



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

ÉCOLE DOCTORALE : *RP2E*

Laboratoire d'Ingénierie de Biomolécules

THÈSE

pour l'obtention du grade de Docteur de l'INPL

Spécialité : Procédés Biotechnologiques et Alimentaires

Présentée par

Leïla ABERKANE

Etude des mécanismes de structuration d'assemblages
 β -lactoglobuline-gomme d'Acacia en présence d'un
flavonoïde, la quercétine

Soutenue publiquement le 08 Octobre 2010 devant la commission d'examen

Président :	M. Christophe BARAVIAN	Professeur, INPL-ENSEM, Nancy
Rapporteurs :	Mme Marie-Hélène MOREL M. Denis RENARD	Directeur de recherche, INRA-SupAgro, Montpellier Directeur de recherche, INRA, Nantes
Examineurs :	M. Said BOUHALLAB M. Joël SCHER M. Christian SANCHEZ	Directeur de recherche, INRA, Rennes Professeur, INPL-ENSAIA, Nancy Professeur, SupAgro, Montpellier

A mes parents
A mes frères et sœurs

Avant-propos

Ce travail de recherche a été réalisé au Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules de l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et d'Industries Alimentaires sous la direction de Monsieur Joël Scher, Professeur à l'ENSAIA. Je tiens à le remercier pour la grande liberté d'action qu'il m'a accordée au cours de cette thèse.

Je tiens à remercier particulièrement Monsieur Christian Sanchez, Professeur à Supagro de Montpellier co-directeur de cette thèse pour le soutien et pour la confiance qu'il m'a témoigné durant ces années passées au laboratoire. Je tiens à le remercier de m'avoir inculqué les principes qui sont à la base de toute démarche scientifique : la curiosité, la rigueur, la ténacité et l'humilité.

Je remercie Monsieur Denis Renard, directeur de recherche à l'INRA de Nantes et Madame Marie-Hélène Morel, directeur de recherche à Supagro de Montpellier pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant d'être les rapporteurs de ce travail. Je tiens également à remercier tout particulièrement Monsieur Said Bouhallab, directeur de recherche à l'INRA de Rennes et Monsieur Christophe Baravian, Professeur à l'INPL de Nancy pour avoir accepté de faire partie de ce jury.

Mes sincères remerciements vont également à Madame Marie-Noëlle Maucourt, Carole Jeandel et Carole Perroud pour leur sympathie et pour toute l'aide qu'elles m'ont apportée durant cette thèse. Un grand merci également à tous les chercheurs du laboratoire « passés et présents » pour tous les agréables moments que j'ai passé avec eux et grâce à qui ces quatre années ont été pour moi riches d'échanges et d'anecdotes inénarrables.

Je remercie également Jordane et Claire pour m'avoir si bien soutenu durant ma dernière année de thèse. Merci de m'avoir fait découvrir les joies des traitements des spectres infrarouge.

Je tiens aussi à remercier tous mes merveilleux amis, Souhila, Nabila, Nidal, Tinhinane, Audray, Stéphanie, Christelle, Magalie, Caroline, Vincent, Benoit, Simon, Hadi, Olivier et tant d'autres avec qui j'ai vécu des moments de joie intense.

Je n'oublie surtout pas les membres de ma famille. Mes parents Makhoul et Malika ainsi que mes frères et sœurs Azzedine, Yasmine, Mékioussa, Samir, Karim et ma belle sœur Adeline. Ils n'ont cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes ces années. Je leur dois toute ma gratitude et ma profonde reconnaissance. Je tiens à remercier plus

particulièrement mon frère Samir pour avoir été à mes côtés et pour m'avoir si bien conseillé et soutenu durant ces années de thèse.

Sommaire

Avant-propos	2
Sommaire	2
Liste des figures	6
Liste des Tableaux	10
Nomenclature	12
Liste des publications	14
Introduction générale	15
Chapitre 1 : Revue bibliographique	19
1. Stabilité des mélanges de biopolymères	19
1.1. Approche thermodynamique	19
1.2. Incompatibilité et comptabilité thermodynamique	22
1.2.1. Séparation de phase ségrégative	22
1.2.2. Séparation de phase associative	22
2. Les forces d'interaction moléculaire	24
2.1. Les liaisons covalentes	24
2.2. Interactions électrostatiques	26
2.3. Forces de Van der Waals	28
2.3.1. Effet de Keesom (interaction dipôle permanent-dipôle permanent)	29
2.3.2. Effet d'induction de Debye (interaction dipôle permanent-dipôle induit)	30
2.3.3. Effet de dispersion de London (interaction dipôle induit-dipôle induit)	31
2.4. Interactions hydrophobes et liaisons hydrogènes	32
3. Principaux paramètres physico-chimiques influençant la formation de complexes protéines-polysaccharides	34
3.1. Influence du pH	37
3.2. Influence de la force ionique	39
3.3. Influence de la concentration totale en biopolymère	41
3.4. Influence de la densité de charge des macromolécules	41
3.5. Influence de la masse moléculaire des biopolymères	42
4. Intérêt des complexes protéines-polysaccharides	42
5. Généralités sur les flavonoïdes	45
5.1. Structure et classification des flavonoïdes	45
5.2. Propriétés physico-chimiques et biologiques des flavonoïdes	49
5.2.1. Solubilité et stabilité des flavonoïdes	49
5.2.2. Propriétés biologiques des flavonoïdes	53

5.2.3. Biodisponibilité des flavonoïdes	57
Références bibliographiques	59
Chapitre 2 : Préparation et caractérisation de nanoparticules à base de quercétine et de gomme d'Acacia	77
1. Introduction	77
1.1. La gomme d'Acacia	80
2. Matériel et méthodes	85
2.1. Matériel	85
2.2. Préparation et caractérisation de particules submicroniques à base de quercétine et de gomme d'Acacia.....	86
2.2.1. Préparation des dispersions de gomme d'Acacia	86
2.2.2. Préparation des particules submicroniques à base de quercétine et de gomme d'Acacia (GAQ) par homogénéisation haute pression.....	86
2.2.3. Mesure de la taille des particules par diffusion dynamique de la lumière (DLS)	87
2.2.4. Mesures du potentiel Zêta et de la mobilité électrophorétique des particules	88
2.2.5. Propriétés anti-oxydantes et anti-radicalaires de la quercétine nanostructurée	92
2.2.5.1. Piégeage de radicaux ABTS ^{•+}	93
2.2.5.2. Piégeage de radicaux DPPH	94
2.2.6. Microscopie électronique à transmission	96
3. Résultats et discussion.....	96
3.1. Taille et stabilité des nanoparticules de gomme Acacia-quercétine (GAQ)	96
3.2. Mobilité électrophorétique et application de la théorie des particules molles	98
3.3. Microscopie électronique à transmission	101
3.4. Piégeage de radicaux ABTS ^{•+} et DPPH	103
4. Conclusion.....	104
Références bibliographiques	106
Chapitre 3 : Caractérisation thermodynamique des complexes gomme Acacia/ β -lactoglobuline et gomme Acacia-quercétine/ β -lactoglobuline.....	114
1. Introduction	114
2. Description de la calorimétrie de titration isotherme (ITC)	116
2.1. Principe de fonctionnement.....	118
3. Présentation de la β -lactoglobuline	119
4. Matériel et méthodes	123
4.1. Matériel	123
4.2. Préparation des dispersions de β -lactoglobuline (BLG), de gomme d'Acacia (GA) et de gomme d'Acacia-quercétine (GAQ)	124
4.3. Calorimétrie de titration isotherme (ITC)	124

5.	Résultats et discussion.....	128
5.1.	Caractéristiques thermodynamiques d'interaction entre la GA ou la GAQ et la BLG	128
5.2.	Effet de la température sur les caractéristiques thermodynamiques	136
6.	Conclusion.....	144
	Références bibliographiques	147
Chapitre 4 : Etude mésoscopique des complexes formés lors de la titration de la β -lactoglobuline par la gomme d'Acacia et la gomme Acacia-quercétine.....		
1.	Introduction	153
2.	Matériels et méthodes.....	154
2.1.	Matériels.....	154
2.2.	Préparation des dispersions de β -lactoglobuline (BLG), de gomme d'Acacia (GA) et de gomme d'Acacia-quercétine (GAQ)	155
2.2.1.	Taille et distribution de taille des particules	155
2.2.2.	Mobilité électrophorétique	156
2.2.3.	Mesure de la turbidité	157
2.2.4.	Microscopie optique	158
2.2.5.	Spectroscopie Infra-Rouge à Transformée de Fourier	158
3.	Résultats et discussion.....	159
3.1.	Taille et distribution de taille des particules.....	159
3.2.	Mobilité électrophorétique	163
3.3.	Evolution micro-structurale des complexes BLG/GA et BLG/GAQ.....	166
3.4.	Spectroscopie Infra-Rouge à Transformée de Fourier. Détermination des changements de la structure secondaire de la BLG durant la titration par la GA ou la GAQ	170
4.	Conclusion.....	177
	Références bibliographiques	179
Conclusion générale		183
Résumé :		Erreur ! Signet non défini.

Liste des figures

Figure 1.1 : Illustration de l'interaction électrostatique entre deux charges Q_1 et Q_2 .	26
Figure 1.2 : Illustration de l'interaction dipôle-dipôle.	29
Figure 1.3 : Illustration de l'interaction dipôle-dipôle induit.	30
Figure 1.4 : Illustration de l'interaction dipôle induit-dipôle induit.	31
Figure 1.5 : Evolution de (●) la lumière diffuse à 90° (I_{90}) et de (○) la turbidité (τ) en fonction du pH dans des dispersions mixtes BLG / GA au ratio massique BLG : GA de 2 : 1 et à la concentration totale en biopolymères de 0,1 % (P / P). Figure insérée : évolution de (●) dI_{90} / dt (coups.s ⁻¹) et de (○) $d\tau / dt$ (x 10 ⁻³ .cm ⁻¹ .s ⁻¹) en fonction du pH du même système. Mekhloufi <i>et al.</i> , (2005).	38
Figure 1.6 : Représentation schématique de différentes étapes de complexation entre protéines et polysaccharides de charges opposées en fonction du pH. Les cercles bleus représentent la protéine, les lignes courbes représentent le polysaccharide. pH_c : pH critique, pH_ϕ : pH de séparation de phase.	39
Figure 1.7 : Squelette de base des flavonoïdes (Cook et Samman, 1996).	46
Figure 1.8 : Les différentes classes de flavonoïdes (Bohm, 1998 ; Birt et al., 2001 ; Pereira et al., 1998).	48
Figure 2.1: Structure chimique de la quercétine 3,3',4',5-7-pentahydroxyflavonone (Wu <i>et al.</i> , 2008).	77
Figure 2.2 : Représentation schématique du modèle « <i>wattle-blossom</i> » de la fraction arabinogalactane-protéine de la gomme d'Acacia (Fincher <i>et al.</i> , 1983).	82
Figure 2.3 : Représentation schématique du modèle « <i>twisted hairy rope</i> » de la fraction arabinogalactane-protéine de la gomme d'Acacia (Qi <i>et al.</i> , 1991).	82
Figure 2.4 : Différents points de vue du DAM (<i>dummy atom model</i>) le plus probable de la fraction arabinogalactane obtenus en utilisant la méthode DAM implémentée dans le programme DAMMIN (Sanchez <i>et al.</i> , 2008).	84
Figure 2.5 : (a) Micrographie (Microscopie Electronique à Transmission) de la fraction arabinogalactane de la gomme d'Acacia. (b) Micrographie Cryo-TEM de la fraction arabinogalactane de la gomme d'Acacia. (c) Correspond à b après variation du contraste et application d'un filtre FFT (Fast Fourier Transform) (Sanchez <i>et al.</i> , 2008).	85
Figure 2.6: Evolution de la mobilité électrophorétique μ de particules chargées négativement en fonction de la concentration en électrolytes du milieu. La mobilité des particules molles tend vers de valeurs non nulles (μ^∞) à la limite des concentrations les plus élevées, alors que la mobilité des particules dures tend vers zéro (Ohshima, 2007).	92
Figure 2.7 : Pourcentage d'inhibition de l'ABTS ^{•+} en fonction de la concentration en Trolox.	94
Figure 2.8 : Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction de la concentration en acide ascorbique.	95

- Figure 2.9 :** Mobilité électrophorétique des particules de (A) gomme d'Acacia et de (B) gomme Acacia-quercétine. Les symboles représentent les valeurs expérimentales mesurées en fonction de la concentration en NaCl. Les lignes représentent les meilleurs modèles obtenus par les valeurs théoriques.....99
- Figure 2.10 :** Micrographies obtenues par microscopie électronique à transmission sur la gomme d'Acacia. Les barres d'échelle sont respectivement de 50 nm (A) et 200 nm (B).101
- Figure 2.11:** Micrographies obtenues par microscopie électronique à transmission sur des particules de gomme Acacia-quercétine à différentes échelles d'observation. Les barres d'échelle sont de 200 nm (A), 100 nm (B) et 50 nm (C, D). (D) représente l'image « C » après utilisation du logiciel de traitement d'images, ImageJ v1.4 et l'application d'un filtre FFT (Fast Fourier Transform).102
- Figure 3.1 :** Représentation schématique d'un calorimètre de titration isotherme.117
- Figure 3.2 :** Exemple d'un thermogramme (A) et d'une isotherme de liaison (B) obtenus par calorimétrie de titration isotherme.119
- Figure 3.3 :** Structure primaire et secondaire du monomère de β -Ig A. ——— feuillet β , - - - - - hélices α , pont disulfure (d'après Molinari *et al.*, 1996).121
- Figure 3.4 :** Représentation schématique de la structure tridimensionnelle d'un monomère de β -lactoglobuline, avec les feuillets β (flèche de A à I), hélice α (rubans épais), structures désordonnées (rubans fins) et les deux ponts disulfures (représentation moléculaire), obtenue par le programme MOLSCRIPT (Kraulis, 1991 ; Kobayashi *et al.*, 2000).122
- Figure 3.5 :** Thermogrammes correspondant à la titration d'une dispersion de β -lactoglobuline (0,6 %, p/p) par l'eau (a), la titration de l'eau par une dispersion de gomme d'Acacia (1,8 %, p/p) (b) et la titration d'une dispersion de gomme d'Acacia-quercétine (1,8 %, p/p) par l'eau (c) à pH 4,2 et à 25 °C.129
- Figure 3.6 :** Thermogrammes correspondant à la titration d'une dispersion de β -lactoglobuline (0,6 %, p/p) par une dispersion de gomme d'Acacia (1,8 %, p/p) (A) ou par une dispersion de gomme d'Acacia-quercétine (1,8 %, p/p) (B). Isothermes de liaison correspondant à la titration d'une dispersion de β -lactoglobuline (0,6 %, p/p) par une dispersion de gomme d'Acacia (1,8 %, p/p) (C) ou par une dispersion de gomme d'Acacia-quercétine (1,8 %, p/p) (D) à pH 4,2 et à 25 °C.131
- Figure 3.7 :** Isothermes de liaison correspondant à la titration d'une dispersion de β -lactoglobuline (0,6 %, p/p) par une dispersion de gomme d'Acacia (1,8 %, p/p) (●) ou par une dispersion de gomme d'Acacia-quercétine (1,8 %, p/p) (○) à pH 4,2 et à 25 °C.134
- Figure 3.8 :** Thermogrammes correspondant à la titration d'une dispersion de β -lactoglobuline (0,6 %, p/p) par une dispersion de gomme d'Acacia (1,8 %, p/p) (A) ou par une dispersion de gomme d'Acacia-quercétine (1,8 %, p/p) (B) à différentes températures : 25 °C, 35 °C, 45 °C et 50 °C.137
- Figure 3.9 :** Isothermes de liaison correspondant à la titration d'une dispersion de β -lactoglobuline (0,6 %, p/p) par une dispersion de gomme d'Acacia (1,8 %, p/p) (a) ou par une dispersion de gomme d'Acacia-quercétine (1,8 %, p/p) (b) à différentes températures : 25 °C (●), 35 °C (○), 45 °C (■) et 50 °C (□).138
- Figure 3.10 :** Dépendance des variations d'enthalpie ΔH_{m1} (●) et ΔH_{m2} (○) à la température durant la titration d'une dispersion de β -lactoglobuline (0,6 %, p/p) par une dispersion de gomme d'Acacia (1,8 %, p/p). 140

- Figure 3.11 :** Dépendance des variations d'enthalpie ΔH_{m1} (●) et ΔH_{m2} (○) à la température durant la titration d'une dispersion de β -lactoglobuline (0,6 %, p/p) par une dispersion de gomme d'Acacia-quercétine (1,8 %, p/p).141
- Figure 3.12 :** compensation enthalpie-entropie durant la titration d'une dispersion de β -lactoglobuline (0,6 %, p/p) par une dispersion de gomme d'Acacia (1,8 %, p/p) à pH 4,2. (●) première phase de structuration, (○) seconde phase de structuration.143
- Figure 3.13 :** compensation enthalpie-entropie durant la titration d'une dispersion de β -lactoglobuline (0,6 %, p/p) par une dispersion de gomme d'Acacia-quercétine (1,8 %, p/p) à pH 4,2. (●) première phase de structuration, (○) seconde phase de structuration.144
- Figure 4.1 :** Evolution du diamètre des particules en fonction du ratio molaire gomme d'Acacia : β -lactoglobuline durant la titration d'une dispersion de β -lactoglobuline (0,06 % p/p) par une dispersion de gomme d'Acacia (0,18 % p/p) à pH 4,2 et à 25 °C. (●) et (○) représentent deux expériences indépendantes.160
- Figure 4.2 :** Evolution du diamètre des particules en fonction du ratio molaire gomme d'Acacia : β -lactoglobuline durant la titration d'une dispersion de β -lactoglobuline (0,06 % p/p) par une dispersion de gomme d'Acacia-quercétine (0,18 % p/p) à pH 4,2 et à 25 °C. (●) et (○) représentent deux expériences indépendantes.161
- Figure 4.3 :** Evolution de la mobilité électrophorétique en fonction du ratio molaire gomme d'Acacia : β -lactoglobuline durant la titration d'une dispersion de β -lactoglobuline (0,06 % p/p) par une dispersion de gomme d'Acacia (0,18 % p/p) (●), la titration d'une dispersion de β -lactoglobuline (0,06 % p/p) par de l'eau (■) et la titration de l'eau par une dispersion de gomme d'Acacia (0,18 % p/p) (○) à pH 4,2 et à 25 °C.164
- Figure 4.4 :** Evolution de la mobilité électrophorétique en fonction du ratio molaire gomme d'Acacia : β -lactoglobuline durant la titration d'une dispersion de β -lactoglobuline (0,06 % p/p) par une dispersion de gomme d'Acacia-quercétine (0,18 % p/p) (●), la titration d'une dispersion de β -lactoglobuline (0,06 % p/p) par de l'eau (■) et la titration de l'eau par une dispersion de gomme d'Acacia-quercétine (0,18 % p/p) (○) à pH 4,2 et à 25 °C.165
- Figure 4.5 :** Evolution de la turbidité (τ) en fonction du ratio molaire gomme d'Acacia : β -lactoglobuline durant la titration d'une dispersion de β -lactoglobuline (0,06 % p/p) par une dispersion de gomme d'Acacia (0,18 % p/p) (●) et la titration d'une dispersion de β -lactoglobuline (0,06 % p/p) par une dispersion de gomme d'Acacia-quercétine (0,18 % p/p) (○) à pH 4,2 et à 25 °C.167
- Figure 4.6 :** Micrographies obtenues par microscopie optique durant la titration d'une dispersion de β -lactoglobuline (0,06 % p/p) par une dispersion de gomme d'Acacia (0,18 % p/p) à pH 4,2, 25 °C et à différents ratios molaires gomme d'Acacia : β -lactoglobuline. (a) 0,0014 ; (b) 0,0043 ; (c) 0,0086 ; (d) 0,0146 ; (e) 0,0271 ; (f) 0,0335. La barre représente 20 μ m. Le contraste et la luminosité ont été traité par le logiciel ImageJ (version 1.40).169
- Figure 4.7 :** Micrographies obtenues par microscopie optique durant la titration d'une dispersion de β -lactoglobuline (0,06 % p/p) par une dispersion de gomme d'Acacia-quercétine (0,18 % p/p) à pH 4,2, 25 °C et à différents ratios molaires gomme d'Acacia : β -lactoglobuline. (a) 0,0014 ; (b) 0,0043 ; (c) 0,0086 ; (d) 0,0146 ; (e) 0,0271 ; (f) 0,0335. La barre représente 20 μ m. Le contraste et la luminosité ont été traité par le logiciel ImageJ (version 1.40).170
- Figure 4.8 :** Spectres infrarouge à transformée de Fourier de la région amide I d'une dispersion de β -lactoglobuline (2 % p/p) seule (a) et après titration par une dispersion de gomme d'Acacia (6 %, p/p) (b) ou une dispersion de gomme d'Acacia-quercétine (6 %, p/p) (c) à pH 4,2, à 25 °C et à différents ratios molaires : 0,00 (●), 0,0057 (○), 0,0131 (■), 0,0146 (□) et 0,0368 (▲).172

Figure 4.9 : Spectre de la dérivée seconde de la bande amide I d'une dispersion de β -lactoglobuline (2 % p/p) à pH 4,2 et à 25 °C.	173
Figure 4.10 : Ajustement de la courbe de la région amide I de la β -lactoglobuline seule.	174

