été analysés par HPLC en phase inversée (Fig. 15).

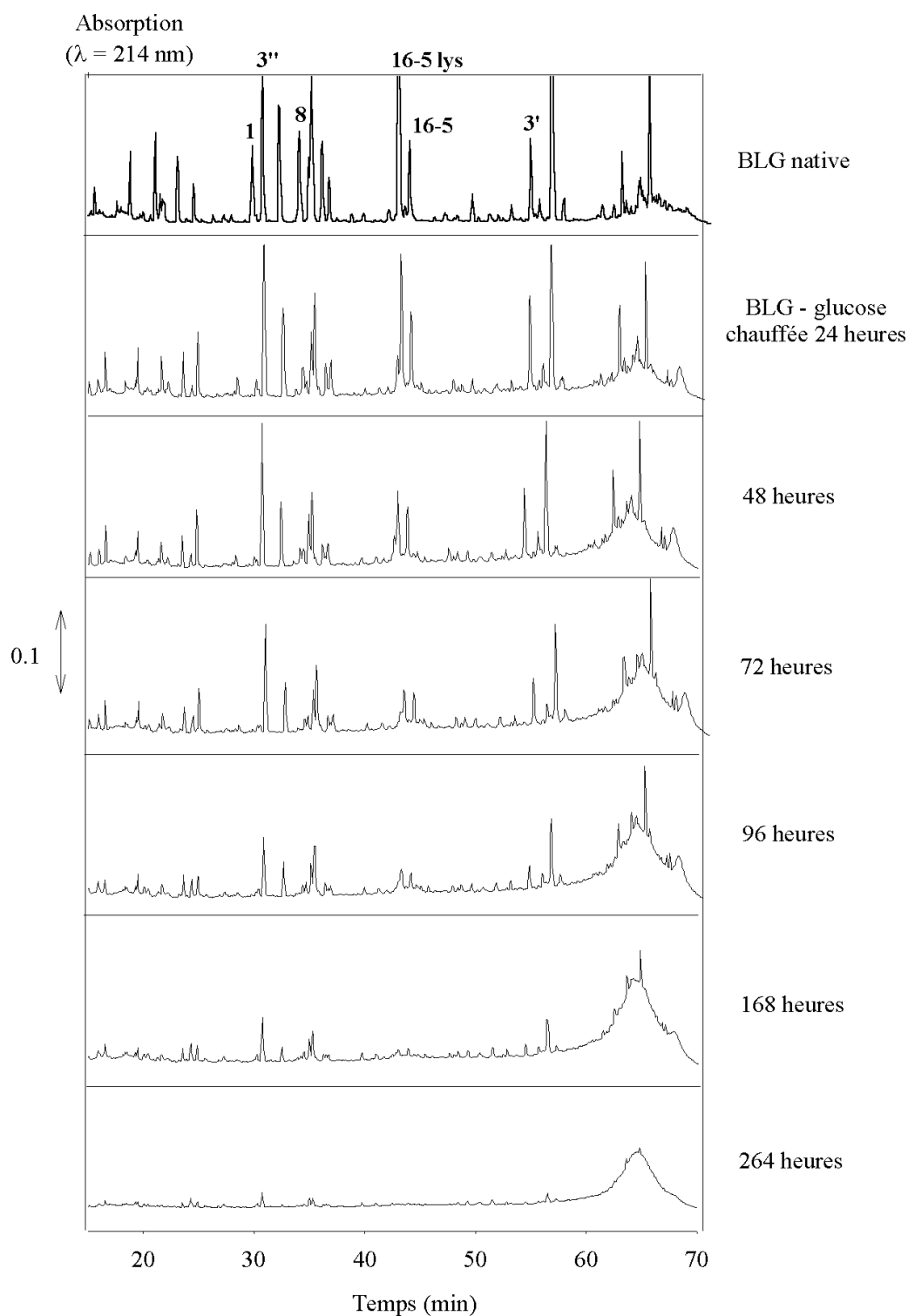


Figure 15 : Profil d'éluion par HPLC en phase inversée d'hydrolysats trypsiques de BLG native ou modifiée par le glucose pendant différentes périodes.

1 : Leu1-Lys8 ; 3' : Ser21-Arg40 ; 3'' : Val15-Tyr20 ; 8 : Ile78-Lys83 ;
16-5 : (Leu149-Ile162)S-S(Trp61-Lys69) ; 16-5lys : (Leu149-Ile162)S-S(Trp61-Lys70).

La BLG native hydrolysée par la trypsine présente un profil d'éluion caractéristique (Dalgalarondo *et al.*, 1990). Au cours de la modification de la BLG par le glucose, une diminution de la surface de chaque pic est observée, indiquant la modification progressive de certains sites de coupures de l'enzyme. Parallèlement à la diminution de l'aire des pics, le nombre de pics ayant un temps d'éluion supérieur à 60 minutes augmente, révélant la présence de peptides ou polypeptides très peu hydrolysés ayant une hydrophobie proche de celle de la BLG native. Après 264 heures de modification de la BLG par le glucose, une très faible quantité de peptides est observée sur le chromatogramme, avec une grande majorité de composés très peu ou non hydrolysés, ce qui traduit un fort taux de modification de la protéine. A partir des analyses de modification de la BLG avec le glucose pendant différentes périodes, une durée de chauffage de 72 heures a été sélectionnée pour effectuer les modifications de la BLG par d'autres sucres. Ce temps de chauffage en présence de glucose conduit à un taux de modification intermédiaire d'environ 40%, ce qui va permettre de tester l'influence de sucres potentiellement plus réactifs ou moins réactifs que le glucose.

1.2 - Influence du sucre utilisé

Six sucres ont été utilisés pour modifier la BLG par la réaction de Maillard dans les mêmes conditions de pH, températures, concentrations, rapport protéine/sucre, et pour une durée de chauffage de 72 heures.

1.2.1 - Mise en évidence de composés colorés

Comme pour la BLG modifiée par le glucose pendant différentes périodes, les échantillons de BLG modifiée par différents sucres à 60°C pendant 72 heures ont été analysés par spectrométrie d'absorption entre 220 et 600 nm (Fig. 16).

La BLG native et la BLG chauffée présentent quasiment le même spectre, avec un maximum à 280 nm et un minimum à 250 nm.

Le spectre d'absorption de la BLG modifiée par le rhamnose (Fig. 16 **B**), le glucose ou le galactose (Fig. 16 **C**) présente un épaulement à environ 330 nm tout à fait identique à celui observé lors de la modification de la BLG par le glucose pendant différentes périodes (Fig. 11 **C**). Cet épaulement est beaucoup moins marqué sur le spectre de BLG modifiée par le lactose, révélant certainement un taux de modification plus faible.

Sur les spectres d'absorption de la BLG modifiée par le ribose ou l'arabinose (Fig. 16 **B**), l'épaulement à environ 330 nm est beaucoup plus important. Sur ces spectres, une

augmentation de l'absorption à toutes les longueurs d'ondes étudiées (220-600 nm) est observée, révélant la présence de nombreux composés colorés. Ces deux derniers sucres semblent donc beaucoup plus réactifs que les autres.

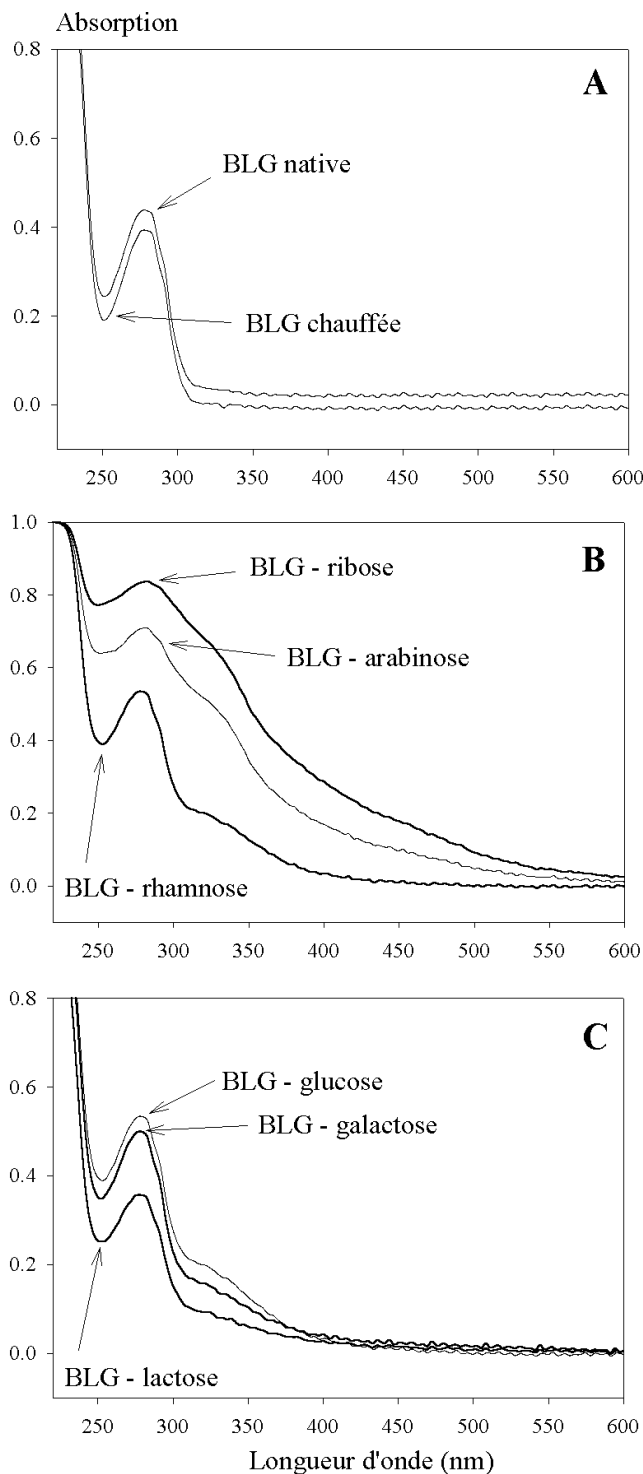


Figure 16 : Spectres d'absorption de la BLG native ou chauffée 3 jours à 60°C (A), chauffée en présence de ribose ou de rhamnose (B), et chauffée en présence de glucose, de galactose ou de lactose (C).

1.2.2 - Estimation du taux de glycation

Le taux de modification de la BLG modifiée par les différents sucres à 60°C pendant 72 heures a été estimé par le dosage des groupes NH₂ selon la méthode OPA (Fig. 17).

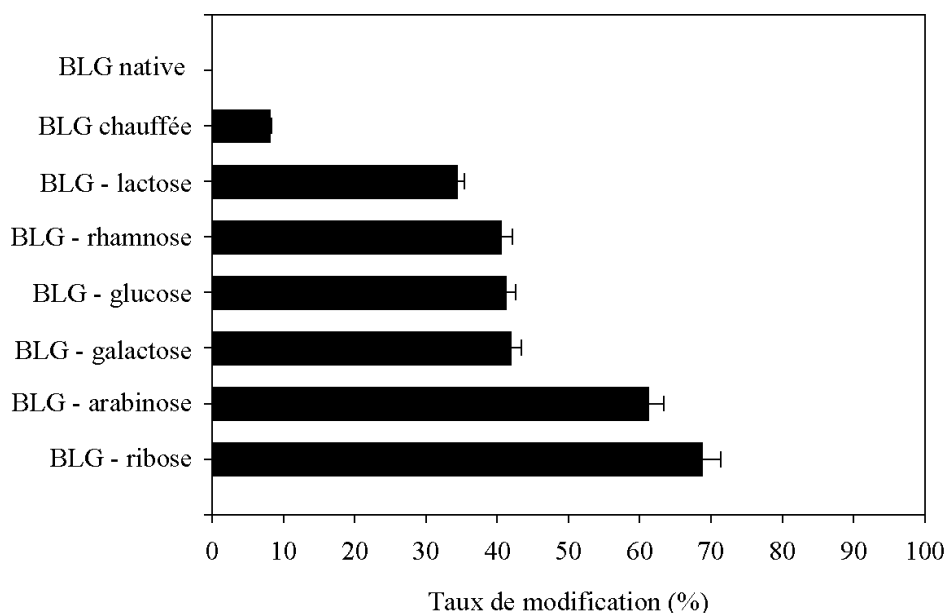


Figure 17 : Estimation par la méthode OPA du taux de modification de la BLG chauffée pendant 3 jours à 60°C en présence de différents sucres.

Comme cela a été observé lors du dosage des groupes NH₂ de la BLG modifiée par le glucose pendant différentes périodes, la BLG chauffée semble présenter un taux de modification d'environ 10%. Comme cette protéine a été chauffée en absence de sucre, ce taux mesuré est un artéfact dû certainement à une modification structurale de la protéine lors du chauffage, conduisant au masquage de certaines fonctions amines primaires.

Lorsque la protéine est chauffée en présence de sucre, des taux de modification différents sont obtenus en fonction du sucre utilisé. La BLG modifiée par le glucose, le galactose ou le rhamnose présente un taux de modification d'environ 40%. En présence de lactose, le taux de modification de la BLG est d'environ 35%. L'arabinose et le ribose induisent la modification la plus importante de la BLG avec des taux de glycation respectifs d'environ 60 et 68%.

Ces résultats confirment les observations effectuées à partir des spectres d'absorption. Le lactose est le sucre qui induit le plus faible taux de modification, alors que l'arabinose et surtout le ribose sont les sucres les plus réactifs.

A partir de ce dosage, il est possible de classer les sucres étudiés par ordre de réactivité :

lactose < rhamnose \approx glucose \approx galactose < arabinose < ribose.

Le taux de modification est en relation directe avec la masse moléculaire et la taille du sucre : plus la molécule a une chaîne carbonée courte, plus elle a tendance à se transformer de la forme cyclique à la forme linéaire et donc plus elle est réactive aux fonctions amines primaires des protéines.

1.2.3 - Modification du point isoélectrique

Afin d'évaluer la modification du point isoélectrique des protéines modifiées par les différents sucres, une isoélectrofocalisation a été réalisée avec la BLG native, chauffée seule ou en présence d'arabinose, de galactose, de glucose, de lactose, de rhamnose ou de ribose pendant 72 heures à 60°C (Fig. 18).

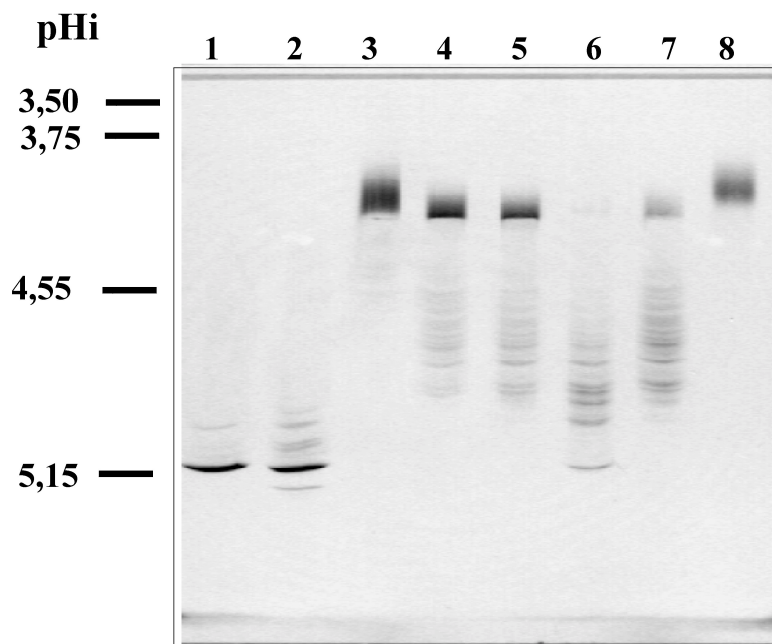


Figure 18 : Isoélectrofocalisation de la BLG native (1), chauffée seule (2), ou en présence d'arabinose (3), de galactose (4), de glucose (5), de lactose (6), de rhamnose (7) ou de ribose (8) pendant 72 heures à 60°C.

La BLG native et la BLG chauffée seule (respectivement pistes 1 et 2) présentent une bande majoritaire pour un pI d'environ 5,15 correspondant à la protéine non modifiée.

Dans le cas de la BLG modifiée par le lactose, seule une légère bande correspondant à ce pI subsiste alors que de nombreuses bandes sont visibles à des pI inférieurs.

Les protéines modifiées par le glucose, le galactose ou le rhamnose présentent un profil électrophorétique quasi-identique avec un pI très hétérogène ; la bande correspondant au pI de la BLG native a disparu. Une bande de plus forte intensité apparaît à un pI d'environ 4.

La BLG modifiée par l'arabinose ou le ribose présente un profil électrophorétique assez homogène avec une bande principale correspondant à un pI d'environ 4.

Comme lors de l'étude de la glycation de la BLG par le glucose en fonction du temps de chauffage, plus la protéine est modifiée, plus son pI devient homogène.

2 - Caractérisation structurale

2.1 - Modification des acides aminés

2.1.1 - Détermination de la composition en acides aminés

Dans le cas des protéines, la réaction de Maillard se produit principalement au niveau des groupes amines primaires des chaînes latérales des résidus lysyle (Hurrel et Carpenter, 1977a). Afin d'évaluer s'il existe d'autres acides aminés modifiés lors de la réaction de Maillard, et dans quelle proportion, une composition en acides aminés a été déterminée sur les échantillons de BLG native ou modifiée par le glucose pendant différentes périodes.

Les résultats sont présentés dans le tableau 19.

Acide aminé	BLG native	Valeurs théoriques	Quantité d'acides aminés modifiés (Différence entre la BLG chauffée et la BLG glucosylée)											
			24 h		48 h		72 h		96 h		168 h		264 h	
ASX	11.52	16	1.25	+/-2.94	1.41	+/-1.68	3.40	+/-2.24	1.26	+/-1.2	3.63	+/-2.23	2.03	+/-1.17
GLX	23.48	25	0.53	+/-1.8	2.26	+/-1.71	4.17	+/-3.28	0.54	+/-1.39	4.71	+/-1.91	2.08	+/-1.36
SER	7.76	7	0.12	+/-0.15	0.33	+/-0.01	0.54	+/-0.14	0.03	+/-0.42	0.63	+/-0.28	0.45	+/-0.41
GLY	3.85	3	0.05	+/-0	0.09	+/-0.25	0.13	+/-0.24	0	+/-0.12	0.12	+/-0.13	0.16	+/-0.08
HIS	2.10	2	0.14	+/-0.03	0.34	+/-0.13	0.39	+/-0.29	0.55	+/-0.03	0.63	+/-0.45	0.91	+/-0.29
ARG	3.20	3	0.36	+/-0.27	0.7	+/-0.04	0.9	+/-0.01	1.15	+/-0.21	1.3	+/-0.25	1.43	+/-0.18
THR	8.76	8	0	+/-0.32	0	+/-0.03	0.44	+/-0.41	0	+/-0.4	0.2	+/-0.2	0.43	+/-0.37
ALA	13.48	14	0	+/-0.38	0	+/-0	0	+/-0.32	0	+/-0.29	0	+/-0.06	0	+/-0.28
PRO	9.47	8	0	+/-0.13	0	+/-0.4	0.16	+/-0.21	0.13	+/-0.06	0.16	+/-0.58	0.19	+/-0.03
TYR	3.63	4	0.56	+/-0.08	0.88	+/-0.35	0.97	+/-0.28	1.08	+/-0.19	1.14	+/-0.44	1.32	+/-0.16
VAL	10.34	10	0.36	+/-0.02	0.38	+/-0.35	0.39	+/-0.14	0.31	+/-0.25	0.19	+/-0.18	0.02	+/-0.28
MET	4.57	4	0.23	+/-0.21	0.21	+/-0.04	0.32	+/-0.12	0.66	+/-0.12	0.56	+/-0.18	0.55	+/-0.08
ILE	10.61	10	0.22	+/-0.28	0	+/-1.3	0.61	+/-0.1	0	+/-0.33	0.35	+/-0.32	0	+/-0.3
LEU	20.69	22	0.42	+/-0.05	0.6	+/-0.93	0.09	+/-0.37	0.77	+/-0.13	0.3	+/-0.52	0.95	+/-0.1
PHE	4.38	4	0.06	+/-0.02	0.15	+/-0.01	0.14	+/-0.08	0.14	+/-0.09	0.06	+/-0.22	0.11	+/-0.06
LYS	15.19	15	2.14	+/-0.41	3.3	+/-0.01	4.02	+/-0.23	4.52	+/-0.17	5.84	+/-0.52	7.10	+/-0.13

Tableau 19 : Analyse des acides aminés de la BLG modifiée par le glucose pendant différentes périodes (de 24 à 264 heures).

La quantité d'acides aminés modifiés est obtenue en soustrayant la quantité d'acides aminés obtenue pour la BLG chauffée à la quantité d'acides aminés obtenue pour la BLG modifiée par le glucose pour un même temps de chauffage.

Ces résultats montrent que quatre acides aminés disparaissent progressivement au cours du chauffage.

Après 264 heures de chauffage à 60°C en présence de glucose,

- 7,1 lysines sur 15,
- 1,32 tyrosine sur 4,
- 1,43 arginine sur 3,
- 0,91 histidine sur 2 sont modifiées en moyenne.

Bien que cette technique ne permette d'observer qu'une partie de la quantité d'acides aminés modifiés (cf 1.1.2.2), il semble bien que d'autres acides aminés que la lysine soient modifiés lors de la réaction de Maillard entre le glucose et la BLG. Cependant, il est difficile de mettre en évidence si ces acides aminés sont modifiés par le sucre lui-même ou par un produit issu de la réaction de Maillard entre les lysines et le glucose.

Néanmoins, en raison de son nombre élevé et de sa forte réactivité, la lysine représente l'acide aminé-cible préférentiel lors de la modification de la BLG par la réaction de Maillard.

2.1.2 - Identification des sites de modification par analyse des hydrolysats tryptiques

2.1.2.1 - Analyse par spectrométrie de masse

Les sites de glycation ont été identifiés en analysant les peptides tryptiques de la BLG modifiée par les différents sucres, par HPLC en phase inversée couplée à la spectrométrie de masse à ionisation par électro-spray (ESI-MS). Les peptides tryptiques de la BLG native ont été identifiés par leur masse moléculaire (MM) par comparaison avec leur MM théorique. Les MM des peptides modifiés correspondent à la somme de la MM du sucre utilisé pour la modification et de la MM du peptide non modifié. Les profils d'éluion de la BLG native ou modifiée par l'arabinose sont présentés sur la figure 19 ; les profils d'éluion de la BLG modifiée par le glucose ou le lactose sont présentés sur la figure 20. Les peptides identifiés par un chiffre correspondent aux peptides présents dans l'hydrolysat tryptique de la BLG native, les peptides identifiés par une lettre correspondent à des peptides nouveaux ayant fixé un sucre. Ces résultats sont présentés dans le tableau 20.

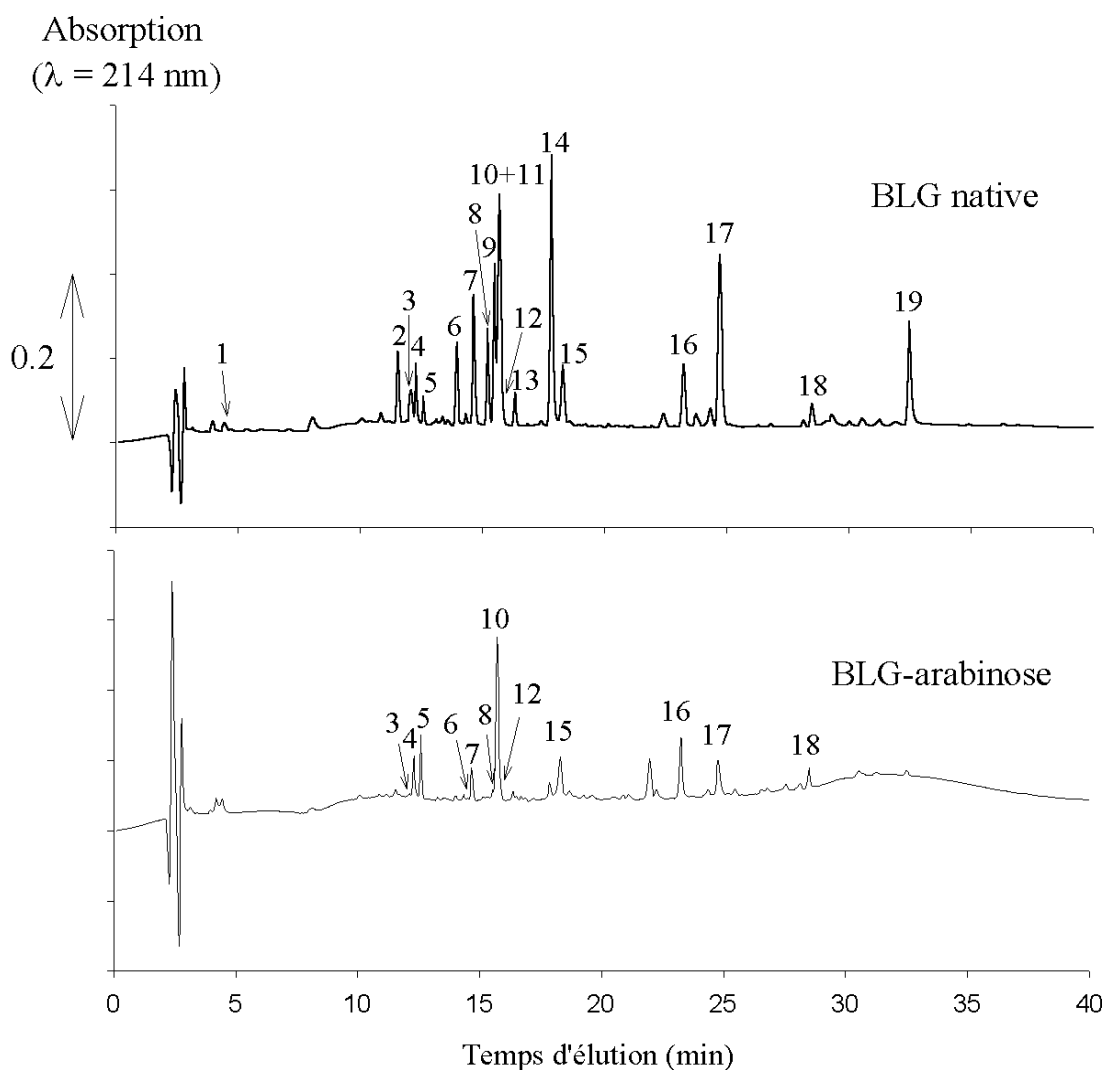


Figure 19 : Identification par spectrométrie de masse des peptides issus de l'hydrolyse trypsique de la BLG native ou modifiée par l'arabinose, séparés par HPLC en phase inversée.

A partir des chromatogrammes d'HPLC en phase inversée des hydrolysats trypsiques de la BLG modifiée par différents sucres, des peptides ayant fixé un sucre ont été identifiés. L'analyse de l'hydrolysat trypsique de la BLG modifiée par le rhamnose, le galactose, le lactose ou le glucose a permis l'identification respective de un, trois, quatre et six nouveaux peptides. Sur ces peptides modifiés, un seul site potentiel de glycation est possible. Ainsi, les lysines 14, 47, 69, 75, 100 et 135 et la leucine 1 ont été identifiées comme sites de glycation de la BLG.

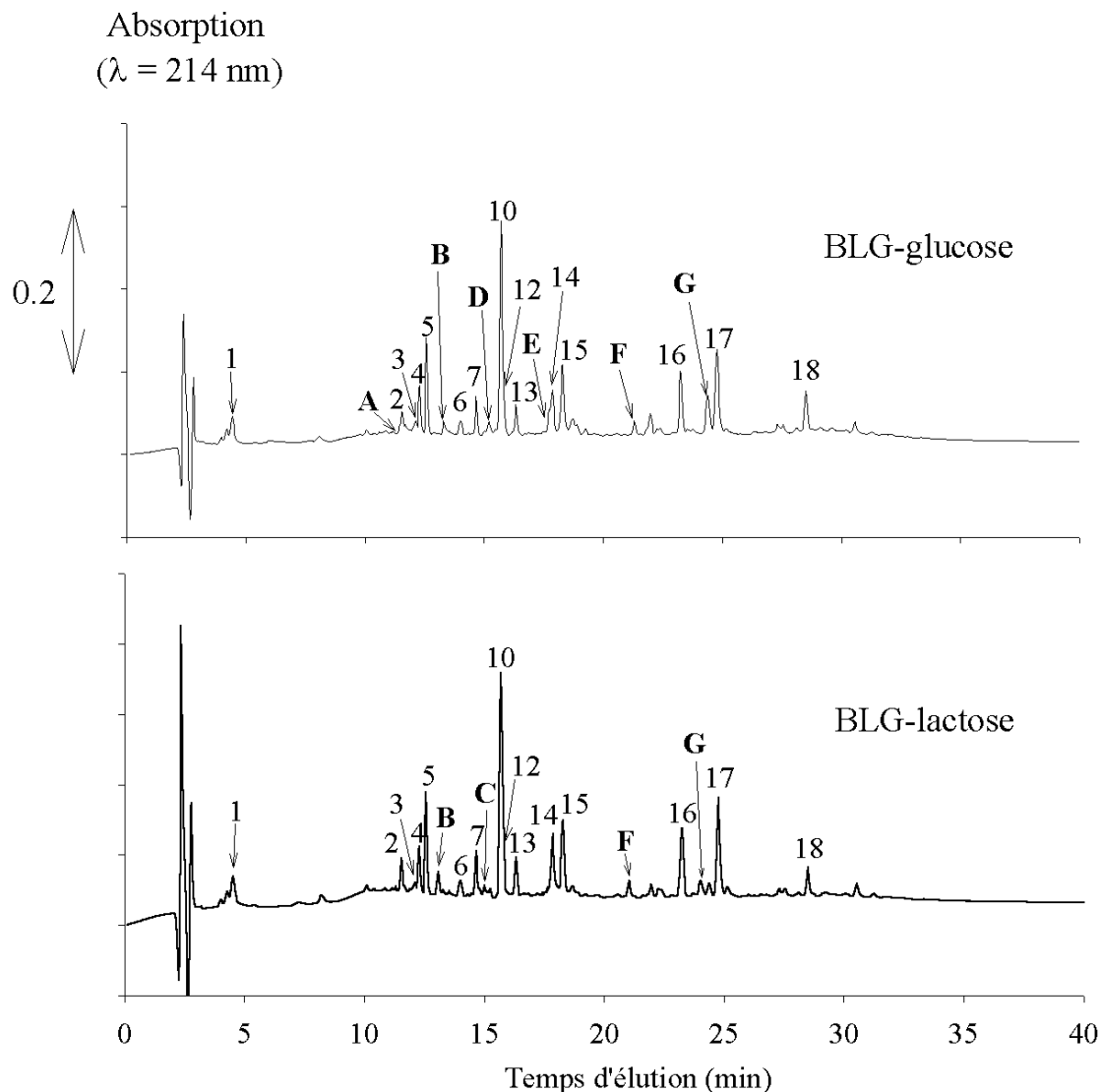


Figure 20 : Identification par spectrométrie de masse des peptides issus de l'hydrolyse trypsique de la BLG modifiée par le glucose ou le lactose, séparés par HPLC en phase inversée.