Liste des Tableaux

Tableau 1.1 : Influence des paramètres physico-chimiques et physiques sur les complexes protéines-polysaccharides.	35
Tableau 1.2 : Exemples d'application des complexes protéines-polysaccharides.	44
Tableau 1.3 : Exemples de propriétés biologiques de flavonoïdes et de leurs esters.	55
Tableau 2.1 : Composition en acide aminés (valeurs données en Résidus / 1000 Résidus) de la gomme d'Acacia obtenue par chromatographie d'interaction hydrophobe (HIC) et par chromatographie d'exclusion de taille (SEC). a : % en protéines obtenu en additionnant les acides aminés, b : % en protéines obtenu par dosage Kjeldahl.	81
Tableau 2.2: Diamètres hydrodynamiques et potentiels Zêta des particules de gomme d'Acacia-quercétine (GAQ).	97
Tableau 2.3: Valeurs de densité de charges et d'épaisseurs de la couche accessible aux contre-ions obtenues par l'application de la théorie d'Ohshima (1995).	100
Tableau 2.4 : Valeurs des activités anti-radicalaires de GAQ et de la quercétine avant et après homogénéisation à haute pression évaluées par piégeage de radicaux ABTS ^{•+} et DPPH.	103
Tableau 3.1 : Paramètres d'interaction correspondant à la première phase de complexation entre la gomme d'Acacia ou la gomme d'Acacia-quercétine et la β -lactoglobuline, obtenus lors de la titration d'une dispersion de β -lactoglobuline (0,6 % p/p) par une dispersion de gomme d'Acacia (1,8 % p/p) ou par une dispersion de gomme d'Acacia-quercétine (1,8 % p/p) à 25 °C et à pH 4,2. N : stoechiométrie, K_a : constante d'association, ΔH_m : variation d'enthalpie, ΔS_m : variation d'entropie et ΔG_m : variation de l'énergie libre de Gibbs.	133
Tableau 3.2 : Paramètres d'interaction correspondant à la seconde phase de complexation entre gomme d'Acacia ou gomme d'Acacia-quercétine et β -lactoglobuline, obtenus lors de la titration d'une dispersion de β -lactoglobuline (0,6 % p/p) par une dispersion de gomme d'Acacia (1,8 % p/p) ou une dispersion de gomme d'Acacia-quercétine (1,8 % p/p) à 25 °C et à pH 4,2. N : stoechiométrie, K_a : constante d'association, ΔH_m : variation d'enthalpie, ΔS_m : variation d'entropie et ΔG_m : variation de l'énergie libre de Gibbs.	134
Tableau 3.3 : Paramètres d'interaction correspondant à la première phase de complexation entre la gomme d'Acacia et la β -lactoglobuline, obtenus lors de la titration d'une dispersion de β -lactoglobuline (0,6 %, p/p) par une dispersion de gomme d'Acacia (1,8 %, p/p) à 25 °C, 35 °C, 45 °C ou 50 °C et à pH 4,2. N : stoechiométrie, K_a : constante d'association, ΔH_m : variation d'enthalpie, ΔS_m : variation d'entropie et ΔG_m : variation de l'énergie libre de Gibbs.	138
Tableau 3.4 : Paramètres d'interaction correspondant à la seconde phase de complexation entre la gomme d'Acacia et la β -lactoglobuline, obtenus lors de la titration d'une dispersion de β -lactoglobuline (0,6 %, p/p) par une dispersion de gomme d'Acacia (1,8 %, p/p) à 25 °C, 35 °C, 45 °C ou 50 °C et à pH 4,2. N : stoechiométrie, K_a : constante d'association, ΔH_m : variation d'enthalpie, ΔS_m : variation d'entropie et ΔG_m : variation de l'énergie libre de Gibbs.	139

Tableau 3.5 : Paramètres d'interaction correspondant à la première phase de complexation entre la gomme d'Acacia-quercétine et la β -lactoglobuline, obtenus lors de la titration d'une dispersion de β -lactoglobuline (0,6 %, p/p) par une dispersion de gomme d'Acacia- quercétine (1,8 %, p/p) à 25 °C, 35 °C, 45 °C ou 50 °C et à pH 4,2. N : stœchiométrie, K_a : constante d'association, ΔH_m : variation d'enthalpie, ΔS_m : variation d'entropie et ΔG_m : variation de l'énergie libre de Gibbs.	139
Tableau 3.6 : Paramètres d'interaction correspondant à la seconde phase de complexation entre la gomme d'Acacia-quercétine et la β -lactoglobuline, obtenus lors de la titration d'une dispersion de β -lactoglobuline (0,6 %, p/p) par une dispersion de gomme d'Acacia- quercétine (1,8 %, p/p) à 25 °C, 35 °C, 45 °C ou 50 °C et à pH 4,2. N : stœchiométrie, K_a : constante d'association, ΔH_m : variation d'enthalpie, ΔS_m : variation d'entropie et ΔG_m : variation de l'énergie libre de Gibbs.	139
Tableau 4.1 : Pourcentage en structure secondaire de la β -lactoglobuline avant et après interaction avec la gomme d'Acacia et la gomme d'Acacia-quercétine.	175

Nomenclature

ATR	Atténuation totale de réflectance
BLG	β -lactoglobuline
d	Distance entre deux molécules
DAM	Dummy atom model
dl_{90} / dt	Dérivée première de l'intensité diffuse à 90° (coups.s ⁻²)
$d\tau / dt$	Dérivée première de la turbidité (m ⁻¹ .s ⁻¹)
D_h	Diamètre hydrodynamique des particules
DLS	Diffusion dynamique de la lumière
D_T	Coefficients de diffusion translationnelle
E	Champ électrique
EEP	pH d'équivalence électrique
ELD	Electrophorèse Laser Doppler
FFT	Fast Fourier Transform
FTIR	Infra-Rouge à Transformée de Fourier
GA	Gomme d'Acacia
GAQ	Gomme d'Acacia-quercétine
HPSEC-MALLS	High performance size exclusion chromatography coupled on-line with multiple angle laser light scattering
I	Energie d'ionisation des molécules
ITC	Colorimétrie de titration isotherme
k_B	Constante de Boltzmann ($1,38 \times 10^{-23}$ N.m.k ⁻¹)
pHi	pH isoélectrique d'une protéine
pH_ϕ	pH de séparation de phase
pH_c	pH de formation des complexes macromoléculaires primaires
Pr	Protéine
Ps	Polysaccharide
Q	Charge portée par la molécule
R	Constante des gaz parfaits (8,3144 J.mole ⁻¹ .K ⁻¹)
R_h	Rayon hydrodynamique
SANS	Diffusion des neutrons aux petits angles
T	Température absolue (K)
TEM	Microscopie Electronique à Transmission
V	Volume total du mélange
V_i	Volume molaire du composé i (m ³ .mole ⁻¹)
ΔE_i	Chaleur de vaporisation du composé i à pression nulle (J.kg ⁻¹ .K ⁻¹)
ΔG_m	Variation de l'énergie libre du mélange (J)
ΔH_m	Variations d'enthalpie du mélange (J.mole ⁻¹)
ΔS_m	Variations d'entropie du mélange (J.K ⁻¹)
α	Polarisabilité de la molécule
ϵ	Constante diélectrique du milieu
ϵ_0	Permittivité du vide ($8,854187 \times 10^{-12}$ A.s.V ⁻¹ .m ⁻¹)
δ_i	Paramètre de solubilité du composé i
ϕ_i	Fraction volumique du composé i
κ	Paramètre électrostatique de Debye-Hückel
μ	Moment dipolaire électrique
μ_i	Moment dipolaire induit
μ^*	Moment de dipôle instantané

η	Viscosité du solvant (Pa.s)
τ	Turbidité
v	Vitesse des particules
ζ	Potentiel zêta

Liste des publications

1. **L. Aberkane**, C., Sanchez, S., Desobry-Banon. Préparation de nanodispersions de quercetine par homogénéisation haute pression dynamique. Séminaire de l'école doctorale RP2E, 17 janvier 2008, Nancy, France.
2. C. Schmitt, **L. Aberkane**, C. Sanchez. Protein-polysaccharide complexes and coacervates. *Handbook of Hydrocolloids*, 2nd edition. Edited by G.O. Phillips and P.A. Williams, Glyndwr University, UK, 2009. Chapitre 16, pages 421- 476.
3. **L. Aberkane**, C. Sanchez. Formation of supramolecular assemblies based on Beta-lactoglobuline and core-shell Acacia-gum-quercetin submicronic particles. Proceeding of the 5th *International Symposium on Food Rheology and Structure*, 15-18 juin 2009, Zürich, Switzerland, pages 294-297.
4. **L. Aberkane**, J. Jasniewski, C. Gaiani, J. Scher, C. Sanchez. (2010). Thermodynamic characterization of Acacia gum- β -lactoglobuline complex coacervation. *Langmuir*, 26(15), 12523–12533.
5. R. Hussain, C. Gaiani, **L. Aberkane**, J. Scher. Characterization of High Milk Proteins Powders Upon Rehydration Under Various Salt Range. *Journal of dairy Science* (sous presse).
6. **L. Aberkane**, J. Jasniewski, C. Gaiani, J. Scher, C. Sanchez. (2010). Binding of Quercetin-gum nanoparticles to β -lactoglobulin: A calorimetric and Spectroscopic investigation. *Biomacromolécules* (en rédaction).
7. R. Hussain, C. Gaiani, **L. Aberkane**, J. Ghanbaja, J. Scher. (2010) Multiscale Characterization of Casein Micelles under NaCl Range Conditions. *Langmuir* (soumise).

Introduction générale

L'évolution socioculturelle de nos pays a entraîné un changement dans nos habitudes alimentaires. La production alimentaire n'a plus pour seul but de satisfaire les besoins alimentaires de base. Les consommateurs s'intéressent de plus en plus aux bienfaits des aliments pour la santé et commencent à regarder au-delà des avantages nutritionnels essentiels des aliments pour s'intéresser à la prévention des maladies et aux composés améliorant la santé que contiennent de nombreux aliments.

Parmi ces nouveaux composés potentiellement intéressants, les antioxydants, tels que les flavonoïdes, ont été particulièrement étudiés en raison de leur utilisation de plus en plus répandue dans les domaines pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires pour leurs effets bénéfiques ou supposés comme tels pour la santé. Des flavonoïdes tels que la rutine, la quercétine, la naringine, l'hesperitine, etc., à l'état pur et sous forme d'extraits, sont aujourd'hui de plus en plus commercialisés pour diverses applications pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires. Cependant, la formulation de ces molécules dans diverses préparations est difficile à réaliser. En effet, la mise en œuvre des flavonoïdes est difficile même aux faibles concentrations des préparations cosmétiques (0,01-0,15 %) en raison d'une faible solubilité de ces composés dans la plupart des solvants utilisés dans ce domaine. De plus, après incorporation dans des préparations, ces composés sont très instables à la lumière et à la chaleur. En effet, les flavonoïdes peuvent s'oxyder rapidement, ce qui conduit à une modification de la couleur de la préparation et à une altération de leurs propriétés bénéfiques.

Notre travail s'inscrit dans le cadre du développement de formes d'administration des molécules d'intérêt biologique en utilisant des systèmes dispersés submicroniques. Les résultats escomptés sont l'obtention d'ingrédients polyfonctionnels faciles à incorporer dans

des matrices alimentaires modèles et possédants une meilleure solubilité, stabilité et biodisponibilité. Les dérivés produits constitueront des ingrédients santé très intéressants.

Le principal objectif de cette thèse était d'acquérir des connaissances à différentes échelles d'étude sur les mécanismes d'interaction et d'assemblage entre flavonoïdes et biopolymères. La structuration des flavonoïdes est de nature à améliorer leur solubilité en solvant aqueux et leur stabilité, mais également leur biodisponibilité en facilitant leur transport à travers les membranes cellulaires.

L'approche méthodologique consiste à former dans une première étape des complexes primaires entre le flavonoïde à l'étude (quercétine) et un polysaccharide anionique tensioactif (gomme d'Acacia). Dans une seconde étape, des complexes supramoléculaires sont formés en faisant interagir la gomme d'Acacia et une protéine globulaire animale (β -lactoglobuline). Chaque étape nécessite une étude fondamentale des mécanismes de structuration, incluant la quantification thermodynamique des interactions, le mécanisme dynamique d'interaction et l'étude de la structure à différentes échelles, incluant celle des biopolymères.

Nous avons choisi comme flavonoïde la quercétine qui est un des polyphénols possédant un très fort potentiel antioxydant. Cependant, elle est aussi connue pour être très peu soluble dans des phases aqueuses et lipophiles. Différentes techniques ont été utilisées afin de pallier à ce problème (ajout d'agents stabilisant, acylation par l'introduction de groupements esters d'acides gras et glycosylation par introduction d'un groupement glycosidique) mais avec un succès limité (risques de toxicité et instabilité lors du stockage). Travailler avec la quercétine, reste donc un bon défi à relever.

Le choix des biopolymères s'explique par nos études antérieures sur ce système, qui nous permettent de bien contrôler les interactions macromoléculaires, ainsi que la structure et

la stabilité des complexes formés. Les principaux enjeux de cette fonctionnalisation physico-chimique originale concernent le contrôle des interactions moléculaires, de la structure et de la stabilité des particules formées. Un autre enjeu important concerne l'insolubilité dans les solvants aqueux de la quercétine, qui nécessite l'utilisation d'un solvant intermédiaire, l'éthanol, afin de permettre la mise en place des interactions avec des biopolymères plutôt hydrophiles.

Le document présenté ici se compose de quatre chapitres qui s'attachent à considérer un point précis de l'étude globale.

Ainsi, le chapitre I est essentiellement consacré à la revue bibliographique des études concernant les complexes protéines-polysaccharides. Il débute en rappelant les connaissances acquises sur les biopolymères à l'étude et les bases théoriques de la stabilité des solutions macromoléculaires, puis fait le point sur les types d'interactions se produisant dans les complexes protéine-polysaccharide. Une seconde partie est par la suite consacrée à une revue bibliographique concernant les flavonoïdes.

Le chapitre II concerne la première étape de notre étude. Il s'agit de la mise au point des particules submicroniques à base de quercétine et de gomme d'Acacia par homogénéisation dynamique à haute pression. Les entités obtenues ont par la suite été caractérisées par des mesures de taille, de mobilité électrophorétique et par microscopie électronique à transmission. Le pouvoir antioxydant de la quercétine a également été mesuré par une étude spectrophotométrique afin d'évaluer l'effet des hautes pressions et de la complexation avec la gomme d'Acacia.

Dans le chapitre III, nous avons étudié les caractéristiques thermodynamiques des complexes gomme Acacia/ β -lactoglobuline et gomme Acacia-quercétine/ β -lactoglobuline.

Les paramètres thermodynamiques d'interaction ont été déterminés par titration calorimétrique isothermique (ITC), méthode permettant de mesurer les contributions enthalpiques/entropiques, la constante d'association, stœchiométrie des complexes.

Finalement, nous avons dans le chapitre IV, une approche à plusieurs niveaux d'observation afin de mieux caractériser les différentes phases de complexation. L'objectif était de déterminer les transitions structurales à différentes échelles lors de la complexation entre la β -lactoglobuline et la gomme d'Acacia ou la gomme Acacia-quercétine. La structure et la morphologie des complexes obtenus ont été déterminées par diffusion dynamique de la lumière, densité optique, microscopie optique et spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier.

Chapitre 1 : Revue bibliographique

1. Stabilité des mélanges de biopolymères

Les mélanges de biopolymères en solution aqueuse présentent soit une instabilité thermodynamique se traduisant macroscopiquement par une séparation de phase, soit, dans des cas plus rares, par une miscibilité des biopolymères dans des solutions diluées (interactions biopolymère-biopolymère égale à celles biopolymère-solvant et solvant-solvant) (Albertsson, 1971 ; Tolstoguzov, 2003 ; Turgeon *et al.*, 2007). La compatibilité ou l'incompatibilité entre les biopolymères proviennent de la faible entropie de mélange des composés macromoléculaires, qui ne peut compenser des valeurs même très faiblement positives de l'enthalpie de mélange, défavorables à la stabilité de ce dernier (Frugier, 1988).

Lorsque la concentration des biopolymères augmente et excède une certaine valeur critique, la co-solubilité entre les biopolymères devient alors limitée conduisant à une séparation de phase (Tolstoguzov, 2003 ; Turgeon *et al.*, 2007). La séparation de phase peut être soit de type ségrégatif soit de type associatif. Dans un cas comme dans l'autre, l'interaction protéines-polysaccharides peut changer de répulsive à attractive et vice versa, suivant les conditions du solvant (pH, force ionique...), de concentrations ou de température (Dickinson, 1993 ; Bergfeldt *et al.*, 1996).

1.1. Approche thermodynamique

L'approche la plus communément utilisée dans le traitement théorique des problèmes de stabilité des solutions biopolymériques découle de la théorie de Flory-Huggins (Flory, 1941 ; Huggins, 1942). D'après cette dernière, en considérant un mélange de biopolymères

avec un solvant, la stabilité du système obtenu dépend en vertu du « Second Principe de la Thermodynamique » de la variation de l'énergie libre du mélange ΔG_m . Selon l'équation (1.1), ΔG_m doit être négative et ne posséder qu'un seul minimum local pour que le mélange soit stable (monophasique) :

$$\Delta G_m = \Delta H_m - T\Delta S_m < 0 \quad (1.1)$$

Les termes ΔH_m et ΔS_m représentent respectivement les variations d'enthalpie et d'entropie dues au mélange. T est la température absolue exprimée en °K. Cette équation démontre qu'une réaction est favorisée lorsque la variation d'entropie (ΔS_m) est positive et/ou lorsque la variation d'enthalpie (ΔH_m) est négative. L'énergie libre de Gibbs est la propriété thermodynamique la plus utilisée lors de l'étude de la stabilité de solutions composées de solvants et de solutés.

La stabilité d'un mélange de biopolymères dépend principalement de la contribution des termes ΔH_m et ΔS_m d'après l'équation (1.1). Cette contribution s'exprime principalement au travers de trois effets thermodynamiques qui sont : l'entropie combinatoire de mélange, la contribution des interactions entre les molécules et l'effet de volume libre (Tompa, 1956 ; Patterson, 1982).

L'énergie combinatoire de mélange, ΔS_m , représente le nombre de positions différentes pouvant être occupées par les molécules à l'intérieur du réseau (mélange). En d'autres termes, ΔS_m représente l'état de désordre potentiel du mélange. L'entropie combinatoire de mélange peut être définie par l'équation (1.2) :

$$\Delta S_m /RV = - [(\varphi_1 \ln \varphi_1)/V_1 + (\varphi_2 \ln \varphi_2)/V_2] \quad (1.2)$$

où φ_i est la fraction volumique du composé i dans le mélange, V_i son volume molaire, R la constante des gaz parfaits ($8,3144 \text{ J.mole}^{-1}.\text{K}^{-1}$) et V le volume total du mélange.

La contribution interactionnelle à l'énergie libre de mélange ou chaleur de mélange, ΔH_m , repose sur l'existence de forces intermoléculaires répulsives (hydratation, répulsions électrostatiques ou stériques) ou attractives (interactions électrostatiques, hydrophobes, Van der Waals) entre les molécules et les atomes des différents constituants du mélange. ΔH_m peut être définie par l'équation (1.3) :

$$\Delta H_m = V (\delta_1 - \delta_2)^2 \varphi_1 \varphi_2 \quad (1.3)$$

$$\text{avec } \delta_i = (\Delta E_i/V_i)^{1/2}$$

où V est le volume total du mélange, ΔE_i la chaleur de vaporisation du composé i à pression nulle, V_i le volume molaire du composé i , δ_i le paramètre de solubilité défini par Scott et Hildebrand (1951).

La contribution du volume libre à l'énergie libre de mélange est liée à la variation de volume induite par les molécules constituant le mélange, généralement le solvant et le/les biopolymère(s). Il représente l'influence de la différence entre les volumes libres du solvant et des biopolymères. Le volume libre du biopolymère est considéré comme très faible par rapport à celui du solvant du fait de la différence de taille entre les molécules. En conséquence, le mélange qui tend à rapprocher les molécules les unes des autres contribue négativement à ΔS_m et ΔH_m .

1.2. Incompatibilité et comptabilité thermodynamique

1.2.1. Séparation de phase ségrégative

La séparation de phase ségrégative, appelée aussi incompatibilité thermodynamique est courante dans les mélanges de macromolécules de type protéine/polysaccharide utilisés en industrie alimentaire. Elle permet d'obtenir un grand nombre de produits possédant des structures et des textures différentes après un traitement technologique des mélanges (Samant *et al.*, 1993 ; Ledward, 1994 ; Tolstoguzov, 1997 ; Dickinson, 1998). C'est une séparation de phase spontanée, provoquée par une répulsion nette entre les biopolymères en solution aqueuse, chacun ayant une affinité préférentielle avec le solvant. Cela donne lieu à une ségrégation en deux phases coexistantes, chacune concentrée en l'un des deux biopolymères.

Les interactions répulsives sont non spécifiques et typiquement transitoires. Elles ont essentiellement lieu par les effets du volume exclu et/ou les forces ioniques entre les charges de même signe, et tendent à être relativement faibles. Les interactions protéines-polysaccharides répulsives nettes se produisent le plus souvent avec des polysaccharides non-ioniques ou anioniques à un pH proche du point isoélectrique de la protéine (Dickinson, 1993 ; Dickinson, 1998). Généralement, les protéines et les polysaccharides sont incompatibles à une concentration suffisamment élevée et sous les conditions inhibant leur complexation (force ionique supérieure à $0,2 \text{ mole.l}^{-1}$, pH supérieur au point isoélectrique de la protéine, concentration totale en biopolymères supérieure à 3 – 4 %) (Tolstoguzov, 1996).

1.2.2. Séparation de phase associative

C'est un phénomène donnant lieu à l'apparition de deux phases distinctes à l'équilibre thermodynamique, l'une contenant principalement le solvant, l'autre concentrée en biopolymères. Ce type de séparation de phase fait alors référence à un phénomène de démixtion induite soit par des interactions directes (électrostatiques ou hydrogènes) entre les

biopolymères, ce qui est le cas de la coacervation complexe, soit par des conditions de mauvais solvant qui favorisent cette séparation sans exiger l'implication d'interaction entre les molécules (Bergfeldt *et al.*, 1996 ; Doublier *et al.*, 2000). La coacervation complexe est un cas particulier de séparation de phase associative ayant lieu en mélangeant dans un milieu aqueux deux macromolécules portant des charges opposées. Elle est essentiellement induite par des forces attractives entre les charges opposées portées par les macromolécules. Elle résulte en la formation de complexes inter-biopolymères donnant lieu à la formation de deux phases distinctes, l'une diluée contenant essentiellement le solvant, l'autre concentrée en complexes (coacervats) dite phase coacervée.

Les interactions attractives varient largement en force et en spécificité. Une liaison covalente entre protéine et polysaccharide représente une interaction attractive spécifique, forte et permanente. Les interactions non spécifiques sont le résultat de la superposition d'une multitude d'interactions chimiques individuelles entre les groupes présents sur les biopolymères (ioniques, dipolaires, Van der Waals, hydrogènes, hydrophobes, etc.). Des interactions attractives faibles peuvent avoir lieu, à de faibles forces ioniques, entre les protéines non chargées ou faiblement chargées négativement ($\text{pH} > \text{pI}$) et des polysaccharides. La complexation électrostatique entre protéines et polysaccharides a lieu généralement dans l'intervalle de pH compris entre le point isoélectrique de la protéine et la valeur pK des groupements anioniques du polysaccharide, principalement des groupements carboxyles ($\text{pK} \sim 3$). Dans cet intervalle de pH, les deux biopolymères portent des charges opposées.

La force de complexation dépend de la distribution des groupements ionisables à la surface de la protéine, de la facilité avec laquelle sa structure native se déplie, de sa flexibilité et de la distribution de charges sur le polysaccharide (Ledward, 1994). Les complexes électrostatiques peuvent être solubles ou insolubles suivant le degré de neutralisation mutuelle

des biopolymères portant des charges opposées. Les complexes solubles sont souvent non-stœchiométriques et chargés. Les complexes insolubles forment une phase concentrée liquide ou un gel, contenant les deux biopolymères en interaction (Tolstoguzov, 1996).

La neutralisation mutuelle des chaînes portant des charges opposées diminue l'hydrophilie des zones de jonction formées par la diminution de la charge nette. Le complexe possède alors une conformation compacte avec des zones de jonctions cachées dans la partie interne hydrophobe du complexe. La neutralisation de charges du polysaccharide anionique peut diminuer la rigidité des chaînes. Ce phénomène est dû à la diminution des interactions répulsives entre des groupements de même charge (Tolstoguzov, 2003).

2. Les forces d'interaction moléculaire

Les interactions macromoléculaires responsables de la formation des complexes peuvent être regroupées en trois classes distinctes : i) les interactions entre les molécules chargées, ii) les interactions entre les résidus acides ou basiques des chaînes latérales des macromolécules et iii) les interactions entre les autres chaînes latérales des macromolécules (Tolstoguzov, 1997). Les interactions attractives peuvent être spécifiques, d'intensités élevées et permanentes (liaisons covalentes). Les interactions attractives non spécifiques résultent généralement d'une multitude d'interactions faibles entre les macromolécules (interactions ioniques, hydrophobes, liaisons hydrogènes).

2.1. Les liaisons covalentes

La liaison covalente est une liaison très spécifique résultant de la mise en commun d'électrons entre deux atomes. Elle peut s'établir entre une protéine et un polysaccharide (Stainsby, 1980) et son énergie potentielle se situe entre 200 et 800 kJ.mole⁻¹ (Israelachvili, 1992). Généralement, ce type de liaison est obtenu par réaction chimique des groupements

aminés des protéines avec les groupes carboxyliques des polysaccharides pour former une liaison de type amide. Cette réaction est favorisée par la déshydratation du complexe (chauffage ou cryo-séchage) ou par l'utilisation d'une enzyme (transglutaminase) ou par l'utilisation d'agents réticulant (glutaraldéhyde, carbodiimide). La production de conjugués protéines-polysaccharides *via* une réaction de Maillard est toutefois reconnue comme étant la méthode la plus apte à être utilisée pour des applications alimentaires (Kato, 2002). Plusieurs études ont montré que la synthèse de conjugués protéine-polysaccharide améliorait les propriétés fonctionnelles des protéines (augmentation de la solubilité des protéines, en particulier aux environs de leur pH isoélectrique et augmentation de la stabilité à la chaleur) en comparaison avec celles des protéines natives (Kato, 2002 ; Oliver *et al.*, 2006 ; O'Regan et Mulvihill, 2009 ; O'Regan et Mulvihill, 2010).

Différentes études ont montré que la conjugaison avec des polysaccharides améliorait la stabilité à la chaleur des protéines du lait (Jiménez-Castaño *et al.*, 2007), des protéines de soja (Diftis et Kiosseoglou, 2006), de l'ovalbumine (Kato *et al.*, 1995) et du lysozyme (Ramezani *et al.*, 2008). O'Regan et Mulvihill (2010) ont travaillé sur le système caséinate de sodium/ dextrane, la conjugaison étant obtenue par réaction de Maillard (incubation à 60 °C, humidité relative 79 %, 4 jours). Les auteurs ont montré que la température de dénaturation du caséinate de sodium conjugué avait augmenté par rapport à la protéine native. De plus, les propriétés émulsifiantes du conjugué ont été fortement améliorées.

La conjugaison s'est aussi révélée être un moyen efficace pour améliorer l'immunogénicité des antigènes. Plusieurs travaux ont permis de montrer que la co-administration d'un dérivé du chitosane, le N-triméthyl chitosane, comme adjuvant d'antigène (ovalbumine) permettait d'augmenter la production d'anticorps en comparaison avec l'antigène seul (Amidi *et al.*, 2007 ; Sayin *et al.*, 2008 ; Hagenars *et al.*, 2009).

Des ponts disulfures intermoléculaires se forment en même temps que le repliement des protéines dans leur conformation native. Ils servent à la stabilisation de la structure tridimensionnelle des protéines qui sont contraintes dans une certaine conformation. Ce type d'interaction dépend du milieu plus ou moins oxydant dans lequel est placée la protéine.

La liaison covalente représente en somme un moyen efficace pour stabiliser et rendre irréversible une interaction électrostatique théoriquement sensible aux variations de pH ou de force ionique.

2.2. Interactions électrostatiques

Les interactions électrostatiques s'établissent entre des molécules portant des charges électriques opposés. Les charges peuvent avoir plusieurs origines :

- Ionisation ou dissociation de groupes en surface.
- Adsorption non équilibrée d'ions conduisant à des excès superficiels positifs ou négatifs.

Les interactions électrostatiques peuvent être de type ion-ion, ion-dipôle ou dipôle-dipôle. L'énergie potentielle (V) de ces interactions dépend des charges portées par les molécules (Q_1 et Q_2), de la distance entre les molécules (d) et de la constante diélectrique du milieu (ϵ) (Figure 1.1).

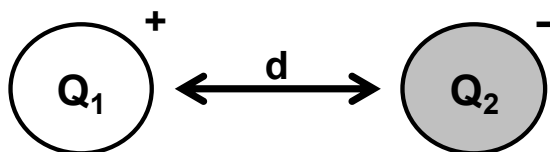


Figure 1.1 : Illustration de l'interaction électrostatique entre deux charges Q_1 et Q_2 .

L'énergie potentielle est exprimée selon l'équation (1.4) :

$$V = \frac{Q_1 Q_2}{4\pi\epsilon\epsilon_0 d}$$

avec :

ϵ_0 : la permittivité du vide : $8,854187 \times 10^{-12}$ A.s.V⁻¹.m⁻¹ (ampères-seconde par volt par mètre).

ϵ : la permittivité du milieu.

d : la distance entre les deux charges.

La complexation électrostatique entre protéines et polysaccharides a lieu dans l'intervalle de pH compris entre le point isoélectrique de la protéine et la valeur pK des groupements anioniques du polysaccharide, principalement carboxyles (pK ~ 3) à de faibles forces ioniques. Dans cet intervalle de pH, les deux biopolymères portent des charges opposées. D'après Ledward (1994), la force de complexation entre protéines et polysaccharides dépend de la distribution des groupes ionisables à la surface de la protéine, de la facilité avec laquelle la structure native de la protéine se déplie, et la flexibilité de structure et de distribution de charge sur le polysaccharide.

Il est admis que deux types de complexes macromoléculaires peuvent être obtenus lors de la mise en jeu d'interactions électrostatiques. D'une part, des complexes solubles lorsque le nombre de charges entre les molécules interagissant ne s'équilibrent pas entièrement. Dans ce cas, la charge globale portée par le complexe obtenu permet à celui-ci de rester soluble en interagissant avec les molécules de solvant. D'autre part, des complexes insolubles lorsque la neutralisation des charges portées par les deux macromolécules est totale, la charge globale du

complexe obtenu étant nulle. Ces complexes insolubles forment une phase concentrée liquide ou comme un gel, contenant les deux biopolymères ayant interagi (Tolstoguzov, 1996).

La neutralisation mutuelle des chaînes portant des charges opposées diminue l'hydrophilicité des zones de jonction formées par la diminution de la charge nette. Le complexe possède alors une conformation compacte avec des zones de jonction cachées dans la partie interne hydrophobe du complexe. La neutralisation de charges du polysaccharide anionique peut diminuer la rigidité des chaînes due à la diminution des interaction répulsives des groupements de même charge (Tolstoguzov, 2003).

Généralement, l'établissement de liaisons électrostatiques entre des molécules chargées entraîne une diminution de l'énergie libre électrostatique du système par diminution de la mobilité et de la flexibilité des biopolymères (de Vries et Cohen Stuart, 2006). Cependant, la perte d'entropie engendrée est en partie compensée par les contributions enthalpiques et entropiques provenant de la libération des contre-ions associés aux macromolécules mais également par la libération de molécules d'eau (Piculell *et al.*, 1995 ; Tolstoguzov, 1997 ; de Vries et Cohen Stuart, 2006). Il est à noter que la libération des contre-ions a été expérimentalement démontrée par Gummel *et al.*, (2007) dans le système lysozyme / polystyrène sulfonate à l'aide de contre-ions de tétraméthylammonium deutéré.

2.3. Forces de Van der Waals

Les forces de Van der Waals résultent de l'interaction entre les nuages électrostatiques des atomes ou molécules très proches les uns des autres. Ce sont des interactions électriques de faible intensité survenant entre des molécules non polaires. Les forces de Van der Waals regroupent l'interaction de Keesom (orientation de dipôles permanents sous l'effet d'un champ électrique provoqué par un dipôle permanent), l'interaction de Debye (orientation des

dipôles induits au sein d'atomes ou de molécules polarisables par un dipôle permanent) et l'interaction de London (orientation de dipôles dans le voisinage d'un dipôle instantané provoqué par une fluctuation dans la distribution de charges électriques). L'énergie d'interaction de Van der Waals est proportionnelle à $1/d^6$ (d étant la distance entre deux atomes), elle est de l'ordre de 1 à 20 kJ.mole⁻¹.

2.3.1. Effet de Keesom (interaction dipôle permanent-dipôle permanent)

Les forces de Keesom sont principalement liées à l'électronégativité. Elles apparaissent entre au moins deux molécules polaires (dipôles dits permanents), d'où leur ancien nom d'interaction « dipôle-dipôle ». Lorsque, dans une molécule neutre, les barycentres des charges positives et des charges négatives ne coïncident pas, la molécule est dite polaire et possède un moment de dipôle électrique (μ) dirigé de la charge négative vers la charge positive. Deux molécules polaires peuvent trouver des positions favorables pour maximiser l'attraction entre elles (Figure 1.2).

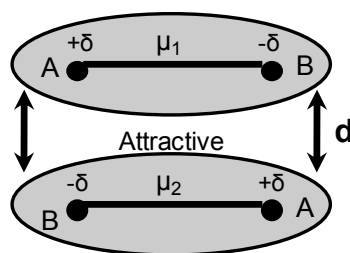


Figure 1.2 : Illustration de l'interaction dipôle-dipôle.

L'énergie potentielle d'interaction (V) correspondante s'exprime selon l'équation (1.5) :

$$V = \frac{-2\mu_1^2\mu_2^2}{3(4\pi\epsilon\epsilon_0)^2kTd^6}$$

avec :

μ : le moment dipolaire de la molécule

k : la constante de Boltzmann (1.38×10^{-23} J/K)

T : la température (°K)

ϵ_0 : la permittivité du vide : $8,854187 \times 10^{-12}$ A.s.V⁻¹.m⁻¹ (ampères-seconde par volt par mètre).

ϵ : la permittivité du milieu

d : la distance entre les deux dipôles

2.3.2. Effet d'induction de Debye (interaction dipôle permanent-dipôle induit)

Les forces de Debye sont les forces intermoléculaires résultant de l'interaction entre un dipôle permanent et un dipôle induit. Une molécule polaire, de moment permanent μ , induit une déformation du nuage électronique des molécules apolaires voisines sous l'effet de son champ électrique E (Figure 1.3). Cette déformation du nuage électronique est caractérisée par la polarisabilité α de la molécule apolaire, qui augmente avec son nombre d'électrons. La molécule apolaire acquiert ainsi un moment dipolaire induit de norme $\mu_i = \alpha E$ qui interagit avec le dipôle permanent de la première molécule.

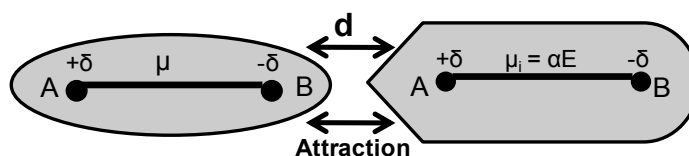


Figure 1.3 : Illustration de l'interaction dipôle-dipôle induit.

L'énergie potentielle d'interaction V correspondante s'exprime selon l'équation (1.6) :

$$V = -\frac{4\mu^2\alpha}{(4\pi\epsilon\epsilon_0)^2 d^6}$$

avec :

μ : le moment dipolaire de la molécule

μ_i : le moment dipolaire induit

α : la polarisabilité de la molécule

E : le champ électrique

ϵ_0 : la permittivité du vide: $8,854187 \times 10^{-12}$ A.s.V⁻¹.m⁻¹ (ampères-seconde par volt par mètre).

ϵ : la permittivité du milieu dans lequel évoluent les molécules

d : la distance entre les deux dipôles

2.3.3. Effet de dispersion de London (interaction dipôle induit-dipôle induit)

Les forces de dispersion de London sont des forces faibles intermoléculaires créées par des dipôles induits (Figure 1.4). Elles représentent en général la composante la plus importante des forces de Van der Waals et se manifestent entre tous les types de molécules. Dans le cas des molécules apolaires, les forces de London sont les seules forces qui agissent entre les molécules. Le mouvement des électrons de la molécule apolaire peut créer un moment de dipôle instantané μ^* qui peut polariser les molécules adjacentes et produire un moment de dipôle induit μ_i . Ces deux dipôles instantanés varient très rapidement au cours du temps et peuvent interagir ensemble.

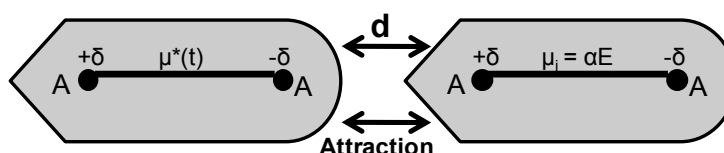


Figure 1.4 : Illustration de l'interaction dipôle induit-dipôle induit.

L'énergie potentielle d'interaction V correspondante s'exprime selon l'équation (1.7) :

$$V = -\frac{2}{3} \frac{\alpha_{01}\alpha_{02}}{(4\pi\epsilon\epsilon_0)^2 d^6} \frac{l_1 l_2}{l_1 + l_2}$$

avec :

$\mu^*(t)$: le moment dipolaire instantané de la molécule

μ_i : le moment dipolaire induit

I : l'énergie d'ionisation des molécules

α : la polarisabilité des molécules

E : le champ électrique

ϵ_0 : la permittivité du vide: $8,854187 \times 10^{-12}$ A.s.V⁻¹.m⁻¹ (ampères-seconde par volt par mètre).

ϵ : la permittivité du milieu dans lequel évoluent les molécules

d : la distance entre les deux dipôles

2.4. Interactions hydrophobes et liaisons hydrogènes

L'importance des interactions électrostatiques dans la formation des complexes protéines-polysaccharides a été largement étudiée dans le passé. Cependant, aucune étude spécifique sur le rôle des interactions de plus faible énergie, en particulier les liaisons hydrogène et les interactions hydrophobe, n'a pu être trouvée dans la littérature.

L'effet hydrophobe n'est pas en soit une liaison mais un facteur thermodynamique qui favorise les interactions macromoléculaires (Pollard et Earnshaw, 2004). Les interactions hydrophobes sont en fait des forces indirectes qui favorisent le regroupement de molécules non polaires suite à des interactions entre des molécules polaires.

Les interactions hydrophobes, au même titre que les liaisons hydrogènes, sont susceptibles de s'établir dans les complexes protéine-polysaccharide. Ces interactions sont de nature endothermique et sont donc favorisées par une augmentation de la température. L'énergie de ces associations hydrophobes est de l'ordre de 2 à 10 kJ.mole⁻¹.

D'un point de vue thermodynamique, l'auto-assemblage et les autres réactions qui aboutissent à l'association de molécules distinctes pour former des structures plus ordonnées semblent peu probables. Néanmoins, de nombreuses réactions d'association se produisent et l'étude expérimentale de ces phénomènes montre une augmentation réelle de l'entropie (Pollard et Earnshaw, 2004). L'entropie du système, qui comprend les macromolécules ainsi que le solvant, augmente proportionnellement avec le désordre des molécules d'eau entourant ces biopolymères. Cette augmentation de l'entropie des molécules d'eau compense largement la structuration des macromolécules et la diminution de l'entropie qu'elle entraîne.

Lorsque des protéines se replient, ou lorsque des macromolécules se lient entre elles, les groupes hydrophobes sont enfouis dans des poches ou entre des interfaces qui excluent les molécules d'eau. Les molécules d'eau auparavant disposées régulièrement au niveau de ces surfaces se dispersent dans des phases moins structurées et l'entropie du système augmente. Cette dispersion des molécules d'eau à la surface résultant de l'enfouissement des zones hydrophobes des macromolécules est appelée « l'effet hydrophobe ». Les interactions hydrophobes constituent une force majeure d'agrégation mais ne suffisent pas à déterminer une spécificité dans les interactions moléculaires qui permet d'exclure les molécules d'eau.

Les liaisons hydrogènes ou ponts hydrogènes sont des liaisons non covalentes, de type dipôle-dipôle. Elles ont un caractère ionique et font référence à une interaction entre un atome d'hydrogène lié à un atome électronégatif (N, O ou S) et un autre atome électronégatif. Les liaisons hydrogènes présentent une propriété supplémentaire, elles sont essentiellement directionnelles et les atomes impliqués (donneurs, H, accepteurs) sont en général disposés de façon linéaire. De plus, les liaisons hydrogènes sont plus spécifiques que les interactions de Van der Waals car elles requièrent la présence de groupements donneurs et accepteurs

d'atomes d'hydrogène supplémentaires. L'établissement de liaisons hydrogène est favorisé à basse température et l'énergie d'une liaison s'échelonne entre 10 et 30 kJ.mole⁻¹.

La contribution des interactions de faible énergie (interactions hydrophobes et liaisons hydrogènes) dans la formation de complexes peut être détectée en faisant varier la température et la concentration en sel du système (Turgeon *et al.*, 2007). Les faibles températures sont favorables aux liaisons hydrogènes alors que les fortes températures sont favorables aux interactions hydrophobes. Ainsi, une diminution de la température a induit une légère augmentation du pH de séparation de phase dans un système composé de protéines du lactosérum et de carraghénane (Weinbreck *et al.*, 2004). De tels résultats indiquent que la contribution des interactions électrostatiques est moins importante en présence de liaisons hydrogènes. Certains auteurs ont suggéré que les interactions électrostatiques jouaient un rôle très important lors de la phase initiale de complexation des biopolymères mais que l'agrégation des complexes et la coacervation seraient plutôt liés aux liaisons hydrogènes ou aux interactions hydrophobes, en fonction de la température (Nigen *et al.*, 2007). Cependant, aucun effet de la température sur le pH de séparation de phase n'a été détecté dans le système gélatine-agar (Singh *et al.*, 2007), ce qui exclut le fait de tirer une tendance générale.

3. Principaux paramètres physico-chimiques influençant la formation de complexes protéines-polysaccharides

De nombreuses études ont permis de montrer que la formation de complexes ainsi que leur stabilité sont sensibles aux conditions du milieu. Quelques travaux décrivant l'influence des paramètres physico-chimiques et physiques sur la formation de complexes protéines-polysaccharides sont résumés dans le tableau 1.

Tableau 1.1 : Influence des paramètres physico-chimiques et physiques sur les complexes protéines-polysaccharides.

Paramètres étudiés	Systèmes	Techniques expérimentales	Références
pH, ratio massique, force ionique, type d'ions, concentration totale en biopolymères	Gélatine / Gomme d'Acacia	Microscopie optique, viscosité, turbidité, diagramme de phase	(Bungenburg de Jong, 1949)
pH, force ionique, densité de charge	Albumine de sérum bovin/ Polysaccharides sulfatés	Calorimétrie différentielle à balayage, chromatographie d'exclusion, spectrofluorimétrie	(Galazka <i>et al.</i> , 1999)
Ratio massique, concentration totale en biopolymères, pH, densité de charge	β -lactoglobuline / Gomme d'Acacia	Microscopie confocale à balayage laser, spectroscopie de diffusion d'onde, diffusion de la lumière aux petits angles, turbidité, diffusion dynamique de la lumière, mobilité électrophorétique, turbidité, dichroïsme circulaire	(Schmitt <i>et al.</i> , 2001 ; Sanchez <i>et al.</i> , 2002a ; Mekhloufi <i>et al.</i> , 2005 ; Sanchez <i>et al.</i> , 2006)
Ratio massique, pH, force ionique, température	β -lactoglobuline / Pectine	Titration potentiométrique, ultrafiltration	(Girard <i>et al.</i> , 2002)
pH, ratio massique, force ionique	Gélatine/ Pectine	Calorimétrie différentielle à balayage, mesure d'absorbance	(Gilsenan <i>et al.</i> , 2003)
pH, ratio massique	Caséinate de sodium/ Gomme d'Acacia	Mesure d'absorbance, diffusion dynamique de la lumière	(Ye <i>et al.</i> , 2006)
pH, concentration en biopolymères, force ionique	11S globuline des garines de <i>Vicia faba</i> / Carboxyméthylcellulose	Ultracentrifugation, viscosimétrie, électrophorèse, chromatographie d'exclusion de taille	(Antonov <i>et al.</i> , 2006)

Paramètres étudiés	Systèmes	Techniques expérimentales	Références
pH, ratio massique	β -lactoglobuline / Chitosane	Calorimétrie de titration isotherme, diffusion de la lumière, mobilité électrophorétique, solubilité	(Guzey et McClements, 2006)
pH	β -lactoglobuline / Alginate de sodium	Calorimétrie de titration isotherme, diffusion dynamique de la lumière, turbidité, potentiel Zêta	(Harnsilawat <i>et al.</i> , 2006)
pH, concentration en NaCl (0,03 M)	Albumine de sérum bovin, β - lactoglobuline / Furcellarane	Turbidité, diffusion dynamique de la lumière, potentiometrie	(Laos <i>et al.</i> , 2007)
pH, concentration totale en biopolymères, ratio massique	Protéine de soie/ Acide hyaluronique	Turbidité, mobilité électrophorétique, viscosité, analyse gravimétrique	(Malay <i>et al.</i> , 2007)
pH, ratio massique	Proteine du lactosérum / pectine	Microscopie optique, mobilité électrophorétique, diffusion laser de la lumière	(Neirynck <i>et al.</i> , 2007)
pH, ratio massique	Gélatine / Agar	Turbidité, diffusion dynamique de la lumière, titration turbidimétrique	(Singh <i>et al.</i> , 2007)
pH, force ionique, température	β -lactoglobuline / Chitosane	Solubilité, turbidité, viscosité, mesure de taille, potentiel Zêta	(Mounsey <i>et al.</i> , 2008)
Traitement thermique (83 °C)	β -lactoglobuline / Pectine	Diffusion dynamique de la lumière, ultracentrifugation, turbidité, microscopie de force atomique	(Jones <i>et al.</i> , 2010)

3.1. Influence du pH

Le pH de la solution (polymérique) est l'un des paramètres les plus importants. Il contrôle le degré d'ionisation des groupements des chaînes latérales des protéines, mais aussi celui des groupements carboxyliques des résidus polysaccharidiques. En considérant par exemple un mélange composé d'une protéine et d'un polysaccharide anionique, le maximum de coacervation sera obtenu pour des $\text{pH} < \text{pH}_i$ de la protéine qui portera alors un excès de charges positives. Le point de neutralisation totale du nombre de charges portées par les deux biopolymères correspond au pH d'équivalence électrique (EEP), pH pour lequel l'intensité d'interaction électrostatique est maximale (Burgess, 1990). En prenant comme exemple le système β -lactoglobuline/ gomme d'Acacia, il a été montré que l'EEP se situait autour d'une valeur de pH de 4,2 (Schmitt *et al.*, 1999). Le rendement maximum de coacervats est obtenu pour un ratio protéine : polysaccharide (Pr : Ps) spécifique. A un pH et une force ionique donnés, le ratio massique Pr : Ps conditionne la neutralisation des charges entre les deux macromolécules (Burgess, 1994 ; Xia et Dubin, 1994).