Ces résultats semblent montrer qu'en fonction du sucre utilisé, les sites de glycation ne sont pas identiques. Certains acides aminés sont modifiés au cours de la glycation par différents sucres : les lysines 14 et 47 et la leucine 1 sont modifiées en présence de galactose, de glucose ou de lactose. Certains acides aminés ne sont modifiés que par un type de sucre : la lysine 100 n'est modifiée qu'en présence de lactose, la lysine 75 qu'en présence de glucose.

Il est surprenant que le D-glucose et le D-galactose, épimères en position C-4, aient des sites de glycation différents. La plupart des peptides modifiés étant en très faible quantité, parfois très proches du bruit de fond (Fig. 20), il est possible que les différences observées soient dues en fait à la limite de détection de la technique.

Pics	Temps d'éluion (min)	Masse (Da)	Peptide	Peptides absents						Acides aminés potentiellement modifiés
				BLG-arabinose	BLG-galactose	BLG-glucose	BLG-lactose	BLG-rhamnose	BLG-ribose	
1	4,482	408,3	[136-138]	X	X					Lys 135 ou Lys 138
2	11,535	572,4	[71-75]							Lys 70 ou Lys 75
3	12,268	915,6	[84-91]							Lys 83 ou Lys 91
4	12,602	672,6	[9-14]							Lys 8 ou Lys 14
5	12,7	1244,84	[125-135]							/
6	13,968	932,84	[1-8]							Leu 1 ou Lys 8
7	14,668	836,84	[142-148]							Lys 141 ou Arg 148
8	15,235	1636,04	[125-138]	X	X	X	X	X	X	Arg 124 ou Lys 135 ou Lys 138
9	15,502	1193,09	[92-101]	X	X	X	X	X	X	Lys 91 ou Lys 100
10	15,702	695,7	[15-20]							/
11	15,702	902,84	[76-83]							Lys 75 ou Lys 77 ou Lys 83
12	15,8	673,5	[78-83]							Lys 77 ou Lys 83
13	16,335	1064,84	[92-100]							Lys 91 ou Lys 100
14	17,835	2907,73	[61-70]-[149-162]	X	X					Lys 60 ou Lys 69 ou Lys 70 ou Arg 148
15	18,302	2779,63	[61-69]-[149-162]							Lys 60 ou Lys 69 ou Arg 148
16	23,235	2030,54	[21-40]							Arg 40
17	24,735	2313,98	[41-60]							Arg 40 ou Lys 47 ou Lys 60
18	28,2	4331,08	[102-124]-[149-162]							Lys 101 ou Arg 124 ou Arg 148
19	32,502	2708,38	[15-40]	X	X	X	X	X	X	Lys 14 ou Arg 40
				Nouveaux peptides						Acides aminés modifiés
A	11,4	802,50 + M	[71-77]*							Lys 75
B	13,307	932,84 + M	[1-8]*							Leu 1
C	14,7	1193,51 + M	[92-101]*							Lys 100
D	15,207	1636,04 + M	[125-138]*							Lys 135
E	17,8	2907,32 + M	[61-70]-[149-162]*							Lys 69
F	21,307	1352,40 + M	[9-20]*							Lys 14
G	24,407	2313,98 + M	[41-60]*							Lys 47

Tableau 20 : identification des peptides issus de l'hydrolyse de la BLG native ou modifiée par différents sucres.

X : peptides absents ; + : présence d'un nouveau peptide ; * : peptides modifiés.

M = masse moléculaire du sucre correspondant (galactose et glucose M = 162,1 Da ; ribose et arabinose M = 132,1 Da ; rhamnose M = 146,1 Da ; lactose M = 324 Da).

Les pics 1 à 19 et A à G sont reportés sur les figures 19 et 20.

Un autre paramètre peut être étudié afin de déterminer les sites de glycation et de corréler les résultats à la détection de nouveaux peptides. La non-détection de certains peptides dans les hydrolysats de protéines modifiées par rapport à ceux présents dans l'hydrolysats de protéine native peut être expliquée par la modification de l'acide aminé impliqué dans la liaison peptidique du site de coupure de l'enzyme ou par celle d'un acide aminé présent dans l'enchaînement peptidique.

Ainsi, le peptide [15-40], correspondant au pic 19, n'est pas détecté dans les hydrolysats de BLG modifiée par l'arabinose, le galactose, le glucose, le lactose ou le ribose. Cela peut résulter de la modification de l'arginine 40 ou de la lysine 14 (ou des deux).

Le peptide [9-20], correspondant au pic **F**, a été détecté avec un sucre greffé dans des hydrolysats de BLG modifiée par le galactose, le glucose, le lactose ou le rhamnose, indiquant que la lysine 14 était modifiée. Cela montre que la non-détection du peptide [15-40] est certainement due (en tout cas en grande partie) à la glycation de la lysine 14 dans le cas de la modification en présence de galactose, de glucose ou de lactose.

Les hydrolysats de BLG modifiée par l'arabinose ou le ribose, à cause de leur taux de modification très élevé, présentent un grand nombre de peptides non-détectés par rapport à ceux issus de l'hydrolyse de la protéine native. Aucun nouveau peptide n'a pu être mis en évidence dans ces échantillons. Cela démontre les limites de la technique employée. Au-delà d'un certain taux de modification, les peptides modifiés ne peuvent plus être détectés, la faible potentialité de protonation des chaînes latérales des lysines et des arginines modifiées empêche l'ionisation par électro-spray et la détection par spectrométrie de masse.

2.1.2.2 - Evolution des différents peptides

Lors de la glycation de la BLG par le glucose au cours du chauffage à 60°C, l'évolution des profils des hydrolysats tryptiques peut mettre en évidence des sites de glycation préférentiels ou non-préférentiels. Les hydrolysats tryptiques présentés sur la figure 15 ont été analysés. Les peptides représentés sur le profil de l'hydrolysats de la BLG native (identifiés par spectrométrie de masse) ont été étudiés au cours du chauffage. L'évolution de l'aire des pics correspondant à ces peptides est représentée sur la figure 21.

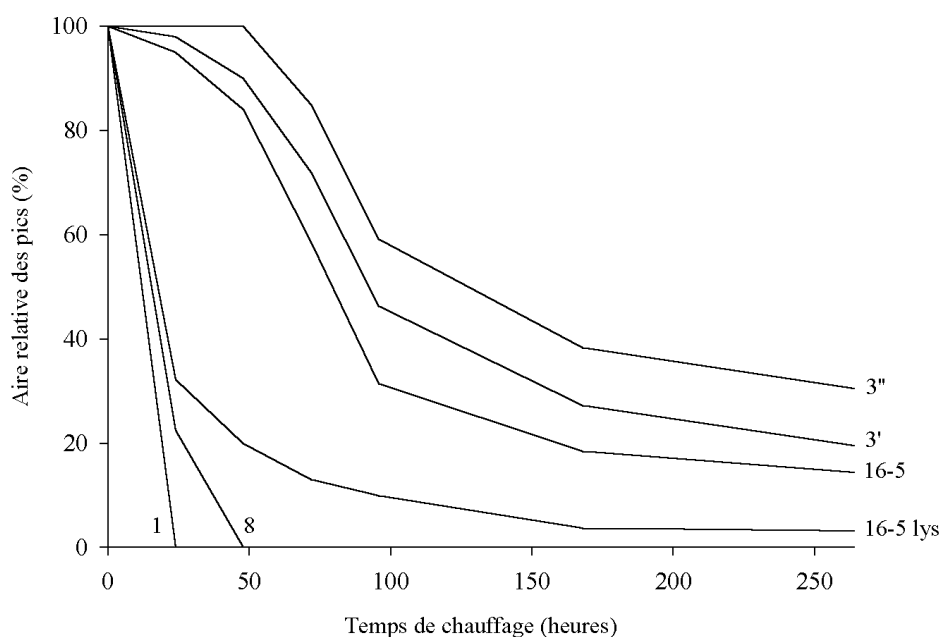


Figure 21 : Evolution au cours du chauffage de certains peptides issus de l'hydrolyse trypsique de la BLG modifiée par le glucose.

Les peptides 1 (Leu1-Lys8) et 8 (Ile78-Lys83) disparaissent assez rapidement au cours du chauffage. Le peptide 1 (Leu1-Lys8) n'est plus obtenu après 24 heures de glycation par le glucose, indiquant que la lysine 8 est modifiée.

Le peptide 8 (Ile78-Lys83), issu du clivage des liaisons peptidiques Lys77-Ile78 et Lys83-Ile84, n'est plus obtenu après 48 heures de glycation par le glucose. Cette rapide diminution de l'aire du pic peut provenir de la modification soit de la lysine 77, soit de la lysine 83 soit des lysines 77 et 83.

Cette cartographie peptidique, bien qu'imprécise pour l'identification des sites modifiés, semble plus utile pour mettre en évidence des sites non-modifiés.

Les peptides 3'' (Val15-Tyr20) et 3' (Ser21-Arg40), issus du clivage atypique de la liaison peptidique Tyr20-Ser21, sont encore largement identifiés après l'hydrolyse trypsique de la BLG chauffée pendant 96 heures en présence de glucose, indiquant que les résidus lysyle 14 et arginyle 40 ne sont pas encore modifiés. Ce ne sont donc pas des sites préférentiels de glycation.

Les peptides 16-5 (Leu149-Ile162)S-S(Trp61-Lys69) et 16-5 Lys (Leu149-Ile162)S-S(Trp61-Lys70), qui diffèrent seulement par la présence d'une lysine supplémentaire en position 70, présentent des cinétiques d'hydrolyse différentes.

Au cours du chauffage, l'aire du peptide 16-5 Lys décroît plus rapidement que celle du peptide 16-5, indiquant que la lysine 70 est modifiée avant la lysine 69.

La localisation de ces acides aminés dans la structure tridimensionnelle de la BLG permet d'expliquer leur réactivité avec le glucose (Fig. 22).

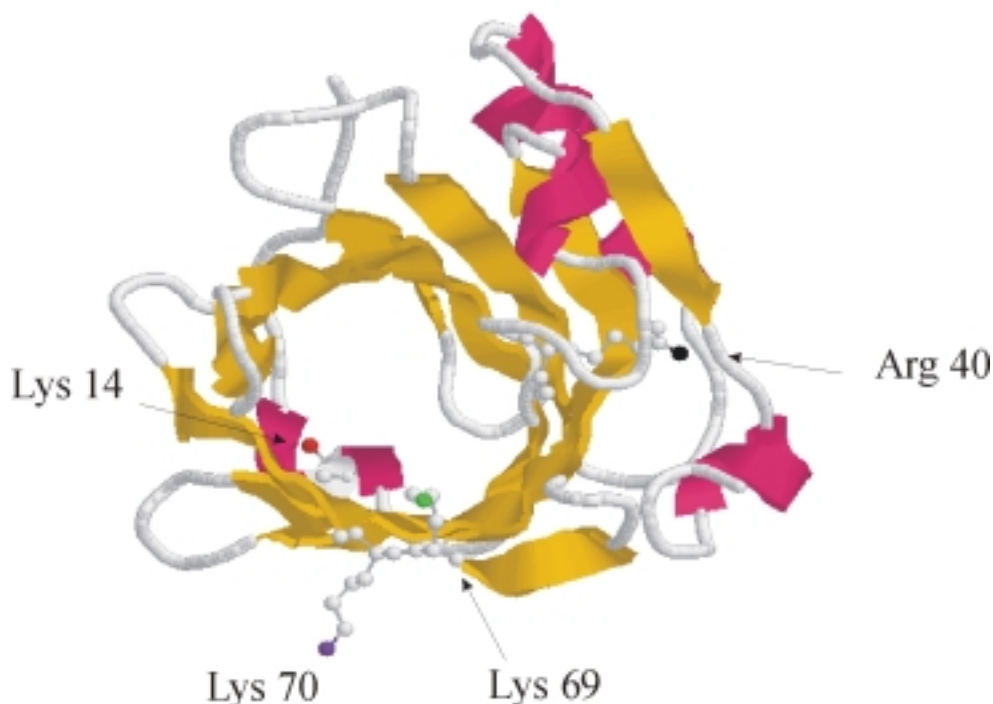


Figure 22 : Localisation dans la structure tridimensionnelle de la BLG d'acides aminés préférentiellement substitués ou non-substitués lors de la modification par le glucose.

L'arginine 40 et la lysine 14 sont situées dans des zones très encombrées de la molécule donc moins accessibles lors de la modification, ce qui peut expliquer qu'elles ne soient pas des sites préférentiels de glycation.

D'après Papiz *et al.* (1986), les lysines 69 et 70 sont situées sur le feuillet β n° D (Glu 62-Thr 76). L'analyse par modélisation moléculaire montre que la chaîne latérale de la lysine 69 est orientée vers l'intérieur de la molécule, alors que celle de la lysine 70 est dirigée vers l'extérieur, expliquant la plus grande réactivité de la lysine 70.

Ce résultat est en accord avec une précédente étude de cinétique de lactosylation (Morgan *et al.*, 1998), qui indiquait que la lysine 70 serait modifiée après 2 heures de glycation par le lactose, alors que la lysine 69 ne serait modifiée qu'après 6 heures de lactosylation.

2.2 - Modification de la structure secondaire

Analyse par dichroïsme circulaire dans la région UV-lointain

Les spectres de dichroïsme circulaire dans la région UV-lointain (180-260 nm) proviennent de l'absorption des liaisons peptidiques et apportent des informations sur la structure secondaire des protéines.

D'après la méthode de Provencher et Glockner (1981), la BLG native (Fig. 23 **A**) présente environ 47% de régions en feuillets- β et 14% de régions en hélices- α , ce qui est en accord avec les résultats de Papiz *et al.* (1986) et de Qi *et al.* (1995).

Après 72 heures de chauffage de la BLG à 60°C, une faible diminution de l'intensité du signal est observée par rapport à celle de la BLG native (Fig. 23 **B**) ; par conséquent, le traitement thermique appliqué lors de la modification des échantillons n'induit par lui-même aucune désorganisation notable de la structure secondaire de la BLG.

Par contre, en présence d'arabinose (Fig. 23 **C**), de galactose (Fig. 23 **D**), de glucose (Fig. 23 **E**) ou de ribose (Fig. 23 **H**), la glycation provoque un déplacement du minimum observé à 216 nm pour la BLG native ou chauffée, vers des longueurs d'ondes inférieures. La modification de la BLG par le lactose ne semble pas avoir une influence significative sur le spectre de dichroïsme circulaire dans l'UV-lointain (Fig. 23 **F**). Cet échantillon possède donc une structure secondaire relativement bien conservée. L'échantillon de BLG modifiée par le ribose présente le spectre le plus éloigné de celui de la BLG native, démontrant ainsi une importante modification de sa structure secondaire.

2.3 - Modification des structures tertiaire et quaternaire, conformation, structure tridimensionnelle

2.3.1 - Analyse par dichroïsme circulaire dans la région UV-proche

Les spectres de dichroïsme circulaire dans la région UV-proche (250-320 nm) proviennent de la chiralité des acides aminés aromatiques tels que le tryptophane, la tyrosine, la phénylalanine et des ponts disulfure.

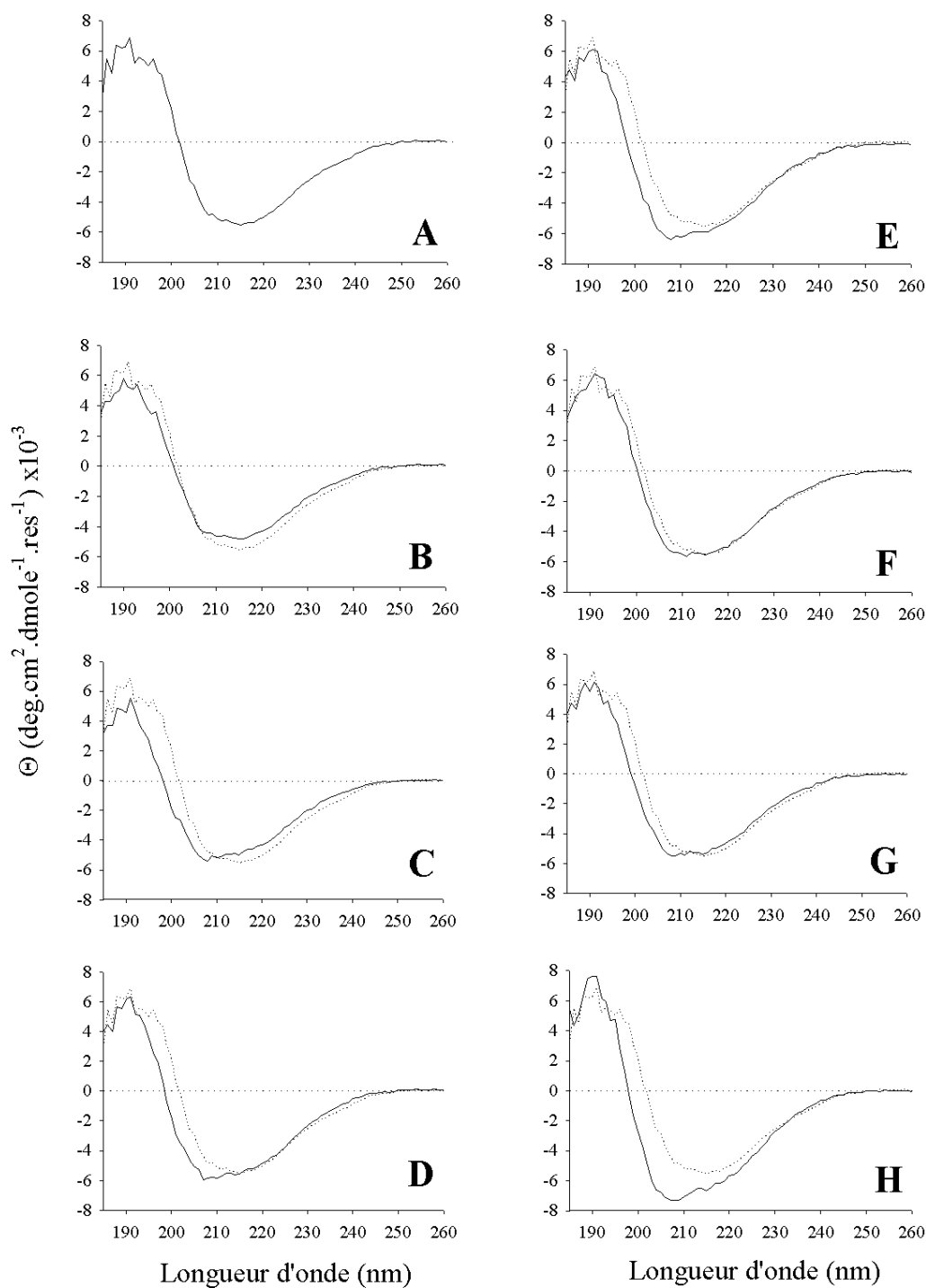


Figure 23 : Spectres de dichroïsme circulaire dans la région UV-lointain de la BLG native (**A** : ligne continue ; **B** à **H** : ligne discontinue), de la BLG chauffée (**B**), et de la BLG modifiée par l'arabinose (**C**), le galactose (**D**), le glucose (**E**), le lactose (**F**), le rhamnose (**G**) ou le ribose (**H**).

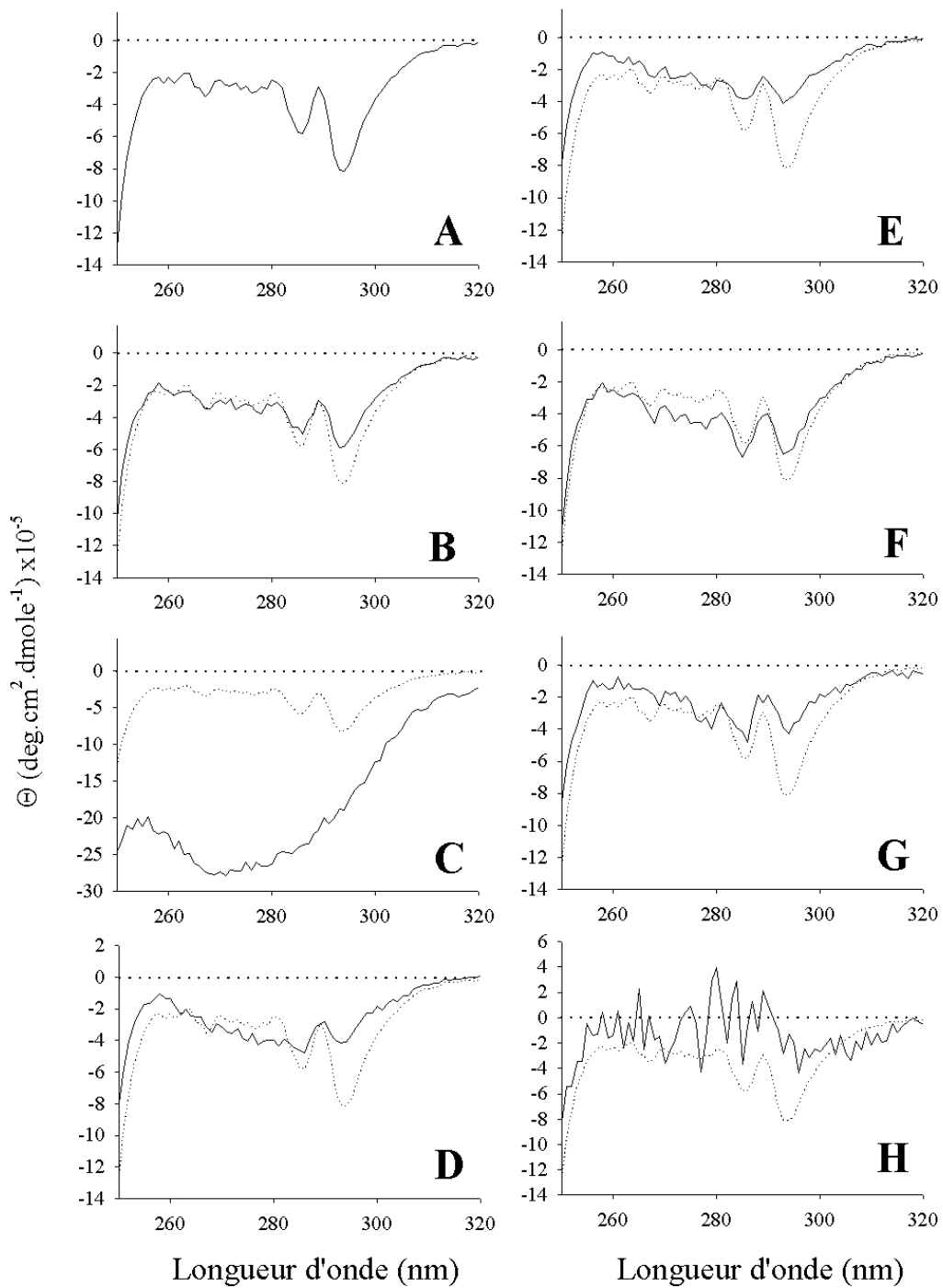


Figure 24 : Spectres de dichroïsme circulaire dans la région UV-proche de la BLG native (**A** : ligne continue ; **B** à **H** : ligne discontinue), de la BLG chauffée (**B**), et de la BLG modifiée par l'arabinose (**C**), le galactose (**D**), le glucose (**E**), le lactose (**F**), le rhamnose (**G**) ou le ribose (**H**).

Un profil caractéristique est observé pour la BLG native (Fig. 24 **A**) avec deux minima à 262 et 269 nm, dus aux résidus de phénylalanine et deux autres importants minima à 286 et 293 nm, dus aux résidus de tryptophane (Strickland, 1974 ; Kahn, 1979). Dans le cas de la BLG, ces minima sont dus au résidu Trp¹⁹ (Manderson *et al.*, 1999).

Après 72 heures de chauffage à 60°C, une diminution de l'intensité des deux minima à 286 et 293 nm est observée, ce qui est en accord avec les résultats de Manderson *et al.* (1999). Un tel changement du spectre de dichroïsme circulaire est probablement dû à une modification de l'environnement du résidu Trp¹⁹.

Dans la région UV-proche, les BLG modifiées par le galactose (Fig. 24 **D**), le glucose (Fig. 24 **E**), le lactose (Fig. 24 **F**) ou le rhamnose (Fig. 24 **G**) ont un profil comparable à celui de la BLG chauffée seule avec toutefois quelques légères différences d'intensité au niveau des deux minima observés à 286 et 293 nm. Ces échantillons semblent donc avoir une structure tertiaire relativement bien conservée.

Par contre, les échantillons les plus modifiés, c'est-à-dire la BLG modifiée par l'arabinose (Fig. 24 **C**) ou le ribose (Fig. 24 **H**), présentent une structure tertiaire complètement désorganisée. Pour ces échantillons, une perte complète du signal est observée dans la région UV-proche. La présence de chromophores, identifiée lors des études des spectres d'absorption, peut aussi expliquer en partie cette perte du signal.

2.3.2 – Analyse par microcalorimétrie

Une transition caractéristique de la température de dénaturation est observée à 78,8 et 81,4°C respectivement pour la BLG native et la BLG chauffée (Fig. 25). Un chauffage de 72 heures à 60°C semble donc induire des modifications conformationnelles mineures avec une légère augmentation de 2,6°C de la température de dénaturation.

Le chauffage de la BLG en présence de sucres induit une modification significative de ces thermogrammes. La température de dénaturation de la BLG modifiée par le lactose, le rhamnose, le glucose ou le galactose est respectivement de 87,5, 89,6, 90,4 et 88,5°C. Tous ces thermogrammes présentent un pic de dénaturation très large montrant l'hétérogénéité de la conformation des échantillons. Cette augmentation d'environ 10°C de la température moyenne de transition pourrait indiquer un rôle protecteur du sucre contre la dénaturation thermique.

Aucune transition n'a pu être observée sur les thermogrammes de la BLG modifiée par l'arabinose ou le ribose, démontrant, comme lors de l'étude par dichroïsme circulaire dans l'UV-proche, une perte importante de la conformation tridimensionnelle de ces échantillons.

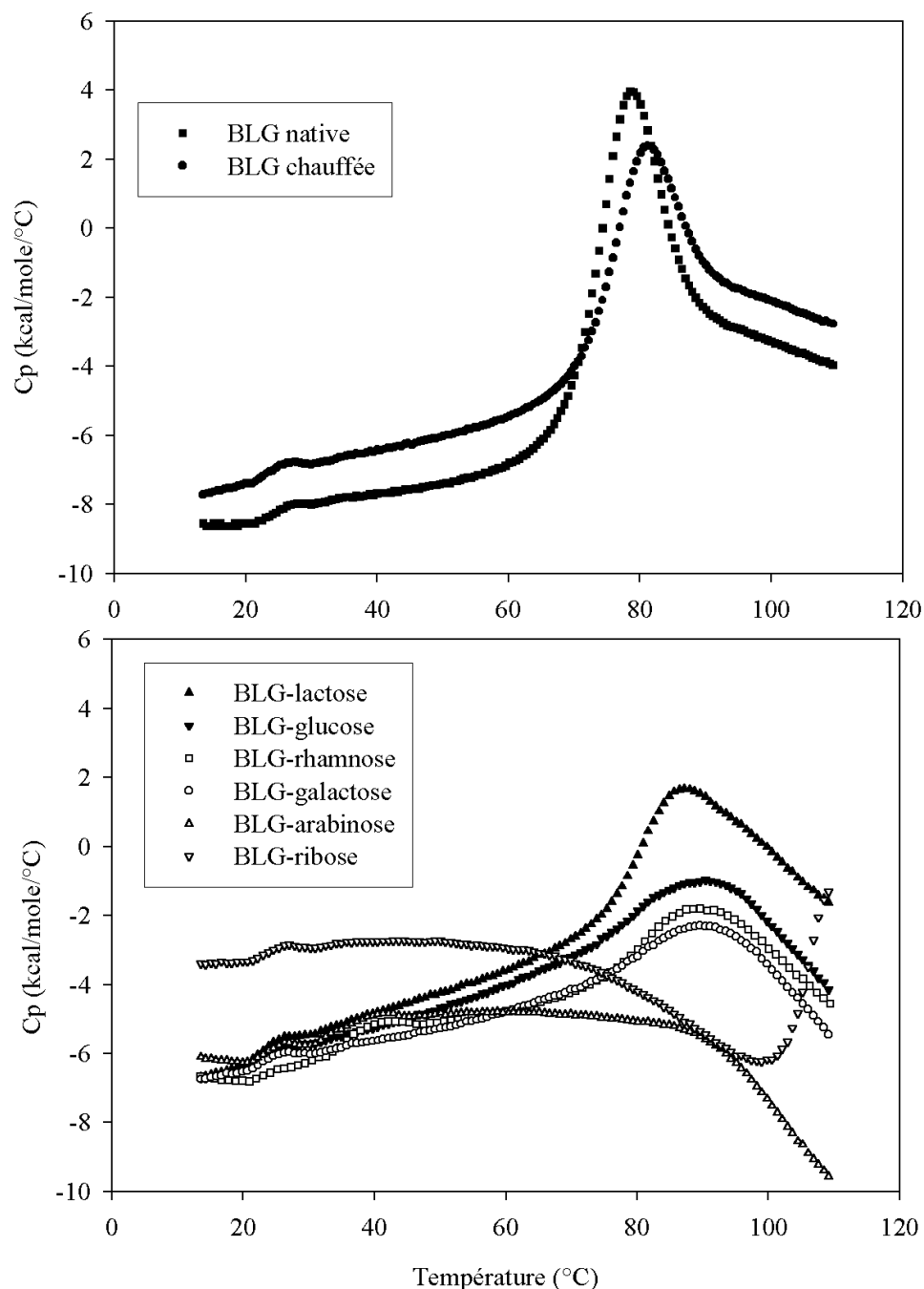


Figure 25 : Courbes de dénaturation de la BLG native, chauffée ou modifiée par différents sucres.

2.3.3 – Analyse par hydrolyse pepsique

La BLG native est résistante à l'hydrolyse pepsique car la plupart des sites de coupure de l'enzyme sont enfouis à l'intérieur de la protéine (Guo *et al.*, 1995). Par conséquent, une modification de la sensibilité de la BLG à l'hydrolyse pepsique met en évidence des changements de structure tridimensionnelle de la protéine.

Des études ont montré qu'une modification de la conformation de la BLG induite par le chauffage (Reddy *et al.*, 1988) ou en milieu éthanolique (Dalgalarondo *et al.*, 1995) ou après son estérification (Chobert *et al.*, 1995) rendait possible son hydrolyse par la pepsine.

Afin d'observer si la glycation de la BLG induit des modifications structurales, une cinétique d'hydrolyse pepsique a été réalisée avec les échantillons de BLG native, chauffée ou modifiée par les différents sucres. La sérum albumine bovine (SAB) a été utilisée comme contrôle positif de l'hydrolyse. Les échantillons ont été hydrolysés par la pepsine pendant différents temps, puis les hydrolysats ont été analysés par HPLC en phase inversée. L'aire du pic correspondant à la protéine non hydrolysée est reportée sur la figure 26. Pour chaque échantillon, l'aire du pic au temps 0 correspond à 100%.

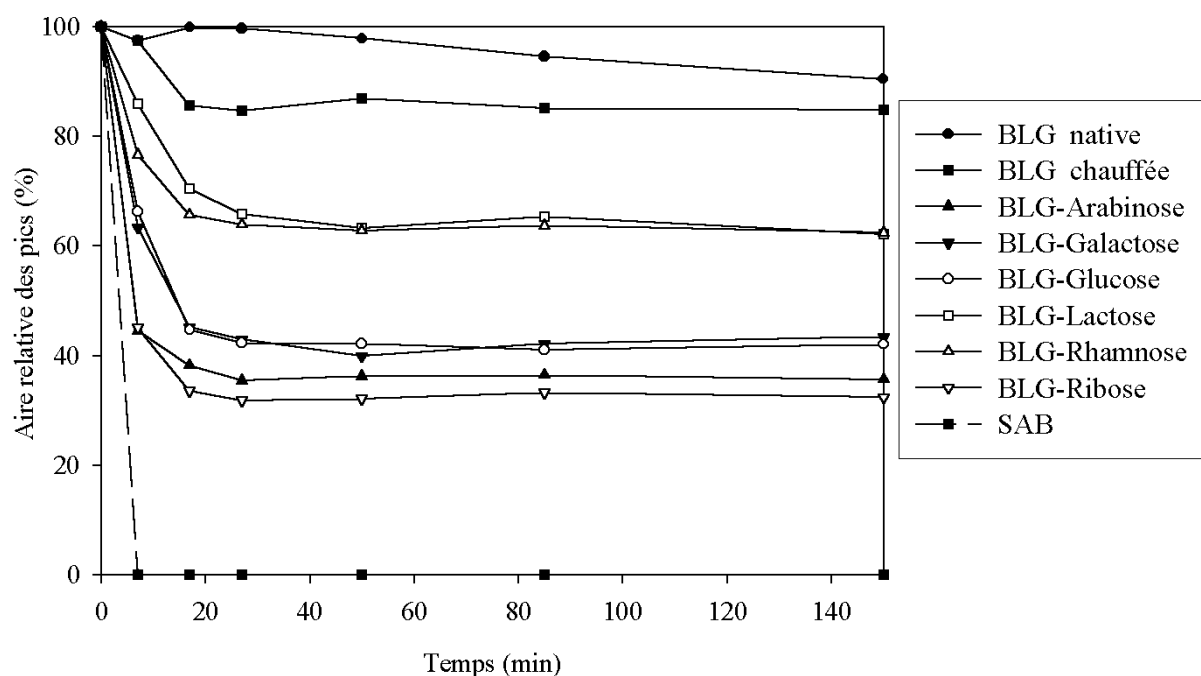


Figure 26 : Evolution de l'hydrolyse pepsique de la BLG native, chauffée ou modifiée par différents sucres et de la SAB.

Quelque soit l'échantillon, la réaction d'hydrolyse est très rapide dans les 15 premières minutes ; puis, après 30 minutes, un plateau est atteint et la réaction n'évolue que très peu.

Après 150 minutes d'hydrolyse par la pepsine, seuls 10% de la BLG native sont hydrolysés, indiquant sa forte résistance.

Un chauffage de 72 heures à 60°C induit un accroissement de 5% du taux d'hydrolyse par rapport au taux obtenu dans le cas de la BLG native après 150 minutes d'incubation avec la pepsine. Comme cela avait été observé par dichroïsme circulaire et par microcalorimétrie, les conditions de chauffage utilisées ne provoquent que de très faibles modifications structurales de la BLG.

Pour les échantillons de BLG modifiée par les sucres, une protéolyse accrue est observée : 62, 43 et 35% respectivement des échantillons modifiés par le lactose ou le rhamnose, le galactose ou le glucose, et l'arabinose ou le ribose, demeurent non-hydrolysés après 150 minutes d'action pepsique.

Ces analyses permettent de classer les échantillons en fonction de leur degré de dénaturation : les échantillons de BLG modifiée par le lactose ou le rhamnose sont les moins dénaturés (38% d'hydrolyse), les échantillons de BLG modifiée par le galactose ou le glucose sont dénaturés modérément (57% d'hydrolyse) et les échantillons de BLG modifiée par l'arabinose ou le ribose sont les plus dénaturés (65% d'hydrolyse).

Ces degrés de dénaturation semblent donc directement liés au degré de modification par la réaction de Maillard, montrant ainsi l'influence de la glycation en milieu aqueux sur la déstabilisation de la conformation de la BLG, ce qui est en accord avec les résultats de Morgan *et al.* (1999 a, b).

3 - Comportement vis-à-vis de l'association – polymérisation

3.1 - Séparation par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE)

Afin d'étudier l'influence de la réaction de Maillard sur la polymérisation de la BLG, les échantillons de BLG modifiée par le glucose durant différentes périodes à 60°C ont été analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS avec ou sans β -mercaptoéthanol (Fig. 27).

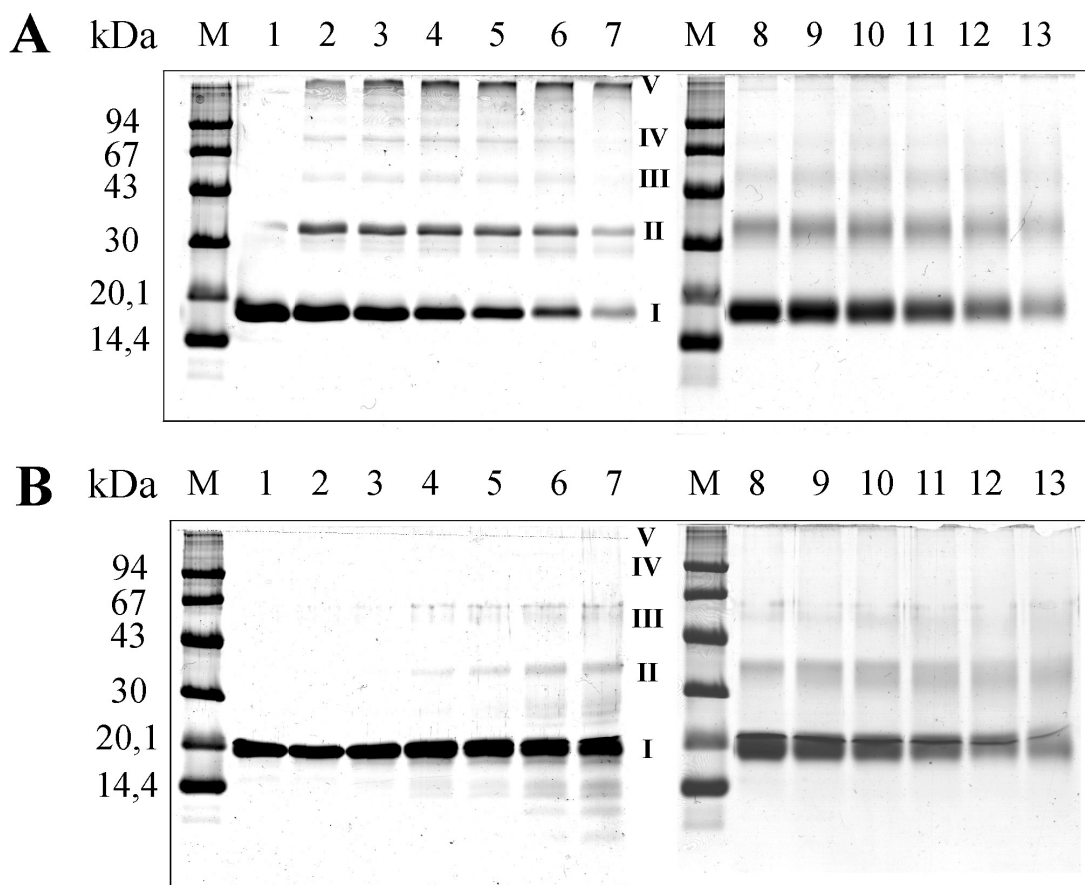


Figure 27 : Tricine SDS-PAGE de la BLG :

1 à 7 : chauffée sans sucre pendant respectivement 0, 24, 48, 72, 96, 128 et 264 heures.

8 à 13 : chauffée avec du glucose pendant respectivement 0, 24, 48, 72, 96, 128 et 264 heures.

A : sans β -mercaptoéthanol ; B : avec β -mercaptoéthanol ;

M : marqueur de masses moléculaires

I : BLG monomérique ; II : BLG dimérique ; III : BLG trimérique ; IV : BLG tétramérique ;

V : BLG polymérique.

Sur la colonne 1 (Fig. 27 A), la BLG non chauffée présente une bande à environ 18 kDa correspondant à la masse moléculaire du monomère «**I**» de la protéine. Au cours du chauffage et en conditions non réductrices (colonnes 2 à 7 de la Fig. 27 A), l'intensité de la bande correspondant au monomère (**I**) diminue au profit de celle de bandes de masses moléculaires supérieures, correspondant au dimère (**II**), au trimère (**III**), au tétramère (**IV**) et au polymère (**V**) de la BLG.

Quand la BLG est chauffée en présence de sucres, trois bandes, correspondant à des masses moléculaires apparentes de 18, 36 et 55 kDa, sont observées quelque soit le temps de chauffage. Cependant, ces bandes deviennent de plus en plus floues au cours du temps de chauffage.

En conditions réductrices (Fig. 27 B, colonnes 2 à 7), la plupart des bandes correspondant aux polymères de BLG chauffée en absence de sucre ont disparu, l'intensité de la bande correspondant au monomère (**I**) restant stable au cours du chauffage. Les polymères formés au cours du chauffage et observés en condition non réductrice sont donc réduits par le β -mercaptoéthanol, montrant clairement qu'ils résultent de la formation de ponts disulfure. Le chauffage de la BLG conduit à une exposition de la cystéine libre en position 121, provoquant ainsi la formation de polymères (Hoffmann et van Mil, 1997). Après 96 heures de chauffage de la BLG à 60°C, des bandes correspondant au dimère et au trimère sont observées en condition réductrice (Fig. 27 B, colonnes 5 à 7). Ces polymères peuvent correspondre au produit de la réaction entre les résidus lysyle et le groupe carboxylique d'un autre monomère. En effet, le chauffage catalyse les interactions entre les groupes ϵ -NH₂ des lysines et les groupes γ -COOH de l'acide glutamique, permettant la formation de dérivés γ -glutamyl-L-lysine (Hurrel et Carpenter, 1977b ; Otterburn *et al.*, 1977).

Dans le cas de la BLG chauffée en présence de sucres, aucune différence significative n'est observée par rapport aux conditions non réductrices. Les polymères formés au cours de la glycation de la BLG et observés en condition non réductrice ne sont pas réduits par le β -mercaptoéthanol. Ces polymères ne sont donc pas stabilisés par des ponts disulfure mais par d'autres types de pontages covalents.

La réaction de Maillard peut induire la formation de tels polymères dans de nombreux systèmes.

Des études ont montré que la modification de la BLG par le lactose (Bouhallab *et al.*, 1999) et l'acide gluconique ou mélibionique (Kitabatake *et al.*, 1985) pouvait provoquer la formation de polymères stables.

Dans le corps humain, la réaction de Maillard est impliquée dans la cataracte, par polymérisation de protéines du cristallin par le glucose (Monnier et Cerami, 1981), ainsi que lors du vieillissement de la peau, par polymérisation du collagène avec le glucose (Sell et Monnier, 1989).

Dans le système étudié, le glucose provoque la polymérisation de la BLG dès 24 heures de chauffage à 60°C. L'un des mécanismes d'oligomérisation (Fig. 28) pourrait dépendre de la formation d'un pontage entre un sucre fixé sur un monomère de BLG et un résidu lysyle d'un autre monomère, conduisant à la formation d'une fonction imidazole (Frye *et al.*, 1998), composé aussi appelé « FFI » (2-(2-furoyl)-4(5)-(2-furanyl)-1H-imidazole) d'après Pongor *et al.* (1984).

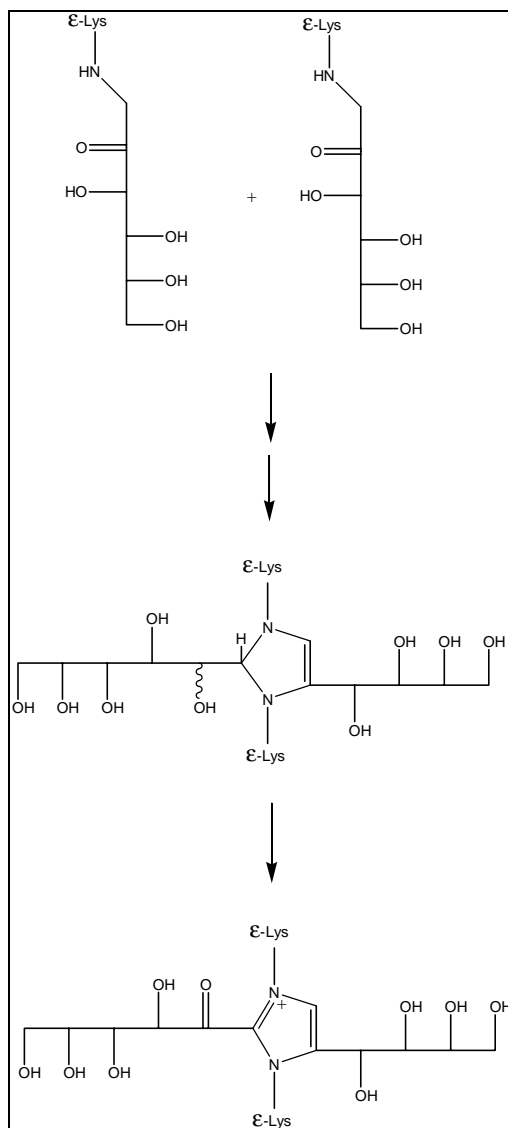


Figure 28 : Mécanisme envisagé pour la formation de protéines polymérisées par un composé d'Amadori formé à partir de glucose et de résidus ε-lysyle.

3.2 - Séparation par perméation sur gel suivie d'une SDS-PAGE

L'influence du sucre utilisé sur la formation de polymères a été étudiée par électrophorèse en présence de SDS avec ou sans β -mercaptoéthanol. Afin d'étudier séparément chaque population de polymères, une étape préparative d'HPLC de filtration sur gel a été réalisée avant l'étude par électrophorèse.

Les chromatogrammes des échantillons de BLG native, chauffée ou modifiée par les différents sucres sont présentés sur la figure 29. Les masses moléculaires des échantillons ont été estimées à l'aide de protéines commerciales de masses moléculaires connues.

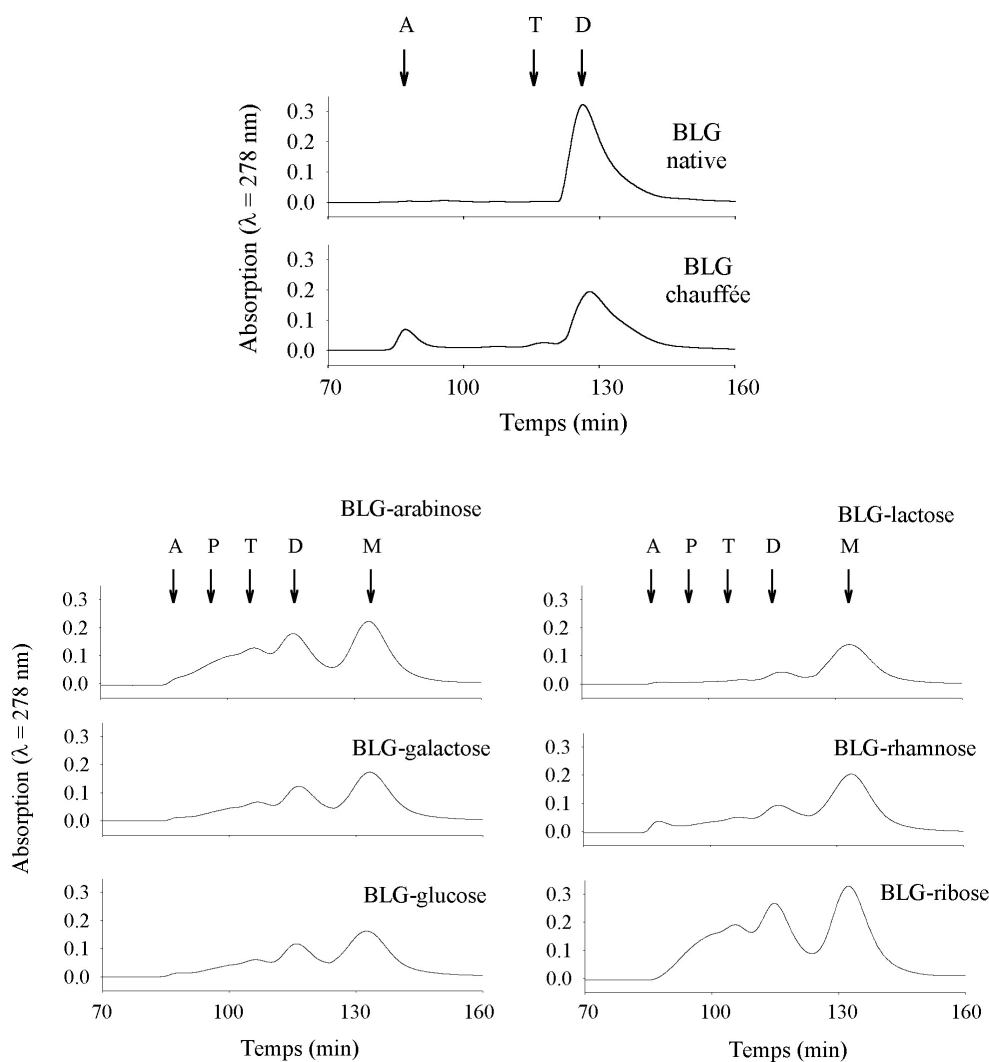


Figure 29 : Profils d'éluion par chromatographie de filtration sur gel de BLG native, chauffée ou modifiée avec différents sucres. **M :** monomères ; **D :** dimères ; **T :** trimères ; **P :** polymères ; **A :** agrégats.

L'élution n'étant pas réalisée en condition dénaturante, les associations par interactions hydrophobes sont maintenues, ce qui permet d'apprécier l'état d'association « natif » des échantillons.

La BLG non chauffée est présente sous forme de dimères au pH de la chromatographie (pH = 8). La BLG chauffée pendant 72 heures à 60°C est également présente majoritairement sous forme de dimères mais des fractions trimériques et agrégées sont observées.

Les échantillons de BLG modifiée par les différents sucres sont majoritairement sous forme monomérique, mais des formes dimériques, trimériques, tétramériques et agrégées sont observées en quantité variable selon les sucres. La présence majoritaire de forme monomérique dans les échantillons modifiés semble indiquer que la fixation de sucre sur la protéine empêche, ou limite, les interactions hydrophobes entre les monomères de BLG.

Ces différents échantillons ont ensuite été analysés par électrophorèse en présence de SDS afin d'observer la nature des liaisons stabilisant ces polymères (Fig. 30). Pour cela, des fractions correspondant au sommet de chaque pic ont été collectées.

En absence de β -mercaptoéthanol, le dimère de BLG native et celui de BLG chauffée présentent deux bandes dont une majoritaire correspondant au monomère et une autre correspondant au dimère. Le trimère de BLG chauffée est en partie transformé en dimère et en monomère, et la fraction agrégée de BLG chauffée est en grande partie retenue dans le puits de dépôt. Une quantité importante de la fraction dimérique observée par filtration sur gel est transformée en monomère sous l'action du SDS, montrant ainsi le rôle prépondérant des interactions hydrophobes dans le maintien du dimère de BLG.

En présence de β -mercaptoéthanol, les dimères de BLG native ou chauffée, observés en absence de β -mercaptoéthanol, sont réduits sous forme de monomères ; seule une partie des agrégats est encore retenue dans le puits de dépôt. Comme cela a été montré précédemment (§ 3.1), le chauffage induit des polymères de BLG par formation de ponts disulfure.

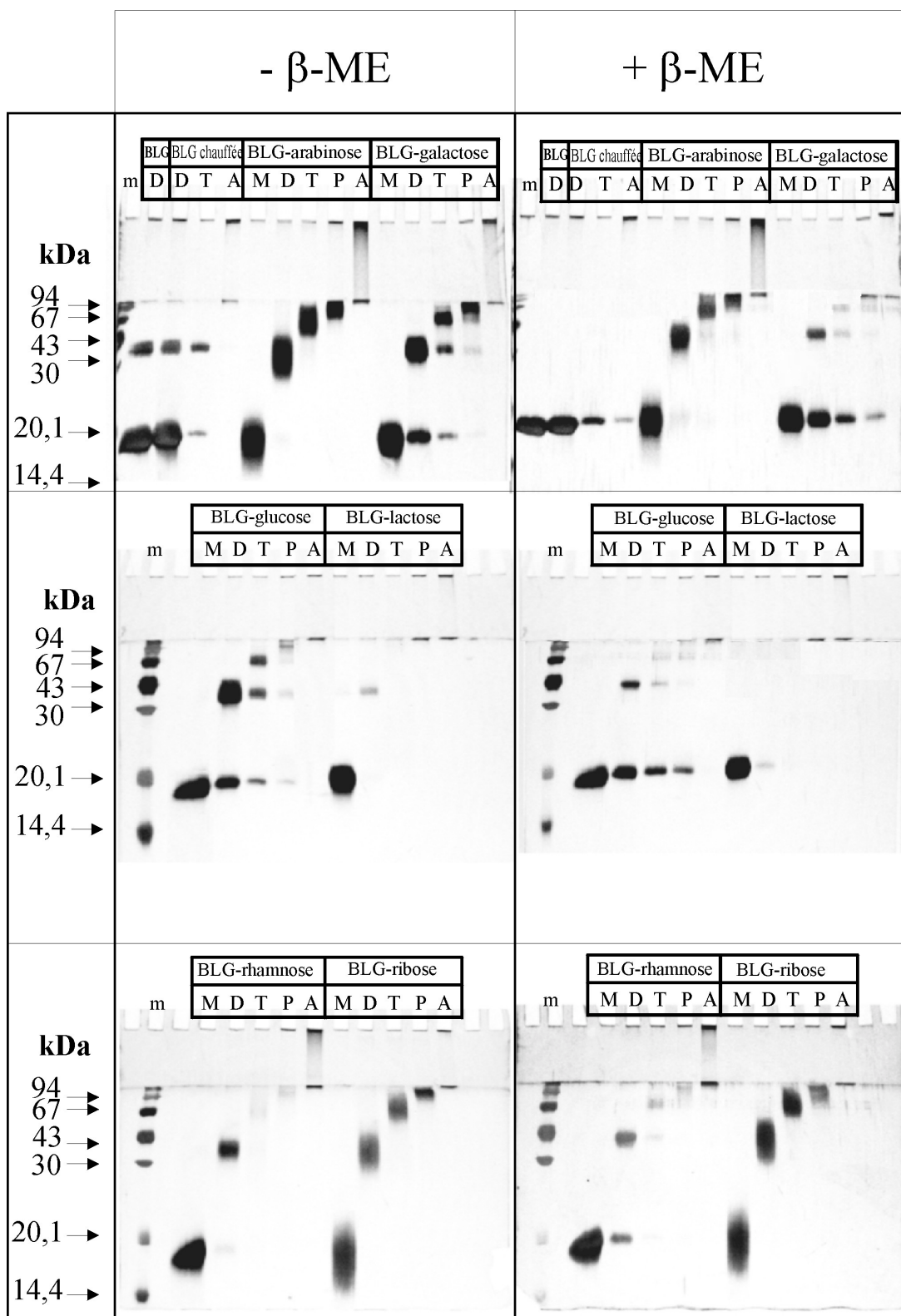


Figure 30 : SDS-PAGE de la BLG native, chauffée ou après glycation en conditions réductrices (droite) ou non réductrices (gauche).
M : monomères ; *D* : dimères ; *T* : trimères ; *P* : polymères ; *A* : agrégats.
m : marqueur de masse moléculaire.

Les échantillons de BLG modifiée par les différents sucres peuvent être classés en trois groupes selon la nature des interactions stabilisant les polymères :

- Dans le premier groupe renfermant la BLG modifiée par l'arabinose ou le ribose, les polymères observés par filtration sur gel sont stables à la fois en présence de SDS et en conditions réductrices. Ces polymères ne sont donc pas seulement stabilisés par des interactions hydrophobes ou par des ponts disulfure, mais aussi par des pontages covalents différents, induits par les sucres (Fig. 28).
- Dans le deuxième groupe comprenant la BLG modifiée par le galactose, le glucose ou le rhamnose, une partie des polymères est transformée en monomères en présence de SDS, et une partie des polymères stables en présence de SDS est réduite en présence de β -mercaptoéthanol. Ces polymères sont donc stabilisés partiellement par des interactions hydrophobes, par des ponts disulfure et par des pontages covalents induits par les sucres.
- Le troisième groupe est composé de la BLG modifiée par le lactose. Pour cet échantillon, les dimères observés en présence de SDS sont réduits en conditions réductrices. Seuls des ponts disulfure semblent stabiliser ces dimères, aucun autre type de liaison covalente n'est impliqué.

D - Conclusion

1 - Caractérisation physico-chimique

La glycation de la BLG par le glucose a été étudiée au cours du temps de chauffage à 60°C. Ces expériences ont permis de déterminer le temps de chauffage nécessaire pour obtenir un taux moyen de glycation. Après 72 heures de chauffage à 60°C, environ 40% des groupes amines primaires de la BLG sont substitués par le glucose. Cette durée de traitement thermique a donc été choisie pour effectuer les modifications par différents autres sucres.