En pratique, l'EEP est généralement déterminée par mesure du potentiel zêta (potentiel- ζ) des deux biopolymères dans une large gamme de pH et en trouvant la valeur pour laquelle les deux valeurs de potentiel- ζ sont égales mais de signe opposé (Noguchi, 1956 ; Burgess et Carless, 1984 ; Schmitt *et al.*, 1999 ; Mekhloufi *et al.*, 2005 ; Guzey et McClements, 2006). Une autre technique analytique, présentée sur la figure (1.5) pour le système BLG / GA, consiste à suivre l'évolution de l'intensité de lumière diffusée et de la turbidité en fonction du pH et à fixer la valeur pour laquelle le maximum de turbidité est atteint (correspondant à la séparation de phase macroscopique) (Xia *et al.*, 1993 ; Weinbreck *et al.*, 2003 ; Mekhloufi *et al.*, 2005).

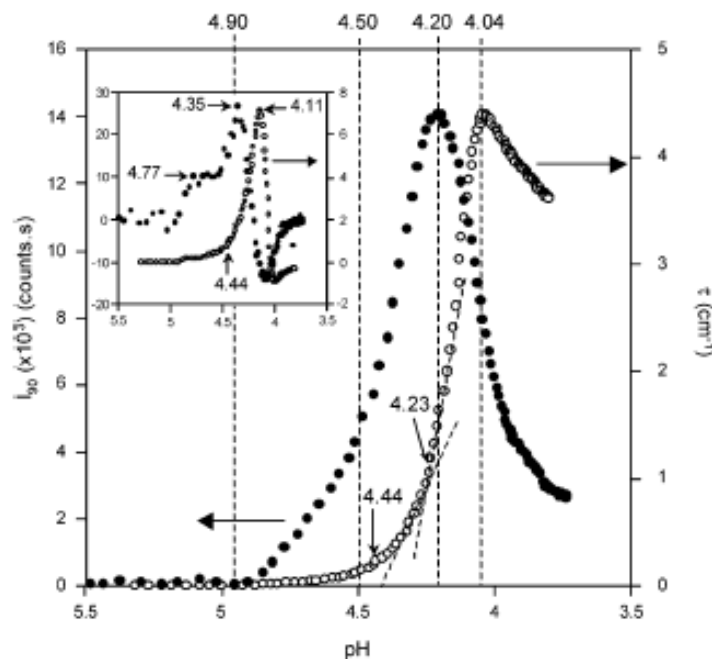


Figure 1.5 : Evolution de (●) la lumière diffuse à 90° (I_{90}) et de (○) la turbidité (τ) en fonction du pH dans des dispersions mixtes β -lactoglobuline / gomme d'Acacia au ratio massique β -lactoglobuline : gomme d'Acacia de 2 : 1 et à la concentration totale en biopolymères de 0,1 % (P / P). Figure insérée : évolution de (●) dI_{90} / dt (coups.s⁻¹) et de (○) $d\tau / dt$ ($\times 10^{-3} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) en fonction du pH du même système. Mekhloufi *et al.*, (2005)

L'influence du pH est telle que des variations de l'ordre de 0,5 unités pH sont suffisantes pour que la formation de complexes soit réduite de manière significative (Schmitt *et al.*, 1999). Deux valeurs de pH, pH_c et pH_ϕ , ont été identifiées et correspondent à des changements structuraux et morphologiques (Mattison *et al.*, 1999 ; Kaibara *et al.*, 2000 ; Mekhloufi *et al.*, 2005). Déterminé par une légère augmentation de la l'intensité lumineuse diffusée dans la dispersion, le pH critique, pH_c , correspond à la complexation primaire des macromolécules et la formation de complexes intrapolymériques (Figure 1.6). Le pH_ϕ fait référence à une séparation de phase à l'échelle microscopique, conduisant à la formation de gouttelettes coacervées (Figure 1.6). Le pH_ϕ est déterminé par une augmentation significative de la turbidité du système.

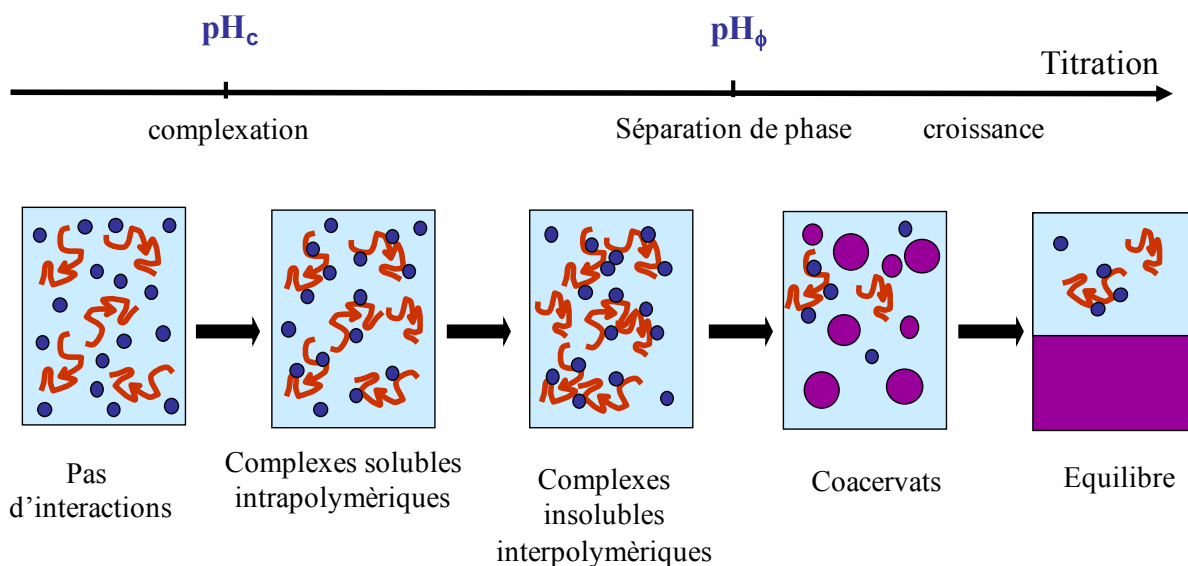


Figure 1.6 : Représentation schématique de différentes étapes de complexation entre protéines et polysaccharides de charges opposées en fonction du pH. Les cercles bleus représentent la protéine, les lignes courbes représentent le polysaccharide. pH_c : pH critique, pH_ϕ : pH de séparation de phase.

3.2. Influence de la force ionique

Le nombre d'ions présents dans un mélange de biopolymères est un facteur très important affectant le phénomène de complexation car il intervient dans les composantes entropiques et enthalpiques de l'énergie libre de mélange (Tolstoguzov, 1997). A faible force ionique, le nombre de charges présentes sur le biopolymère est suffisant pour qu'il y ait des interactions électrostatiques. La libération des contre-ions lors de la complexation entre les macromolécules favorise le gain entropique de mélange et l'énergie libre électrostatique. De fortes concentrations salines produisent un effet inverse, les ions présents entrant alors en compétition avec les macromolécules et l'attraction électrostatique entre les biopolymères est réduite à cause de la diminution de charge nette de ces derniers pouvant aller jusqu'à supprimer totalement la coacervation complexe (Xia et Dubin, 1994). Cet effet est plus

prononcé en présence d'électrolytes ou d'ions de valence supérieure à un (Burgess *et al.*, 1991 ; Tsung et Burgess, 1997).

L'effet de la force ionique sur la coacervation complexe a été précédemment décrit par Bungenberg de Jong (1949). Il a montré que l'augmentation de la force ionique conduisait à la suppression de la coacervation complexe dans le système gélatine / gomme arabique. Il a également indiqué qu'en utilisant des ions divalents, la suppression de coacervation se produit à des valeurs de force ionique plus basses que celles des ions monovalents. Burgess *et al.*, (1991) ont noté le même effet de la force ionique sur le rendement en coacervats formés dans le système sérum albumine bovin (BSA) / gomme arabique. La coacervation a été supprimée par addition de 100 mM de NaCl. Fait intéressant, le plus haut rendement coacervat n'a pas été obtenu dans un milieu exempt en sel, mais après ajout de 10 mM de NaCl. L'explication pourrait être liée à l'effet salting-in sur les protéines. Cet effet pourrait favoriser l'exposition de nouvelles régions à la surface de la protéine au solvant, ce qui induit de nouvelles interactions électrostatiques. L'effet « salting-in » a été repris par Seyrek *et al.*, (2003) pour un système constitué de BSA et d'un acide polyacrylique modifiée hydrophobiquement ou encore par Wang *et al.*, (2007) pour un système BSA / pectine.

Pour conclure, il faudrait rappeler que la force ionique a un effet sur le pH_c et le pH_ϕ . La tendance générale est que pour un ratio protéine : polysaccharide donné, les pH évoluent généralement vers des valeurs plus acides afin de compenser les charges masquées par les ions ajoutés (Grymonpré *et al.*, 2001), cela veut dire que la densité de charge des protéines doit être augmentée afin d'atteindre le même niveau de neutralisation de charge entre les protéines et les polysaccharides. Par exemple la valeur du pH_ϕ diminue de 9 à 7 en ajoutant 200 mM de NaCl dans le système gélatine / κ -carraghénane à un ratio massique protéine : polysaccharide de 1:1 (Fang *et al.*, 2006).

3.3. Influence de la concentration totale en biopolymère

La concentration totale en biopolymère est aussi un paramètre important dans le phénomène de complexation. Une concentration totale dépassant un seuil critique peut engendrer la suppression de la coacervation. Le système n'évolue plus vers une séparation de phase associative mais ségrégative (Tolstoguzov, 1986). En étudiant différents systèmes ternaires eau/protéine/polysaccharide, Tolstoguzov (1986) démontra qu'il n'était pas possible de former des coacervats à des concentrations totales supérieures à 4 % (p / p). Il devient thermodynamiquement inutile de former une phase concentrée en biopolymères si cette concentration est déjà obtenue avant séparation de phase. Cette valeur devrait sans doute être réévaluée en fonction des conditions physicochimiques du système.

3.4. Influence de la densité de charge des macromolécules

La densité de charge est un facteur essentiel dans le phénomène de séparation de phase. Il est défini comme étant le nombre de charges par unité de longueur présentes sur le biopolymère. La charge résiduelle nette influence la solubilité des complexes obtenus. Une faible densité de charges inhibe la formation des complexes (l'interaction électrostatique n'intervient pas), alors qu'une forte densité peut induire une précipitation ou une gélification (Wang *et al.*, 1999). Les complexes sont solubles lorsque la charge d'une des macromolécules en excès permet d'interagir avec le solvant. Les complexes sont insolubles lorsque les charges des macromolécules sont opposées et égales en nombre.

3.5. Influence de la masse moléculaire des biopolymères

L'effet de la masse moléculaire des biopolymères sur la séparation de phase d'un système ternaire intervient au niveau du volume occupé par les molécules. Cette séparation de phase est obtenue plus facilement lorsque la masse moléculaire des biopolymères est grande. Toutefois, afin de tenir compte de l'influence de ce paramètre, deux cas limites sont proposés (Veis *et al.*, 1967). Si la masse moléculaire des biopolymères est trop faible, l'interaction se fera plutôt par simple pontage ionique plutôt que par formation de complexes électrostatiques intermoléculaires. Au contraire, si les masses moléculaires sont trop élevées, l'interaction conduira à la formation de précipités plutôt que de coacervats.

D'autres paramètres, qualifiés de physiques, peuvent également contrôler la formation des complexes en agissant soit directement sur les macromolécules, soit sur les complexes ou enfin sur les coacervats obtenus. Ils englobent les traitements mécaniques (cisaillement, temps de cisaillement, pression) et thermiques (Schmitt *et al.*, 1998 ; Sanchez *et al.*, 2001).

4. Intérêt des complexes protéines-polysaccharides

La complexation entre protéines et polysaccharides est un moyen d'améliorer les propriétés fonctionnelles de chaque biopolymère. Ces propriétés peuvent être modulées en contrôlant les conditions physico-chimiques de formation des complexes (pH, force ionique, température...). Ces propriétés (hydratation, structures, et interfaces) sont connues et certaines applications industrielles en découlent (Tableau 1.1).

Les complexes protéines-polysaccharides sont utilisés en industrie alimentaire, pharmaceutique, cosmétique, dans les biotechnologies et en médecine. La complexation entre protéines et polysaccharides peut être appliquée dans la purification des molécules et en

particulier des protéines. Montilla *et al.*, (2007) ont montré qu'il était possible de récupérer jusqu'à 90 % de la β -lactoglobuline contenue dans du lactosérum de fromage par complexation avec du chitosane. La formation de complexes peut être utile dans l'encapsulation de molécules actives sensibles à différents stress externes (pH, température, oxygène...) (Tableau 1.1). Oliveira *et al.*, (2007) ont, par exemple, évalué la résistance des microcapsules contenant *Bifidobacterium lactis* et *Lactobacillus acidophilus* au séchage, au stockage (120 jours, entre 7 et 37 °C) et leur tolérance, *in vitro*, aux pH acides (pH 1,0 et 3,0). Les microcapsules étaient produites par coacervation complexe en utilisant un système caséine / pectine. Le procédé utilisé a été efficace pour la protection des micro-organismes, mais *Bifidobacterium lactis* microencapsulés n'étaient plus viables à la fin du stockage. L'encapsulation permet également d'assurer une libération contrôlée d'arômes avant ou pendant la consommation de certains aliments ou même de masquer le mauvais goût de certains matériaux biologiquement actifs (Gouin, 2004). Les complexes protéines / polysaccharides sont aussi utilisés en industrie alimentaire afin d'améliorer et de stabiliser (gélifiants, texturants, stabilisation des interfaces) les formulations alimentaires. Il a d'ailleurs été montré qu'il était possible d'obtenir des thermogels possédant une large gamme de textures par formation de complexes entre de la β -lactoglobuline ou de l' α -lactalbumine et de la carboxyméthylcellulose (Capitani *et al.*, 2007).

Parmi les domaines importants impliquant l'utilisation de complexes protéines / polysaccharides, il y a celui de la synthèse de biomatériaux. En effet, ces biopolymères sont utilisés comme biomatériaux ou matrices en ingénierie tissulaire. Cela permet le contrôle de la structure et de la morphologie de ces matériaux (Velema et Kaplan, 2006). Quelques exemples d'applications industrielles des complexes protéines-polysaccharides sont présentés dans le tableau 1.2.

Tableau 1.2 : Exemples d'application des complexes protéines-polysaccharides.

Complexes protéine-polysaccharide	Utilisations	Domaines d'application	Références
Collagène / Gomme xanthane, Alginate	Biomatériel	Médical, pharmacie	(Easton et Gorham, 1986)
Collagène / Glycoaminoglycane	Derme artificiel	Médical	(Ellis et Yannas, 1996)
Gélatine / Gomme d'Acacia	Encapsulation de méthoxybutropate (anti-inflammatoire)	Pharmacie	(Palmieri <i>et al.</i> , 1999)
Immunoglobuline / Alginate, Cellulose, Pectine	Purification des immunoglobulines du jaune d'œuf	Alimentaire	(Chang <i>et al.</i> , 2000)
Lactosérum / Gomme xanthane	Substitut de matières grasses (gélifiant, texturant)	Alimentaire	(Laneuville <i>et al.</i> , 2005)
Gélatine / Gomme d'Acacia	Encapsulation d'huiles essentielles	Alimentaire, cosmétique	(Yeo <i>et al.</i> , 2005)
Gélatine / Gomme gellane	Encapsulation (probiotiques)	Alimentaire	(Anal et Singh, 2007)
Protéines du lactosérum / Gomme xanthane	Encapsulation de vitamine B1	Alimentaire	(Benichou <i>et al.</i> , 2007)
β -lactoglobuline / Chitosane	Purification de la β -lactoglobuline	Alimentaire	(Montilla <i>et al.</i> , 2007)
Caséine / Pectine	Encapsulation de <i>Bifidobacterium lactis</i> et de <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Alimentaire	(Oliveira <i>et al.</i> , 2007)
β -lactoglobuline / Pectine	Encapsulation de l'acide docosahexaénoïque (DHA)	Alimentaire	(Zimet et Livney, 2009)

5. Généralités sur les flavonoïdes

5.1. Structure et classification des flavonoïdes

Plus de 4000 types de flavonoïdes ont été identifiés dans la nature. Ce sont des substances naturelles issues des plantes présentes dans tout le règne végétal et leur concentration dépend du niveau et des conditions de croissance des plantes ainsi que de leur maturité (Cao *et al.*, 1996 ; Cook et Samman, 1996 ; Di Carlo *et al.*, 1999). Les flavonoïdes sont rares chez les végétaux inférieurs. De plus, leur localisation au sein de la plante est caractéristique. En effet, les flavonoïdes se répartissent dans les organes aériens jeunes (jeunes feuilles, boutons floraux) où ils sont localisés dans les tissus superficiels (assise palissadique). Ils se répartissent aussi dans les racines (Milan, 2004b). Ces molécules appartiennent au vaste groupe des polyphénols. Elles constituent un groupe d'antioxydants naturels qui présentent un intérêt de plus en plus important grâce à leurs propriétés anti-inflammatoires, anti-allergiques, anti-virales, anti-microbiennes, anti-tumorales et vasorelaxatrices (Makris et Rossiter, 2000).

Les flavonoïdes, présents dans la plupart des fruits et des légumes, comptent parmi les composés phytochimiques d'importance de notre alimentation (Surh, 2003). Ces molécules sont constituées de deux noyaux benzènes (A et B) connectés par un noyau pyrène contenant un oxygène (C) (Figure 1.7). Les flavonoïdes possédant un groupe hydroxyle en position C-3 du noyau C sont classifiés en tant que 3-hydroxyflavonoïdes (famille comprenant les sous-classes des flavonols, anthocyanes, leucoanthocyanes et catéchines), tandis que ceux ne la possédant pas sont classifiés en tant que 3-désoxyflavonoïdes (famille comprenant les sous-classes des flavanones et flavones) (Figure 1.7). A l'exception de ces deux familles, le noyau B des isoflavonoïdes est lié au noyau C en C-3 plutôt qu'en C-2, faisant des isoflavonoïdes

une catégorie à part. Il est intéressant de souligner que les anthocyanes et les catéchines ne possèdent pas de groupement carbonyle en position C-4 (Erlund, 2004).

Les flavonoïdes se subdivisent en différentes classes en fonction de la nature du cycle C et de son degré d'insaturation et d'oxydation (Aherne et O'Brien, 2002). Par ailleurs, au sein d'une même sous-classe, les possibilités de substitution des cycles A et B sont multiples : onze carbones du squelette flavonoïde peuvent porter un substituant de type hydroxyle, méthoxyle, méthyle, isoprényle ou benzyle. Chaque groupement hydroxyle, ainsi que certains carbones, peuvent être conjugués avec un sucre. Enfin, le glycoside correspondant peut être acylé à partir d'un acide phénolique ou aliphatique (Harborne et Williams, 2001 ; Li *et al.*, 2001 ; Williams et Grayer, 2004).

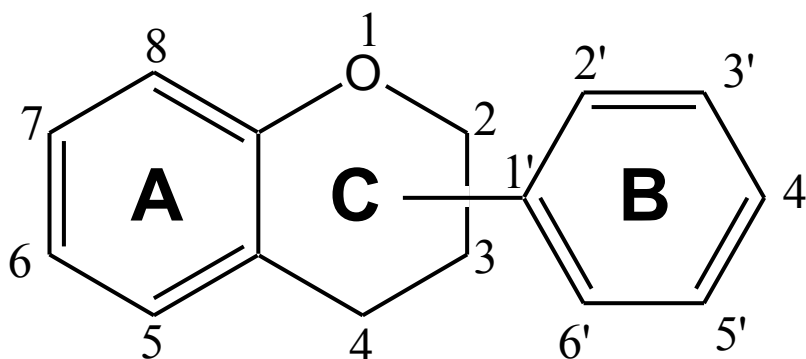


Figure 1.7 : Squelette de base des flavonoïdes (Cook et Samman, 1996).

Majoritairement présents dans les plantes sous forme glycosylée, les flavonoïdes sont rarement retrouvés sous la forme aglycone (exempte d'un groupement saccharide). Au moins huit types de monosaccharides ou combinaisons de ceux-ci (disaccharides ou trisaccharides)

peuvent se lier aux différents groupes hydroxyles libres sous la forme aglycone des flavonoïdes. Ces combinaisons ont pour conséquence la création d'une très grande possibilité de flavonoïdes. Généralement, les flavonoïdes se retrouvent sous la forme O-glycosilée où le sucre (dont les plus communs sont le D-glucose et le L-rhamnose) est lié au groupement hydroxyle en position C-3 ou C-7 (Erlund, 2004).

Les flavonoïdes existent sous différentes classes et ceci en fonction du degré d'oxydation et d'insaturation du cycle C (Figure 1.8), à savoir :

- les chalcones (1,3-diphényl-prop-2-èn-1-one) : davidigénine, nubigénole,
- les aurones (benzo-furone) : leptosidine, maritimétine,
- les flavanones (2-phényl-2,3-dihydrochromone) : hespéritine, naringénine, eriodictyole,
- les dihydroflavonols (2-phényl-3-hydroxy-2,3-dihydrochromone) : taxifoline, fusetine,
- les flavones (2-phénylchromone) : apigénine, chrysine, lutéoline,
- les flavonols (2-phényl-3-hydroxychromone) : quercétine, myricétine, kamphérole,
- les anthocyanes (2-phényl-1-benzopyrilium) : pelargonine, delphinidine, cyanidine,
- les isoflavones (3-phénylchromone) : daidzein, genistein,
- les flavanols (2-phényl -3-hydroxychromane) : catéchine, gallocatéchin.