Le dosage OPA semble mieux adapté que la détermination de la composition en acides aminés pour estimer le taux de glycation. En effet, la quantification des acides aminés donne un taux de modification inférieur à celui obtenu par le dosage OPA, certainement à cause de la libération de sucres substitués sur la protéine lors de l'hydrolyse acide des liaisons peptidiques.

L'apparition de composés colorés a pu être mise en évidence par des spectres d'absorption entre 220 et 600 nm. Deux composés ont en particulier été observés à des longueurs d'onde de 330 et 370 nm. Cependant, il semble que ces composés soient en grande partie dus à une réaction de condensation du glucose lors du chauffage car ils sont aussi observés dans des solutions de glucose chauffées en absence de protéine. Parallèlement à l'augmentation du taux de modification, une diminution progressive du point isoélectrique et de la sensibilité à l'hydrolyse trypsique est observée au cours du chauffage.

La glycation de la BLG par différents sucres a permis d'étudier l'influence de la nature du sucre sur l'avancée de la réaction de Maillard lors d'un chauffage de 72 heures à 60°C. Les sucres utilisés ont induit différents taux de glycation en fonction de leur nature chimique. Le lactose, un diholoside, conduit au plus faible taux (35%) de modification de la BLG. Les hexoses (galactose, glucose et rhamnose) conduisent à un taux intermédiaire d'environ 40% ; les pentoses induisent le plus fort taux de modification avec respectivement 60 et 68% de glycation en présence d'arabinose et de ribose. Une diminution du point isoélectrique a été observée, proportionnelle au taux de glycation. Plus le taux de glycation est élevé, plus les points isoélectriques sont acides et homogènes.

2 - Caractérisation structurale

L'analyse de la composition en acides aminés des échantillons de BLG modifiée par le glucose pendant différentes périodes a montré que d'autres acides aminés que la lysine pouvaient être modifiés au cours de la réaction de Maillard. En plus de la lysine, la tyrosine, l'arginine et l'histidine semblent être modifiées par le glucose ou par des sous-produits de la réaction.

Des études par spectrométrie de masse ont permis de mettre en évidence sept sites de glycation de la BLG (les lysines 14, 47, 69, 75, 100 et 135 et la leucine 1) en fonction du sucre utilisé. Un, trois, quatre et six sites ont été observés pour la BLG modifiée respectivement par le rhamnose, le galactose, le lactose ou le glucose. L'analyse des hydrolysats trypsiques de la BLG modifiée par le glucose a révélé que l'arginine 40 et la lysine 14 ne sont pas des sites préférentiels de glycation ; ces expériences ont aussi montré que la lysine 70 est modifiée au cours du chauffage avant la lysine 69. Ces résultats sont interprétés par la localisation différente de ces acides aminés au sein de la structure tridimensionnelle de la BLG.

Les techniques de dichroïsme circulaire, de microcalorimétrie et d'hydrolyse pepsique ont été utilisées afin d'évaluer la conformation de la protéine modifiée par les différents sucres. Ces trois techniques ont révélé que le traitement thermique (72 heures à 60°C) n'induisait pas de modifications conformationnelles fondamentales de la BLG en absence de sucre. En présence de sucres, la modification de la conformation de la protéine est proportionnelle au taux de modification.

D'après les résultats des hydrolyses pepsiques, la glycation par l'arabinose ou le ribose dénature à plus de 65% la BLG. 57 et 38% de dénaturation sont observés avec la BLG modifiée respectivement en présence de galactose ou de glucose et en présence de rhamnose ou de lactose.

3 - Comportement vis-à-vis de l'association – polymérisation

Des polymères ont été mis en évidence dans les échantillons de BLG modifiée par le glucose. L'étude de la nature des liaisons intervenant dans la stabilisation de ces polymères a révélé la présence de pontages covalents induits par les sucres.

Selon le sucre utilisé, différents types de liaisons sont impliqués dans la stabilisation des polymères. Tous les polymères de BLG modifiée par le ribose ou l'arabinose sont stabilisés par des pontages covalents. Dans le cas de la BLG modifiée par le galactose, le glucose ou le rhamnose, des ponts disulfure, des interactions hydrophobes et des pontages covalents semblent être impliqués dans la stabilisation de ces polymères. Seule la BLG modifiée par le lactose ne présente pas de pontages covalents induits par les sucres ; seuls des ponts disulfure ont été identifiés dans cet échantillon.

Il est difficile de conclure que les liaisons impliquées dans la formation et la stabilisation de ces polymères sont dépendantes de la nature du sucre utilisé lors de la modification ou si elles sont dépendantes du taux de modification des protéines.

Il semble cependant que la présence de pontages covalents soit liée au taux de glycation. C'est avec les sucres les plus réactifs (le ribose et l'arabinose) que ce type de liaison semble être prédominant. Néanmoins, dès 24 heures de chauffage de la BLG par le glucose, la présence de pontages covalents a été observée pour un taux de glycation de 25%, alors que la BLG modifiée par le lactose pendant 72 heures ne présente pas ce type de pontage malgré un taux de modification de 35%. La durée du chauffage est probablement un autre facteur déterminant.

CHAPITRE 2 : ETUDE DES PROPRIETES TECHNO-FONCTIONNELLES DES PROTEINES MODIFIEES

Une partie des travaux présentés dans ce chapitre a fait l'objet de publications :

Chevalier F., Chobert J.-M., Popineau Y., Nicolas M. G., Haertlé T. (2001c) Improvement of the functional properties of β -lactoglobulin glycosylated through the Maillard reaction is related to the sugar nature. *International Dairy Journal* 11 (3), 19-26.

Chevalier F., Chobert J.-M., Haertlé T. Interfacial properties of glycosylated β -lactoglobulin. In "Recent Advances in Agricultural and Food Chemistry", Research Signpost (Ed.), Kerala, Inde *Accepted*.

A - Introduction

Les protéines sériques comme la BLG sont valorisées en tant qu'ingrédients fonctionnels dans de nombreux produits alimentaires.

Afin de satisfaire à des utilisations industrielles de plus en plus ciblées, le lactosérum subit des traitements biochimiques spécifiques visant à purifier les protéines d'intérêt ou à modifier leur structure et leur composition par des procédés de chromatographie, de filtration, de thermodénaturation ou de protéolyse. Ces produits modifiés spécifiquement peuvent ainsi être utilisés pour leurs propriétés émulsifiantes, moussantes ou pour leur excellente solubilité.

1 - La solubilité

La solubilité d'une protéine est un facteur primordial dans la mise en œuvre de ses propriétés techno-fonctionnelles par l'influence qu'elle exerce sur les autres propriétés fonctionnelles (Kinsella et Whitehead, 1989).

La BLG non modifiée possède une excellente solubilité quels que soient le pH et la force ionique (Cheftel et Lorient, 1982) ; elle présente une bonne aptitude à la formation et à la stabilisation de mousses et d'émulsions.

Au cours du traitement thermique et/ou de la modification chimique, la solubilité d'une protéine peut énormément varier. Afin d'appréhender les propriétés fonctionnelles d'un échantillon modifié, il est donc très important de connaître sa solubilité au pH concerné.

2 - Propriétés émulsifiantes des protéines

Les protéines dotées de propriétés émulsifiantes ont un potentiel d'utilisation important dans les aliments contenant de l'eau et des graisses comme la charcuterie, la viande et les condiments.

Ces propriétés sont dues à la faculté des protéines à réduire les tensions interfaciales entre les composants hydrophiles et hydrophobes. Elles sont directement liées à la solubilité de la protéine dans l'eau (Cheftel et Lorient, 1982).

Les protéines globulaires comme la BLG conservent une partie de leurs structures secondaire et tertiaire lors de leur adsorption à l'interface. Cette adsorption dépend du pH et démontre l'importance des effets électrostatiques sur la formation et la stabilisation du film interfacial (Cayot et Lorient, 1998c).

La BLG adsorbée à l'interface huile/eau ne serait que partiellement dénaturée. A pH 9, la structure du monomère est détruite et l'adsorption s'apparente à celle d'une protéine flexible. A pH 7, les monomères et les dimères se déplient très peu pour former un film dont l'épaisseur correspond à peu près à l'épaisseur d'une molécule de BLG en solution. A pH 4,65, l'ensemble octamérique se brise en partie à l'interface.

Au cours du vieillissement des émulsions, des réarrangements des ponts disulfure intramoléculaires et la création de ponts disulfure intermoléculaires seraient à l'origine d'une gélification des couches adsorbées (Cayot et Lorient, 1998c).

3 - Propriétés moussantes

Très appréciées en pâtisserie (cakes, soufflés, meringues), les propriétés moussantes résultent d'un dépliement partiel des protéines qui s'orientent à l'interface eau/air.

Un « bon » composé moussant semble être celui qui diffuse rapidement vers l'interface pour abaisser la tension interfaciale et stabiliser les bulles d'air afin de retarder leur éclatement (Dickinson, 1989).

Il existe principalement deux techniques pour fabriquer une mousse :

- le battage qui consiste à battre une solution à l'aide d'un fouet ;
- le bullage qui consiste à faire barboter un gaz dans une solution protéique à travers un verre fritté.

Les résultats obtenus avec ces deux techniques ne sont pas comparables car elles ne relèvent pas du même type de dénaturation, les énergies mises en jeu étant différentes (Cayot et Lorient, 1998c). Il semble cependant que la technique par bullage soit plus reproductible d'un laboratoire à l'autre, permettant ainsi une meilleure comparaison des résultats (Kinsella, 1984).

Parmi les protéines du lait, le caséinate de sodium donne une mousse plus abondante qu'un concentré de protéines sériques (Patel *et al.*, 1988). Néanmoins, les mousses réalisées en présence de BLG sont plus stables que celles réalisées en présence d' α -lactalbumine (Cayot et Lorient, 1998c).

La stabilité des mousses est influencée par différents facteurs :

- la concentration en protéines (plus la concentration est forte, plus le drainage du liquide est faible) ;
- le pH (la stabilité des mousses est maximale au pI quand les protéines restent solubles ; Kinsella, 1984) ;
- le chauffage (le chauffage de la BLG à 70°C pendant 30 minutes améliore, quel que soit le pH, sa capacité à stabiliser des mousses).

4 - Etudes des propriétés techno-fonctionnelles de la BLG modifiée

L'amélioration des propriétés fonctionnelles des protéines du lactosérum, par modifications chimiques et/ou enzymatiques, fait l'objet de nombreuses recherches (Haertlé et Chobert, 1999). Dans le but d'améliorer sa stabilité thermique et ses propriétés moussantes et émulsifiantes, la BLG a été modifiée par fixation d'ester (Mattarella et Richardson, 1983 ; Sitohy *et al.*, 2000), d'acides gluconique et mélibionique (Kitabatake *et al.*, 1985), d'acide phosphorique (Sitohy *et al.*, 1995 a, b) et de sucres par alkylation réductrice (Waniska et Kinsella, 1988 ; Bertrand-Harb *et al.*, 1990). La fixation de glucose-6-phosphate par la réaction de Maillard a permis d'améliorer la stabilité thermique et les propriétés émulsifiantes de la BLG (Aoki *et al.*, 1997, 1999).

Pour étudier l'influence de la glycation de la BLG par différents sucres sur ses propriétés fonctionnelles, les échantillons de BLG modifiée pendant 72 heures à 60°C en présence d'arabinose, de galactose, de glucose, de lactose, de rhamnose ou de ribose ont été analysés.

La stabilité thermique, les propriétés émulsifiantes et les propriétés moussantes de ces différents échantillons ont été étudiées. Afin de mieux maîtriser l'influence du pH sur ces propriétés fonctionnelles, la solubilité des échantillons a été mesurée en fonction du pH.

B - Matériel et Méthodes

1 - Mesure de la solubilité en fonction du pH

La BLG native, chauffée ou modifiée par différents sucres a été solubilisée dans de l'eau distillée à une concentration de 2 mg/ml. Le pH des solutions était ensuite ajusté entre 2 et 10 avec de l'HCl ou du NaOH concentré. Les échantillons amenés aux différents pH ont été centrifugés pendant 15 minutes à 15 000 g et la concentration en protéines solubles dans le surnageant a été déterminée par la méthode utilisant l'acide bicinchonique (BCA, Pierce) avec la SAB comme standard. La solubilité a ensuite été exprimée comme étant le pourcentage de protéines présentes dans le surnageant par rapport à la quantité totale de protéines. Toutes ces expériences ont été réalisées à 25°C.

2 - Mesure de la stabilité thermique

La BLG native, chauffée ou modifiée par différents sucres a été solubilisée dans un tampon d'acétate de sodium 0,1 M de pH 4, 4,5 et 5 ou dans un tampon phosphate de sodium 0,1 M de pH 7 à une concentration de 2 mg/ml. Après leur solubilisation dans le tampon au pH approprié, les échantillons ont été chauffés jusqu'à 1 heure dans un bain-marie à différentes températures (de 25 à 90°C). Les échantillons ont ensuite été placés pendant 15 minutes à 4°C puis centrifugés pendant 15 minutes à 15 000 g afin de précipiter les agrégats. La concentration en protéines a ensuite été estimée par mesure de l'absorption à 280 nm et comparée à celle de l'échantillon non chauffé.

3 - Estimation des propriétés émulsifiantes

La BLG native, chauffée ou modifiée par différents sucres a été solubilisée dans un tampon d'acétate de sodium 0,1 M de pH 5 ou dans un tampon phosphate de sodium 0,1 M de pH 7 à

une concentration de 2 mg/ml. L'émulsion « huile dans eau » a été préparée avec les solutions de protéines et de l'huile de tournesol (Fruit d'Or) avec une proportion d'huile de 15% (V/V). Une première émulsion a été réalisée à une vitesse de 20 000 tours par minute pendant 30 secondes avec un système de rotor stator de type Polytron PT3000 équipé d'une tête de 12 mm (Kinematica, Littau, Suisse).

La réalisation de l'émulsion a ensuite été achevée sous pression à l'aide d'un homogénéisateur (Stansted Fluid Power, Stansted, RU). 20 ml de la pré-émulsion ont été placés dans l'homogénéisateur pour circuler en boucle pendant 90 secondes à un débit de 120 ml/min et une pression de 50 bars. 1 ml de cette émulsion a ensuite été dilué avec 9 ml de SDS à 0,1% (P/V).

Le diamètre moyen des gouttelettes a été estimé à l'aide d'un granulomètre laser de type Malvern Mastersizer 3600 (Malvern Instruments, Malvern, RU). Le système était équipé d'une lentille ayant une distance focale de 45 mm ; le code 0503 était sélectionné pour le paramètre de « présentation » afin de tenir compte de l'index de réfraction de l'huile utilisée.

Une mesure du diamètre moyen de la distribution de taille des gouttelettes d'huile ($d_{3,2}$) de l'émulsion a été réalisée pour chaque échantillon.

4 - Estimation des propriétés moussantes

La BLG native, chauffée ou modifiée par différents sucres a été solubilisée dans un tampon phosphate de sodium 0,1 M de pH 7 à une concentration de 1 mg/ml.

Les expériences ont été réalisées dans un tube de plastique transparent (2 cm x 22,5 cm) équipé d'une paire d'électrodes et d'un disque métallique poreux (pores d'un diamètre de 2 μ m) situé à la base de la colonne où de l'air était insufflé (15 ml/min et 1 bar) à travers le liquide ($T_1 = 8$ ml), formant ainsi la mousse.

Le volume de mousse et la conductivité ont été suivis par une caméra (Schmersal OM-1024) équipée d'une lentille de 25 mm. Lorsque le volume de mousse atteignait 35 ml, le bullage était arrêté. L'évolution du volume de mousse et de la conductivité a été mesurée pendant 20 minutes.

La mesure de la conductivité (C_t) avec pour référence la conductivité du tampon (C_{init}) a permis de calculer le volume de liquide drainé dans la mousse au cours du temps.

Différents paramètres ont été calculés pour caractériser les propriétés moussantes des échantillons (Fig. 31) :

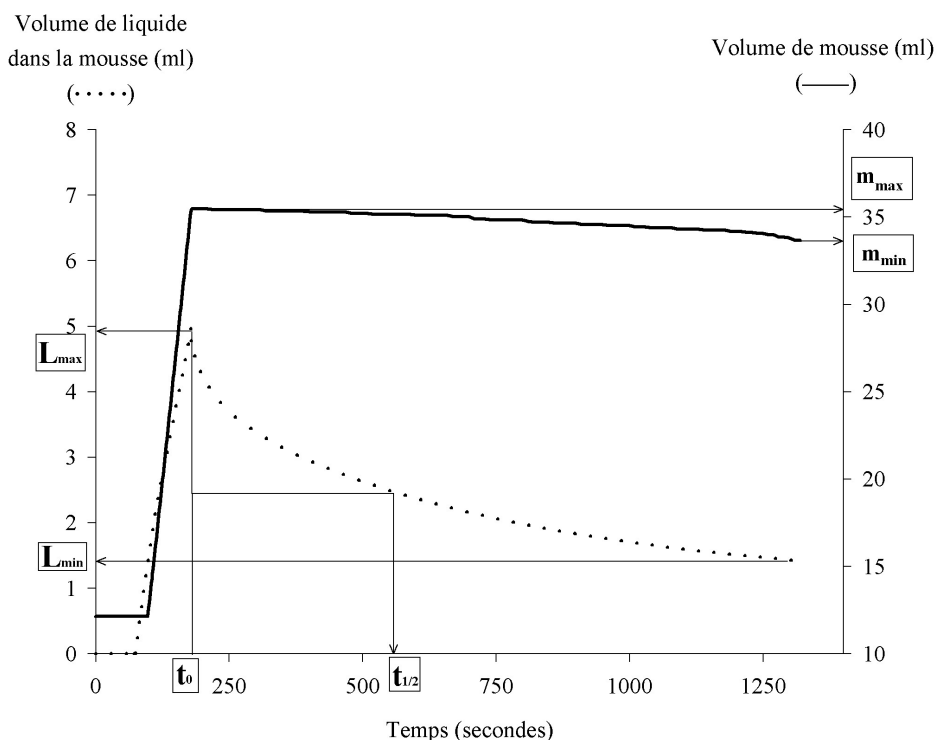


Figure 31 : Courbes expérimentales d'une mousse obtenue avec l'échantillon de BLG chauffée.

- La capacité moussante a été estimée par :
 - le volume maximum de mousse (M_{max})

$$M_{max} = m_{max} - (T_1 - L_{max})$$
 où m_{max} est le volume de mousse à la fin du bullage et L_{max} le volume de liquide drainé dans la mousse à la fin du bullage ;
 - la densité de la mousse (MD)

$$MD = (L_{max} / M_{max})$$
- La stabilité de la mousse a été déterminée par :
 - la demi-vie de drainage ($T_{1/2}$) :

$$T_{1/2} = t_{1/2} - t_0$$
 où t_0 correspond au temps nécessaire pour atteindre L_{max} et $t_{1/2}$ à celui nécessaire pour atteindre $L_{max} / 2$
 - le volume minimum de mousse (M_{min}) :

$$M_{min} = m_{min} - (T_1 - L_{min})$$
 - l'index de stabilité (S_i) :

$$S_i = (M_{min} / M_{max}) \times 100$$

C - Résultats

1 - Mesure de la solubilité en fonction du pH

La solubilité de la BLG native, chauffée ou modifiée par différents sucres a été mesurée en fonction du pH à une concentration de 2 mg/ml dans l'eau (Fig. 32).

La BLG native présentait une solubilité supérieure à 95% sur toute la gamme de pH étudiée. Après un chauffage de 72 heures à 60°C (Fig. 32 **A**), une diminution de 50% de la solubilité a été mesurée lorsque le pH était compris entre 4,0 et 5,5. Le minimum de solubilité était observé à pH 5, ce qui correspond au pI de la BLG native.

Après un chauffage de la BLG en présence d'arabinose ou de ribose (Fig. 32 **B**), une solubilité minimale d'environ 35% a été observée à pH 4, valeur inférieure à celle obtenue avec la BLG chauffée seule. Néanmoins, certainement à cause du déplacement de la valeur du pI vers un pH plus acide (environ pH 4 ; cf Fig. 18), la solubilité de la BLG chauffée en présence d'arabinose ou de ribose à pH 5 a été maintenue à environ 100%.

Lorsque les protéines étaient modifiées par le galactose, le glucose, le lactose ou le rhamnose (Fig. 32 **C**), un minimum de 75% de solubilité a été observé à pH 4,5, montrant l'effet protecteur de la glycation contre la diminution de solubilité due au chauffage.

2 - Mesure de la stabilité thermique

Les échantillons de BLG native, chauffée seule ou en présence de différents sucres ont été incubés à différentes températures (entre 25 et 90°C) et à pH 5 et 7. Leur solubilité après ce traitement thermique a été mesurée et est reportée sur la figure 33.

La solubilité des échantillons n'est pas modifiée de façon importante après une incubation d'une heure à différentes températures et à pH 7. Chaque échantillon présentait une solubilité d'environ 90% (Fig. 33 **A, B, C** ; ligne discontinue).

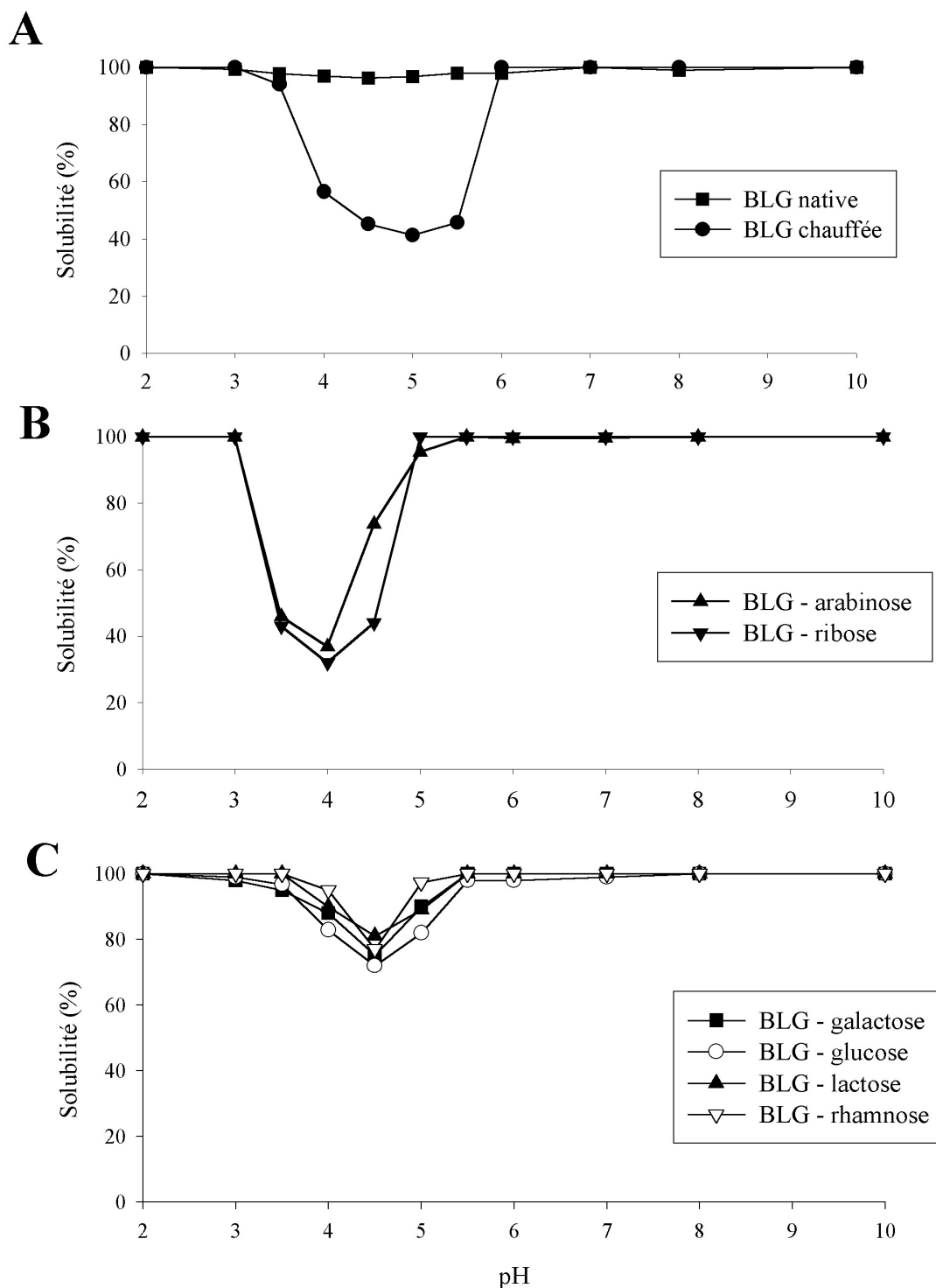


Figure 32 : Solubilité en fonction du pH de la BLG native ou chauffée 72 heures à 60°C (A), de la BLG modifiée par l'arabinose ou le ribose (B) et de la BLG modifiée par le glucose, le galactose, le rhamnose ou le lactose (C).

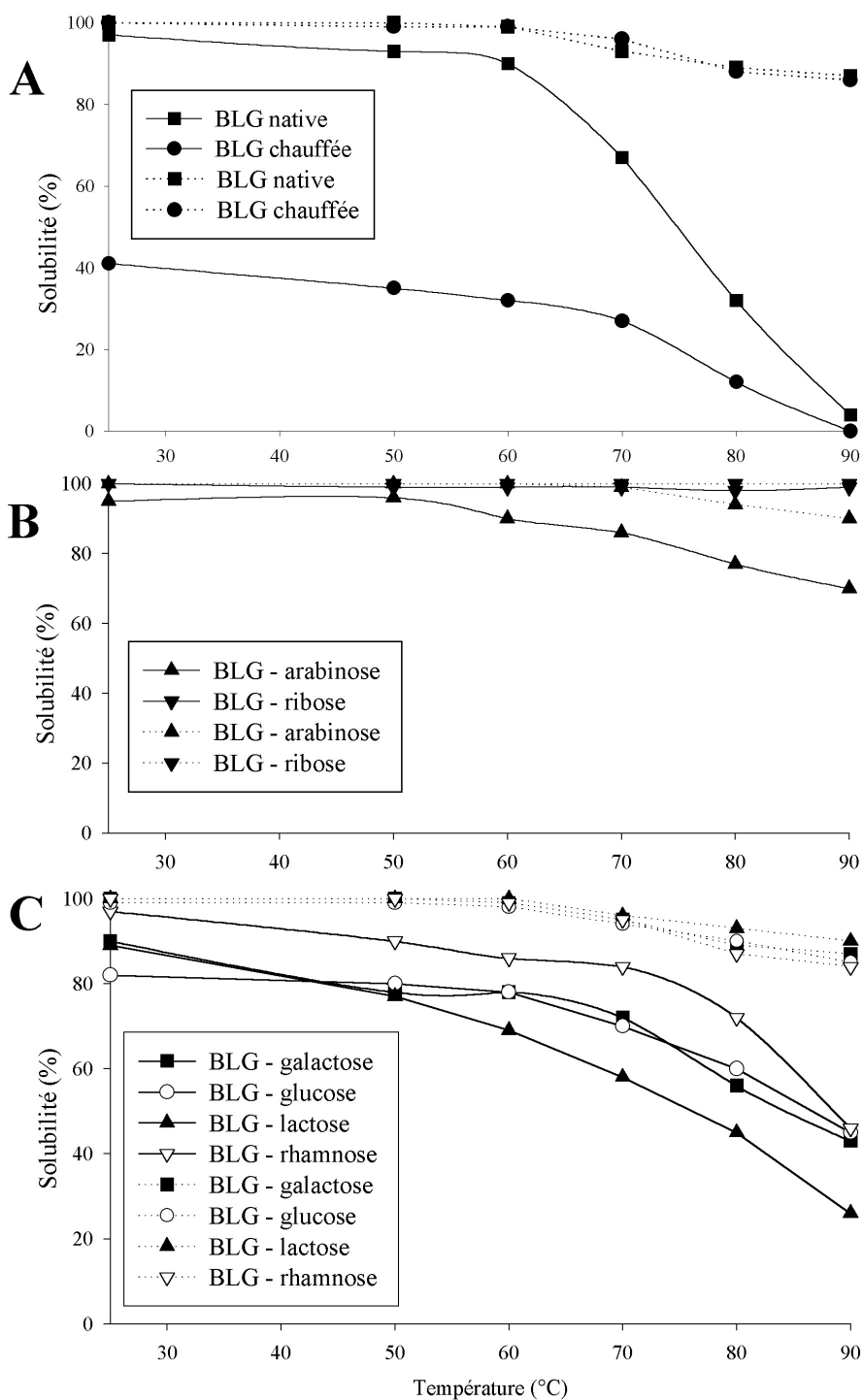


Figure 33 : Stabilité thermique de la BLG native ou chauffée (A), modifiée par le ribose ou l'arabinose (B), et modifiée par le galactose, le glucose, le lactose ou le rhamnose (C) à pH 5 (—) et à pH 7 (- - -).

Lorsque les échantillons ont été incubés à pH 5, des différences de comportement ont été observées entre les protéines modifiées par les sucres et la BLG native ou chauffée seule.

Lorsque l'incubation était réalisée à des température inférieures ou égales à 60°C, la solubilité de la BLG native était d'environ 90%. Par contre, au-dessus de 60°C, la solubilité de cet échantillon a diminué progressivement jusqu'à 5% de solubilité pour un traitement thermique correspondant à une heure d'incubation à 90°C.

Cette diminution de la solubilité est caractéristique de la BLG qui présente une dénaturation irréversible lors d'un chauffage à une température supérieure à 70°C (De Wit et Klarenbeck, 1984 ; Iametti *et al.*, 1996). Le chauffage de la BLG à un pH proche de son pI provoque une agrégation et une précipitation de la protéine. C'est la raison pour laquelle cette perte de solubilité a été observée à pH 5 et non à pH 7.

Le même phénomène a été mesuré avec l'échantillon de BLG chauffée qui montrait une diminution constante de sa solubilité lorsque la température d'incubation était supérieure à 60°C. La diminution initiale de solubilité de 60% par rapport à celle de la BLG native correspond au préchauffage de cet échantillon (72 heures à 60°C ; Fig. 32).

Les échantillons de BLG modifiée par le galactose ou le glucose (Fig. 33 C) avaient une solubilité d'environ 80% tant que la température d'incubation était inférieure à 60°C, puis leur solubilité diminuait jusqu'à 50% lorsque la température d'incubation atteignait 90°C.

La solubilité de la BLG modifiée par le rhamnose incubée à différentes températures était d'environ 10% supérieure à celle de la BLG modifiée par le galactose ou le glucose, sauf lorsque l'incubation était réalisée à 90°C où la solubilité des échantillons était quasi-identique et d'environ 50%.

La solubilité de la BLG modifiée par le lactose diminuait progressivement de 90% à 25°C jusqu'à 30% à 90°C.

Les différents traitements thermiques à pH 5 ont eu peu d'influence sur la solubilité des échantillons les plus modifiés. La solubilité de la BLG modifiée par l'arabinose diminuait lorsque l'incubation était réalisée à 50°C et un minimum de solubilité de 70% était atteint dans le cas d'une incubation à 90°C. Par contre, aucune influence du traitement thermique sur la solubilité n'a pu être mise en évidence pour l'échantillon de BLG modifiée par le ribose, après une heure d'incubation à pH 5 et à 90°C, conditions dans lesquelles cet échantillon présentait toujours une solubilité de 95%.

Ces résultats montrent l'effet favorable de la glycation sur la stabilité thermique des échantillons de BLG chauffés à pH 5.

Afin d'étudier la vitesse d'insolubilisation des échantillons chauffés à pH 5, une cinétique de chauffage à 80°C a été réalisée avec les échantillons de BLG native, chauffée ou modifiée par différents sucres (Fig. 34).

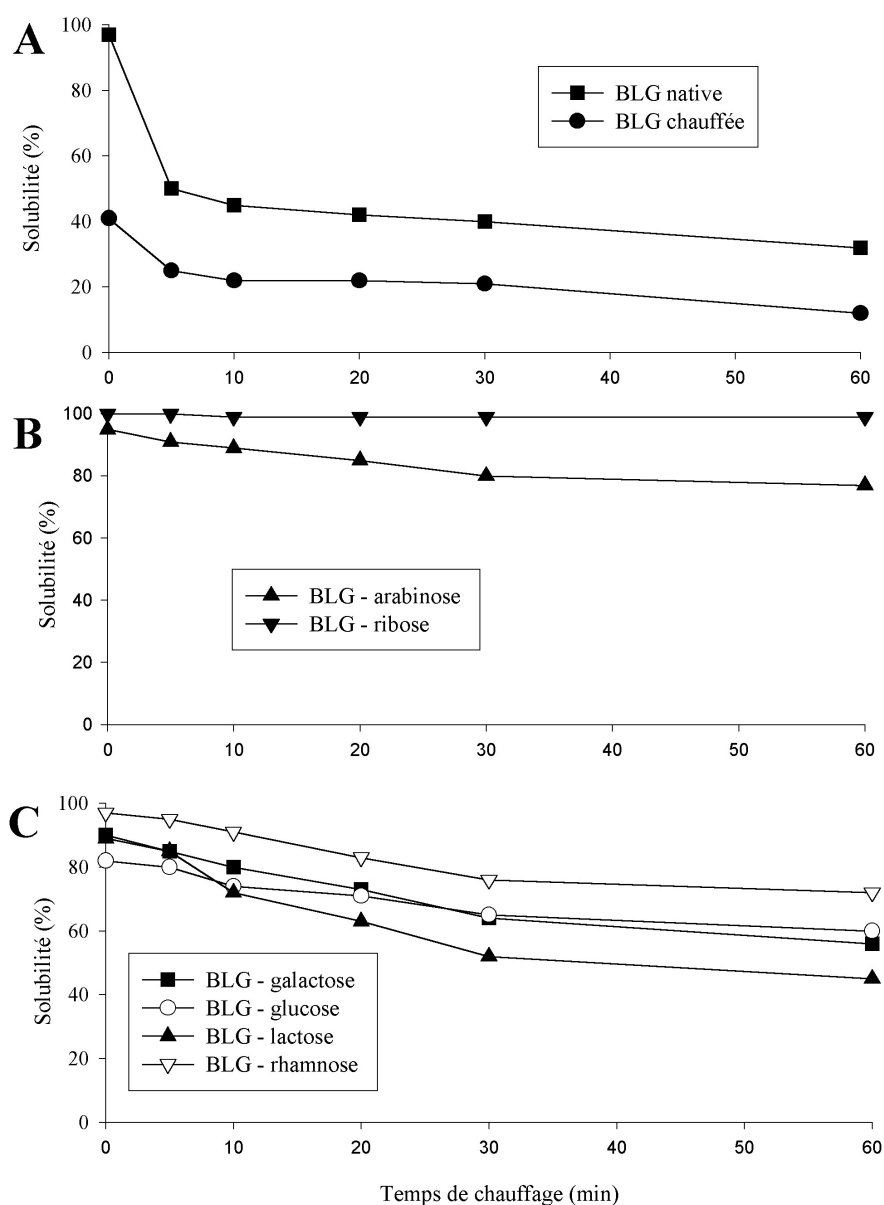


Figure 34 : Stabilité thermique à 80°C et pH 5 de la BLG native ou chauffée (A), modifiée par le ribose ou l'arabinose (B) et modifiée par le galactose, le glucose, le lactose ou le rhamnose (C).

Une diminution rapide de la solubilité a été observée pour la BLG native (de 100 à 40%) et pour la BLG chauffée en absence de sucres (de 40 à 25%) dans les dix premières minutes d'incubation à 80°C (Fig. 34 **A**). Par contre, une diminution lente de la solubilité a été observée pour les échantillons de BLG modifiée par les sucres (Fig. 34 **B** et **C**).

La BLG native et la BLG chauffée étaient très sensibles à l'incubation lorsqu'elle était réalisée à un pH proche de leur pI (pH 5) c'est-à-dire dans des conditions où l'on est proche du minimum de solubilité de la BLG chauffée.

Afin d'étudier si ce phénomène peut aussi être observé pour les échantillons de BLG modifiée par les différents sucres, les protéines modifiées par l'arabinose ou le ribose ont été incubées à différentes températures et à pH 4 (Fig. 35 **A**) alors que les protéines modifiées par le galactose, le glucose, le lactose ou le rhamnose étaient incubées à différentes températures à pH 4,5 (Fig. 35 **B**).

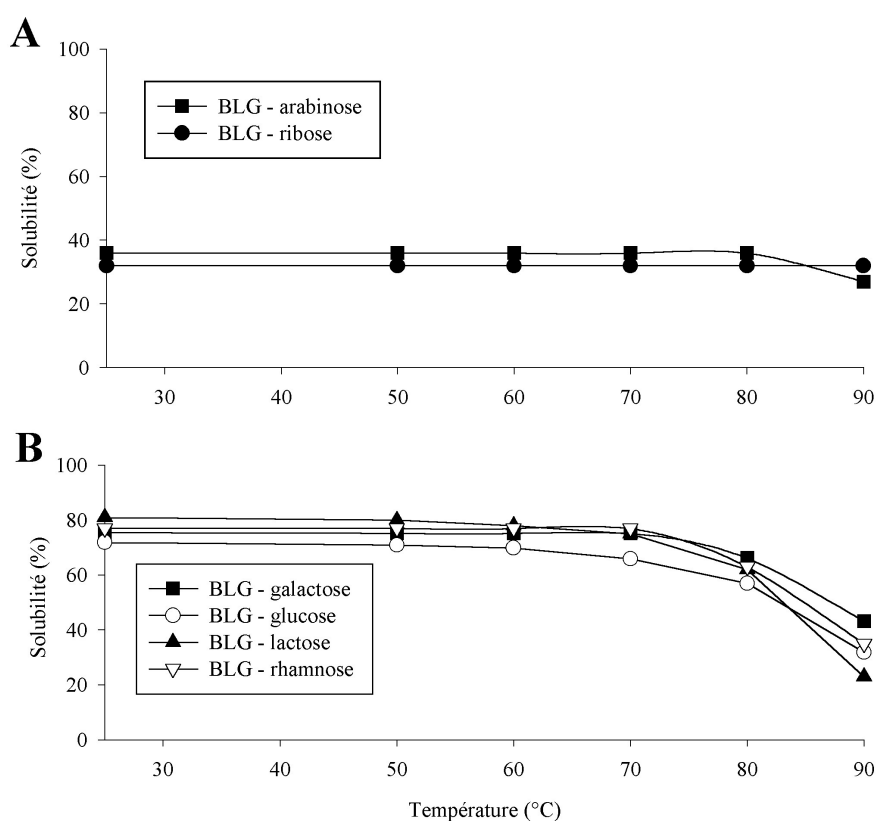


Figure 35 : Stabilité thermique à pH 4 de la BLG modifiée par l'arabinose ou le ribose (**A**) ; stabilité thermique à pH 4,5 de la BLG modifiée par le galactose, le glucose, le lactose ou le rhamnose (**B**).

A pH 4, la solubilité de la BLG modifiée par le ribose ou l'arabinose est d'environ 35% (Fig. 32 **B**). La solubilité de ces échantillons n'était pas affectée par une incubation à pH 4, même après une heure à 90°C.

La solubilité des échantillons de BLG modifiée par le galactose, le glucose, le lactose ou le rhamnose incubés à pH 4,5 était constante lorsque la température d'incubation était inférieure à 70°C, puis elle diminuait de 75% à 70°C jusqu'à environ 40% à 90°C.

Ces résultats sont très semblables à ceux observés à pH 5, montrant ainsi que les protéines modifiées par différents sucres ne sont que faiblement affectées par un traitement thermique à un pH correspondant à leur minimum de solubilité.

3 – Estimation des propriétés émulsifiantes

Les propriétés émulsifiantes des échantillons de BLG native, chauffée ou modifiée par différents sucres ont été déterminées à pH 5 et à pH 7 en mesurant le diamètre moyen de la distribution de taille des gouttelettes d'huile ($d_{3,2}$) obtenu par granulométrie laser (Fig. 36).

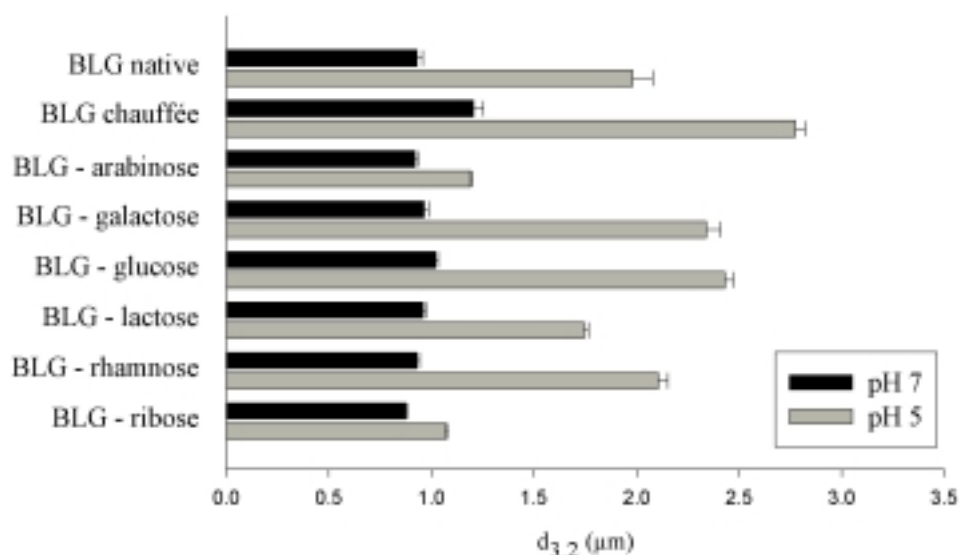


Figure 36 : Propriétés émulsifiantes de la BLG native, chauffée ou modifiée par différents sucres, déterminées par la mesure du diamètre moyen de la distribution de taille des gouttelettes d'huile ($d_{3,2}$) de l'émulsion.

A pH 7, le $d_{3,2}$ de tous les échantillons de BLG native, chauffée ou modifiée par les différents sucres était d'environ 1 μm .

Une différence de 0,4 μm a néanmoins été observée entre la BLG chauffée et les autres échantillons, montrant ainsi l'amélioration des propriétés émulsifiantes de la BLG chauffée en présence de sucres, comme l'avaient montré les travaux de Aoki *et al.* (1997).

A pH 5, une augmentation significative du $d_{3,2}$ a été observée pour la BLG native, chauffée ou modifiée par le galactose, le glucose, le lactose ou le rhamnose, les valeurs de $d_{3,2}$ étant situées entre 2,0 et 2,5 μm .

Par contre, le $d_{3,2}$ des échantillons de BLG modifiée par le ribose ou l'arabinose n'a pas augmenté dans la même proportion, sa valeur restant proche de 1,1 à 1,2 μm .

L'augmentation de la valeur du $d_{3,2}$ de la BLG chauffée peut être expliquée par une diminution de la solubilité puisque seulement 40% de l'échantillon de BLG chauffée étaient solubles à pH 5 (Fig. 32 A).

Dans le cas de la BLG native et de la BLG modifiée par le galactose, le glucose, le lactose ou le rhamnose, un autre facteur que la solubilité est responsable de cette augmentation du $d_{3,2}$ puisque ces échantillons étaient très solubles ($\geq 80\%$) à pH 5 (Fig. 32 A et C).

La BLG native présente une faible capacité à stabiliser les émulsions à un pH proche de son pI (Klemaszewski *et al.*, 1992), certainement parce qu'elle est présente sous une forme octamérique, gênant ainsi son adsorption à l'interface. Comme les échantillons de BLG modifiée par le galactose, le glucose, le lactose ou le rhamnose étaient les moins modifiés et présentaient une structure tertiaire proche de celle de la BLG native, ils peuvent adopter, au moins en partie, une conformation quaternaire proche de celle de la BLG native, limitant ainsi leur adsorption à l'interface.

4 – Estimation des propriétés moussantes

Les propriétés moussantes des échantillons de BLG native, chauffée ou modifiée par différents sucres ont été mesurées à pH 7. La capacité moussante et la stabilité de la mousse ont été déterminées par différents paramètres présentés dans le tableau 21.

La technique de formation de mousse par bullage a permis l'obtention de mousses avec tous les échantillons. Leur capacité moussante, déterminée par le M_{max} , était quasiment identique.

Echantillon	L_{\max} (ml)	L_{\min} (ml)	M_{\max} (ml)	$T_{1/2}$ (s)	M_{\min} (ml)	S_i (%)	MD ($\times 10^{-2}$)
BLG	3,01 \pm 0,21	0,73 \pm 0,07	30,4 \pm 0,06	100 \pm 4	21,8 \pm 2,47	71,7 \pm 0,41	10,0 \pm 0,05
BLG chauffée	4,90 \pm 0,13	1,28 \pm 0,12	32,3 \pm 0,04	346 \pm 14	27,6 \pm 0,68	85,5 \pm 0,17	15,0 \pm 0,09
BLG - arabinose	4,25 \pm 0,10	0,93 \pm 0,09	31,7 \pm 0,15	270 \pm 15	11,9 \pm 1,19	37,5 \pm 0,79	13,4 \pm 0,17
BLG - galactose	4,56 \pm 0,01	1,38 \pm 0,05	32,1 \pm 0,14	413 \pm 29	27,4 \pm 0,76	85,5 \pm 0,54	14,2 \pm 0,07
BLG - glucose	4,40 \pm 0,13	1,35 \pm 0,13	31,8 \pm 0,10	413 \pm 40	26,9 \pm 0,18	84,7 \pm 1,25	13,8 \pm 0,13
BLG - lactose	3,99 \pm 0,05	0,98 \pm 0,06	31,4 \pm 0,03	297 \pm 6	21,8 \pm 3,13	69,4 \pm 0,10	12,7 \pm 0,12
BLG - rhamnose	4,33 \pm 0,07	1,23 \pm 0,14	31,8 \pm 0,07	387 \pm 34	23,6 \pm 2,83	74,3 \pm 0,40	13,6 \pm 0,10
BLG - ribose	4,38 \pm 0,16	1,12 \pm 0,15	31,8 \pm 0,10	313 \pm 35	12,0 \pm 1,81	37,8 \pm 1,81	13,8 \pm 0,11

Tableau 21 : Propriétés moussantes de la BLG native, chauffée ou modifiée par différents sucres.

La stabilité de la mousse, déterminée par le volume de mousse restant à la fin de l'expérience (M_{\min}) et l'index de stabilité (S_i), ont montré des différences entre la BLG modifiée par l'arabinose ou le ribose ($M_{\min} \approx 12$ ml), la BLG native ou modifiée par le lactose ou le rhamnose ($M_{\min} \approx 22$ ml) et la BLG chauffée ou modifiée par le galactose ou le glucose ($M_{\min} \approx 27$ ml).

La mousse obtenue avec les protéines les plus modifiées (BLG-arabinose et BLG-ribose) semblait la moins stable ($S_i \approx 37\%$). Par contre, la mousse obtenue avec les protéines les moins modifiées (BLG-lactose et BLG-rhamnose) présentait la même stabilité que celle obtenue avec la protéine native ($S_i \approx 70-74\%$). La meilleure stabilité a été obtenue avec les échantillons de BLG chauffée ou modifiée par le glucose ou le galactose ($S_i \approx 85\%$).

La mesure de la demi-vie de drainage ($T_{1/2}$) a montré que la BLG native présentait la valeur la plus basse avec seulement 100 s. Bien que le volume de mousse en fin d'expérience ait été très faible pour les protéines modifiées par le ribose ou l'arabinose, leur demi-vie de drainage a été trois fois plus grande que celle de la BLG native ($T_{1/2}$ ribose ≈ 310 s) révélant une augmentation de la rétention de liquide dans la mousse grâce à la modification par la réaction de Maillard.

Les courbes de volume de mousse et de volume de liquide dans la mousse de la BLG modifiée par le glucose et de la BLG modifiée par le ribose ont été comparées sur la figure 37.

Bien que la mousse réalisée avec la BLG modifiée par le ribose n'ait pas été très stable (le volume de mousse diminuait très rapidement dès la fin du bullage), la courbe correspondant au volume de liquide dans la mousse suivait la même pente que celle obtenue avec la BLG modifiée par le glucose, montrant ainsi une bonne rétention d'eau par rapport à sa faible stabilité.

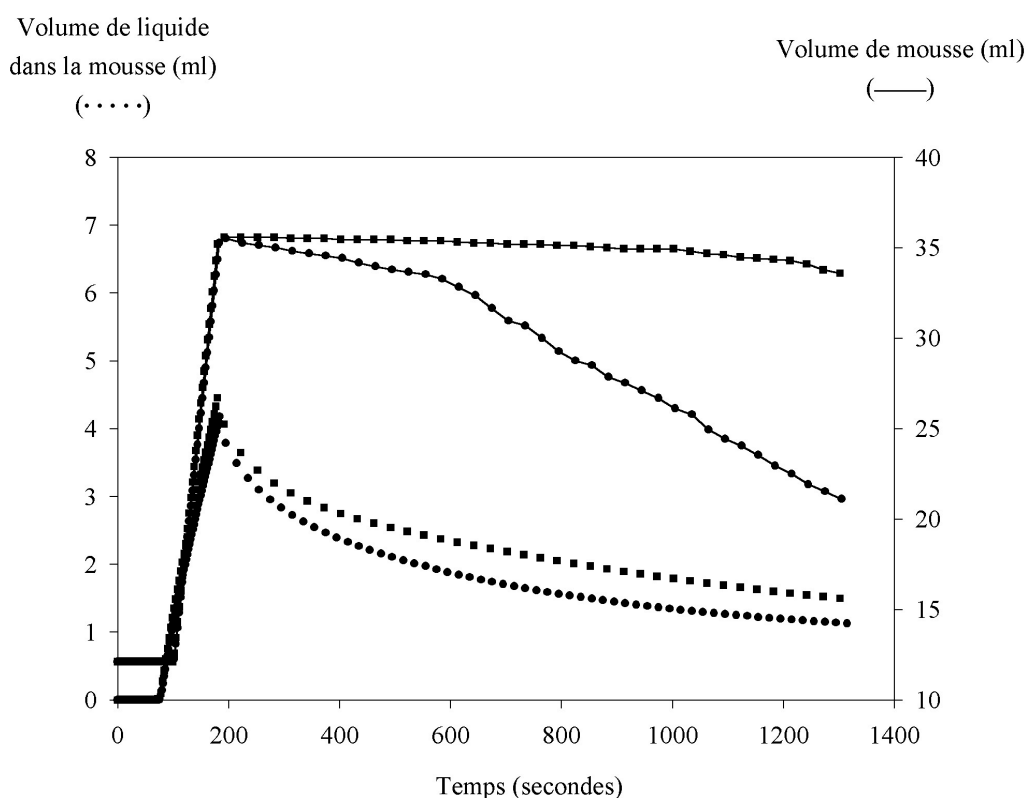


Figure 37 : Propriétés moussantes de la BLG modifiée par le glucose (■), ou le ribose (●) déterminées par le volume de liquide dans la mousse et le volume de mousse.

Cela a été confirmé par l'analyse de la densité de la mousse (M_{\min} / L_{\min}) : la mousse réalisée avec la BLG modifiée par le glucose avait la même densité que la mousse réalisée avec la BLG modifiée par le ribose ($MD \approx 14 \times 10^{-2}$). Une forte modification des protéines par la réaction de Maillard limite leur capacité à stabiliser les mousses mais augmente leur faculté à retenir l'eau dans la mousse.

Le meilleur compromis entre ces deux paramètres a été obtenu avec les protéines modifiées par le galactose ou le glucose qui ont permis d'obtenir une mousse présentant une bonne stabilité ($Si \approx 85\%$) et un faible drainage ($T_{1/2} \approx 413$ s).

D - Conclusion

1 – Mesure de la solubilité en fonction du pH

L'analyse de la solubilité, en fonction du pH, des échantillons de BLG chauffée ou modifiée par différents sucres a permis de mettre en évidence des changements dans les profils de solubilité en particulier dans la zone de pH proche du pI de la BLG native.

Le chauffage de la BLG durant 72 heures à 60°C a conduit à une perte de 60% de sa solubilité à pH 5. La présence de sucres a limité cette perte de solubilité à pH 5.

Le chauffage de la BLG en présence de sucres a conduit à un décalage du minimum de solubilité vers un pH plus acide. La BLG modifiée par le galactose, le glucose, le lactose ou le rhamnose avait un minimum de solubilité, à pH 4,5, d'environ 70%. La modification par l'arabinose ou le ribose (les sucres les plus réactifs) a accentué ce décalage du minimum de solubilité. La BLG modifiée par ces deux derniers sucres avait un minimum de solubilité, à pH 4, d'environ 35%.

L'acidification du pI, plus ou moins importante selon les sucres utilisés, est certainement la cause de ce décalage du minimum de solubilité. La neutralisation des charges des protéines à leur pI favorise leur agrégation et leur précipitation.

Comme les protéines modifiées par le galactose, le glucose, le lactose ou le rhamnose présentent un profil très hétérogène en isoélectrofocalisation, entre pH 5 et 4, seule une faible proportion de ces échantillons a précipité dans ce domaine de pH, montrant ainsi l'effet bénéfique de la présence de sucre sur le maintien de la solubilité de la BLG après un chauffage à 60°C.

Au contraire, les protéines modifiées par l'arabinose ou le ribose ont présenté un pI assez homogène, comme cela est montré par isoélectrofocalisation, conduisant à une précipitation importante autour de ce pH.

2 – Mesure de la stabilité thermique

A pH 7, aucune différence significative de la stabilité thermique n'a pu être mise en évidence entre la BLG native ou chauffée et la BLG modifiée par la réaction de Maillard.

A pH 5, les échantillons de BLG modifiée par différents sucres ont présenté dans l'ensemble une meilleure stabilité thermique par rapport à la BLG native et à la BLG chauffée. A ce pH, la BLG native et la BLG chauffée ont presque totalement précipité après une heure de chauffage à 90°C, alors que la BLG modifiée par les sucres les plus réactifs (l'arabinose et le ribose) avait une solubilité supérieure à 70% et les protéines modifiées par les sucres les moins réactifs avaient une stabilité thermique intermédiaire.

Lors d'une incubation réalisée au pH de leur minimum de solubilité (pH 4 pour les échantillons de BLG-arabinose et BLG-ribose ; pH 4,5 pour les échantillons modifiés par les autres sucres), la solubilité des protéines modifiées par différents sucres a été maintenue jusqu'à une température de 70°C. Au-delà, la solubilité des protéines modifiées par les sucres les moins réactifs a significativement diminué. Ces résultats sont en accord avec les analyses de microcalorimétrie qui avaient montré une augmentation de 10°C de la température de transition des protéines modifiées par le galactose, le glucose, le lactose ou le rhamnose par rapport à la protéine native dont la stabilité thermique à son pI diminuait à partir de 60°C.

Les échantillons les plus modifiés (BLG-arabinose et BLG-ribose) ont présenté la meilleure stabilité thermique quel que soit le pH. Malgré une perte importante de solubilité à pH 4, la solubilité de ces échantillons était constante quelle que soit la température d'incubation.

3 – Estimation des propriétés émulsifiantes

A pH 7, la modification de la BLG par les sucres a légèrement amélioré ses propriétés émulsifiantes par rapport à celles de la BLG chauffée seule.

Par contre, à pH 5, seuls les échantillons de BLG modifiée par le ribose ou l'arabinose ont des propriétés émulsifiantes proches de celles obtenues à pH 7. Il semble donc qu'un fort taux de modification soit nécessaire pour obtenir de bonnes propriétés émulsifiantes. En plus de leur excellente solubilité à pH 5, la désorganisation de la conformation et le dépliement de la structure de la protéine peuvent expliquer de telles propriétés émulsifiantes.

Au contraire, dans le cas de la BLG modifiée par les sucres les moins réactifs, un certain maintien des structure tertiaires et quaternaires pourrait expliquer leurs faibles propriétés émulsifiantes, proches de celles de la BLG native.

4 – Estimation des propriétés moussantes

Les mousses réalisées avec la BLG native ou la BLG modifiée par les sucres les moins réactifs (lactose et rhamnose) avaient une mauvaise aptitude à la rétention d'eau. La modification de la BLG par les sucres les plus réactifs (ribose et arabinose) a permis d'améliorer sensiblement la rétention d'eau. Par contre, la mousse était alors bien moins stable. La BLG chauffée seule a permis d'obtenir une mousse avec une excellente stabilité et une rétention d'eau intermédiaire. La modification de la BLG par le galactose ou le glucose a permis de conserver une stabilité équivalente à celle obtenue avec les mousses réalisées avec la BLG chauffée seule, et conduisant à une meilleure rétention d'eau.

L'utilisation du galactose et du glucose lors de la modification de la BLG a donc permis de réaliser des mousses avec de meilleures propriétés de stabilité et de rétention d'eau. Ces sucres ont une réactivité intermédiaire dans la réaction de Maillard et représentent un compromis pour obtenir les meilleures propriétés moussantes. Lorsque la protéine est modifiée par des sucres très réactifs, les interactions électrostatiques entre les protéines à l'interface déstabilisent la mousse. Par contre, lorsque la protéine est modifiée par des sucres peu réactifs, la rétention d'eau de la mousse est faible car la structure de la protéine à l'interface est très proche de celle de la protéine native.

CHAPITRE 3 :

ETUDE DES PROPRIETES BIOLOGIQUES DES PROTEINES MODIFIEES

Une partie des travaux présentés dans ce chapitre a fait l'objet d'une publication :

Chevalier F., Chobert J.-M., Genot C., Haertlé T. (2001d) Scavenging of free radicals, anti-microbial and cytotoxic activities of the Maillard reaction products of β -lactoglobulin glycosylated with several sugars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 5031-5038.

A - Introduction

1 – Peptides du lait à activités biologiques

La recherche de substances biologiquement actives dans le lait fait l'objet de nombreuses recherches en vue de la commercialisation de produits laitiers aux pouvoirs bénéfiques pour la santé humaine. Libérées après protéolyse de certaines protéines laitières par des enzymes digestives, de nombreuses substances biologiquement actives ont été identifiées (Tab. 22). Une fois libérés dans le corps, ces peptides peuvent agir comme des composés régulateurs avec une activité proche de celle des hormones (Meisel, 1997).

Ils peuvent ainsi exercer des effets :

- sur les défenses de l'organisme (propriétés antimicrobiennes ou immunostimulantes) ;
- sur le système cardiovasculaire (propriétés antithrombotiques ou antihypertenseurs par inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine) ;
- sur le système nerveux (propriétés opioïdes agonistes ou antagonistes).