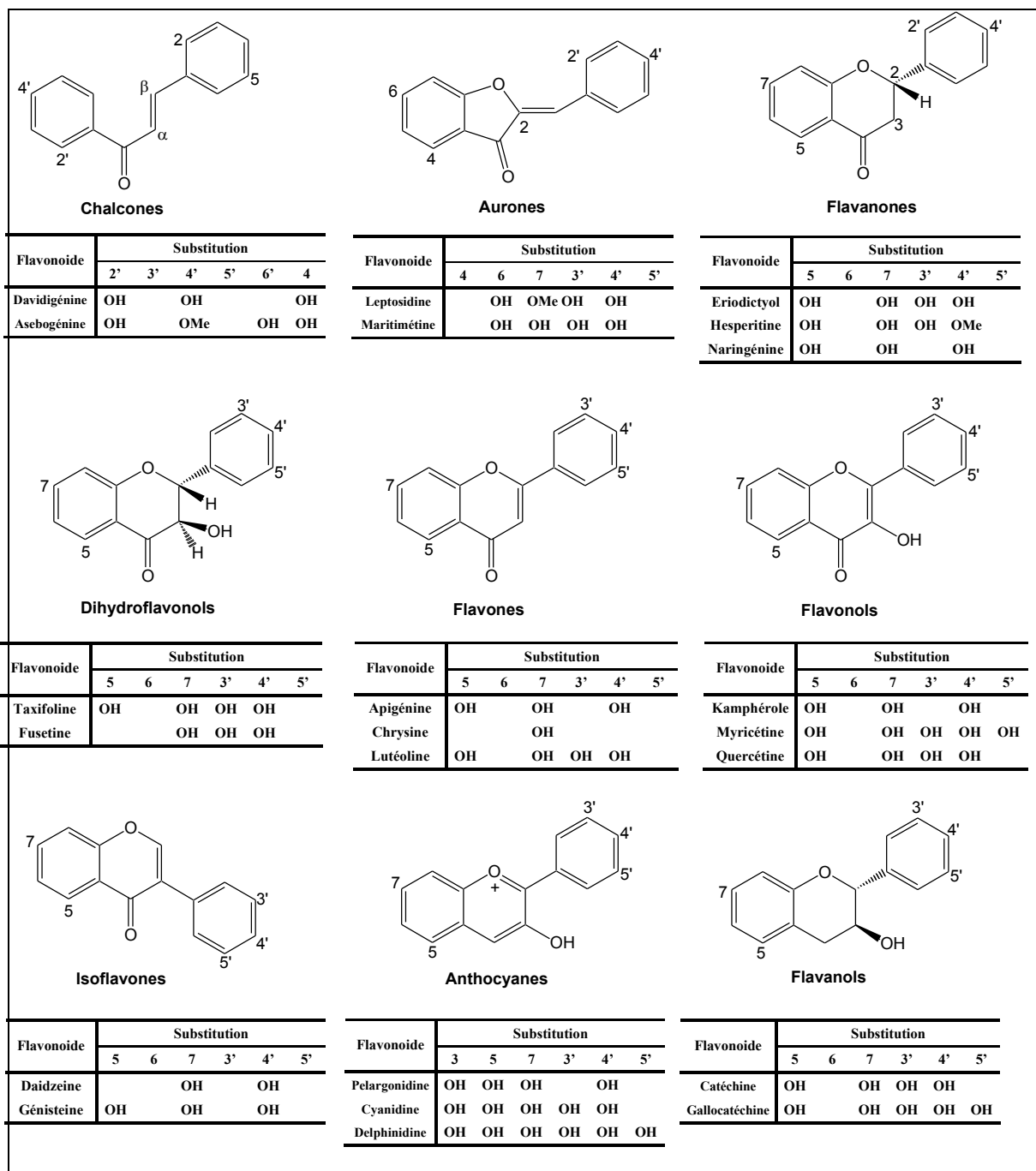


Figure 1.8 : Les différentes classes de flavonoïdes (Bohm, 1998 ; Birt et al., 2001 ; Pereira et al., 1998)

Les flavonols sont les flavonoïdes les plus répandus dans la diète et sont reconnus pour leurs propriétés anticancéreuses ainsi que pour leur vaste gamme d'effets biologiques et pharmacologiques (Middleton Jr *et al.*, 2000). Les représentants principaux sont le kaempférol, la myricétine et la quercétine, cette dernière est la plus abondante des

bioflavonoïdes, étant présente en bonne quantité dans les aliments d'origine végétale consommés quotidiennement par l'homme (oignon, pomme, thé, brocoli et vin rouge) (Kaldas *et al.*, 2005). La quercétine peut également être retrouvée sous forme glycosylée, par exemple en tant que quercitrine (quercétine-3-O- α -rhamnoside) ou que rutine (quercétine-3-rhamnoglucoside), cette dernière forme étant la plus répandue. Tout dépendant de la source, la quercétine peut se retrouver sous la forme d'un glucoside (oignons), d'un galactoside (pommes) ou encore d'un arabinoside (baies) (Erlund, 2004).

5.2. Propriétés physico-chimiques et biologiques des flavonoïdes

5.2.1. Solubilité et stabilité des flavonoïdes

Selon la structure des flavonoïdes, différentes interactions peuvent se développer en présence d'un solvant (Mompon *et al.*, 1996):

- des interactions de type hydrophobe avec les solvants apolaires concernant les cycles aromatiques (A et B) et les substituants carbonés aliphatiques ;
- des interactions dipolaires entre les solvants polaires et les groupes fonctionnels des flavonoïdes (carbonyle, éther, ester et hydroxyle) ;
- des liaisons hydrogènes entre le solvant (eau, alcool ou amine) et les divers groupes donneurs ou accepteurs de ce type de liaison présent sur le flavonoïde ;

Il a été rapporté que le facteur principal influençant la solubilité de la flavone dans l'éthanol est sa capacité à former des liaisons hydrogènes avec le solvant (Saidman *et al.*, 2002). L'utilité et le potentiel bénéfique des flavonoïdes sont limités par leur très faible solubilité dans l'eau (Calabro *et al.*, 2004 ; Tommasini *et al.*, 2004). Les différences

structurales au sein d'une même famille sont tellement importantes qu'il est difficile d'estimer la solubilité d'un composé dans un solvant. Toutefois, la solubilité des flavonoïdes dans l'eau et dans les solvants très apolaires dépend du pH mais reste faible (Abou El Hassan *et al.*, 2000).

Tommasini *et al.* (2004) ont étudié la solubilité de la naringénine en milieu aqueux à pH 4,0 et 8,0. Ils ont montré que la solubilité de la naringénine est nettement plus élevée à pH 8,0 qu'à pH 4,0 et la même tendance en présence de β -cyclodextrine a été observée. D'autre part, la solubilité de la rutine, de la naringine et de la quercétine dans l'eau à 20 °C est respectivement de l'ordre de 125 mg.l⁻¹, 500 mg.l⁻¹ et < 10 mg.l⁻¹ (Pulley, 1936 ; Calias *et al.*, 1996). La solubilité de la néohespéridine dihydrochalcone a été évaluée dans différents mélanges eau/éthanol. La solubilité de ce composé à 20 °C dans l'eau, l'éthanol et le mélange eau/éthanol (1/1) est respectivement de 0,4 g.l⁻¹, de 12 g.l⁻¹ et de 123 g.l⁻¹ (Benavente-Garcia *et al.*, 2001).

Cette faible solubilité dans des phases aqueuses et lipophiles est contraignante pour la formulation de produit. Toutefois, la métabolisation (hydrolyse de la partie glycosylée, sulfatation, glucuronisation) de ces composés par les cellules de l'intestin permettent leur absorption par l'organisme (Bokkenheuser *et al.*, 1987 ; Walle, 2004 ; Kay *et al.*, 2009).

Pour pallier à ces problèmes de solubilité, différentes techniques ont été utilisées ayant pour but de modifier la structure de ces molécules comme l'acylation (Chebil *et al.*, 2006 ; Viskupiccova *et al.*, 2009) et la glycosylation (Falcimaigne, 2004) ou l'ajout d'agents stabilisant comme les cyclodextrines (Schwingel *et al.*, 2008 ; Ribeiro *et al.*, 2009) :

- la glycosylation de la naringine par du maltotriose, en présence de l'amylase maltogénique de *Bacillus stearothermophilus*, a permis l'augmentation de sa solubilité dans l'eau de 250 fois (Lee *et al.*, 1999).
- la complexation de la naringénine et de l'héspéretine avec de la β -cyclodextrine a permis d'augmenter leur solubilité dans des milieux hydrophiles à différents pH (Tommasini *et al.*, 2004).
- l'acylation par des acides gras ou aliphatiques substitués avec un groupement polaire (sucre, phosphate, carboxylate) a permis d'améliorer la solubilité respectivement dans des phases lipophiles ou en milieu aqueux. Le succinate de quercétine (2-phosphonomyo- inositol) (Calias *et al.*, 1996), l'acétate de quercétine et le propionate de quercétine (Saija *et al.*, 2003) ont une solubilité dans l'eau respectivement 15000 fois, 500 fois et 12 fois plus importante que la quercétine. Cependant, Perrier *et al.* (1998) et Sakai *et al.* (1994) ont observé, respectivement, une augmentation de la solubilité de l'héspéretine et de la catéchine dans les phases grâce après acylation par des acides gras.
- la polymérisation de la rutine a permis d'augmenter sa solubilité dans l'eau (Kurisawa *et al.*, 2003).

L'encapsulation par des biopolymères pourrait aussi être une bonne alternative (Anal et Singh, 2007 ; Oliveira *et al.*, 2007). Ils ont une capacité à enfermer des particules hydrophiles et hydrophobes, ce qui est très prometteur pour différentes applications (Renard *et al.*, 2002). La coacervation complexe est par exemple une méthode bien établie pour l'encapsulation.

Elle est utilisée en industrie alimentaire afin de masquer le mauvais goût ou éviter l'oxydation de certains ingrédients (Lamprecht *et al.*, 2000 ; Anal et Singh, 2007).

La stabilité des flavonoïdes est influencée par la lumière, le pH, la température, la nature du solvant la présence ou l'absence d'ions métalliques et d'oxydant. Les flavonoïdes étant des molécules très réactives, ils sont plus ou moins sensibles à ces facteurs selon leur structure. Une élévation de la température, du pH et la présence d'ions métalliques favorisent la dégradation des flavonoïdes. En effet, leur stabilité est plus faible à des valeurs de pH basiques en raison d'une augmentation de l'oxydation de ces molécules (Neilson *et al.*, 2007). Par exemple, la très faible bio-disponibilité des anthocyanes peut être attribuée, au moins partiellement, à la très forte instabilité de ses molécules dans le milieu alcalin de l'intestin grêle (pH = 8) (Pérez-Vicente *et al.*, 2002). Différents travaux menés *in vitro* ont montrés que les catéchines, flavonoïdes de la famille des flavanols, sont stables en milieu acide mais fortement dégradées dans des milieux à pH plus ou moins neutres (intestin, plasma, bile ou milieux de culture) (Hou *et al.*, 2005 ; Sang *et al.*, 2005 ; Green *et al.*, 2007).

La nature du solvant affecte le mécanisme de dégradation des flavonoïdes. Une étude concernant l'effet des solvants sur la capacité anti-oxydante de la quercétine a montré que le maximum d'activité était observé, dans l'ordre, dans : éthanol > méthanol > mélange éthanol-eau (1 : 9) (Pinelo *et al.*, 2004). De même, Tommasini *et al.* (2004) ont rapporté, lors de l'étude de la photostabilité du 3-hydroxyflavone, l'existence de voies de dégradation différentes selon la nature du solvant avec une amélioration de la stabilité en présence de cyclodextrines.

Des pigments naturels comme les flavonoïdes glycosylés et les anthocyanes sont présents sous une forme acylés avec des acides aromatiques. Certaines activités biologiques

des plantes telles que la résistance aux rayons UV est due à l'existence de ces flavonoïdes glycosylés dans les tissus cellulaires. Cette stabilité est attribuée aux interactions hydrophobes intra et inter-moléculaires induites par l'acylation (Nakajima *et al.*, 1999). L'acylation des flavonoïdes améliore la stabilité vis-à-vis de la température, de la lumière et du pH (Nakajima *et al.*, 1999 ; Ishihara et Nakajima, 2003). Cet effet a été observé pour des flavonols et des flavones à la fois glycosylées et aglycones (Ishihara et Nakajima, 2003). L'effet de l'acylation par des acides aromatiques sur la stabilité a été attribué à des interactions de type hydrophobe intra et/ou intermoléculaire entre la partie génine du flavonoïde et la partie acyle (Ishihara et Nakajima, 2003).

L'absence d'un groupe hydroxyle libre en position 3 sur les flavones a un effet positif sur la stabilité en particulier à la lumière. Les flavones et les flavonols glycosylés en position 3 sont moins réactifs (Ishihara et Nakajima, 2003 ; Falcimaigne, 2004).

5.2.2. Propriétés biologiques des flavonoïdes

De nombreuses activités biologiques des flavonoïdes ont été décrites dans la littérature telles que des propriétés photoprotectrices (Otto *et al.*, 2001 ; Suk *et al.*, 2005), antivirales (Formica, 1995 ; Ramadan et Selim Asker, 2009), anti-carcinogènes (Lin *et al.*, 2008), antibactériennes (Alcaraz *et al.*, 2000 ; Syuichi *et al.*, 2006), anti-inflammatoires (Formica, 1995 ; Paoletti *et al.*, 2009) et antioxydantes (Sakai *et al.*, 1994 ; Chen *et al.*, 1999).

Les flavonoïdes sont des antioxydants naturels. Ce sont des piègeurs efficaces des radicaux hydroxyles et peroxydes, particulièrement impliqués dans la peroxydation lipidique. L'inhibition de cette dernière est un élément important pour la protection des membranes cellulaires (Bouhamidi *et al.*, 1998 ; Lahouel *et al.*, 2004 ; Milan, 2004a).

De nombreux travaux (Da Silva Emim *et al.*, 1994 ; Formica, 1995 ; Guardia *et al.*, 2001 ; Rao *et al.*, 2005 ; Lin *et al.*, 2008) semblent indiquer que les flavonoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoires. En effet, ce sont de puissants inhibiteurs de la prolifération des lymphocytes. Dans leur étude sur les propriétés anti-inflammatoires des flavonoïdes, Guardia *et al.*, (2001) ont montré que la rutine était très efficace pour la réduction des œdèmes.

Les flavonoïdes sont décrits pour leur activité protectrice contre les radiations UV. Ils peuvent prévenir ou diminuer les dommages de la peau induits par le stress oxydant en particulier celui provoqué par des radiations UV en modulant la réponse cellulaire et en piégeant les espèces radicalaires oxygénées (Zhai et Maibach, 2002).

Les différents composés flavonoïdes sont reconnus comme étant des inhibiteurs particulièrement efficaces d'une vaste gamme de récepteurs à tyrosine kinase (Chen et Zhang, 2003 ; Adhami *et al.*, 2004 ; Sah *et al.*, 2004) à la fois *in vitro* ou *in vivo*, soulignant que ces composés pourraient jouer un rôle important dans la prévention du cancer (Surh, 2003). Parmi ceux-ci, les flavonols sont une sous-classe particulièrement intéressante. En effet, des études épidémiologique ont démontré une association entre une faible incidence de cancer du sein et du poumon chez les individus ayant une consommation élevée en quercétine, et une faible incidence de cancer de la prostate chez ceux consommant beaucoup de myricétine (Knekt *et al.*, 2002 ; Nichenametla *et al.*, 2006).

Malgré le fait que la quercétine ait probablement été l'un des premiers inhibiteurs à tyrosine kinase à avoir été décrit, les mécanismes d'action en cause dans la prévention du cancer par la quercétine et les autres flavonols sont généralement liés au potentiel antioxydant de ceux-ci ou encore à leur effet sur le cycle, la croissance et la mort cellulaire (Nichenametla *et al.*, 2006 ; Murakami *et al.*, 2008). Le tableau 1.3 récapitule quelques exemples d'application des flavonoïdes.

Tableau 1.4 : Exemples de propriétés biologiques de flavonoïdes et de leurs esters

Applications et propriétés pharmaceutiques		
propriétés	flavonoïdes	références
Traitement de l'hypercholestérolémie	Hespéridine octonicotinoate	(Leroi, 1973)
Inhibition de la lipoperoxydation	Esters de cyanidan-3-ol	(Albert <i>et al.</i> , 1977)
Protection des cartilages, inhibition de la dégradation du protéoglycane, traitement pour l'arthropathie	Esters d'esculétine et d'acide gras	(Watanabe <i>et al.</i> , 1993)
Anti-inflammatoire, anti-tumeur, anti-virale	Quercétine	(Formica, 1995)
Prévention du cancer et des maladies cardio-vasculaires	4-OXO-flavonoïdes	(Manach <i>et al.</i> , 1996)
Activité anti-bactérienne	Flavones, flavanones, chalcones	(Alcaraz <i>et al.</i> , 2000)
Activité anti-HIV	Flavone, flavanone	(Mantas <i>et al.</i> , 2000)
Anti-inflammatoire	Rutine, quercétine, hesperidine	(Guardia <i>et al.</i> , 2001)
Antiradicalaire, traitement d'anomalies thrombotiques et artérioscléreuses	Propionyl L-carnitine, quercétine, rutine	(Cavazza, 2003)
Activité anti-angiogénique	Quercétine, isoquercitrine, rutine	(Matsubara <i>et al.</i> , 2004)
Anti-bactérienne, traitement pour glucosidase	Eridictyol / diosmetine	(Syuichi <i>et al.</i> , 2006)
Activité anti-métastatique (réduction de la prolifération cellulaire)	Hésperidine, naringénine	(Lentini <i>et al.</i> , 2007)
Anti-inflammatoire, prévention du cancer, anti-allergique	Lutéoline	(Lin <i>et al.</i> , 2008)
Prévention du cancer	Cyanidine-3-glucoside	(Marczylo <i>et al.</i> , 2009)
Anti-inflammatoire, protection vasculaire	8-prénylnaringénine et 8-prénylapigénine	(Paoletti <i>et al.</i> , 2009)
Activités anti-bactérienne et anti-virale	Quercétine	(Ramadan et Selim Asker, 2009)

Applications cosmétiques

Propriétés	Flavonoïdes	Références
Inhibition de la tyrosinase, suppression de la formation de mélanine, anti-UV	Esters de quercétine et d'acide gras	(Gorou, 1983)
Activité antiradicalaire, traitement du vieillissement cutané	Microcapsules de flavonoïdes	(Levy et Andry, 1994)
Effet anti-âge (amélioration de l'élasticité de la peau, antiride), antiradicalaire, amincissement	Esters de flavonoïdes et d'acide gras	(Perrier <i>et al.</i> , 1998)
Réduction de la formation de dimers de pyrimidine induite par les UVB dans l'épiderme et le derme	Epicatechine, epigallocatechine,	(Katiyar <i>et al.</i> , 2000)
Activité de photoprotection et d'activation de la synthèse de collagène	Esters de flavones et isoflavones et d'acides aromatiques et d'acides gras polyinsaturés	(Otto <i>et al.</i> , 2001)
Photoprotection UV, prévient le photo-vieillessement de la peau	Génistéine	(Kang <i>et al.</i> , 2003)
Modification de l'état des cellules endogènes de la peau	Flavonoïdes aglycones et glycosylés	(Amalia, 2004)
Résistance à l'oxygène et à la lumière pour des préparations cosmétiques	Gallate d'epicatechine	(Suk <i>et al.</i> , 2005)

Applications agro-alimentaires

Propriétés	Flavonoïdes	Références
Compléments diététiques (boissons, produits laitiers et dérivés, confiserie), conservation des aliments	Peresters de catéchine et d'acide gras	(Vercauteren <i>et al.</i> , 1993)
Antioxydant alimentaire	Esters de catéchine et d'acides gras	(Sakai <i>et al.</i> , 1994)
Antioxydant alimentaire	Esters de flavanones et d'acides gras et aromatiques	(Bok <i>et al.</i> , 2001)
Antioxydant pour les huiles	Polyphénols du thé acylés par des acides gras	(Chen <i>et al.</i> , 1999)

5.2.3. Biodisponibilité des flavonoïdes

Les flavonoïdes présentent des propriétés biologiques et antioxydantes bénéfiques. Cependant, leur qualité nutritionnelle et leurs effets systémiques dépendent de leur absorption et de leur métabolisation au niveau du tractus digestif. Leur capacité à interagir avec les membranes biologiques ainsi qu'à réagir avec des protéines et des substances sécrétées par la cellule dans l'environnement de la paroi cellulaire, c'est-à-dire à une interface eau-lipide. En effet, la forme bioactive du flavonoïde *in vivo* n'est donc pas nécessairement la forme phytochimique naturelle. Lors de l'absorption des flavonoïdes par l'intestin, la première phase de métabolisation correspond à déglycosylation par hydrolyse, puis l'aglycone résultant (quercétine, hespéritine, naringénine, épicatechine) est ensuite glucuronylé, sulphaté ou *O*-méthylé (Falcimaigne, 2004 ; Walle, 2004).

Peu d'études systématiques ont été menées sur l'homme. Toutefois, d'après les expériences menées sur les flavonoïdes provenant de l'alimentation, il apparaît que leur absorption est faible et implique des mécanismes encore mal connus (Manach *et al.*, 1996 ; Hollman *et al.*, 1997). Seuls les flavonoïdes aglycones sont supposés être absorbables au niveau intestinal contrairement aux flavonoïdes glycosylés tels que la rutine. En effet, la partie glycosylée augmente l'hydrophilie et rend ainsi leur passage très difficile du flavonoïde à travers les phospholipides des membranes cellulaires. Les flavonoïdes glycosylés doivent subir l'hydrolyse de leur liaison osidique par l'action des entérobactéries de la microflore intestinale (Murota et Terao, 2003).

La rutine est difficilement absorbée chez les rats comparativement à la quercétine aglycone (Crespy *et al.*, 1999). En ce qui concerne la quercétine glycosylée, elle est convertie en sa forme aglycone avant son passage au niveau intestinal. Cependant, d'autres travaux ont montré que la quercétine 3-*O*- β -glucoside était mieux absorbée que la quercétine aglycone, la

rutine ou la quercétine 3-*O*- β -rhamnoside (Morand *et al.*, 2000). En conclusion, la biodisponibilité de la quercétine glycosylée dépend alors de la nature de la partie osidique liée à son groupement phénolique.

Références bibliographiques

- Abou El Hassan, M.A.I., Touw, D.J., Wilhelm, A.J., Bast, A., et Van Der Vijgh, W.J.F., 2000. Stability of monoHER in an aqueous formulation for i.v. administration. *International Journal of Pharmaceutics*, 211, 51-56.
- Adhami, V.M., Siddiqui, I.A., Ahmad, N., Gupta, S., et Mukhtar, H., 2004. Oral consumption of green tea polyphenols inhibits insulin-like growth factor-I-induced signaling in an autochthonous mouse model of prostate cancer. *Cancer Research*, 64, 8715-8722.
- Aherne, S.A., et O'Brien, N.M., 2002. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*, 18, 75-81.
- Albert, A., Courbat, P., et Weith, A. 1977. Process of the preparation of O-substituted derivatives of cyanidan-3-o1. US4255336.
- Albertsson, P.A., 1971. Partition of cell particles and macromolecules Wiley Interscience, New York.
- Alcaraz, L.E., Blanco, S.E., Puig, O.N., Tomas, F., et Ferretti, F.H., 2000. Antibacterial activity of flavonoids against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Journal of Theoretical Biology*, 205, 231-240.
- Amalia, P. 2004. Flavonoïd compounds and their pharmaceutical uses. US2004266699.
- Amidi, M., Romeijn, S.G., Verhoef, J.C., Junginger, H.E., Bungener, L., Huckriede, A., Crommelin, D.J.A., et Jiskoot, W., 2007. N-Trimethyl chitosan (TMC) nanoparticles loaded with influenza subunit antigen for intranasal vaccination: Biological properties and immunogenicity in a mouse model. *Vaccine*, 25, 144-153.
- Anal, A.K., et Singh, H., 2007. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science and Technology*, 18, 240-251.
- Antonov, Y.A., Dmitrochenko, A.P., et Leontiev, A.L., 2006. Interactions and compatibility of 11 S globulin from Vicia Faba seeds and sodium salt of carboxymethylcellulose in an aqueous medium. *International Journal of Biological Macromolecules*, 38, 18-24.
- Aymard, P., Durand, D., et Nicolai, T., 1996. The effect of temperature and ionic strength on the dimerisation of β -lactoglobulin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 19, 213-221.
- Benavente-Garcia, O., Castillo, J., Del Baño, M.J., et Lorente, J., 2001. Improved water solubility of neohesperidin dihydrochalcone in sweetener blends. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 189-191.