2 – La glycation pour générer de nouvelles activités biologiques

La modification des protéines par la réaction de Maillard est aussi connue pour induire une large variété de propriétés biologiques nouvelles dans des systèmes alimentaires ou non qui en étaient dépourvus. Comme cela a été décrit dans la première partie, cette réaction permet la formation de produits présentant des propriétés antioxydantes, antibiotiques, antiallergènes ou antimutagènes. Dans certains cas, cette réaction favorise aussi une réduction de la valeur nutritive des aliments avec la génération de composés toxiques.

La BLG permet la formation de peptides à activité opioïde et inhibant l'enzyme de conversion de l'angiotensine (Meisel, 1997). Par contre, son rôle biologique est encore méconnu même si son appartenance à la famille des lipocalines laisse supposer une fonction dans le transport de petites molécules hydrophobes.

Origine	Fragment	Nom	Activité
Caséine α_{S1}	23-27	α_{S1} -casokinine 5	ACE inhibiteur
	28-34	α_{S1} -casokinine 7	ACE inhibiteur
	43-58	α_{S1} -caséinophosphate	fixation de minéraux
	59-79	α_{S1} -caséinophosphate	fixation de minéraux
	90-96	α_{S1} -caséine exorphine	opioïde agoniste
	91-96	α_{S1} -caséine exorphine	opioïde agoniste
	91-92	/	ACE inhibiteur
	194-199	α_{S1} -casokinine 6	ACE inhibiteur
	194-199	α_{S1} -casokinine 6	immunostimulante
Caséine β	1-25	β -caséinophosphate	fixation de minéraux
	60-64	β -casomorphine 5	opioïde agoniste
	60-70	β -casomorphine 11	opioïde agoniste
	60-66	β -casomorphine 7	opioïde agoniste
	63-68	/	immunostimulante
	177-183	β -casokinine 7	ACE inhibiteur
	191-193	/	immunostimulante
	193-202	β -casokinine 10	ACE inhibiteur
Caséine κ	25-34	Casoxine C	opioïde antagoniste
	35-42	Casoxine A	opioïde antagoniste
	58-61	Casoxine B	opioïde antagoniste
	103-111	casoplatéline	antithrombotique
	113-116	casoplatéline	antithrombotique
BLG	102-105	β -lactorphine	opioïde agoniste
	102-105	β -lactorphine	ACE inhibiteur
	104-105	/	ACE inhibiteur
α -lactalbumine	18-19	/	ACE inhibiteur
	18-19	/	immunostimulante
	50-51	/	ACE inhibiteur
	50-53	α -lactorphine	opioïde agoniste
	50-53	α -lactorphine	ACE inhibiteur
Lactoferrine	17-41	lactoferricine	antimicrobien
Sérum albumine	399-404	serorphine	opioïde agoniste

Tableau 22 : *Activité biologique des peptides issus de la protéolyse des protéines lactières (Meisel, 1997, 1998).*

ACE inhibiteur : inhibe l'activité de l'enzyme de conversion de l'angiotensine.

La modification de la BLG par la réaction de Maillard peut permettre :

- de générer de nouvelles propriétés biologiques ;
- de modifier sa sensibilité pour les enzymes protéolytiques et ainsi permettre la formation de peptides nouveaux présentant, *in vitro*, de nouvelles propriétés biologiques.

Dans le but d'étudier dans quelle mesure la glycation de la BLG par différents sucres peut générer de nouvelles fonctions biologiques, les propriétés antiradicalaires, antibiotiques et cytotoxiques des protéines et des hydrolysats de protéines modifiées par la réaction de Maillard ont été analysées.

B - Matériel et Méthodes

1 – Hydrolyse de la BLG

La BLG native, chauffée ou modifiée (72 heures à 60°C) par les différents sucres a été solubilisée (2 mg/ml) dans une solution d'acide acétique 0,2 M de pH 2,5 pour l'hydrolyse pepsique et dans un tampon de carbonate d'ammonium 30 mM de pH 7,9 pour l'hydrolyse trypsique. Ces tampons volatils ont été utilisés pour la solubilisation des échantillons afin de permettre la lyophilisation des échantillons après hydrolyse. La pepsine, solubilisée dans de l'eau distillée (1 mg/ml), a été ajoutée au milieu réactionnel avec un rapport enzyme/substrat (E/S) de 1/100 (P/P). La trypsine, solubilisée dans de l'HCl 10 mM (1 mg/ml), a été ajoutée au milieu réactionnel avec un rapport enzyme/substrat (E/S) de 1/100 (P/P). Le mélange a été incubé à 37°C pendant 120 minutes. Le degré d'hydrolyse a été contrôlé par HPLC en phase inversée, puis les hydrolysats ont été congelés et conservés à -20°C avant lyophilisation.

2 – Séparation des hydrolysats par HPLC en phase inversée

L'équipement de chromatographie liquide hautes performances était composé d'un module de séparation de type WatersTM 2690 avec solvants intégrés, d'une plate-forme de contrôle des échantillons et d'un détecteur à barrettes de diodes modèle WatersTM 996. Le système était piloté par le programme Millennium^{®32} (Waters).

Les peptides ont été séparés sur une colonne Symmetry 300 Å C₁₈ (3,9 mm x 150 mm, Waters, USA), équilibrée avec 80% de solvant A (acide trifluoroacétique/H₂O ; 0,11/99,89 ; V/V) et 20% de solvant B (acétonitrile/H₂O/acide trifluoroacétique ; 80/19,91/0,09 ; V/V/V). L'élution a été réalisée à l'aide du gradient présenté dans le tableau 23.

La température de la colonne et des solvants a été maintenue à 30°C. Le débit était de 0,6 ml/min. Les pics ont été détectés à 214 nm. Pour chaque échantillon, l'aire du pic correspondant à la forme non-hydrolysée de la protéine a été calculée. Les aires relatives ont été calculées par rapport à l'aire du pic de l'échantillon non-hydrolysé qui représente 100%.

Temps (min)	Solvant A (%)	Solvant B (%)
	0,11% TFA, 99,89% H ₂ O	80% acétonitrile, 19,91% H ₂ O, 0,09% TFA
0	80	20
30	0	100
31	80	20

Tableau 23 : Gradient d'éluion utilisé pour la séparation par HPLC en phase inversée des peptides issus de l'hydrolyse par la trypsine et par la pepsine de la BLG native ou modifiée par les différents sucres.

3 - Tests d'activité antiradicalaire

L'activité antiradicalaire a été mesurée en utilisant un radical libre stable, le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle). Sous sa forme radicalaire, ce composé absorbe à 515 nm. Après sa réduction par un composé antioxydant, son absorption disparaît, ce qui permet d'estimer l'activité antiradicalaire d'un composé (Brand-Williams *et al.*, 1995).

Les échantillons de protéines et de peptides ont été solubilisés dans de l'eau distillée à différentes concentrations et 0,1 ml de chaque échantillon a été mélangé à 0,9 ml de solution de DPPH à 6.10^{-5} M dans du méthanol.

Des expériences ont été réalisées en cinétique en utilisant un spectrophotomètre CARY 13. La diminution d'absorption à 515 nm a été mesurée toutes les 30 secondes pendant 30 minutes à 25°C avec une concentration constante en protéines de 5 mg/ml.

Les mesures en point final ont été réalisées avec différentes concentrations de protéines et de peptides (de 0,1 à 5 mg/ml). Le mélange de protéines ou de peptides avec le DPPH a été incubé à 25°C pendant 30 minutes et l'absorption à 515 nm a alors été mesurée.

Pour toutes ces expériences, de l'eau distillée a été utilisée comme contrôle négatif (blanc) à la place de l'échantillon. De l'acide gallique à une concentration de 60 µM a été utilisé comme contrôle positif antiradicalaire.

L'activité antiradicalaire (Act AR) des échantillons a été calculée à partir de la formule :

$$\text{Act AR} = [1 - (\text{Abs}_{515\text{nm}} \text{ échantillon} / \text{Abs}_{515\text{nm}} \text{ blanc})] \times 100$$

Les IC.50 et IC.10 correspondent à la concentration d'un échantillon (en mg/ml) nécessaire pour obtenir une inhibition de l'activité radicalaire du DPPH de respectivement 50 et 10%.

4 - Tests d'activité antibactérienne

Différentes espèces bactériennes ont été utilisées pour les tests (Tab. 24).

Souche bactérienne	Morphologie	Milieu de culture		Température de culture (°C)	Temps de culture (h)
		Liquide	Solide		
Escherichia coli (CIMBSA HB 101)	Bacille Gram -	BHI	PCA	37	24
Bacillus subtilis (ATCC 6633)	Bacille Gram +	BHI	PCA	37	24
Streptococcus mutans (CIP 103220 T)	Coque Gram +	BHI	PCA	37	24
Listeria innocua F (ENITIAA)	Bacille Gram +	BHI	Eliker	30	48

Tableau 24 : Souches bactériennes utilisées lors des tests d'activités antimicrobiennes.

BHI : Bouillon cœur-cerveille (*Brain Heart Infusion*) ;

PCA : gélose pour numération (*Plate count Agar*).

CIMBSA : Collection de l'Institut de Microbiologie de l'Académie des Sciences de Bulgarie ;

ATCC : American Type Culture Collection ;

CIP : Collection de l'Institut Pasteur ;

ENITIAA : Ecole Nationale d'Ingénieur des Techniques des Industries Agricoles et Alimentaire de Nantes.

Les échantillons de protéines et de peptides ont été dissous dans de l'eau distillée à 1mg/ml et filtrés sur une membrane dont les pores mesuraient 0,22 µm de diamètre, puis ils ont été conservés à 4°C pour les différentes méthodes d'analyse.

Trois méthodes ont été utilisées pour estimer l'activité antibactérienne des échantillons de protéines et de peptides :

- **Diffusion en surface** : 10, 25 et 50 µl de chaque solution ont été déposés sur un disque de papier (Whatman 1) de 6 mm de diamètre, puis les disques ont été séchés sous une hotte à flux laminaire. Une pré-culture de 24 heures a été réalisée avec chaque souche en utilisant du bouillon BHI (Brain Heart Infusion). 10 µl de cette culture ont été mélangés avec 10 ml d'eau distillée. Cette suspension a été appliquée sur toute la surface du milieu gélosé adéquat. L'excès de suspension a été retiré et la boîte ainsiensemencée a séché pendant 5 minutes sous le flux laminaire. Puis les disques de papier ont été déposés à la surface des géloses et les boîtes ont été placées dans une étuve à la température et pour la durée correspondant à la souche utilisée (Tab. 24). Après la culture, les boîtes ont été retirées de l'étuve et les zones d'inhibition autour des disques de papier ont été mesurées.
- **Diffusion dans la masse** : une pré-culture de 24 heures a été réalisée avec chaque souche en utilisant du bouillon BHI. 10 µl de cette culture ont été mélangés avec 10 ml d'eau distillée. Cette suspension a été doucement mélangée avec 90 ml du milieu gélosé adéquat maintenu en surfusion à 55°C. Le milieu contenant les bactéries a été coulé dans les boîtes de Pétri puis il a été laissé se solidifier à 4°C pendant 30 minutes. Des puits ont ensuite été réalisés dans la gélose avec un emporte-pièce de 5 mm de diamètre stérilisé sur la flamme. 50 ou 100 µl des différents échantillons ont été déposés dans les puits. Après 10 minutes de diffusion à température ambiante, les boîtes ont été placées dans une étuve à la température correspondant à la souche utilisée (Tab. 24). Après la culture, les boîtes ont été retirées de l'étuve et les zones d'inhibition autour des puits ont été mesurées.
- **Homogénéisation en milieu liquide** : une pré-culture de 24 heures a été réalisée avec chaque souche en utilisant du bouillon BHI. 50 µl de cette culture ont été mélangés avec 50 ml de bouillon BHI stérile dans un Erlenmeyer de 100 ml. La suspension a été placée sous agitation à la température correspondant à la souche utilisée (Tab. 24) jusqu'à obtenir une absorption à 600 nm de 0,4. Puis 25 ml de cette suspension ont été répartis dans 5 tubes contenant 100 µl de l'échantillon à tester (à raison de 5 ml par tube). Chaque tube a ensuite été placé sous agitation à la température correspondant à la souche utilisée, et aux temps 0, 1, 2, 3 et 4 h, un tube a été retiré de l'étuve. L'absorption à 600 nm a ainsi été mesurée et le pourcentage d'inhibition correspondant à chaque échantillon a été calculé.

5 - Tests d'activité cytotoxique

Deux lignées cellulaires ont été utilisées pour estimer l'activité cytotoxique des échantillons de protéines et de peptides.

La lignée COS-7 (fibroblastes de reins de singe) a été cultivée en monocouche dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Media, Gibco) supplémenté avec 10% (V/V) de sérum de veau foetal, de la pénicilline (50 U/ml) et de la streptomycine (50 µg/ml). Les cellules ont été cultivées à 37°C en présence de 5% de CO₂ et de 95% d'humidité relative.

La lignée HL-60 (prémyéloblastes humains) a été cultivée dans du milieu RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute, Gibco) supplémenté avec 20% (V/V) de sérum de veau foetal, de la pénicilline (50 U/ml) et de la streptomycine (50 µg/ml). Les cellules ont été cultivées à 37°C en présence de 5% de CO₂ et de 95% d'humidité relative.

Le test était basé sur la transformation du sel de tétrazolium (MTT) en un composé bleu, le formazan, par une enzyme mitochondriale. Cette conversion ne peut avoir lieu que dans les cellules vivantes et la quantité de formazan détectée à 540 nm est proportionnelle au nombre de cellules présentes.

50 µl de milieu de culture contenant 40 000 cellules/ml ont été mélangés dans une microplaque de 96 puits avec 50 µl de chaque échantillon dissous dans le même milieu à différentes concentrations. Après 72 heures d'incubation à 37°C, 25 µl de MTT à 2,5 mg/ml dans du PBS (Phosphate Buffer Saline) ont été ajoutés dans chaque puits et laissés en contact 4 heures à 37°C. Puis 100 µl de SDS 10% (P/V) ont été ajoutés dans chaque puits et laissés en contact 24 heures à 37°C. Les plaques ont ensuite été lues à 540 nm.

Le pourcentage de cytotoxicité a été estimé d'après le calcul :

$$\text{Inhibition (\%)} = [1 - (\text{Abs}_{540\text{nm}} \text{ échantillon}) / (\text{Abs}_{540\text{nm}} \text{ contrôle})] \times 100$$

C - Résultats

1 - Susceptibilité à l'hydrolyse pepsique et trypsique de la BLG native ou modifiée par la réaction de Maillard

Les échantillons de protéine ont été hydrolysés par la pepsine et par la trypsine et la quantité de protéine non hydrolysée a été analysée par RP-HPLC. L'aire du pic correspondant à la protéine restant non hydrolysée a été calculée et rapportée à celle obtenue avant l'hydrolyse de la protéine (Tab. 25).

Echantillon	Aire relative du pic correspondant à la protéine non hydrolysée (%)	
	Après hydrolyse pepsique	Après hydrolyse trypsique
BLG native	95	7
BLG chauffée	85	3
BLG-arabinose	39	48
BLG-galactose	40	19
BLG-glucose	42	17
BLG-lactose	74	13
BLG-rhamnose	56	24
BLG-ribose	28	97
SAB	0	0

Tableau 25 : Comparaison de la susceptibilité à l'hydrolyse pepsique et trypsique de la BLG native, chauffée ou modifiée par différents sucres et de la SAB.

Les hydrolysats ont été utilisés pour les analyses d'activités antiradicalaire, antimicrobienne et cytotoxique. La proportion de protéines hydrolysées par rapport à celle des protéines non hydrolysées peut permettre une analyse plus précise de ces activités biologiques.

Comme cela avait été montré dans l'étude structurale de la BLG modifiée par différents sucres (§ 2.3.3), plus la protéine est modifiée, plus elle est sensible à l'hydrolyse pepsique. Ainsi, les échantillons de BLG native ou chauffée en absence de sucres étaient résistants à

l'hydrolyse pepsique. Environ 95 et 85%, respectivement de la BLG native ou de la BLG chauffée en absence de sucre, n'ont pas été hydrolysés par la pepsine après 120 minutes d'incubation à 37°C avec l'enzyme. La BLG chauffée en présence de lactose (le sucre le moins réactif) était la protéine modifiée la plus résistante à la pepsine puisque 74% des protéines restaient non hydrolysées. Les hydrolysats pepsiques de la BLG modifiée par le rhamnose, le glucose ou le galactose montraient respectivement que 56, 42 et 40% des protéines n'étaient pas hydrolysées. Les échantillons de BLG chauffée en présence d'arabinose ou de ribose (les sucres les plus réactifs) étaient les plus sensibles à la pepsine car respectivement 39 et 28% des protéines demeuraient non hydrolysées.

Le phénomène inverse a été observé en utilisant la trypsine : plus la protéine est modifiée, moins elle est sensible à l'hydrolyse trypsique (§ 1.1.4 et 2.1.2). Ainsi, les échantillons correspondant à la BLG modifiée par les sucres les plus réactifs (arabinose et ribose) renfermaient respectivement 48 et 97% de protéines non hydrolysées par la trypsine. En ce qui concerne les autres échantillons un maximum de 24% de protéines non hydrolysées était obtenu avec la BLG modifiée par le rhamnose et un minimum de 7 et 3% de protéines non hydrolysées était respectivement mesuré pour la protéine chauffée en absence de sucre et pour la protéine native.

Dans les mêmes conditions d'hydrolyse, la SAB était totalement hydrolysée par la pepsine et par la trypsine.

2 - Tests d'activité antiradicalaire : évaluation de l'activité antioxydante de la BLG native ou modifiée par la réaction de Maillard

Les propriétés antiradicalaires de la BLG native, chauffée seule ou en présence de différents sucres ont été testées avec les protéines non hydrolysées ou hydrolysées par la pepsine ou la trypsine.

Une étude par cinétique a été réalisée dans le but d'estimer le temps nécessaire pour obtenir une absorption relativement stable du DPPH après sa mise en présence avec les différents échantillons (Fig. 38).

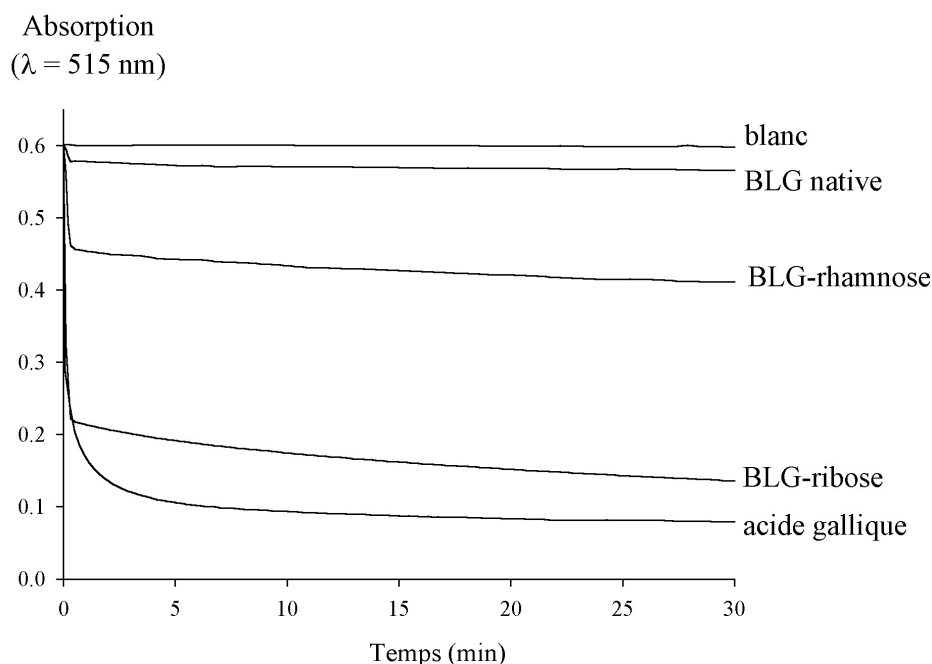


Figure 38 : Mesure par absorption à 515 nm de la disparition du DPPH seul (blanc) ou en présence de BLG native ou modifiée par le rhamnose ou le ribose, ou en présence d'acide gallique.

Pour chaque échantillon, la réaction a été très rapide dans les cinq premières minutes de contact avec le DPPH ; après 30 minutes, la réaction a été considérée stable et l'absorption a pu être mesurée.

Les activités antiradicalaires des différents échantillons sont reportées sur la figure 39. Les concentrations en échantillon inhibant 10% (IC.10) et 50% (IC.50) de l'activité radicalaire du DPPH sont reportées dans le tableau 26.

Pour les échantillons de BLG native, chauffée en absence de sucre et pour la SAB, l'activité antiradicalaire correspondant à la plus forte concentration utilisée en protéines ou en peptides (5 mg/ml) était inférieure à 10% (Fig. 39). Pour cette raison, l'IC.10 et l'IC.50 de ces échantillons n'ont pas pu être déterminées car elles correspondaient à une concentration en protéines supérieure à 5 mg/ml (Tab. 26). Une activité antiradicalaire d'environ 7% a été observée pour tous ces échantillons, soulignant la faible aptitude des protéines à capter les radicaux libres avant leur glycation.

La BLG non hydrolysée modifiée par la réaction de Maillard a présenté une activité antiradicalaire supérieure à celle des protéines non modifiées (BLG, BLG chauffée et SAB).

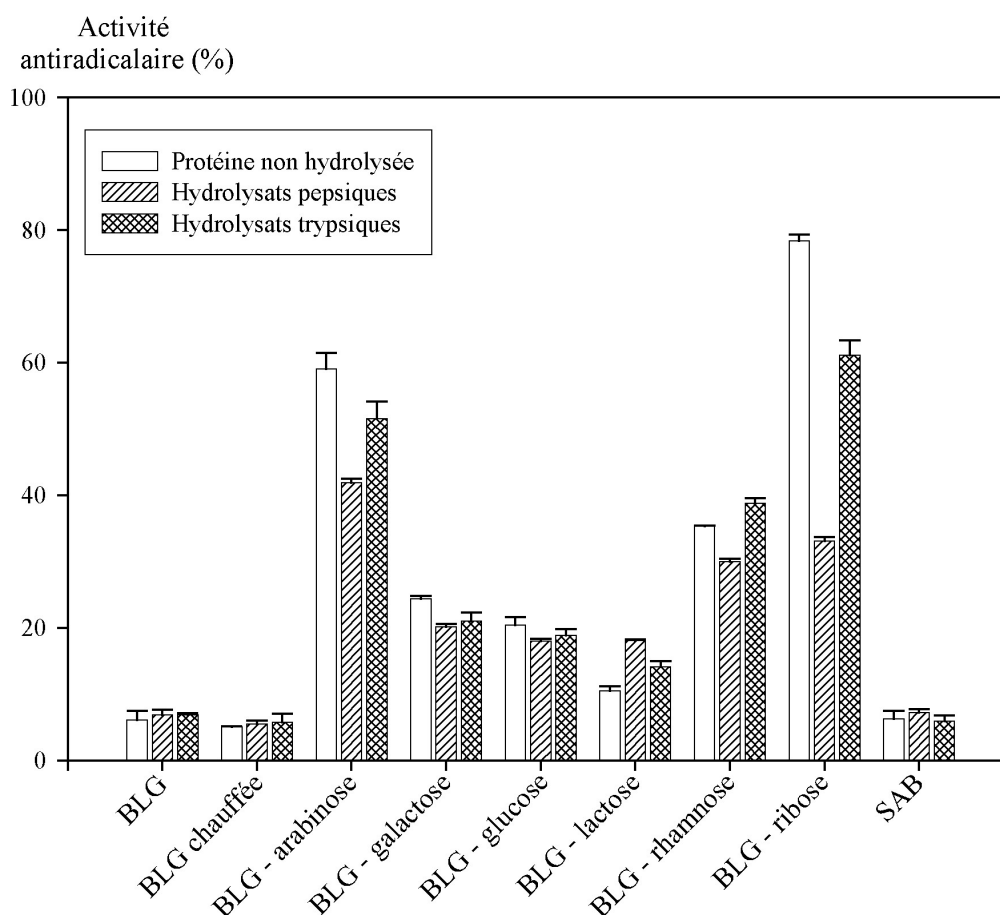


Figure 39 : *Activité antiradicalaire de la BLG native, chauffée ou modifiée par l'arabinose, le galactose, le glucose, le lactose, le rhamnose ou le ribose et de la SAB, non hydrolysées, hydrolysées par la pepsine et hydrolysées par la trypsine.*

L'activité la plus importante a été mesurée avec l'échantillon de BLG modifiée par le ribose (80%). La BLG modifiée par l'arabinose a présenté environ 60% d'activité antiradicalaire et la BLG modifiée par le rhamnose, le glucose, le galactose ou le lactose, présentait respectivement 35, 24, 20 et 10% d'activité.

Hormis celle obtenue avec l'échantillon de BLG modifiée par le rhamnose, les activités antiradicalaires observées pour les échantillons de BLG non hydrolysée étaient directement liées au taux de glycation. Cette observation est en accord avec les travaux de Nishino *et al.* (2000) qui ont mis en évidence l'aptitude des protéines lactières modifiées par la réaction de Maillard à capter des radicaux libres.

Echantillons	Protéines		Hydrolysats pepsiques		Hydrolysats tryptiques	
	I.C.10 (mg/ml)	I.C.50 (mg/ml)	I.C.10 (mg/ml)	I.C.50 (mg/ml)	I.C.10 (mg/ml)	I.C.50 (mg/ml)
BLG native	> 5	> 5	> 5	> 5	> 5	> 5
BLG chauffée	> 5	> 5	> 5	> 5	> 5	> 5
BLG-arabinose	0,9	4,0	1,4	> 5	1,0	4,8
BLG-galactose	2,0	> 5	2,5	> 5	2,4	> 5
BLG-glucose	2,1	> 5	2,4	> 5	2,6	> 5
BLG-lactose	4,7	> 5	2,8	> 5	3,5	> 5
BLG-rhamnose	1,4	> 5	1,7	> 5	1,3	> 5
BLG-ribose	0,6	2,7	1,5	> 5	0,8	3,8
BSA	> 5	> 5	> 5	> 5	> 5	> 5

Tableau 26 : *Activité antiradicalaire des protéines et de leurs hydrolysats pepsiques et tryptiques mesurée par la détermination de leurs IC.10 et IC.50.*

En ce qui concerne les activités antiradicalaires des protéines non-hydrolysées, les différents échantillons modifiés par la réaction de Maillard peuvent être classés du moins actif au plus actif :

BLG-lactose < $\begin{matrix} \text{BLG-glucose} \\ \text{BLG-galactose} \end{matrix}$ < BLG-rhamnose < BLG-arabinose < BLG-ribose

Le taux de glycation n'explique pas entièrement l'activité antiradicalaire des échantillons de BLG modifiée. Dans le cas de la BLG modifiée par le rhamnose, une activité antiradicalaire d'environ 10% de plus que celle obtenue avec la BLG modifiée par le glucose ou le galactose a été mesurée alors que ces trois échantillons ont un taux de modification quasi-identique. Une aptitude particulière de ce sucre à former des composés antiradicalaires pourrait expliquer une telle différence.

Afin d'analyser l'influence de la nature du sucre et du taux de modification sur l'activité antiradicalaire des protéines modifiées, des courbes montrant le nombre de groupes amines primaires réactifs pour chaque sucre en fonction de l'activité antiradicalaire ont été réalisées (Fig. 40).

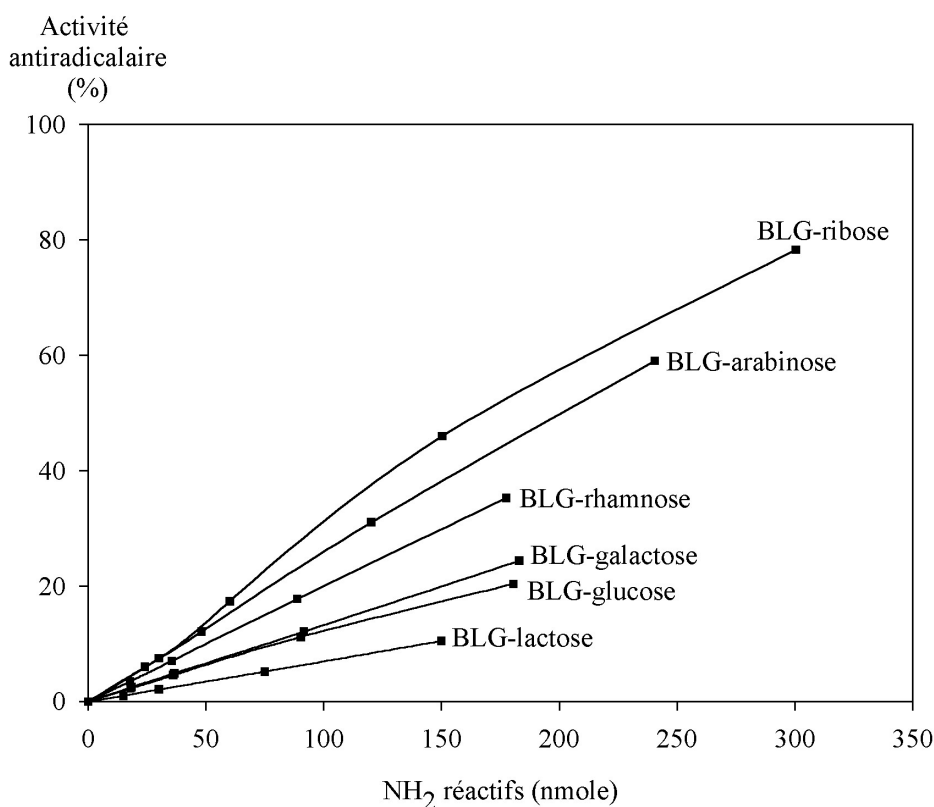


Figure 40 : Activité antiradicalaire de la BLG modifiée par l'arabinose, le galactose, le glucose, le lactose, le rhamnose ou le ribose en fonction du nombre de groupes NH₂ réactifs de la BLG.