- Benichou, A., Aserin, A., et Garti, N., 2007. W/O/W double emulsions stabilized with WPI-polysaccharide complexes. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 294, 20-32.
- Bergfeldt, K., Piculell, L., et Linse, P., 1996. Segregation and association in mixed polymer solutions from Flory-Huggins model calculations. *Journal of Physical Chemistry*, 100, 3680-3687.
- Bok, S.H., Jeong, T.S., Lee, S.K., Kim, J.R., Moon, S.S., Choi, M.S., Hyun, B.H., Lee, C.H., et Choi, Y.K. 2001. Flavanone derivatives and composition for preventing or treating blood lipid level-related diseases comprising same. US 20010006978A1.
- Bokkenheuser, V.D., Shackleton, C.H.L., et Winter, J., 1987. Hydrolysis of dietary flavonoid glycosides by strains of intestinal Bacteroides from humans. *Biochemical Journal*, 248, 953-956.
- Bouhamidi, R., Prévost, V., et Nouvelot, A., 1998. High protection by grape seed proanthocyanidins (GSPC) of polyunsaturated fatty acids against UV-C induced peroxidation. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences - Serie III*, 321, 31-38.
- Bungenberg de Jong, H.G., 1949. Crystallisation-coacervation-floculation, p. 232-258, dans: H. G. Kruyt, (Ed.), *Colloid Science Elsevier* : Amsterdam.
- Burgess, D.J., et Carless, J.E., 1984. Microelectrophoretic studies of gelatin and Acacia for the prediction of complex coacervation. *Journal of Colloid and Interface Science*, 98, 1-8.
- Burgess, D.J., 1990. Practical analysis of complex coacervate systems. *Journal of Colloid and Interface Science*, 140, 227-238.
- Burgess, D.J., Kwok, K.K., et Megremis, P.T., 1991. Characterization of albumin-acacia complex coacervation. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 43, 232-236.
- Burgess, D.J., 1994. Complex coacervation : Microcapsule formation, p. 281-300, dans: P. L. Dubin, J. Bock, R. Davis, D. N. Schulz and C. Thies, Eds., *Macromolecular complexes in chemistry and Biology Springer Verlag*: Berlin.
- Calabro, M.L., Tommasini, S., Donato, P., Raneri, D., Stancanelli, R., Ficarra, P., Ficarra, R., Costa, C., Catania, S., Rustichelli, C., et Gamberini, G., 2004. Effects of α - and β -cyclodextrin complexation on the physico-chemical properties and antioxidant activity of some 3-hydroxyflavones. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 35, 365-377.

- Calias, P., Galanopoulos, T., Maxwell, M., Khayat, A., Graves, D., Antoniadis, H.N., et D'Alarcao, M., 1996. Synthesis of inositol 2-phosphate-quercetin conjugates. *Carbohydrate Research*, 292, 83-90.
- Cao, G., Sofic, E., et Prior, R.L., 1996. Antioxidant Capacity of Tea and Common Vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 3426-3431.
- Capitani, C., Pérez, O.E., Pacheco, B., Teresa, M., et Pilosof, A.M.R., 2007. Influence of complexing carboxymethylcellulose on the thermostability and gelation of β -lactalbumin and α -lactoglobulin. *Food Hydrocolloids*, 21, 1344-1354.
- Cavazza, C. 2003. Antioxidant composition comprising propionyl L-carnitine and a flavonoid against throm-bosis and atherosclerosis. US2003206895.
- Chang, H.M., Lu, T.C., Chen, C.C., Tu, Y.Y., et Hwang, J.Y., 2000. Isolation of immunoglobulin from egg yolk by anionic polysaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 995-999.
- Chebil, L., Humeau, C., Falcimaigne, A., Engasser, J.M., et Ghoul, M., 2006. Enzymatic acylation of flavonoids. *Process Biochemistry*, 41, 2237-2251.
- Chen, A., et Zhang, L., 2003. The antioxidant (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits rat hepatic stellate cell proliferation in vitro by blocking the tyrosine phosphorylation and reducing the gene expression of platelet-derived growth factor- β receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 23381-23389.
- Chen, P., Zhong, J., et Zhang, G. 1999. Fat-soluble tea polyphenol and esterification method productive process thereof. CN1231277.
- Connolly, S., Fenyo, J.C., et Vandeveld, M.C., 1988. Effect of a proteinase on the macromolecular distribution of Acacia senegal gum. *Carbohydrate Polymers*, 8, 23-32.
- Cook, N.C., et Samman, S., 1996. Flavonoids - Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 7, 66-76.
- Creamer, L.K., Parry, D.A.D., et Malcolm, G.N., 1983. Secondary structure of bovine β -lactoglobulin B. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 227, 98-105.
- Crespy, V., Morand, C., Manach, C., Besson, C., Demigne, C., et Remesy, C., 1999. Part of quercetin absorbed in the small intestine is conjugated and further secreted in the intestinal lumen. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 277.
- Da Silva Emim, J.A., Oliveira, A.S., et Lapa, A.J., 1994. Pharmacological evaluation of the anti-inflammatory activity of a citrus bioflavonoid, hesperidin, and the isoflavonoids,

- duartin and claussequinone, in rats and mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 46, 118-122.
- de Vries, R., et Cohen Stuart, M., 2006. Theory and simulations of macroion complexation. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 11, 295-301.
- Di Carlo, G., Mascolo, N., Izzo, A.A., et Capasso, F., 1999. Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sciences*, 65, 337-353.
- Dickinson, E., 1993. Protein-Polysaccharide Interactions in Food Colloids, p. 77-93, dans: E. Dickinson and P. Walstra, Eds., *Food Colloids and Polymers: Stability and Mechanical Properties*, The Royal Society of Chemistry: Cambridge.
- Dickinson, E., 1998. Stability and rheological implications of electrostatic milk protein-polysaccharide interactions. *Trends in Food Science & Technology*, 9, 347-354.
- Diffis, N., et Kiosseoglou, V., 2006. Physicochemical properties of dry-heated soy protein isolate-dextran mixtures. *Food Chemistry*, 96, 228-233.
- Doublier, J.L., Garnier, C., Renard, D., et Sanchez, C., 2000. Protein-polysaccharide interactions. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 5, 202-214.
- Easton, I.A., et Gorham, S.D. 1986. Protein/polysaccharide complexes. US Patent Application 4, 614, 794.
- Ellis, D.L., et Yannas, I.V., 1996. Recent advances in tissue synthesis *in vivo* by use of collagen-glycosaminoglycan copolymers. *Biomaterials*, 17, 291-299.
- Erlund, I., 2004. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research*, 24, 851-874.
- Falcimaigne, A., 2004. Mise au point d'un procédé de production enzymatique des esters de flavonoïde : cinétique, purification, étude conformationnelle et caractérisation des propriétés physico-chimiques et biologiques. Thèse, Institut National Polytechnique de Lorraine.
- Fang, Y., Li, L., Inoue, C., Lundin, L., et Appelqvist, I., 2006. Associative and segregative phase separations of gelatin/ κ -carrageenan aqueous mixtures. *Langmuir*, 22, 9532-9537.
- Fincher, G.B., Stone, B.A., et Clarke, A.E., 1983. Arabinogalactan-proteins: structure, biosynthesis and function. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 34, 47-70.
- Flory, P.J., 1941. Thermodynamics of high polymer solutions. *The Journal of Chemical Physics*, 9, 660-661.

- Flower, D.R., North, A.C.T., et Attwood, T.K., 1993. Structure and sequence relationships in the lipocalins and related proteins. *Protein Science*, 2, 753-761.
- Flower, D.R., 1996. The lipocalin protein family: Structure and function. *Biochemical Journal*, 318, 1-14.
- Formica, J.V., 1995. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food and Chemical Toxicology*, 33, 1061-1080.
- Frugier, D., 1988. Copolymères anioniques et cationiques de faible densité de charge: synthèse et étude de leur coacervation complexe., Paris, France.
- Galazka, V.B., Smith, D., Ledward, D.A., et Dickinson, E., 1999. Complexes of bovin serum albumin with sulphated polysaccharides: effects of pH, ionic strength and high pressure treatment. *Food Chemistry*, 64, 303-310.
- Gilsenan, P.M., Richardson, R.K., et Morris, E.R., 2003. Associative and segregative interactions between gelatin and low-methoxy pectin: Part 1. Associative interactions in the absence of Ca^{2+} . *Food Hydrocolloids*, 17, 723-737.
- Girard, M., Turgeon, S.L., et Gauthier, S.F., 2002. Interbiopolymer complexing between [beta]-lactoglobulin and low- and high-methylated pectin measured by potentiometric titration and ultrafiltration. *Food Hydrocolloids*, 16, 585-591.
- Gorou, H. 1983. Cosmetic for fair-complexioned face containing fatty acid ester of quercetin. JP 58131911.
- Gouin, S., 2004. Microencapsulation: Industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science and Technology*, 15, 330-347.
- Green, R.J., Murphy, A.S., Schulz, B., Watkins, B.A., et Ferruzzi, M.G., 2007. Common tea formulations modulate in vitro digestive recovery of green tea catechins. *Molecular Nutrition and Food Research*, 51, 1152-1162.
- Grymonpré, K.R., Staggemeier, B.A., Dubin, P.L., et Mattison, K.W., 2001. Identification by integrated computer modeling and light scattering studies of an electrostatic serum albumin-hyaluronic acid binding site. *Biomacromolecules*, 2, 422-429.
- Guardia, T., Rotelli, A.E., Juarez, A.O., et Pelzer, L.E., 2001. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. *Farmaco*, 56, 683-687.
- Guichard, E., et Langourieux, S., 2000. Interactions between β -lactoglobulin and flavour compounds. *Food Chemistry*, 71, 301-308.

- Guzey, D., et McClements, D.J., 2006. Characterization of [beta]-lactoglobulin-chitosan interactions in aqueous solutions: A calorimetry, light scattering, electrophoretic mobility and solubility study. *Food Hydrocolloids*, 20, 124-131.
- Hagenaars, N., Mastrobattista, E., Verheul, R.J., Mooren, I., Glansbeek, H.L., Heldens, J.G.M., Van Den Bosch, H., et Jiskoot, W., 2009. Physicochemical and immunological characterization of N,N,N-trimethyl chitosan-coated whole inactivated influenza virus vaccine for intranasal administration. *Pharmaceutical Research*, 26, 1353-1364.
- Hambling, S.G., 1992. β -lactoglobulin, dans: P. F. Fox, (Ed.), *Advanced Dairy Chemistry*, Elsevier Science Publisher Ltd: Londres.
- Harborne, J.B., et Williams, C.A., 2001. Anthocyanins and other flavonoids. *Natural Product Reports*, 18, 310-333.
- Harnsilawat, T., Pongsawatmanit, R., et McClements, D.J., 2006. Characterization of [beta]-lactoglobulin-sodium alginate interactions in aqueous solutions: A calorimetry, light scattering, electrophoretic mobility and solubility study. *Food Hydrocolloids*, 20, 577-585.
- Hollman, P.C.H., Van Trijp, J.M.P., Buysman, M.N.C.P., V.d. Gaag, M.S., Mengelers, M.J.B., De Vries, J.H.M., et Katan, M.B., 1997. Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *FEBS Letters*, 418, 152-156.
- Hou, Z., Sang, S., You, H., Lee, M.J., Hong, J., Chin, K.V., et Yang, C.S., 2005. Mechanism of action of (-)-epigallocatechin-3-gallate: Auto-oxidation- dependent inactivation of epidermal growth factor receptor and direct effects on growth inhibition in human esophageal cancer KYSE 150 cells. *Cancer Research*, 65, 8049-8056.
- Huggins, M.L., 1942. Theory of solutions of high polymers. *Journal of the American Chemical Society*, 64, 1712-1719.
- Idris, O.H.M., Williams, P.A., et Phillips, G.O., 1998. Characterisation of gum from Acacia senegal trees of different age and location using multidetection gel permeation chromatography. *Food Hydrocolloids*, 12, 379-388.
- Ishihara, K., et Nakajima, N., 2003. Structural aspects of acylated plant pigments: Stabilization of flavonoid glucosides and interpretation of their functions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 23, 411-417.

- Islam, A.M., Phillips, G.O., Sljivo, A., Snowden, M.J., et Williams, P.A., 1997. A review of recent developments on the regulatory, structural and functional aspects of arabic gum Food Hydrocolloids, 11, 493-505.
- Israelachvili, J., 1992. Intermolecular and surface forces 2nd Edition Academic Press, London.
- Jiménez-Castaño, L., Villamiel, M., et López-Fandiño, R., 2007. Glycosylation of individual whey proteins by Maillard reaction using dextran of different molecular mass. Food Hydrocolloids, 21, 433-443.
- Jones, O.G., Lesmes, U., Dubin, P., et McClements, D.J., 2010. Effect of polysaccharide charge on formation and properties of biopolymer nanoparticles created by heat treatment of [beta]-lactoglobulin-pectin complexes. Food Hydrocolloids, 24, 374-383.
- Kaibara, K., Okazaki, T., Bohidar, H.B., et Dubin, P.L., 2000. pH-Induced Coacervation in Complexes of Bovine Serum Albumin and Cationic Polyelectrolytes. Biomacromolecules, 1, 100-107.
- Kaldas, M.I., Walle, U.K., Van Der Woude, H., McMillan, J.M., et Walle, T., 2005. Covalent binding of the flavonoid quercetin to human serum albumin. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 4194-4197.
- Kang, S., Chung, J.H., Lee, J.H., Fisher, G.J., Wan, Y.S., Duell, E.A., et Voorhees, J.J., 2003. Topical n-acetyl cysteine and genistein prevent ultraviolet-light-induced signaling that leads to photoaging in human skin *in vivo*. Journal of Investigative Dermatology, 120, 835-841.
- Katiyar, S.K., Perez, A., et Mukhtar, H., 2000. Green tea polyphenol treatment to human skin prevents formation of ultraviolet light B-induced pyrimidine dimers in DNA. Clinical Cancer Research, 6, 3864-3869.
- Kato, A., 2002. Industrial Applications of Maillard-Type Protein-Polysaccharide Conjugates. Food Science and Technology Research, 8, 193-199.
- Kato, Y., Aoki, T., Kato, N., Nakamura, R., et 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.
- Kay, C.D., Kroon, P.A., et Cassidy, A., 2009. The bioactivity of dietary anthocyanins is likely to be mediated by their degradation products. Molecular Nutrition and Food Research, 53.

- Kinsella, J.E., 1984. Milk proteins: physicochemical and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 21, 197-262.
- Knekt, P., Kumpulainen, J., Järvinen, R., Rissanen, H., Heliövaara, M., Reunanen, A., Hakulinen, T., et Aromaa, A., 2002. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *American Journal of Clinical Nutrition*, 76, 560-568.
- Kobayashi, T., Ikeguchi, M., et Sugai, S., 2000. Molten globule structure of equine β -lactoglobulin probed by hydrogen exchange. *Journal of Molecular Biology*, 299, 757-770.
- Kraulis, P.J., 1991. MOLSCRIPT. A program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *Journal of Applied Crystallography*, 24, 947-950.
- Kurisawa, M., Chung, J.E., Uyama, H., et Kobayashi, S., 2003. Enzymatic synthesis and antioxidant properties of poly(rutin). *Biomacromolecules*, 4, 1394-1399.
- Lahouel, M., Boulkour, S., Segueni, N., et Fillastre, J.P., 2004. Protective affect of flavonoides against the toxicity of vinblastine, cyclophosphamide and paracetamol by inhibition of lipid-peroxydation and increase of liver glutathion. *HAEMA*, 7, 59-67.
- Lamprecht, A., Ubrich, N., Hombreiro Perez, M., Lehr, C.M., Hoffman, M., et Maincent, P., 2000. Influences of process parameters on nanoparticle preparation performed by a double emulsion pressure homogenization technique. *International Journal of Pharmaceutics*, 196, 177-182.
- Laneuville, S.I., Paquin, P., et Turgeon, S.L., 2005. Formula optimization of a low-fat food system containing whey protein isolate-xanthan gum complexes as fat replacer. *Journal of Food Science*, 70, 513-519.
- Laos, K., Brownsey, G.J., et Ring, S.G., 2007. Interactions between furcellaran and the globular proteins bovine serum albumin and β -lactoglobulin. *Carbohydrate Polymers*, 67, 116-123.
- Ledward, D.A., 1994. Protein - Polysaccharide interactions, p. 225-259, dans: N. Hettiarachchy and G. R. Ziegler, Eds., *Protein Functionality in Food Systems*, Marcel Dekker: New York.
- Lee, S.J., Kim, J.C., Kim, M.J., Kitaoka, M., Park, C.S., Lee, S.Y., Ra, M.J., Moon, T.W., Robyt, J.F., et Park, K.H., 1999. Transglycosylation of naringin by *Bacillus stearothermophilus* maltogenic amylase to give glycosylated naringin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3669-3674.
- Lentini, A., Forni, C., Provenzano, B., et Beninati, S., 2007. Enhancement of transglutaminase activity and polyamine depletion in B16-F10 melanoma cells by flavonoids naringenin

- and hesperitin correlate to reduction of the in vivo metastatic potential. *Amino Acids*, 32, 95-100.
- Leroi, E. 1973. Polynicotinic esters of hesperidin. US 3751570.
- Levy, M.-C., et Andry, M.-C. 1994. Microcapsule à paroi de flavonoïde reticule et composition en contenant. FR 2715582.
- Li, X.C., Jacob, M.R., Pasco, D.S., ElSohly, H.N., Nimrod, A.C., Walker, L.A., et Clark, A.M., 2001. Phenolic compounds from *Miconia myriantha* inhibiting *Candida* aspartic proteases. *Journal of Natural Products*, 64, 1282-1285.
- Lin, Y., Shi, R., Wang, X., et Shen, H.M., 2008. Luteolin, a flavonoid with potential for cancer prevention and therapy. *Current Cancer Drug Targets*, 8, 634-646.
- Makris, D.P., et Rossiter, J.T., 2000. Heat-induced, metal-catalyzed oxidative degradation of quercetin and rutin (quercetin 3-O-rhamnosylglucoside) in aqueous model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3830-3838.
- Malay, O., Bayraktar, O., et Batigun, A., 2007. Complex coacervation of silk fibroin and hyaluronic acid. *International Journal of Biological Macromolecules*, 40, 387-393.
- Manach, C., Regerat, F., Texier, O., Agullo, G., Demigne, C., et Remesy, C., 1996. Bioavailability, metabolism and physiological impact of 4-oxo-flavonoids. *Nutrition Research*, 16, 517-544.
- Mantas, A., Deretey, E., Ferretti, F.H., Estrada, M.R., et Csizmadia, I.G., 2000. Structural analysis of flavonoids with anti-HIV activity. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 504, 171-179.
- Marczylo, T.H., Cooke, D., Brown, K., Steward, W.P., et Gescher, A.J., 2009. Pharmacokinetics and metabolism of the putative cancer chemopreventive agent cyanidin-3-glucoside in mice. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 64, 1261-1268.
- Matsubara, K., Ishihara, K., Mizushina, Y., Mori, M., et Nakajima, N., 2004. Anti-angiogenic activity of quercetin and its derivatives. *Letters in Drug Design & Discovery*, 1, 329-333.
- Mattison, K.W., Wang, Y., Grymonpre, K., et Dubin, P.L., 1999. Micro- and macro-phase behavior in protein-polyelectrolyte complexes. *Macromolecular Symposia*, 140, 53-76.
- Mc Kenzie, H.A., 1971. β -lactoglobulins, p. 257-330, dans: H. A. Mc Kenzie, (Ed.), *Milk proteins Chemistry and Molecular Biology*, Academic Press: London.

- Mekhloufi, G., Sanchez, C., Renard, D., Guillemin, S., et Hardy, J., 2005. pH-Induced Structural Transitions during Complexation and Coacervation of β -Lactoglobulin and Acacia Gum. *Langmuir*, 21, 386-394.
- Middleton Jr, E., Kandaswami, C., et Theoharides, T.C., 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*, 52, 673-751.
- Milan, H., 2004a. La quercétine et ses dérivés : molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres ; études et applications thérapeutiques. Thèse, Université Louis Pasteur, Strasbourg I.
- Milan, H., 2004b. La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques, Université Louis Pasteur, Strasbourg I.
- Molinari, H., Ragona, L., Varani, L., Musco, G., Consonni, R., Zetta, L., et Monaco, H.L., 1996. Partially folded structure of monomeric bovine β -lactoglobulin. *FEBS Letters*, 381, 237-243.
- Mompon, B., Lemaire, B., Mengal, P., et Surbled, M. 1996. Extraction des polyphénols : du laboratoire à la production industrielle, Polyphénols, Bordeaux.
- Montilla, A., Casal, E., Javier Moreno, F., Belloque, J., Olano, A., et Corzo, N., 2007. Isolation of bovine β -lactoglobulin from complexes with chitosan. *International Dairy Journal*, 17, 459-464.
- Morand, C., Manach, C., Crespy, V., et Remesy, C., 2000. Quercetin 3-*o*- β -glucoside is better absorbed than other quercetin forms and is not present in rat plasma. *Free Radical Research*, 33, 667-676.
- Mounsey, J.S., O'Kennedy, B.T., Fenelon, M.A., et Brodkorb, A., 2008. The effect of heating on β -lactoglobulin-chitosan mixtures as influenced by pH and ionic strength. *Food Hydrocolloids*, 22, 65-73.
- Murakami, A., Ashida, H., et Terao, J., 2008. Multitargeted cancer prevention by quercetin. *Cancer Letters*, 269, 315-325.
- Murota, K., et Terao, J., 2003. Antioxidative flavonoid quercetin: Implication of its intestinal absorption and metabolism. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 417, 12-17.
- Nakajima, N., Ishihara, K., Itoh, T., Furuya, T., et Hamada, H., 1999. Lipase-catalyzed direct and regioselective acylation of flavonoid glucoside for mechanistic investigation of stable plant pigments. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 87, 105-107.

- Neilson, A.P., Hopf, A.S., Cooper, B.R., Pereira, M.A., Bomser, J.A., et Ferruzzi, M.G., 2007. Catechin degradation with concurrent formation of homo- and heterocatechin dimers during in vitro digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 8941-8949.
- Neirynek, N., Van der Meeren, P., Lukaszewicz-Lausecker, M., Cocquyt, J., Verbeken, D., et Dewettinck, K., 2007. Influence of pH and biopolymer ratio on whey protein-pectin interactions in aqueous solutions and in O/W emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 298, 99-107.
- Nichenametla, S.N., Taruscio, T.G., Barney, D.L., et Exon, J.H., 2006. A review of the effects and mechanisms of polyphenolics in cancer. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46, 161-183.
- Nigen, M., Croguennec, T., Renard, D., et Bouhallab, S., 2007. Temperature Affects the Supramolecular Structures Resulting from β -Lactalbumin-Lysozyme Interaction, 46, 1248-1255.
- Noguchi, H., 1956. Interactions of proteins with polymeric materials. *Biochimica et Biophysica Acta*, 22, 459-462.
- O'Regan, J., et Mulvihill, D.M., 2009. Preparation, characterisation and selected functional properties of sodium caseinate-maltodextrin conjugates. *Food Chemistry*, 115, 1257-1267.
- O'Regan, J., et Mulvihill, D.M., 2010. Heat stability and freeze-thaw stability of oil-in-water emulsions stabilised by sodium caseinate-maltodextrin conjugates. *Food Chemistry*, 119, 182-190.
- Oliveira, A.C., Moretti, T.S., Boschini, C., Baliero, J.C.C., Freitas, O., et Favaro-Trindade, C.S., 2007. Stability of microencapsulated *B. lactis* (BI 01) and *L. acidophilus* (LAC 4) by complex coacervation followed by spray drying. *Journal of Microencapsulation*, 24, 685-693.
- Oliver, C.M., Melton, L.D., et Stanley, R.A., 2006. Creating proteins with novel functionality via the maillard reaction: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46, 337-350.
- Otto, R.T., Geers, B.W., A., Petersohn, D., Schlotmann, K., et Schroeder, K.-L. 2001. Novel flavone glycoside derivatives for use in cosmetics, pharmaceuticals and nutrition. WO0179245

- Palmieri, G.F., Lauri, D., Martelli, S., et Wehrle, P., 1999. Methoxybutropate microencapsulation by gelatin-acacia complex coacervation. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 25, 399-407.
- Paoletti, T., Fallarini, S., Gugliesi, F., Minassi, A., Appendino, G., et Lombardi, G., 2009. Anti-inflammatory and vascularprotective properties of 8-prenylapigenin. *European Journal of Pharmacology*, 620, 120-130.
- Papiz, M.Z., Sawyer, L., et Eliopoulos, E.E., 1986. The structure of β -lactoglobulin and its similarity to plasma retinol-binding protein. *Nature*, 324, 383-385.
- Patterson, D., 1982. Polymer compatibility with and without a solvent. *Polymer Engineering and Science*, 22, 64-73.
- Pérez-Vicente, A., Gil-Izquierdo, A., et Garcia-Viguera, C., 2002. In vitro gastrointestinal digestion study of pomegranate juice phenolic compounds, anthocyanins, and vitamin C. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2308-2312.
- Pérez, M.D., et Calvo, M., 1995. Interaction of beta-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.
- Perrier, E., Mariotte, A.M., Boumendjel, A., et Bresson-Rival, D. 1998. Nouveaux esters de flavonoïdes, leur utilisation en cosmétique, dermopharmacie, en pharmacie et en agroalimentaire. FR2778663-A1
- Picton, L., Bataille, I., et Muller, G., 2000. Analysis of a complex polysaccharide (Arabic gum) by multi-angle laser light scattering coupled on-line to size exclusion chromatography and flow field flow fractionation. *Carbohydrate Polymers*, 42, 23-31.
- Piculell, L., Bergfeldt, K., et Nilsson, S., 1995. Factor Determining Phase Behaviour of Multi-Component Polymer Systems, p. 13-36, dans: S. E. Harding, S. E. Hill and J. R. Mitchell, Eds., *Biopolymer Mixtures*, Nottingham University Press: Nottingham.
- Pinelo, M., Manzocco, L., Jose Nunez, M., et Cristina Nicoli, M., 2004. Solvent effect on quercetin antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 88, 201-207.
- Pollard, T.D., et Earnshaw, W.C., 2004. *Biologie cellulaire* Elsevier SAS, Paris.
- Pulley, G.N., 1936. Solubility of naringin in water. *Industrial and Engineering Chemistry*, 8, 360.
- Qi, W., Fong, C., et Lamport, D.T.A., 1991. Gum arabic glycoprotein is a twisted hairy rope : A new model based on *o*-galactosylhydroxyproline as the polysaccharide attachment site. *Plant Physiology*, 96, 848-855.

- Ramadan, M.F., et Selim Asker, M.M., 2009. Antimicrobial and antiviral impact of novel quercetin-enriched lecithin. *Journal of Food Biochemistry*, 33, 557-571.
- Ramezani, R., Esmailpour, M., et Aminlari, M., 2008. Effect of conjugation with glucosamine on the functional properties of lysozyme and casein. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88, 2730-2737.
- Randall, R.C., Phillips, G.O., et Williams, P.A., 1988. The role of the proteinaceous component on the emulsifying properties of gum arabic. *Food Hydrocolloids*, 2, 131-140.
- Randall, R.C., Phillips, G.O., et Williams, P.A., 1989. Fractionation and characterization of gum from *Acacia senegal*. *Food Hydrocolloids*, 3, 65-75.
- Rao, Y.K., Fang, S.H., et Tzeng, Y.M., 2005. Anti-inflammatory activities of flavonoids isolated from *Caesalpinia pulcherrima*. *Journal of Ethnopharmacology*, 100, 249-253.
- Renard, D., Robert, P., Lavenant, L., Melcion, D., Popineau, Y., Gueguen, J., Duclairoir, C., Nakache, E., Sanchez, C., et Schmitt, C., 2002. Biopolymeric colloidal carriers for encapsulation or controlled release applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 242, 163-166.
- Renard, D., Lavenant-Gourgeon, L., Ralet, M.C., et Sanchez, C., 2006. Acacia senegal Gum: Continuum of Molecular Species Differing by Their Protein to Sugar Ratio, Molecular Weight, and Charges. *Biomacromolecules*, 7, 2637-2649.
- Ribeiro, M.E.N.P., Vieira, I.G.P., Cavalcante, I.M., Ricardo, N.M.P.S., Attwood, D., Yeates, S.G., et Booth, C., 2009. Solubilisation of griseofulvin, quercetin and rutin in micellar formulations of triblock copolymers E62P39E62 and E137S18E137. *International Journal of Pharmaceutics*, 378, 211-214.
- Sah, J.F., Balasubramanian, S., Eckert, R.L., et Rorke, E.A., 2004. Epigallocatechin-3-gallate inhibits epidermal growth factor receptor signaling pathway: Evidence for direct inhibition of ERK1/2 and AKT kinases. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 12755-12762.
- Saidman, E., Yurquina, A., Rudyk, R., Molina, M.A.A., et Ferretti, F.H., 2002. A theoretical and experimental study on the solubility, dissolution rate, structure and dipolar moment of flavone in ethanol. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 585, 1-13.
- Saija, A., Tomaino, A., Trombetta, D., Pellegrino, M.L., Tita, B., Messina, C., Bonina, F.P., Rocco, C., Nicolosi, G., et Castelli, F., 2003. 'In vitro' antioxidant and photoprotective

- properties and interaction with model membranes of three new quercetin esters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 56, 167-174.
- Sakai, M., Suzuki, M., Nanjo, F., et Hara, Y. 1994. 3-*O*-acylated catechins and methods of producing same. EP0618203.
- Samant, S.K., Singhal, R.S., Kulkarni, P.R., et Rege, D.V., 1993. Protein-polysaccharide interactions: a new approach in food formulations. *International Journal of Food Science and Technology*, 28, 547-562.
- Sanchez, C., Despond, S., Schmitt, C., et Hardy, J., 2001. Effect of heat and shear on β -lactoglobulin-acacia gum complex coacervation, p. 332-341, dans: E. Dickinson and R. Miller, Eds., *Food Colloids : Fundamentals of Formulation*, Royal Society of Chemistry: Chambridge.
- Sanchez, C., Mekhloufi, G., Schmitt, C., Renard, D., Robert, P., Lehr, C.M., Lamprecht, A., et Hardy, J., 2002a. Self-Assembly of β -Lactoglobulin and Acacia Gum in Aqueous Solvent: Structure and Phase-Ordering Kinetics. *Langmuir*, 18, 10323-10333.
- Sanchez, C., Renard, D., Robert, P., Schmitt, C., et Lefebvre, J., 2002b. Structure and rheological properties of acacia gum dispersions. *Food Hydrocolloids*, 16, 257-267.
- Sanchez, C., Mekhloufi, G., et Renard, D., 2006. Complex coacervation between [β]-lactoglobulin and Acacia gum: A nucleation and growth mechanism. *Journal of Colloid and Interface Science*, 299, 867-873.
- Sanchez, C., Schmitt, C., Kolodziejczyk, E., Lapp, A., Gaillard, C., et Renard, D., 2008. The Acacia Gum Arabinogalactan Fraction Is a Thin Oblate Ellipsoid: A New Model Based on Small-Angle Neutron Scattering and Ab Initio Calculation. *Biophysical Journal*, 94, 629-639.
- Sang, S., Lee, M.J., Hou, Z., Ho, C.T., et Yang, C.S., 2005. Stability of tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate and formation of dimers and epimers under common experimental conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 9478-9484.
- Sawyer, L., Brownlow, S., Polikarpov, I., et Wu, S.Y., 1998. β -lactoglobulin: Structural studies, biological clues. *International Dairy Journal*, 8, 65-72.
- Sawyer, L., et Kontopidis, G., 2000. The core lipocalin, bovine β -lactoglobulin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1482, 136-148.
- Sawyer, L., Barlow, P.N., Boland, M.J., Creamer, L.K., Denton, H., Edwards, P.J.B., Holt, C., Jameson, G.B., Kontopidis, G., Norris, G.E., Uhrinova, S., et Wu, S.Y., 2002. Erratum: Milk protein structure - What can it tell the dairy industry? (*International*

- Dairy Journal (2002) 12:4 (299-310) PII: S0958694602000250). International Dairy Journal, 12, 709.
- Sayin, B., Somavarapu, S., Li, X.W., Thanou, M., Sesardic, D., Alpar, H.O., et Åzenel, S., 2008. Mono-N-carboxymethyl chitosan (MCC) and N-trimethyl chitosan (TMC) nanoparticles for non-invasive vaccine delivery. International Journal of Pharmaceutics, 363, 139-148.
- Schmitt, C., Sanchez, C., Désobry-Banon, S., et Hardy, J., 1998. Structure and technofunctional properties of protein-polysaccharide complexes : A review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 38, 689-753.
- Schmitt, C., Sanchez, C., Thomas, F., et Hardy, J., 1999. Complex coacervation between [beta]-lactoglobulin and acacia gum in aqueous medium. Food Hydrocolloids, 13, 483-496.
- Schmitt, C., Sanchez, C., Lamprecht, A., Renard, D., Lehr, C.-M., de Kruif, C.G., et Hardy, J., 2001. Study of [beta]-lactoglobulin/acacia gum complex coacervation by diffusing-wave spectroscopy and confocal scanning laser microscopy. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 20, 267-280.
- Schwingel, L., Fasolo, D., Holzschuh, M., Lula, I., Sinisterra, R., Koester, L., Teixeira, H., et Bassani, V.L., 2008. Association of 3-O-methylquercetin with β -cyclodextrin: Complex preparation, characterization and ex vivo skin permeation studies. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, 62, 149-159.
- Singh, S.S., Bohidar, H.B., et Bandyopadhyay, S., 2007. Study of gelatin-agar intermolecular aggregates in the supernatant of its coacervate. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 57, 29-36.
- Stainsby, G., 1980. Proteinaceous gelling systems and their complexes with polysaccharides. Food Chemistry, 6, 3-14.
- Street, C.A., et Anderson, D.M.W., 1983. Refinement of structures previously proposed for gum arabic and other acacia gum exudates. Talanta, 30, 887-893.
- Suk, L.J., Woong, K.J., Junoh, K.H., S. H., et Seop, C.I. 2005. Flavonoid-deposited polymer composite particles and process for preparation of the same, and cosmetic compositions containing the same. WO2005049704.
- Surh, Y.J., 2003. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. Nature Reviews Cancer, 3, 768-780.
- Syuichi, F., Kazutaka, T., et Shigeharu, M. 2006. Antioxidant material, anti-deterioration agent and food or beverage. WO2006070810.

- Timasheff, S.N., et Townend, R., 1961. Molecular interactions in β -lactoglobulin. VI. The dissociation of the genetic species of β -lactoglobulin at acid pH's. *Journal of the American Chemical Society*, 83, 470-473.
- Tolstoguzov, V., 1996. *Structure-Property Relationships in Foods ACS Symposium Series 650*, Washington DC, 2.
- Tolstoguzov, V., 2003. Some thermodynamic considerations in food formulation. *Food Hydrocolloids*, 17, 1-23.
- Tolstoguzov, V.B., 1986. Functional properties of protein-polysaccharide mixtures, p. 385-415, dans: J. R. Mitchell and D. A. Ledward, Eds., *Functional properties of macromolecules*, Elsevier Applied Science: Londres.
- Tolstoguzov, V.B., 1997. Food Proteins and Their Application, p. 171-198, dans: S. Damodaran and A. Paraf, Eds., *Food Proteins and Their Applications*, Marcel Dekker, Inc: New York.
- Tommasini, S., Raneri, D., Ficarra, R., Calabro, M.L., Stancanelli, R., et Ficarra, P., 2004. Improvement in solubility and dissolution rate of flavonoids by complexation with [beta]-cyclodextrin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 35, 379-387.
- Tompa, H., 1956. *Polymer Solutions*. Butterworth Scientific Publications ed., Londres.
- Tsung, M., et Burgess, D.J., 1997. Preparation and stabilization of heparin/gelatin complex coacervate microcapsules. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 86, 603-607.
- Turgeon, S.L., Schmitt, C., et Sanchez, C., 2007. Protein-polysaccharide complexes and coacervates. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 12, 166-178.
- Uhrinova, S., Smith, M.H., Jameson, G.B., Uhrin, D., Sawyer, L., et Barlow, P.N., 2000. Structural changes accompanying pH-induced dissociation of the β -lactoglobulin dimer. *Biochemistry*, 39, 3565-3574.
- Veis, A., Bodor, E., et Mussell, S., 1967. Molecular weight fractionation and the self-suppression of complex coacervation. *Biopolymers (Peptide Science)*, 5, 37-59.
- Velema, J., et Kaplan, D., 2006. Biopolymer-based biomaterials as scaffolds for tissue engineering. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 102, 187-238.
- Vercauteren, J., Weber, J.-F., Bisson, J.-L., et Bignon, J. 1993. Polyphenol derivative compositions and preparation thereof. US 5844061.
- Viskupicova, J., Ondrejovic, M., et Sturdik, E., 2009. The potential and practical applications of acylated flavonoids. *Pharmazie*, 64, 355-360.
- Walle, T., 2004. Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 36, 829-837.

- Wang, Y., Kimura, K., Huang, Q., Dubin, P.L., et Jaeger, W., 1999. Effects of Salt on Polyelectrolyte-Micelle Coacervation. *Macromolecules*, 32, 7128-7134.
- Watanabe, K., Niimura, K., et Miyagawa, J. 1993. Esculetin derivatives and method for manufacture thereof, use thereof, and pharmaceutical composition. EP 0654479A2.
- Weinbreck, F., de Vries, R., Schrooyen, P., et de Kruif, C.G., 2003. Complex Coacervation of Whey Proteins and Gum Arabic. *Biomacromolecules*, 4, 293-303.
- Weinbreck, F., Nieuwenhuijse, H., Robijn, G.W., et de Kruif, C.G., 2004. Complexation of Whey Proteins with Carrageenan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3550-3555.
- Whitney, R.M., 1977. Milk proteins, p. 66-151, dans: H. D. Graham, (Ed.), *Food Colloids*, The Avi Publishing Company INC.: Connecticut.
- Williams, C.A., et Grayer, R.J., 2004. Anthocyanins and other flavonoids. *Natural Product Reports*, 21, 539-573.
- Williams, P.A., Phillips, G.O., et Randall, R.C., 1990. Structure-function relationships of gum arabic, p. 25-36, dans: G. O. Phillips, D. J. Wedlock and P. A. Williams, Eds., *Gum and stabilisers for food industry*, IRL Press: Oxford.
- Wong, D.W.S., Camirand, W.M., et Pavlath, A.E., 1996. Structures and Functionalities of Milk Proteins. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36, 807-844.
- Xia, J., Dubin, P.L., et Kokufuta, E., 1993. Dynamic and electrophoretic light scattering of a water-soluble complex formed between pepsin and poly(ethylene glycol). *Macromolecules*, 26, 6688-6690.
- Xia, J., et Dubin, P.L., 1994. Protein-polyelectrolyte complexes, p. 247-271, dans: P. L. Dubin, J. Bock, R. Davis, D. N. Schulz and C. Thies, Eds., *Macromolecular Complexes in Chemistry and Biology*, Springer Verlag: Berlin.
- Yang, J., Powers, J.R., Clark, S., Dunker, A.K., et Swanson, B.G., 2002. Hydrophobic probe binding of β -lactoglobulin in the native and molten globule state induced by high pressure as affected by pH, KIO₃ and N-ethylmaleimide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5207-5214.
- Ye, A., Flanagan, J., et Singh, H., 2006. Formation of stable nanoparticles via electrostatic complexation between sodium caseinate and gum arabic. *Biopolymers*, 82, 121-133.
- Yeo, Y., Bellas, E., Firestone, W., Langer, R., et Kohane, D.S., 2005. Complex coacervates for thermally sensitive controlled release of flavor compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 7518-7525.
- Zhai, H., et Maibach, H., 2002. Skin antioxidants. *Cosmetics & Toiletries*, 117, 28-32.

Zimet, P., et Livney, Y.D., 2009. Beta-lactoglobulin and its nanocomplexes with pectin as vehicles for [omega]-3 polyunsaturated fatty acids. *Food Hydrocolloids*, 23, 1120-1126.

Chapitre 2 : Préparation et caractérisation de nanoparticules à base de quercétine et de gomme d'Acacia

1. Introduction

La quercétine, 3,3',4',5-7-pentahydroxyflavonone (Figure 2.1) est un flavonoïde de la famille des flavonols, composés naturels présents dans une large variété d'aliments consommés quotidiennement par l'Homme (Kaldas *et al.*, 2005). Elle est la plus représentative de cette famille de composés et intervient dans l'ensemble des processus biologiques et pharmacologiques associés aux flavonoïdes (Formica, 1995 ; Zheng *et al.*, 2005 ; Schaab *et al.*, 2006). Elle présente diverses activités biologiques intéressantes et joue notamment un rôle dans les processus de métabolisation de l'oxygène moléculaire et du monoxyde d'azote, ainsi que dans la neutralisation de différents radicaux.

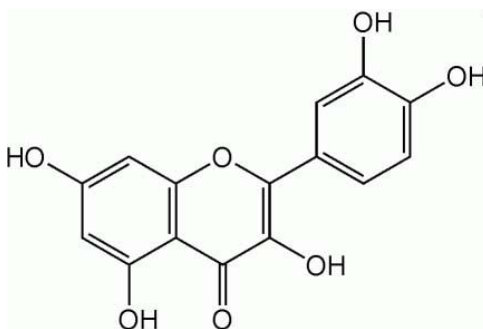


Figure 2.1: Structure chimique de la quercétine 3,3',4',5-7-pentahydroxyflavonone (Wu *et al.*, 2008).

La quercétine a été largement étudiée pour ses effets pharmacologiques concernant ses activités anti-tumorales (Kanadaswami *et al.*, 2005), anti-inflammatoires (Comalada *et al.*, 2005), anti-oxydantes (Erden Inal et Kahraman, 2000), et hépto-protectives (Lee *et al.*, 2003). En dépit de ce large éventail de propriétés pharmacologiques, l'utilisation de la

quercétine dans le domaine pharmaceutique est limitée par sa faible solubilité (Pralhad et Rajendrakumar, 2004). En outre, elle est chimiquement instable, en particulier en milieu alcalin, ce qui peut impliquer l'attaque des ions hydroxyles se trouvant sur le cycle C de la quercétine (Makris et Rossiter, 2000).

Des travaux ont été effectués afin d'améliorer la solubilité de la quercétine en ajoutant du diméthylsulfoxyde (DMSO) (Ader *et al.*, 2000) dont l'utilisation est discutable en raison du risque d'effets vasoconstricteurs et de toxicité neurologique (Windrum *et al.*, 2005). Pour tenter de remédier à ce problème, un dérivé soluble de la quercétine a été synthétisé mais sa biodisponibilité n'était que de 20 % (Mulholland *et al.*, 2001). Diverses techniques ont aussi été utilisées afin d'accroître la solubilité de la quercétine comme la complexation avec la cyclodextrine et les liposomes de polyéthylène glycol (Pralhad et Rajendrakumar, 2004 ; Yuan *et al.*, 2006). Néanmoins, l'utilisation de la cyclodextrine présente des risques de néphrotoxicité (Frijlink *et al.*, 1991) et l'utilisation de liposomes peut induire des problèmes de stabilité lors du stockage (Mu et Zhong, 2006).

Au cours des dernières années, d'importants efforts ont été consacrés au développement des nanotechnologies comme moyen d'administration de molécules d'intérêt. Les nanotechnologies se focalisent sur l'élaboration de nano-composites biocompatibles tels que les nanoparticules, les nano-capsules et les systèmes micellaires et conjugués (Panyam et Labhasetwar, 2003). Ce sont des particules colloïdales de taille submicronique comprenant des molécules d'intérêt encapsulées ou adsorbées sur une matrice polymérique (Labhasetwar, 1997). Leur taille submicronique offre un certain nombre d'avantages par rapport aux microparticules. En effet, cela permet d'augmenter la surface spécifique des particules. Différents travaux ont montré l'amélioration de l'absorption au niveau du tractus gastro-

intestinal et de la biodisponibilité de certaines molécules actives hydrophobes (Atkinson *et al.*, 1962 ; Jani *et al.*, 1990 ; Kamiya *et al.*, 2006).

L'absorption intracellulaire des nanoparticules est en général relativement élevée par rapport à celle des microparticules (Desai *et al.*, 1996 ; Desai *et al.*, 1997 ; Kroll *et al.*, 1998 ; Panyam et Labhasetwar, 2003). Des études ont montré que la taille des particules affecte de manière significative l'absorption cellulaire et tissulaire (Desai *et al.*, 1996 ; Desai *et al.*, 1997). En plus, pour certaines lignées de cellules (Hepa 1-6, HepG2, et KLN 205), seule les particules de taille submicronique sont efficacement prises en charge (Zauner *et al.*, 2001). Desai *et al.* (1997) ont montré que pour des cellules Caco-2, une lignée cellulaire humaine d'origine intestinale, l'absorption de nanoparticules de 100 nm est de deux à six fois plus élevée que l'absorption de microparticules (de 1 à 10 µm). D'autres auteurs ont montré que les nanoparticules peuvent traverser la barrière sang-cerveau à travers des jonctions serrées. Une telle stratégie pourrait servir pour l'administration d'agents thérapeutiques afin de lutter contre certaines maladies difficiles à traiter comme les tumeurs cérébrales (Kroll *et al.*, 1998).

En général, il est difficile de produire des nanoparticules en phase sèche. Cependant, cela s'avère possible en milieu aqueux en utilisant des procédés mécaniques (Peters *et al.*, 1999 ; Hu *et al.*, 2004). L'objectif de ce travail est d'améliorer la stabilité de la quercétine en milieu dispersé et aqueux mettant au point des particules de taille submicronique (nanoparticules) en utilisant de la gomme d'Acacia (GA), polysaccharide négativement chargé, comme vecteur colloïdal.