Ces différentes courbes montrent que l'activité radicalaire est en relation non seulement avec le taux de modification mais aussi avec la nature du sucre utilisé. En effet, dans le cas de la BLG modifiée par le lactose ou le ribose, pour un nombre de groupes amines primaires réactifs de 150 nmole, une activité antiradicalaire de respectivement 10 et 46% a été mesurée. Si cette activité avait seulement été en relation avec le taux de modification, pour une même quantité de groupes amines primaires réactifs, une même activité aurait dû être observée, ce qui n'était pas le cas.

Différentes hypothèses peuvent être formulées pour expliquer cette différence d'activité. D'après la mesure du taux de modification de la BLG, le ribose est le sucre le plus réactif. Ce sucre permet peut-être la formation plus rapide d'une grande quantité de composés avancés de la réaction de Maillard.

Ces composés, souvent colorés et de nature polymérique (Chuyen, 1998 ; Friedman, 1996), ont pu être observés par l'étude des spectres d'absorption (Fig. 16 **B**) et par électrophorèse en présence de SDS (Fig. 30). A l'opposé, le lactose est le sucre le moins réactif ; il ne

permettrait pas la formation d'une grande quantité de composés avancés de la réaction de Maillard. D'après les spectres d'absorption des échantillons de BLG modifiée par le lactose, seule une petite quantité de composés colorés a été formée (Fig. 16 C). L'analyse par électrophorèse en présence de SDS ne montre pas une présence significative de composés de nature polymérique (Fig. 30).

En plus de leur différence de vitesse de réactivité, le ribose et le lactose ont une nature chimique et une structure différentes pouvant induire la formation de divers composés de Maillard ayant des activités antiradicalaires totalement différentes.

Afin d'observer l'influence de l'hydrolyse sur l'aptitude des protéines modifiées par la réaction de Maillard à capter des radicaux libres, l'activité antiradicalaire d'hydrolysats trypsiques et pepsiques des échantillons modifiés a été étudiée (Fig. 39 et Tab. 26).

Dans le cas des hydrolysats trypsiques, une activité antiradicalaire assez proche de celle de la protéine non hydrolysée a été observée pour les échantillons de BLG modifiée par le galactose, le glucose, le lactose ou le rhamnose. Néanmoins, une légère augmentation de l'activité antiradicalaire a été observée pour la BLG modifiée par le lactose ou le rhamnose. Cette augmentation pourrait s'expliquer par un démasquage de certains groupes antiradicalaires situés à l'intérieur de la molécule et rendus accessibles après hydrolyse trypsique.

La BLG modifiée par l'arabinose ou le ribose était la moins hydrolysée par la trypsine (Tab. 25). Pourtant, les différences les plus importantes ont été observées avec ces échantillons. Après trypsinolyse, une diminution de l'activité antiradicalaire de 8% pour la BLG modifiée par l'arabinose et de 17% pour la BLG modifiée par le ribose a été mesurée, correspondant à une augmentation respective de 0,8 et 1,1 mg/ml de leur I.C.50.

L'hydrolyse enzymatique n'est pas la seule cause de cette modification d'activité, en particulier dans le cas de la BLG modifiée par le ribose, car la protéine est quasiment entièrement résistante à l'hydrolyse trypsique. Dans ce cas, le traitement subi après hydrolyse (congélation, lyophilisation) pourrait être la cause de cette perte partielle d'activité antiradicalaire.

Les hydrolysats tryptiques des différents échantillons modifiés par la réaction de Maillard peuvent être classés par leurs activités antiradicalaires du moins actif au plus actif :

BLG-glucose
BLG-galactose < BLG-rhamnose < BLG-arabinose < BLG-ribose
BLG-lactose

Après pepsinolyse, l'activité antiradicalaire des échantillons de BLG modifiée par l'arabinose ou le ribose a respectivement diminué de 20 et 45%. Les autres échantillons n'ont pas présenté une telle diminution, leur activité antiradicalaire étant quasiment similaire à celle obtenue avec les protéines non hydrolysées ou hydrolysées par la trypsine. L'activité antiradicalaire de la BLG modifiée par le rhamnose est ainsi très proche de celle de la BLG modifiée par le ribose.

Les hydrolysats pepsiques des différents échantillons modifiés par la réaction de Maillard peuvent être classés par leurs activités antiradicalaires du moins actif au plus actif :

BLG-glucose
BLG-galactose < BLG-rhamnose < BLG-arabinose
BLG-lactose < BLG-ribose

Les activités antiradicalaires des échantillons de BLG modifiée par le galactose ou le glucose non hydrolysés ou hydrolysés par la trypsine étaient très proches malgré un taux d'hydrolyse de plus de 80% (Tab. 25). L'activité antiradicalaire de la BLG modifiée par le galactose ou le glucose n'a donc pas été influencée par une forte hydrolyse.

Par contre, dans le cas de la BLG modifiée par le ribose, une forte diminution de son activité antiradicalaire a été observée après son hydrolyse à plus de 70% par la pepsine (Tab. 25). Dans ce cas, une destruction de la structure tridimensionnelle de la protéine peut expliquer une telle diminution d'activité.

3 - Tests d'activité antibactérienne

Différentes espèces de bactéries ont été utilisées pour étudier l'activité antibiotique de la BLG modifiée par la réaction de Maillard (Tab. 24). Les hydrolysats trypsiques et pepsiques ont aussi été testés pour leur activité antibiotique avec les trois techniques utilisées.

3.1 - Diffusion en surface

Les échantillons ont été déposés sur des disques de papier placés à la surface d'une géloseensemencée en surface. Après diffusion de l'échantillon à la surface de la gélose, aucune zone d'inhibition de la croissance bactérienne n'a pu être mise en évidence avec les échantillons de BLG native, chauffée ou modifiée par les différents sucres. Les hydrolysats trypsiques et pepsiques ont également donné des résultats négatifs, similaires à ceux obtenus avec les protéines non hydrolysées. Aucune zone d'inhibition n'ayant pu être mesurée, aucun résultat concernant ces expériences n'est présenté.

3.2 - Diffusion dans la masse

Pour cette technique, les échantillons ont été déposés dans des puits creusés dans une géloseensemencée dans la masse. Après diffusion de l'échantillon dans la gélose, aucune zone d'inhibition de la croissance bactérienne n'a pu être mise en évidence avec les échantillons de BLG native, chauffée ou modifiée par les différents sucres. Les hydrolysats trypsiques et pepsiques ont aussi donné des résultats négatifs, similaires à ceux obtenus avec les protéines non hydrolysées. Aucune zone d'inhibition n'ayant pu être mesurée, aucun résultat n'est présenté.

3.3 - Homogénéisation en milieu liquide

Cette technique permet de suivre la croissance bactérienne en milieu liquide, en présence ou en absence des échantillons à tester. Les résultats obtenus avec la BLG native, chauffée ou modifiée par le lactose, le glucose ou le ribose sur la croissance de *Escherichia coli* HB 101 sont présentés sur la figure 41.

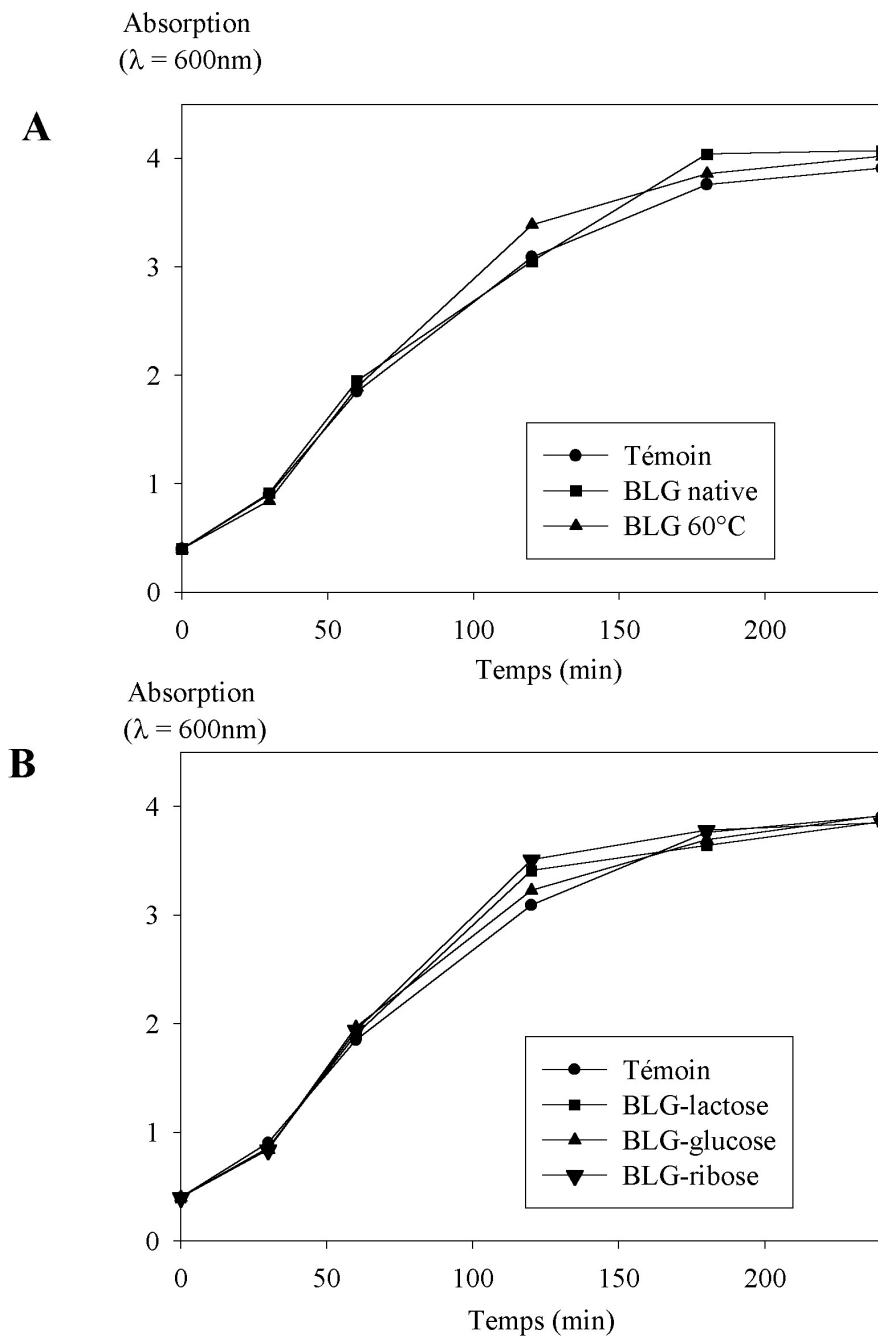


Figure 41 : Croissance en milieu liquide d'*Escherichia coli* HB 101 seule (Témoin) ou en présence de BLG native ou chauffée (A), ou en présence de BLG modifiée par le lactose, le glucose ou le ribose (B).

Aucune différence significative de croissance n'a été observée entre la bactérie cultivée seule et celle cultivée en présence des échantillons de BLG native, chauffée ou modifiée par les différents sucres.

Au départ de l'expérience, la bactérie est en croissance exponentielle ($Abs = 0,4$). L'ajout des différents échantillons de protéine n'a pas modifié cette croissance, un plateau était systématiquement atteint après environ 180 minutes de croissance. Les courbes de croissance obtenues avec les hydrolysats pepsiques et trypsiques ont donné des résultats similaires quels que soient l'échantillon ou la souche testée.

Aucune activité antibiotique n'a donc pu être mise en évidence avec les échantillons hydrolysés ou non hydrolysés de BLG native, chauffée ou modifiée par les différents sucres envers l'ensemble des souches bactériennes testées.

4 - Tests d'activité cytotoxique

Comme les échantillons de BLG modifiée par l'arabinose, le galactose, le lactose ou le rhamnose ont donné des résultats similaires à ceux obtenus avec la BLG modifiée par le glucose, seuls les échantillons de BLG native, chauffée ou modifiée par le glucose ou le ribose, et de SAB sont présentés sur la figure 42. La SAB (hydrolysée ou non) a été utilisée comme contrôle non actif.

Deux lignées cellulaires ont été utilisées pour étudier l'activité cytotoxique des différents échantillons : la lignée de cellules non-adhérentes (HL-60) et la lignée de cellules adhérentes (COS-7).

Environ 50 à 60% d'inhibition de la croissance des cellules COS-7 ont été obtenus avec les échantillons de BLG native, chauffée ou modifiée par le glucose ou le ribose avec la concentration maximale utilisée (100 $\mu\text{g/ml}$). Cette inhibition a été observée pour les protéines non hydrolysées, hydrolysées par la pepsine ou hydrolysées par la trypsine. L'inhibition de la croissance de la lignée cellulaire COS-7 a été plus faible en utilisant la SAB ; environ 10 à 20% d'inhibition ont été mesurés en utilisant la plus forte concentration de cette protéine et de ses peptides. Une différence significative de l'activité cytotoxique apparente a donc été observée entre les échantillons de BLG et les échantillons de BSA. Néanmoins, la glycation de la BLG n'a pas permis d'améliorer ses propriétés cytotoxiques contre la lignée cellulaire COS-7, les échantillons de BLG native ou chauffée seule ont présenté des inhibitions de croissance similaires aux échantillons de BLG modifiée par les différents sucres.

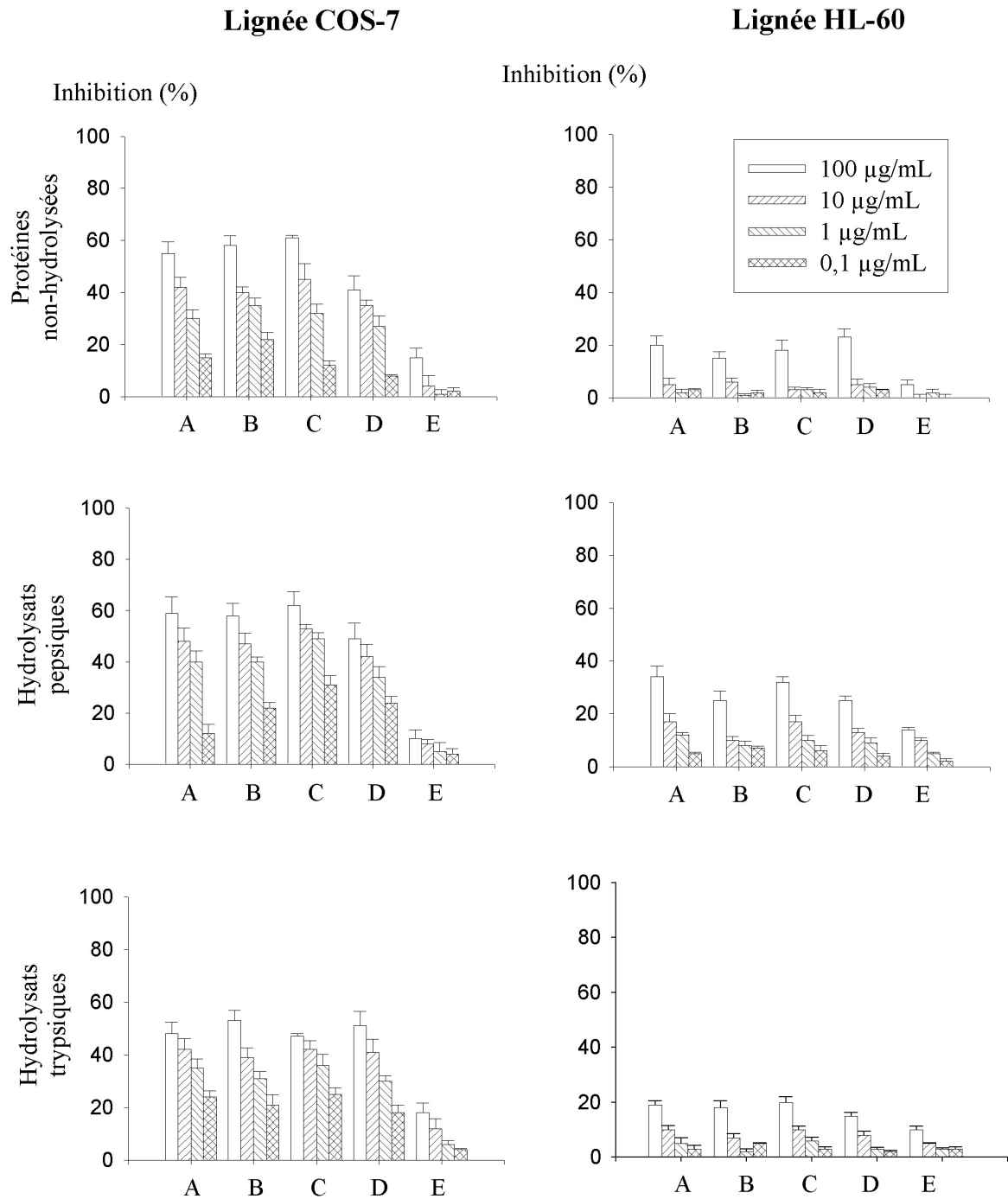


Figure 42 : Activité cytotoxique contre les lignées COS-7 et HL-60 de la BLG native (A), chauffée (B) ou modifiée par le glucose (C) ou le ribose (D) et de la SAB (E) non hydrolysées, hydrolysées par la pepsine et hydrolysées par la trypsine.

La lignée cellulaire HL-60 a semblé plus résistante aux échantillons de BLG que la lignée cellulaire COS-7. Un maximum d'inhibition de croissance d'environ 30% a été obtenu avec la plus forte concentration en hydrolysats pepsiques de BLG native, chauffée ou modifiée par le glucose ou le ribose. Les échantillons de protéines non hydrolysées ou hydrolysées par la trypsine ont présenté environ 20% d'inhibition de croissance avec la plus forte concentration utilisée. La SAB non hydrolysée ou hydrolysée par la pepsine a présenté une inhibition inférieure à celle obtenue avec les échantillons de BLG. Par contre, après hydrolyse trypsique, l'inhibition de croissance de la lignée HL-60 obtenue avec les échantillons de BLG était très proche de celle obtenue avec l'échantillon de SAB.

D - Conclusion

1 - Susceptibilité à l'hydrolyse pepsique et trypsique de la BLG native ou modifiée par la réaction de Maillard

La susceptibilité des différents échantillons de BLG à l'hydrolyse pepsique ou trypsique est directement liée au taux de modification par la réaction de Maillard. Une quantité variable de peptides a donc été obtenue en fonction des échantillons testés.

Plus la protéine est modifiée, plus elle est sensible à l'hydrolyse pepsique et moins elle est sensible à l'hydrolyse trypsique.

2 - Tests d'activité antiradicalaire

Des activités antiradicalaires ont été observées dans les échantillons de BLG modifiée par la réaction de Maillard, alors que les protéines non modifiées (BLG native ou chauffée, SAB) ont présenté une faible aptitude à capter les radicaux libres.

Cette activité est liée au taux de modification (plus la protéine est modifiée, plus son activité antiradicalaire est forte) et à la nature du sucre utilisé pour modifier la protéine (pour une même quantité de groupe NH₂ réactif, la modification de la BLG par le ribose induit une plus forte activité antiradicalaire que la modification de la BLG par le lactose).

L'hydrolyse des échantillons de BLG modifiée par la réaction de Maillard diminue leur activité antiradicalaire. Cependant, celle-ci est tout de même maintenue à un niveau supérieur à celui des échantillons de BLG non modifiée, révélant la capacité des protéines modifiées à capter les radicaux libres même après leur hydrolyse.

3 - Tests d'activité antibactérienne

Aucune activité antibactérienne n'a pu être mise en évidence par les techniques utilisées dans les échantillons hydrolysés ou non hydrolysés de BLG native, chauffée ou modifiée par la réaction de Maillard.

Une activité antibactérienne a déjà été observée dans des produits de la réaction de Maillard. Une capacité à inhiber la croissance bactérienne a été mise en évidence dans des systèmes modèles composés d'arginine et de glucose, d'arginine et de xylose, et d'histidine et de glucose (Einarson *et al.*, 1983 ; Einarson, 1987 a, b). Après modification du lysozyme par le dextran, une modification de son spectre d'activité a été observée : en plus de son activité d'inhibition de la croissance des bactéries Gram positives, la protéine modifiée présente une activité d'inhibition de la croissance des bactéries Gram négatives.

Néanmoins, aucune activité antibactérienne n'a été observée en utilisant une protéine modifiée par la réaction de Maillard (ou des peptides issus de sa protéolyse) dont la forme native est inactive.

Dans notre étude, la BLG native ne présentait aucune activité antimicrobienne. Seule l'apparition d'une activité nouvelle aurait pu être observée. Une telle activité est certainement très difficile à induire par une modification non spécifique comme c'est le cas de la réaction de Maillard.

4 - Tests d'activité cytotoxique

La réaction de Maillard est connue pour induire des composés mutagènes et cytotoxiques au cours de la fabrication et de la cuisson des aliments (O'Brien et Morrissey, 1989). Les composés avancés de la réaction de Maillard et les amines hétérocycliques sont certainement impliqués dans ces propriétés. De tels composés n'ont pas semblé être formés dans les conditions de réaction utilisées pour modifier la BLG puisqu'aucune différence de cytotoxicité n'a pu être observée entre la protéine non modifiée et la protéine modifiée. Le traitement thermique relativement doux utilisé (72 heures à 60°C) ne semble donc pas générer l'apparition de composés mutagènes et/ou toxiques pour les cellules.

L'inhibition de croissance observée avec la lignée COS-7, en particulier avec les échantillons de BLG, semble plutôt liée aux caractéristiques biochimiques de la protéine. Une interaction non spécifique de la protéine avec la matrice extracellulaire des cellules ou avec le plastique des flasques utilisées pourrait gêner l'adhésion des cellules, inhibant ainsi leur croissance.

**CONCLUSION
GENERALE**

Depuis sa première description en 1912 par L. C. Maillard, la réaction du même nom fait l'objet de nombreuses recherches dans le domaine des sciences des aliments. Une grande quantité de publications scientifiques ont été rédigées sur la réaction complexe entre les composés aminés et les sucres réducteurs. De nombreux composés ont été identifiés afin de mieux appréhender les mécanismes de dégradation et de polymérisation des sucres et des composés aminés ainsi que la formation d'arômes.

Bien que cette réaction soit couramment rencontrée lors de processus industriels et dans la cuisson des aliments, son influence sur les propriétés fonctionnelles et la valeur nutritive des protéines alimentaires ainsi modifiées est encore assez mal connue.

Depuis environ 20 ans et la mise en évidence de son implication au cours du vieillissement et chez les diabétiques dans de nombreuses pathologies humaines, comme la cataracte ou la maladie d'Alzheimer, la réaction de Maillard semble maintenant un domaine de recherche privilégié des physiciens et des biologistes (Henle, 2001).

Le travail réalisé au cours de ma thèse consistait à modifier par la réaction de Maillard une protéine alimentaire et à étudier l'influence des composés formés sur les caractéristiques physico-chimiques de la protéine dans le but d'améliorer les propriétés techno-fonctionnelles et de générer de nouvelles fonctions biologiques aux protéines et peptides modifiés.

CHAPITRE 1 : PREPARATION ET CARACTERISATION DES PROTEINES MODIFIEES

L'étude a été réalisée avec un système composé d'une protéine (la bêta-lactoglobuline variant A) et de différents sucres. Ce système simplifié, volontairement éloigné des systèmes biologiques et/ou alimentaires, avait pour objectif d'appréhender les mécanismes de modification et l'influence des conditions de milieu sur la modification.

La nature du sucre et le temps de chauffage ont été identifiés comme étant des facteurs fondamentaux dans l'avancée et le contrôle de la réaction de Maillard entre une protéine et un sucre réducteur. D'autres conditions opératoires comme le pH, la température, la présence de sels ou l'ajout d'autres protéines peuvent amener des informations supplémentaires sur cette réaction.

L'étude des mécanismes de modification a mis en évidence certains sites préférentiels de glycation de la protéine, la présence de pontages entre monomères, responsables, au moins en

partie, des premières étapes de polymérisation dans la formation de mélanoides et une modification structurale de la protéine modulée par le taux de glycation.

La nature des pontages covalents responsables de la formation des dimères, trimères et tétramères n'a pas été élucidée. Seules des hypothèses sur la présence d'une fonction imidazole dans ces liaisons ont été avancées.

Une étude plus approfondie de ce type de liaison pourrait permettre de mieux comprendre les phénomènes de polymérisation. Des applications en médecine sont possibles, une inhibition spécifique de ce type de pontage pourrait notamment ralentir l'évolution de la cataracte ou de maladies dégénératives comme la maladie d'Alzheimer.

CHAPITRE 2 : ETUDE DES PROPRIETES TECHNO-FONCTIONNELLES DES PROTEINES MODIFIEES

Une amélioration de la stabilité thermique, des propriétés émulsifiantes et moussantes a été observée en utilisant les protéines modifiées dans certaines conditions de pH ou de température.

Les échantillons les plus modifiés ont présenté la meilleure solubilité à la suite d'un traitement thermique. La fixation de sucre à la surface de la protéine, par modification de la charge globale, et par augmentation des possibilités d'hydratation, a ainsi amélioré la stabilité thermique de la bêta-lactoglobuline.

Le maintien des propriétés émulsifiantes obtenues avec les protéines les plus modifiées lors du changement de pH de 7,0 à 5,0 est sûrement lié en grande partie à la solubilité de ces échantillons aux différents pH.

Un taux de modification moyen (obtenu avec le glucose ou le galactose) a présenté le meilleur compromis pour obtenir des mousses stables avec un faible drainage. Un taux de modification élevé déstabilise la mousse (en partie à cause de la déstructuration de la protéine) et un taux de modification faible augmente le drainage. L'utilisation de polyosides pourrait être envisagée pour améliorer les propriétés moussantes de protéines modifiées par la réaction de Maillard.

CHAPITRE 3 : ETUDE DES PROPRIETES BIOLOGIQUES DES PROTEINES MODIFIEES

La modification de la bêta-lactoglobuline par la réaction de Maillard n'a pas permis de conférer aux protéines et peptides modifiés de nouvelles propriétés antibiotiques et cytotoxiques décelables.

Par contre, l'étude des propriétés antiradicalaires a mis en évidence une aptitude des protéines et peptides modifiés à capter les radicaux libres proportionnellement à leur taux de modification et dépendant du sucre utilisé.

Des études plus approfondies des propriétés antioxydantes des protéines modifiées par la réaction de Maillard en utilisant d'autres techniques (dosage d'oxygène, de composés volatils, d'hydro peroxydes...) devraient permettre de mieux appréhender ces propriétés dans leur ensemble.

Cette propriété biologique de la bêta-lactoglobuline modifiée par la réaction de Maillard peut présenter de nombreux avantages pour son utilisation éventuelle comme ingrédient alimentaire doté de certaines propriétés fonctionnelles intéressantes et d'une aptitude à capter les radicaux libres.

**RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES**

1. Alexander L. J., Hayes G., Pearse M. J., Beattie C. W., Stewart A. F., Willis I. M., McKinlay A. G. (1989) Complete sequence of the bovine beta-lactoglobulin cDNA. *Nucleic Acid Research* 17, 6739.
2. Alonzo M. L., Zapico J. (1995) Changes in sugars and lysine in baby foods during storage. *Journal of Food Biochemistry* 18, 393-403.
3. Ames B. N., Mc Cann J., Yamasaki E. (1975) Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation Research* 31, 347-364.
4. Ames J. M. (1990) Control of the Maillard reaction in food systems. *Trends in Food Science and Technology* 1, 150-154.
5. Anese M., Nicoli M. C., Lericci C. R. (1994) Influence of pH on the oxygen scavenging properties of heat-treated glucose-glycine systems. *Italian Journal of Food Science* 3, 339-343.
6. Aoki T., Kitahata K., Fukumoto T., Sugimoto Y., Ibrahim H. R., Kimura T., Kato Y., Matsuda T. (1997) Improvement of functional properties of β -lactoglobulin by conjugation with glucose-6-phosphate through the Maillard reaction. *Food Research International* 30, 401-406.
7. Aoki T., Hiidome Y., Kitahata K., Sugimoto Y., Ibrahim H. R., Kato Y. (1999) Improvement of heat stability and emulsifying activity of ovalbumin by conjugation with glucuronic acid through the Maillard reaction. *Food Research International* 32, 129-133.
8. Ashoor S. H., Zent J. B. (1984) Maillard browning of common amino acids and sugars. *Journal of Food Science* 49, 1206-1207.
9. Beckel R. W., Waller G. R. (1983) Antioxidative arginine-xylose Maillard reaction products: conditions of synthesis. *Journal of Food Science* 48, 996-997.

10. Bertrand-Harb C., Charrier B., Dalgalarondo M., Chobert J.-M., Haertlé T. (1990) Condensation of glycosidic and aromatic structures on amino groups of β -lactoglobulin B via reductive alkylation. Solubility and emulsifying properties of the protein derivatives. *Le Lait* 71, 205-215.
11. Bidlingmeyer B. A., Cohen S. A., Tarvin T. L. (1984) Rapid analysis of amino acids using precolumn derivatization. *Journal of Chromatography* 336, 93-104.
12. Bouhallab S., Morgan F., Henry G., Mollé D., Léonil J. (1999). Formation of stable covalent dimer explains the high solubility at pH 4.6 of lactose- β -lactoglobulin conjugates heated near neutral pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 1489-1494.
13. Brignon G., Chtourou A., Ribadeau Dumas B. (1985) Does β -lactoglobulin occur in human milk ? *Journal of Dairy Research* 52, 249-254.
14. Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset C. (1995) Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie* 28, 25-30.
15. Brownlee M., Vlassara H., Kooney A., Ulrich P., Cerami A. (1986) Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking. *Science* 232, 1629-1632.
16. Brownlow S., Morais Cabral J. H., Cooper R., Flower D. R., Yewdall S. J., Polikarpov I., North A. C., Sawyer L. (1997) Bovine beta-lactoglobulin at 1.8 Å resolution - still an enigmatic lipocalin. *Structure* 5, 481-495.
17. Burr R., Moore C. H., Hill J. P. (1996) Evidence of multiple glycosylation of bovine β -lactoglobulin by electrospray ionization mass spectrometry. *Milchwissenschaft* 51, 488-492.

18. Cayot P., Lorient D. (1998a) Structure native des protéines majeures du lait de vache. *In* : « Structure et technofonction des protéines du lait. » Arilait Recherches. Techniques et documentation-Lavoisier, Paris ; pp. 16-102.
19. Cayot P., Lorient D. (1998b) Effets des technologies sur la structure des protéines du lait. *In* : « Structure et technofonction des protéines du lait. » Arilait Recherches. Techniques et documentation-Lavoisier, Paris ; pp. 105-203.
20. Cayot P., Lorient D. (1998c) Quelques propriétés fonctionnelles des protéines laitières. *In* : « Structure et technofonction des protéines du lait. » Arilait Recherches. Techniques et documentation-Lavoisier, Paris ; pp. 205-354.
21. Cayot P., Roullier L., Tainturier G. (1999) Electrochemical modification of proteins. 1. Glycitulation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 1915-1923.
22. Cheftel J. C., Lorient D. (1982) Aspects Technologiques. Les propriétés fonctionnelles des protéines laitières et leur amélioration. *Le Lait* 62, 435-483.
23. Cheftel J. C., Cuq J. L., Lorient D. (1985) Propriétés fonctionnelles des protéines. *In* : « Les protéines alimentaires ». Techniques et documentation-Lavoisier, Paris ; pp. 70-79.
24. Chevalier F. (1994) Recherche de S-Lac Lectine dans des cancers du sein. BTS de Biotechnologie, Lycée Simone Weil, Le Puy en Velay.
25. Cho Y., Batt C. A., Sawyer L. (1994) Probing the retinal-binding site of bovine beta-lactoglobulin. *Journal of Biological Chemistry* 269, 11102-11107.
26. Chobert J.-M., Sitohy M. Z., Whitaker J. R. (1987) Specific limited hydrolysis and phosphorylation of food proteins for improvement of functional and nutritional properties. *Journal of the American Oil Chemist Society* 64, 1704-1711.

27. Chobert J.-M., Sitohy M. Z., Whitaker J. R. (1988) Solubility and emulsifying properties of caseins modified enzymatically by *Staphylococcus aureus* V8 protease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 36, 220-224.
28. Chobert J.-M., Briand L., Grinberg V. Ya., Haertlé T. (1995) Impact of esterification on the folding and the susceptibility to peptic proteolysis of β -lactoglobulin. *Biochimica et Biophysica Acta* 1248, 261-269.
29. Chuyen N. V. (1998) Maillard reaction and food processing. Application aspects, *Advances in Experimental Medicine and Biology* 434, 213-235.
30. Cuzzoni M. T., Stoppini A., Gazzani G., Mazza P. (1989) Effect of storage on mutagenicity, absorbance and content of furfural in the ribose-lysine Maillard system. *Food Chemical Toxicology* 27, 209-213.
31. Dalgalarrodo M., Chobert J.-M., Dufour E., Bertrand-Harb C., Dumont J.-P., Haertlé T. (1990) Characterization of bovine β -lactoglobulin B tryptic peptides by reversed-phase high performance liquid chromatography. *Milchwissenschaft* 45, 212-216.
32. Dalgalarrodo M., Dufour E., Chobert J. -M., Bertrand-Harb C., Haertlé T. (1995). Proteolysis of β -lactoglobulin and β -casein by pepsin in ethanolic media. *International Dairy Journal* 5, 1-14.
33. Danehy J. P. (1986) Maillard reactions: nonenzymatic browning in food systems with special reference to the development of flavor. *Advances in Food Research* 30, 77-138.
34. Darewicz M., Dziuba J., Mioduszevska H. (1998) Some physico-chemical properties and structural changes of bovine beta-casein upon glycation. *Nahrung/Food* 42, 213-214.
35. De Wit J. N., Klarenbeck G. (1984) Effect of various heat treatments on the structure and stability of whey proteins. *Journal of Dairy Science* 67, 2701-2710.

36. Dickinson E. (1989) Surface and emulsifying properties of caseins. *Journal of Dairy Research* 56, 471-477.
37. Didier E., Henou C., de la Tour M., Vasseur A., Chevalier F. (1994) Distribution d'une lectine endogène, h-Mac-2 dans les tumeurs du sein. 14ème forum de cancérologie. 30 mai – 1^{er} juin 1994. Paris.
38. Drickamer K. (1988) Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. *Journal of Biological Chemistry* 263, 9557-9560.
39. Dufour E., Haertlé T. (1991) Binding of retinoids and beta-carotene to beta-lactoglobulin. Influence of protein modifications. *Biochimica et Biophysica Acta* 1079, 316-320.
40. Dyer D. G., Dunn J. A., Thorpe S. R., Bailie K. E., Lyons T. J., McCance D. R., Baynes J. W. (1993) Accumulation of Maillard reaction products in skin collagen in diabetes and aging. *The Journal of Clinical Investigation* 91, 2463-2469.
41. Einarsson, H. (1987a) The effect of time, temperature, pH and reactants on the formation of antibacterial compound in the Maillard reaction. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* 20, 51-55.
42. Einarsson, H. (1987b) The effect of pH and temperature on the antibacterial effect of Maillard reaction products. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* 20, 56-58.
43. Einarsson H., Snygg B. G., Eriksson C. (1983) Inhibition of bacterial growth by Maillard reaction products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 31, 1043-1047.
44. Evangelisti F., Calgagno C., Nardi S., Zunin P. (1999) Deterioration of protein fraction by Maillard reaction in dietetic milks. *Journal of Dairy Research* 66, 237-243.

45. Farrel Jr. H. M., Behe M. J., Enyeart J. A. (1987) Binding of p-nitrophenyl phosphate and other aromatic compounds by β -lactoglobulin. *Journal of Dairy Science* 70, 252-258.
46. Feeney R. E., Yeh Y. (1978) Antifreeze proteins from fish bloods. *Advances in Protein Chemistry* 32, 191-282.
47. Flower D. R. (1996) The lipocalin protein family : structure and function. *Biochemical Journal* 318, 1-14.
48. Fogliano V., Monti S. M., Visconti A., Ritieni A. (1998) Identification of a β -lactoglobulin lactosylation site. *Biochimica et Biophysica Acta* 1388, 295-304.
49. Fox P. F. (1989) The milk protein system. In : « Developpement in dairy chemistry. 4. Functional milk proteins. » Elsevier Applied Science, London and New York ; pp. 1-55.
50. Friedman M. (1996) Food browning and its prevention. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44, 631-653.
51. Frister H., Meisel H., Schlimme E., (1988) OPA method modified by use of N,N-dimethyl-2 mercaptoethylammoniumchloride as thiol component. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 330, 631-633.
52. Frye E. B., Degenhardt T. P., Thorpe S. R., Baynes J. W. (1998) Role of the Maillard reaction in aging of tissue proteins. Advanced glycation end product-dependent increase in imidazolium cross-links in human lens proteins. *Journal of Biological Chemistry* 273, 18714-18719.
53. Gazzani G., Vagnarelli P., Cuzzoni M. T., Mazza P. (1987) Mutagenic activity of the Maillard reaction products of ribose with different amino acids. *Journal of Food Science* 52, 757-760.

54. Godovac-Zimmermann J. U., Krause I., Baranyi M., Fisher-Frühholz S., Juszczak J., Erhardt G., Buchberger J., Klostermeyer H. (1996) Isolation and rapid sequence characterization of two novel β -lactoglobulin I and J. *Journal of Protein Chemistry* 15, 743-750.
55. Guo M. R., Fox P. F., Flynn A., Kindstedt P. S. (1995) Susceptibility of beta-lactoglobulin and sodium caseinate to proteolysis by pepsin and trypsin. *Journal of Dairy Science* 78, 2336-2344.
56. Haertlé T., Chobert J.-M. (1999) Recent progress in processing of dairy proteins : a review. *Journal of Food Biochemistry* 23, 367-407.
57. Haque Z. U., Mozzafar Z. (1992) Casein hydrolysates. II. Functional properties of peptides. *Food Hydrocolloids* 5, 559-571.
58. Hayase F., Hirashima S., Okamoto G., Kato H. (1989) Scavenging of active oxygens by melanoidins. *Agricultural and Biological Chemistry* 53, 3383-3385.
59. Hayes H. C., Petit E. J. (1993) Mapping of the β -lactoglobulin gene and of an immunoglobulin M heavy chain-like sequence of homologous cattle, sheep and goat chromosomes. *Mammalian Genome* 4, 207-210.
60. Henle T. (2001) Maillard reactions of food proteins : chemical, nutritional and functional aspects. *Nahrung/Food* 45, 149.
61. Hoffmann M. A. M., van Mil P. J. J. M. (1997) Heat-induced aggregation of β -lactoglobulin : role of the free thiol group and disulfide bonds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 2942-2948.
62. Hoskin J. C. (1994) Sensory properties of chocolate and their development. *American Journal of Clinical Nutrition* 60, 1068S-1070S.

63. Hurrell R. F., Carpenter K. J. (1977a) Maillard reaction in food. In "Physical, chemical and biological changes in food caused by thermal processing". Barking (England) : Applied Science Publishers, pp. 168-184.
64. Hurrell R. F., Carpenter K. J. (1977b) Nutritional significance of cross-link formation during food processing. In "Protein crosslinking : Nutritional and Medical consequences" (M. Friedman ed.), pp. 225-238, Plenum: New York.
65. Iametti S., de Gregori B., Vecchio G., Bonomi F. (1996) Modifications occur at different structural levels during the heat denaturation of beta-lactoglobulin. *European Journal of Biochemistry* 237, 106-112.
66. Jamieson A. C., Vandeyar M. A., Kang Y. C., Kinsella J. E., Batt C. A. (1987) Cloning and nucleotide sequence of the bovine beta-lactoglobulin gene. *Gene* 61, 85-90.
67. Jing H., Kitts D. D. (2000) Comparison of the antioxidative and cytotoxic properties of glucose-lysine and fructose-lysine Maillard reaction. *Food Research International* 33, 509-516.
68. Jones A. D., Tier C. M., Wilkins J. P. G. (1998) Analysis of the Maillard reaction products of β -lactoglobulin and lactose in skimmed milk powder by capillary electrophoresis and electrospray ionization spectrometry. *Journal of Chromatography A* 822, 147-154.
69. Kahn P. C. (1979). The interpretation of near-ultraviolet circular dichroism. *Methods in Enzymology* 61, 339-378.
70. Kato Y., Watanabe K., Nakamura R., Sato Y. (1983) Effect of pre-heat treatment on tryptic hydrolysis of Maillard-reacted ovalbumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 31, 437-441.

71. Kato Y., Aoki T., Kato N., Nakamura R., Matsuda T. (1995) Modification of ovalbumin with glucose-6-phosphate by amino-carbonyl reaction. Improvement of protein heat stability and emulsifying activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43, 301-305.
72. Kinsella J. E. (1981) Functional properties of proteins : possible relationship between structure and function in foams. *Food Chemistry* 7, 273-288.
73. Kinsella J. E. (1984) Milk proteins : physicochemical and functional properties. *Critical Review of Food Science and Nutrition* 21, 197-262.
74. Kinsella J. E., Whitehead D. M. (1989) Proteins in whey : chemical, physical, and functional properties. *Advances in Food and Nutrition Research* 33, 343-438.
75. Kitabatake N., Cuq J. L., Cheftel C. (1985). Covalent binding of glycosyl residues to β -lactoglobulin : effects on solubility and heat stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 33, 125-130.
76. Kitts D. D., Wu C. H., Stich H. F., Powrie W. D. (1993) Effect of glucose-lysine Maillard reaction product on bacterial and mammalian cell mutagenesis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41, 2353-2358.
77. Klemaszewski J. L., Das K. P., Kinsella J. E. (1992) Formation and covalence stability of emulsions stabilized by different milk proteins. *Journal of Food Science* 57, 366-371.
78. Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural protein during the assemblage of the head of bacteriophage T4. *Nature* 225, 650-657.
79. Lea C. H., Hannan R. S. (1949) The effect of activity of water, of pH and of temperature on the primary reaction between casein and glucose. *Biochimica et Biophysica Acta* 3, 313-325.

80. Ledl F., Schleicher E. (1990). New aspects of the Maillard reaction in foods and in the human body. *Angewandte Chemie International (Edition in English)* 29, 565-594.
81. Lee K.-W., Mossine V., Ortwerth B. J. (1998) The relative ability of glucose and ascorbate to glycate and crosslink lens proteins in vitro. *Experimental Eye Research* 67, 95-104.
82. Léonil J., Mollé D., Fauquand J., Maubois J.-L., Pearce R. J., Bouhallab S. (1997) Characterization by ionization mass spectrometry of lactosyl β -lactoglobulin conjugates formed during heat treatment of milk and whey and identification of one lactose-binding site. *Journal of Dairy Science* 80, 2270-2281.
83. Lodish H., Darnell J., Baltimore D. (1988) Glycosylation des protéines. In « La Cellule, Biologie Moléculaire ». Edition Vigot Decarie, Paris, pp. 957-964.
84. Maillard L. C. (1912). Action des amines sur les sucres : formation des mélanoidines par voie méthodique. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* 154, 66-68.
85. Mailliart P., Ribadeau Dumas B. (1988) Preparation of β -lactoglobulin and β -lactoglobulin-free proteins from whey retentate by NaCl salting out at low pH. *Journal of Food Science* 53, 743-746.
86. Manderson G. A., Creamer L. K., Hardman M. J. (1999) Effects of heat treatment on the circular dichroism spectra of bovine beta-lactoglobulin A, B, and C. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 4557-4567.
87. Maron D. M., Ames B. N. (1983) Revised methods for the salmonella mutagenicity test. *Mutation Research* 113, 173-215.
88. Matsuda T., Kato Y., Nakamura R. (1991) Lysine loss and polymerization of bovine β -lactoglobulin by amino-carbonyl reaction with lactulose (4-O- β -D-Galactopyranosyl-D-fructose). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 39, 1201-1204.

89. Mattarella N. L., Richardson T. (1983) Physicochemical and functional properties of positively charged derivatives of bovine β -lactoglobulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 31, 972-978.
90. Maubois J.-L., Léonil J., Bouhallab S., Mollé D. (1995) Characterization by ionization mass spectrometry of a lactosyl- β -lactoglobulin conjugate occurring during mild heating of whey. *Journal of Dairy Science* 78 (sup 1), 133.
91. McAlpine A. S., Sawyer L. (2-6 April 1990) β -lactoglobulin: a protein drug carrier ? 643rd Meeting, University of Bath, Scotland, Abstract N°13.
92. Meisel H. (1997) Biochemical properties of bioactive peptides derived from milk proteins; potential nutraceuticals for food and pharmaceutical applications. *Livestock Production Science* 50, 125-138.
93. Meisel H. (1998) Overview on milk protein-derived peptides. *International Dairy Journal* 8, 363-373.
94. Mollé D., Morgan F., Bouhallab S., Léonil J. (1998) Selective detection of lactolated peptides in hydrolysates by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* 259, 152-161.
95. Monaco H. L, Zanotti G. (1992). Three-dimensional structure and active site of three hydrophobic molecule-binding proteins with significant amino acid sequence similarity. *Biopolymers* 32, 457-465.
96. Monaco H. L., Zanotti G., Spadon P., Bolognesi M., Sawyer L., Eliopoulos E. E. (1987) Crystal structure of the trigonal form of bovine beta-lactoglobulin and of its complex with retinol at 2.5 Å resolution. *Journal of Molecular Biology* 197, 695-706.
97. Monnier V. M., Cerami A. (1981) Non enzymatic browning in vivo : possible process for aging of long live protein. *Science* 211, 491-493.

98. Morgan F., Léonil J., Mollé D., Bouhallab S. (1997) Nonenzymatic lactosylation of bovine β -lactoglobulin under mild heat treatment leads to structural heterogeneity of the glycoforms. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 236, 413-417.
99. Morgan F., Bouhallab S., Mollé D., Henry G., Maubois J.-L., Léonil J. (1998) Lactolation of β -lactoglobulin monitored by electrospray ionisation mass spectrometry. *International Dairy Journal* 8, 95-98.
100. Morgan F., Léonil J., Mollé D. Bouhallab S. (1999a). Modification of bovine β -lactoglobulin by glycation in a powdered state or in an aqueous solution: effect on association behavior and protein conformation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 83-91.
101. Morgan F., Mollé D., Henry G., Vénien A., Léonil J., Peltre G., Levieux D., Maubois J.-L. Bouhallab S. (1999b). Glycation of bovine β -lactoglobulin : effect on the protein structure. *International Journal of Food Science and Technology* 34, 429-435.
102. Morgan F., Vénien A., Bouhallab S., Mollé D., Léonil J., Peltre G., Levieux D. (1999c). Modification of bovine β -lactoglobulin by glycation in a powdered state or in aqueous solution : immunological characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 4543-4548.
103. Nesterenko M. V., Tilley M., Upton S. J. (1994) A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 28, 239-342.
104. Nishino T., Shibahara-Sone H., Kikuchi-Hayakawa H., Ishikawa F. (2000) Transit of radical scavenging activity of milk products prepared by Maillard reaction and *Lactobacillus casei* strain Shirota fermentation through the hamster intestine. *Journal of Dairy Science* 83, 915-922.

105. O'Brien J., Morrissey P. A. (1989) Nutritional and toxicological aspects of the Maillard browning reaction in foods. *Critical Review in Food Science and Nutrition* 28, 211-248.
106. O'Neill T. H., Kinsella J. E. (1987) Binding of alkanone flavours to beta-lactoglobulin: effects of conformational and chemical modification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 35, 770-774.
107. Oste R. E., Brandon D. L., Bates A. H., Friedman M. (1990) Effects of the Maillard reaction of the Kunitz soybean trypsin inhibitor on its interaction with monoclonal antibodies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38, 258-261.
108. Otte J., Larsen K. S., Bouhallab S. (1998) Analysis of lactosylated β -lactoglobulin by capillary electrophoresis. *International Dairy Journal* 8, 857-862.
109. Otterburn M., Healy M., Sinclair W. (1977) The formation, isolation and importance of isopeptides in heated proteins. In "Protein crosslinking : Nutritional and Medical consequences" (M. Friedman ed.), pp. 239-262, Plenum, New York.
110. Palmer A. H. (1934) The preparation of a crystalline globulin from the albumin fraction of cow's milk. *Journal of Biological Chemistry* 104, 359-372.
111. Papiz M. Z., Sawyer L., Eliopoulos E. E., North A.C.T., Findlay J. B. C., Sivaprasad Rao R., Jones T. A., Newcomer M. E., Kraulis P. J. (1986) The structure of β -lactoglobulin and its similarity to plasma retinol-binding protein. *Nature* 324, 383-385.
112. Patel P. D., Stripp A. M., Fry J. C. (1988) Whipping test for the determination of foaming capacity of proteins : a collaborative study. *International Journal of Food Science and Technology* 23, 57-63.
113. Pelletier E., Sostmann K., Guichard E. (1998) Measurement of interactions between beta-lactoglobulin and flavor compounds (esters, acids, and pyrazines) by affinity and exclusion size chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 1506-1509.

114. Pérez M. D., Calvo M. (1995) Interaction of β -lactoglobulin with retinol and fatty acids and its role as a possible biological function for this protein : a review. *Journal of Dairy Science* 78, 978-988.
115. Pessen H., Purcell J. M., Farrell Jr. H. M. (1985) Proton relaxation rates of water dilute solutions of β -lactoglobulin. Determination of cross relaxation and correlation with structural changes by the use of two genetic variants of a self-associating globular protein. *Biochimica et Biophysica Acta* 828, 1-12.
116. Pongor S., Ulrich P. C., Bencsath F. A., Cerami A. (1984) Ageing of proteins : isolation and identification of a fluorescent chromophore from the reaction of polypeptides with glucose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81, 2684-2688.
117. Powrie W. D., Wu C. H., Rosin M. P., Stich H. F. (1981) Clastogenic and mutagenic activities of Maillard reaction model systems. *Journal of Food Science* 46, 1433-1445.
118. Provencher S. W., Glockner J. (1981). Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry* 20, 33-37.
119. Qi X. L., Brownlow S., Holt C., Sellers P. (1995) Multi-state thermal unfolding and aggregation of β -lactoglobulin A. *Biochemical Society Transactions* 23, 74S.
120. Qi X. L., Holt C., McNulty D., Clarke D. T., Brownlow S., Jones G. R. (1997) Effect of temperature on the secondary structure of beta-lactoglobulin at pH 6.7, as determined by CD and IR spectroscopy: a test of the molten globule hypothesis. *Biochemical Journal* 324, 341-346.
121. Rahbar S., Blumenfeld O., Ranney H. M. (1969) Studies of an unusual hemoglobin in patients with diabetes mellitus. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 22, 838-843.

122. Ramírez-Jiménez A. Guerra-Hernández E. García-Villanova B. (2000) Browning indicators in bread. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 4176-4181.
123. Reddy M., Kella N. K. D., Kinsella J. E. (1988). Structural and conformational basis of the resistance of β -lactoglobulin to peptic and chymotryptic digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 36, 737-741.
124. Ribadeau Dumas B., Grappin R. (1989) Milk protein analysis. *Le Lait* 69, 357-416.
125. Schägger H., von Jagow G. (1987) Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry* 166, 368-379.
126. Sell D. R., Monnier V. M. (1989) Structure elucidation of a senescence cross-link from human extra cellular matrix. *Journal of Biological Chemistry* 264, 21597-21602.
127. Shinohara K., Wu R. T., Jahan N., Tanaka M., Morinaga N., Murakami H., Hirohisa O. (1980) Mutagenicity of the browning mixtures by amino-carbonyl reactions on *Salmonella typhimurium* TA 100. *Agricultural and Biological Chemistry* 44, 671-678.
128. Sitohy M., Chobert J.-M., Haertlé T. (1995a) Phosphorylation of β -lactoglobulin under mild conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43, 59-62.
129. Sitohy M., Chobert J.-M., Popineau Y., Haertlé T. (1995b) Functional properties of β -lactoglobulin phosphorylated in the presence of different aliphatic amines. *Le Lait* 75, 503-512.
130. Sitohy M., Chobert J.-M., Haertlé T. (2000) Simplified short-time method for the esterification of milk proteins. *Milchwissenschaft* 56, 127-131.
131. Sivaprasadarao A., Boudjelal M., Findlay J. B. C. (1993) Lipocalin structure and function. *Biochemical Society Transactions* 21, 619-622.

132. Smith M. A., Taneda S., Richey P. L., Miyata S., Yan S. D., Stern D., Sayre L. M., Monnier V. M., Perry G. (1994) Advanced Maillard reaction end products are associated with Alzheimer disease pathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 5710-5714.
133. Strickland E. H. (1974). Aromatic contributions to circular dichroism spectra of proteins. *CRC Critical Reviews in Biochemistry* 2, 113-175.
134. Takeda A., Yasuda T., Miyata T., Mizuno K., Li M., Yoneyama S., Horie K., Maeda K., Sobue G. (1996) Immunohistochemical study of the advanced glycation end products in aging and Alzheimer's disease brain. *Neuroscience Letters* 221, 17-21.
135. Tanford C., Bunvile L. G., Nozaki Y. (1959) The reversible transformation of β -lactoglobulin at pH 7.5. *Journal of the American Chemical Society* 81, 4032-4036.
136. Tressl R., Silwar R. (1981) Investigation of sulfur-containing components in roasted coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 29, 1078-1082.
137. Turner L. G., Swaisgood H. E., Hansen A. P. (1978) Interaction of lactose and proteins of skim milk during ultra-high temperature processing. *Journal of Dairy Science* 61, 384-392.
138. Vagnarelli P., de Sario A., Cuzzoni M.T., Mazza P., de Carli L. (1991) Cytotoxic and clastogenic activity of ribose-lysine browning model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 39, 2237-2239.
139. van Boekel M. A. J. S. (1998) Effects of heating on Maillard reactions in milk. *Food Chemistry* 62, 403-414.
140. Wang Q., Allen J. C., Swaisgood H. E. (1997a). Binding of retinoids to β -lactoglobulin isolated by bioselective adsorption. *Journal of Dairy Science* 80, 1047-1053.
141. Wang Q., Allen J. C., Swaisgood H. E. (1997b). Binding of vitamin D and cholesterol to beta-lactoglobulin. *Journal of Dairy Science* 80, 1054-1059.

142. Waniska R. D., Kinsella J. E. (1988) Foaming and emulsifying properties of glycosylated β -lactoglobulin. *Food Hydrocolloid* 2, 439-449.
143. Wolf J. C., Thompson D. R., Reineccius G. A. (1978) Initial losses of available lysine in model systems. *Journal of Food Science* 43, 1486-1490.
144. Wu S. Y., Pérez M. D., Puyol P., Sawyer L. (1999) Beta-lactoglobulin binds palmitate within its central cavity. *Journal of Biological Chemistry* 274, 170-174.
145. Yamasaki N., Kojima S., Bovin N. V., Andre S., Gabius S., Gabius H. J. (2000) Endogenous lectins as targets for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 43, 225-244.
146. Yen, G. C., Hsieh, P. P. (1995) Antioxidative activity and scavenging effects on native oxygen of xylose-lysine Maillard reaction products. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 67, 415-420.

Résumé

La première partie de ce travail décrit la modification de la bêta-lactoglobuline à l'aide de la réaction de Maillard (greffage de sucres) et la caractérisation des propriétés physico-chimiques et structurales des dérivés obtenus. En plus de la présence de composés colorés caractéristiques de cette réaction, une modification du taux de glycation, du point isoélectrique et de la sensibilité à l'hydrolyse trypsique est observée en fonction du temps de réaction et du sucre utilisé. L'analyse des produits modifiés révèle des sites de glycation préférentiels et met en évidence le rôle des sucres dans les pontages covalents conduisant à la formation de polymères. La modification de la structure native de la protéine semble proportionnelle à la réactivité du sucre utilisé. La seconde partie de ce travail consiste à rechercher de nouvelles propriétés techno-fonctionnelles et biologiques. Les protéines modifiées présentent une meilleure stabilité au cours du chauffage en comparaison avec la protéine native. Les protéines les plus modifiées stabilisent le mieux les émulsions, alors que des protéines ayant un taux de modification intermédiaire semblent les mieux adaptées à la formation de mousses. Les protéines modifiées par la réaction de Maillard comme les peptides issus de ces protéines présentent une activité antiradicalaire proportionnelle au taux de modification des protéines. Aucune activité antibiotique ou cytotoxique spécifique à la glycation n'est détectée avec les quatre souches bactériennes et les deux lignées cellulaires utilisées.

Techno-functional and biological properties of beta-lactoglobulin modified through the Maillard reaction

Summary

The first part of this work means in modifying beta-lactoglobulin through the Maillard reaction (linkage of sugars) and in the characterization of the physico-chemical and the structural properties of the products. In addition to colored compounds, characteristics of the reaction, a modification of glycation degree, isoelectric point and susceptibility to tryptic hydrolysis is observed as a function of reactional time and sugar used. Analysis of modified products reveals preferential glycation sites and shows the role of sugars in covalent linkage leading to polymer formation. The second part of this work means in the research of new techno-functional and biological properties. Modified proteins show a better stability during heating as compared to native samples. The best emulsion stability is observed with the most modified products, whereas medium modified samples seems the most adapted in the formation of foams. Proteins modified through the Maillard reaction and peptides issued from these proteins present a radical scavenging activity proportional to the glycation degree of proteins. No antibiotic or cytotoxic specific activities is detected with the four bacteria strains and two cellular lines used.

Discipline : Sciences des Aliments et Nutrition.

Mots clés : réaction de Maillard, glycation, bêta-lactoglobuline, hydrolysats, conformation, solubilité, stabilité thermique, émulsions, mousses, antioxydants.

Intitulé du laboratoire : Laboratoire d'Etude des Interactions des Molécules Alimentaires
INRA – Centre de Nantes BP 71627
44316 NANTES Cedex 3 FRANCE