La gomme d'Acacia, polymère naturel, est non seulement d'un coût raisonnable et en quantité abondante dans la nature, mais possède aussi d'excellentes propriétés émulsifiantes et tensio-actives, ce qui est bénéfique pour la conception de nanoparticules. C'est l'un des

hydrocolloïdes émulsifiants les plus connus. Elle est actuellement utilisée pour ses propriétés nutritionnelles et de surface en industrie alimentaire, dans des procédés de microencapsulation (Burgess, 1994) ou de coacervation complexe (Burgess et Carless, 1984 ; Schmitt *et al.*, 1999), dans l'industrie des encres, mais également en lithographie, dans les explosifs, dans l'industrie textile, en médecine (Al-Mosawi, 2002), en pharmaceutique ou en cosmétique. La gomme d'Acacia ainsi que sa fraction principale (arabinogalactane) est largement utilisée comme agent protecteur et comme stabilisant dans des systèmes colloïdaux. Elles est, par exemple, souvent utilisée pour la mise au point de suspensions à base de nanoparticules de métaux précieux (platine, palladium et argent) (Mucalo *et al.*, 2002 ; Mohan *et al.*, 2007 ; Vimala *et al.*, 2009).

Dans cette étude, des nanoparticules de gomme d'Acacia-quercétine (GAQ) ont été préparées par homogénéisation dynamique à haute pression. Les mesures du diamètre hydrodynamique (D_h) des particules ont été effectuées par diffusion dynamique de la lumière (DLS). Les caractéristiques de surface ont été étudiées par le suivi de l'évolution de la mobilité électrophorétique et en particulier, en milieu salin.

Des analyses par microscopie électronique à transmission (TEM) ont aussi été entreprises sur la formulation sélectionnée afin d'étudier la morphologie des particules formées. L'effet des hautes pressions sur le pouvoir antioxydant de la quercétine a été évalué par la suite par une étude spectrophotométrique du piégeage de radicaux colorés tel que le 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ou l'acide 2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS).

1.1. La gomme d'Acacia

La gomme d'Acacia est un hétéropolysaccharide de structure complexe, ramifiée et encore mal connue avec une chaîne principale formée d'unités de β -galactopyranose liées en

1→3 et des chaînes latérales de galactopyranose en position 1→6 terminées par des résidus d'acide glucuronique ou acide 4-*O*-méthylglucuronique (Street et Anderson, 1983). Le polysaccharide est composé de D-galactose (~ 40 % des résidus), de L-arabinose (~ 24 %) et de L-rhamnose (~ 13 %) ainsi que de deux acides uroniques (qui confèrent le caractère polyanionique à la gomme) qui sont l'acide D-glucuronique (~ 21 %) et l'acide 4-*O*-méthylglucuronique (~ 2 %). La gomme d'Acacia n'est pas uniquement composée de résidus glucidiques. Elle contient également près de 2 % de protéine ou plus exactement de peptides. La composition de la fraction peptidique de la gomme d'Acacia a été étudiée par chromatographie. La composition détaillée en acide aminés est rapportée dans le tableau 2.1. Les acides aminés les plus abondants sont l'hydroxyproline et la sérine (Renard *et al.*, 2006).

Tableau 2.1 : Composition en acide aminés (valeurs données en Résidus / 1000 Résidus) de la gomme d'Acacia. a : % en protéines obtenu en additionnant les acides aminés, b : % en protéines obtenu par dosage Kjeldahl. D'après Renard *et al.*, (2006).

Acides aminés	résidus / 1000 résidus	Acides aminés	résidus / 1000 résidus
Hyp	229	Met	0
Asx	48	Ile	33
Thr	72	Leu	68
Ser	108	Tyr	13
Glx	47	Phe	40
Pro	72	His	61
Gly	55	Lys	34
Ala	44	Arg	30
Cys (R-SH)	0	% protein ^a	2.3
Val	46	% protein ^b	2.4

La partie polypeptidique de la gomme est liée de façon covalente à la fraction saccharide par les résidus sérine et hydroxyproline, donnant un mélange de complexes arabinogalactane-protéine (AGP). Chaque molécule d'arabinogalactane-protéine contient plus de 1600 résidus d'acides aminés qui forment une chaîne polypeptidique sur laquelle sont reliés cinq résidus glucidiques ayant une masse de 2.10^5 g.mole⁻¹. Cet ensemble de blocs polysaccharidiques autour de la chaîne peptidique donne une structure dite « *wattle-blossom* » (Figure 2.2) (Fincher *et al.*, 1983 ; Connolly *et al.*, 1988) et confère à la macromolécule un caractère amphiphile favorisant ainsi son adsorption à l'interface air/eau ou huile/eau.

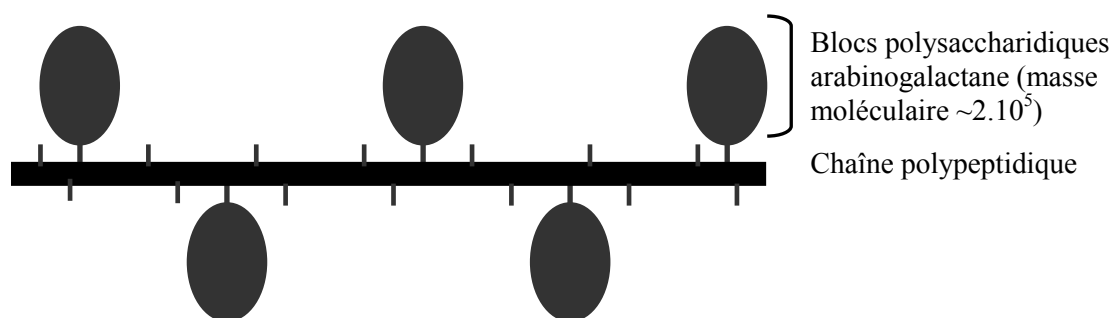


Figure 2.2 : Représentation schématique du modèle « *wattle-blossom* » de la fraction arabinogalactane-protéine (AGP) de la gomme d'Acacia (Fincher *et al.*, 1983).

Un modèle contradictoire a prédit une conformation en chaînes compactes aussi bien pour la fraction dite arabinogalactane que pour le complexe AGP. La structure de l' AGP serait plutôt en forme de tige, forme de corde chevelue torsadée dite « *twisted hairy rope* » (Figure 2.3) (Qi *et al.*, 1991).

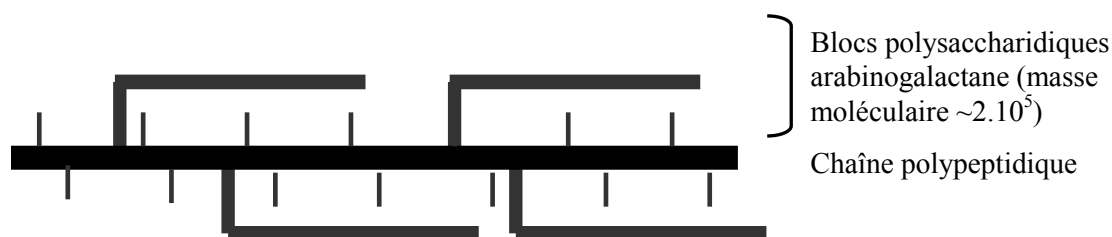


Figure 2.3 : Représentation schématique du modèle « *twisted hairy rope* » de la fraction arabinogalactane-protéine (AGP) de la gomme d'Acacia (Qi *et al.*, 1991).

L'AGP est l'une des trois principales fractions distinctement identifiées dans la gomme d'Acacia, les deux autres étant l'arabinogalactane (AG) et un ensemble de glycoprotéines (GP) (Randall *et al.*, 1988 ; Randall *et al.*, 1989 ; Williams *et al.*, 1990 ; Picton *et al.*, 2000 ; Sanchez *et al.*, 2002). La fraction AG constitue à elle seule près de 88 % de la masse totale de la gomme avec un poids moléculaire de $2,86.10^5$ g.mole⁻¹. Sa structure tertiaire n'a jamais été étudiée. La fraction AGP représente 10,4 % de la masse totale de la gomme d'Acacia, contenant près de 12 % de la teneur total en protéines. Son poids moléculaire est de $1,86.10^6$ g.mole⁻¹, son rayon hydrodynamique varie de 25 nm à plus de 50 nm (Picton *et al.*, 2000). Sa teneur en protéine représente 0,35 % de la teneur totale en protéines dans la gomme. La dernière fraction, GP, représente environ 1% de la masse totale de la gomme et contient près de 50 % de la teneur en protéines. Dans cette fraction, les résidus galactose (près de 12 % du galactose total) sont liés à un résidu de sérine.

Récemment, une étude combinant des mesures HPSEC-MALLS (High performance size exclusion chromatography coupled on-line with multiple angle laser light scattering), de la diffusion des neutrons aux petits angles (SANS) (couplées à des calculs *ab initio*), et diverses techniques microscopiques a permis de fournir le premier modèle de la fraction AG de la gomme d'Acacia (Sanchez *et al.*, 2008). A partir des résultats obtenus par SANS, il semblerait que la fraction AG possède une structure à deux dimensions avec un rayon de giration de 6,5 nm et une structure interne dense et ramifiée.

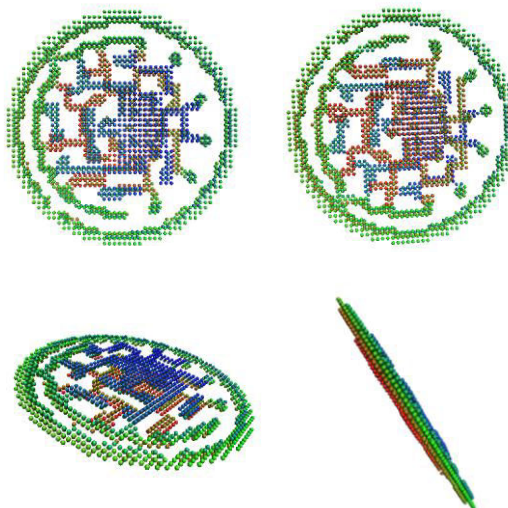


Figure 2.4 : Différents points de vue du DAM (*dummy atom model*) le plus probable de la fraction arabinogalactane (AG) obtenus en utilisant la méthode DAM implémentée dans le programme DAMMIN (Sanchez *et al.*, 2008).

La transformée inverse de Fourier a révélé, à partir du facteur de forme révélé par SANS, une morphologie semblable à celle d'un disque d'un diamètre de 20 nm et d'une épaisseur inférieure à 2 nm. Les calculs *ab initio* sur la fonction de distribution de paires ont mis en évidence des particules obliques poreuses, ellipsoïdes, aplaties aux pôles et possédant un réseau central enchevêtré (Figure 2.4). Les dimensions structurales et le modèle du disque fin ont été confirmés par microscopie électronique à transmission (Figure 2.5) et à force atomique.

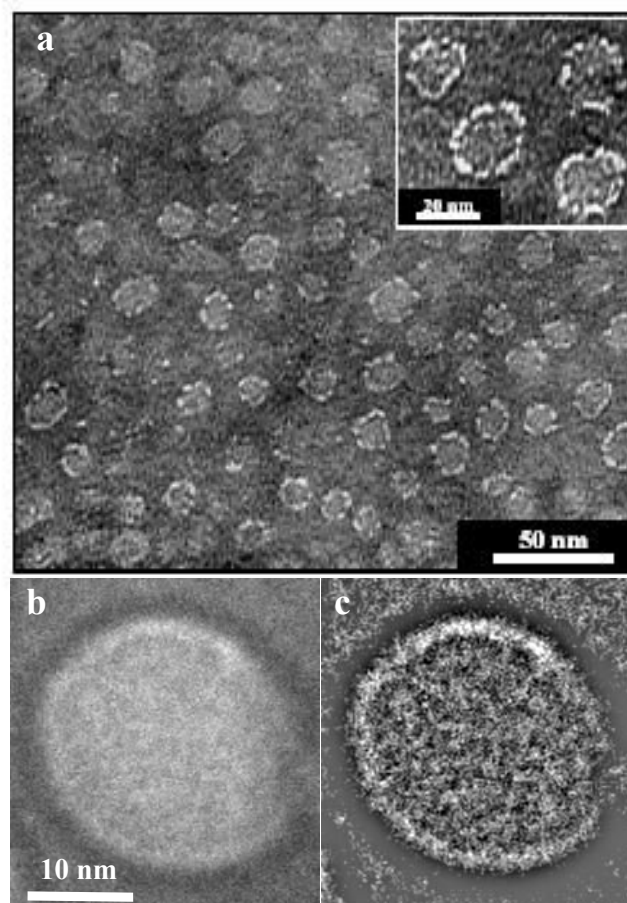


Figure 2.5 : (a) Micrographie TEM (Microscopie Electronique à Transmission) de la fraction arabinogalactane (AG) de la gomme d'Acacia. (b) Micrographie Cryo-TEM de la fraction arabinogalactane de la gomme d'Acacia. (c) Correspond à b après variation du contraste et application d'un filtre FFT (Fast Fourier Transform) (Sanchez *et al.*, 2008).

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel

La gomme d'Acacia (GA) (lot no. 97 J 716) a été fournie par la société CNI (Colloïdes Naturels International, Rouen, France). La poudre contenait (en g.100g⁻¹ de poudre humide) : 89,4 % de polysaccharides, 7,0 % d'humidité, 0,6 % de protéines et 3,0 % de cendres. La composition minérale (en g.100g⁻¹ de poudre) était : Mg²⁺ : 0,20 %, Ca²⁺ : 0,61 %, Na⁺ : 0,032 %, K⁺ : 0,90 %.

La quercétine (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavonone) a été fournie par Sigma-Aldrich (pureté $\geq$ 98 %)

2.2. Préparation et caractérisation de particules submicroniques à base de quercétine et de gomme d'Acacia

2.2.1. Préparation des dispersions de gomme d'Acacia

Des dispersions de GA à 5 % (p / p) en concentration totale finale ont été préparées par dispersion de la poudre de GA dans de l'eau ultrapure (résistivité : 18,2 m Ω) sous une agitation modérée pendant 2 heures à $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Les dispersions ont été stockées sans agitation pendant 18 heures à $4 \pm 1^\circ\text{C}$ pour permettre une bonne réhydratation du biopolymère. Par la suite, les dispersions ont été centrifugées à 10 000 rpm (rotor Eppendorf F36-6-38) pendant 40 minutes afin d'éliminer les bulles d'air et les particules insolubles résiduelles.

2.2.2. Préparation des particules submicroniques à base de quercétine et de gomme d'Acacia (GAQ) par homogénéisation haute pression

Des particules de GAQ ont été obtenues par la méthode de substitution du solvant en utilisant comme vecteur colloïdal la gomme d'Acacia (GA). Une dispersion éthanol / quercétine (2 g.l⁻¹) est mélangée dans la dispersion de GA à 5 % (p / p) et le tout a été homogénéisé par Ultra Turrax pendant 3 minutes à 9500 rpm. Le pré-mélange obtenu a été par la suite homogénéisé par haute pression (5 cycles à 1500 bars) à l'aide d'un homogénéisateur à haute-pression dynamique (Emulsiflex-C3, Avestin, Canada).

L'homogénéisateur à haute pression fonctionne selon le principe de la pompe à piston. A la sortie du dispositif, la réduction de la taille des particules est initiée par une combinaison de

phénomènes de cisaillement laminaire, de turbulence et/ou de cavitation (Lander *et al.*, 2000). Cependant, la turbulence est probablement le facteur dominant dans la réduction du diamètre des particules (Dickinson, 1992 ; Marie *et al.*, 2002) Les suspensions de GAQ sont ensuite centrifugées à 4500 rpm puis lyophilisées. Cette étape permettait de supprimer l'éthanol et de stabiliser le système. Des témoins de GA et de quercétine ont été préparés suivant la même méthode.

Différentes formulations ont été testées en variant la concentration en quercétine (0,02 %, 0,04 % et 0,06 % (p / p)).

La concentration finale en quercétine des nanoparticules de GAQ a été obtenue par dosage sur HPLC (Shimadzu). Les mesures ont été effectuées sur la formulation retenue (§ 3.2). Le dosage a été effectué sur les culots obtenus après centrifugation à 4500 rpm. Le système chromatographique se composait d'une pompe LC-10AT, d'un injecteur automatique SIL-10AD et d'un détecteur UV SPD-M10A ($\lambda = 254$ nm). La colonne utilisée était une Zorbax SB-C18 (250 mm $\times$ 4,6 mm i.d., 5 μ m) et la température était maintenue à 25 °C. La phase mobile se composait de méthanol / eau (70 : 30) et les éluions ont été réalisées en gradient avec un débit de 1 ml.min⁻¹.

La concentration des solutions standards de quercétine variait de 0,025 à 0,200 mg.ml⁻¹. La courbe étalon obtenue était linéaire avec un $R^2 = 0,996$.

2.2.3. Mesure de la taille des particules par diffusion dynamique de la lumière (DLS)

Les mesures de taille des particules de GAQ et GA en solution aqueuse à 0,1 % ont été réalisées avec un appareil de diffusion dynamique de la lumière type Zetasizer Nano ZS (HPPS 5001, Malvern Instruments, Angleterre) ayant une gamme de mesure de taille allant de

0,6 nm à 6 μm . Il est équipé d'un faisceau laser de type He/Ne (puissance 4 mW) de longueur d'onde 633 nm, d'un détecteur photodiode à avalanche, d'un photomultiplicateur et d'un corrélateur. Des cuvettes verticales de 10 mm de trajet optique ont été utilisées comme cellules de mesure. Les mesures ont été effectuées à un angle de diffusion de 173° et à une température de 25 $^\circ\text{C}$. Les fonctions d'autocorrélation ont été analysées par l'algorithme d'analyse CONTIN (modèle de calcul intégré dans le logiciel Malvern) permettant de déterminer la distribution des coefficients de diffusion translationnelle (D_T). Le coefficient de diffusion D_T ($\text{m}^2.\text{s}^{-1}$) est relié au rayon hydrodynamique (R_h) des particules qui diffusent selon la relation de Stokes-Einstein:

$$D_T = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h} \quad (2.1)$$

avec η la viscosité du solvant (Pa.s), k_B la constante de Boltzmann ($1,38 \times 10^{-23} \text{ N.m.k}^{-1}$) et T la température absolue ($^\circ\text{K}$). Les résultats obtenus par l'algorithme CONTIN permettent de déterminer les distributions de R_h (m) et l'amplitude respective de chaque population de particules. Les résultats sont présentés en diamètre hydrodynamique (D_h).

2.2.4. Mesures du potentiel Zêta et de la mobilité électrophorétique des particules

Les mesures de mobilité électrophorétique de GAQ et GA en solution aqueuse à 0,1 % ont été réalisées sur un Zetasizer Nano ZS (HPPS 5001, Malvern Instruments, Angleterre) équipé d'un faisceau laser de type He/Ne (puissance 4 mW) de longueur d'onde 633 nm. Les mesures de mobilité électrophorétique sont alors effectuées par Electrophorèse Laser Doppler (ELD). Le principe de l'ELD est de provoquer la migration des particules d'un échantillon contenu dans la cellule de mesure en appliquant un champ électrique. Les particules sont en

mouvement dans un réseau d'interférences générées par le croisement de deux faisceaux laser. La vitesse de déplacement des particules (vitesse) est ainsi évaluée par mesure de fluctuation temporelle de l'intensité diffusée par les particules en mouvement. La mobilité électrophorétique est calculée à partir de la vitesse des particules en appliquant la théorie de von Smoluchowski modifiée par Henry (Hunter, 1986) selon l'équation (2.2) :

$$\mu_E = v/E \quad (2.2)$$

où v est la vitesse des particules ($\mu\text{m.s}^{-1}$), E le champ électrique appliqué par unité de longueur (V.cm^{-1}) et μ_E la mobilité électrophorétique ($\mu\text{m.cm.s}^{-1}.\text{V}^{-1}$, abrégé dans la suite du texte par e.m.u. pour unité de mesure électrophorétique). L'appareil a d'abord été étalonné avec une solution standard DTS005 de latex (potentiel Zêta de -50 mV). Les mesures ont été effectuées à une température de 25 °C.

La mobilité électrophorétique d'une particule est considérée comme sa vitesse par unité de champ électrique. Elle est convertie en valeur de potentiel Zêta en la multipliant par un facteur dépendant de la permittivité et de la nature du milieu, comme cela est décrit par l'équation de Henry (2.3):

$$\zeta = (3\eta f(\kappa a))/2\varepsilon \mu_l E \quad 2.3)$$

où ε est la permittivité, η la viscosité du milieu de dispersion, $f(\kappa a)$ est une fonction liée à la proportion entre la taille (a) caractéristique du système et la longueur de Debye ($1/\kappa$) (Kimura *et al.*, 2002).

L'influence de la concentration en sel (NaCl) du milieu sur la mobilité électrophorétique de GA (5 g.l⁻¹) et GAQ (5 g.l⁻¹) en solution aqueuse a été étudiée. Cette

étude a permis de caractériser les propriétés de surface des particules. Les concentrations en sel (NaCl) du milieu varient de 0 à 200 mM. Les résultats de mesure de la mobilité électrophorétique sont exprimés en fonction de la concentration en sel.

Théorie

La théorie d'analyses des particules molles est un modèle validé (Ohshima et Kondo, 1987 ; Ohshima, 1995 ; Ohshima, 1998 ; Tsuneda *et al.*, 2003 ; Tsuneda *et al.*, 2004), qui suggère la présence autour du noyau des particules, d'une couche de polymère accessible aux contre-ions. Récemment, ce modèle a été utilisé pour étudier les propriétés de surface de différentes bactéries (Bos *et al.*, 1998 ; Morisaki *et al.*, 1999 ; Kiers *et al.*, 2001 ; Tsuneda *et al.*, 2003 ; Tsuneda *et al.*, 2004 ; Duval *et al.*, 2005 ; Murata *et al.*, 2005 ; Chandrababha *et al.*, 2007), de macromolécules (Ducel *et al.*, 2005 ; Rotureau *et al.*, 2007), de nanoparticules (Phenrat *et al.*, 2007 ; Kuo et Lin, 2008 ; López-Viota *et al.*, 2009) ainsi que pour étudier les interactions électrostatiques entre particules molles (Tolstoguzov, 2003 ; Ducel *et al.*, 2005 ; Ohshima, 2008).

La théorie d'analyse des particules molles (Ohshima, 1998) a été appliquée aux particules de GA et GAQ. Ce modèle vise à déterminer ZN , où N représente la densité de charge dans la région polyélectrolytique (charges/m^3) et Z correspond à la valence de ces charges. Le modèle permet également la détermination de $1/\lambda$, qui est liée à la profondeur de la couche accessible aux contre-ions. Ce paramètre est généralement décrit comme le degré de résistance à l'écoulement du liquide dans la région polyélectrolytique (Kim *et al.*, 2009). Un sel tel que le NaCl est utilisé pour masquer progressivement les charges des polymères. Le modèle théorique appliqué aux résultats obtenus prend comme paramètres ajustables ZN et $1/\lambda$.

La mobilité électrophorétique (μ_E) d'une particule molle est exprimée par l'équation (2.4) :

$$\mu_E = \frac{\epsilon_0 \epsilon_r}{\eta} \frac{\psi_0 / \kappa_m + \psi_{DON} / \lambda}{1 / \kappa_m + 1 / \lambda} + \frac{eZN}{\eta \lambda^2} \quad (2.4)$$

où η est la viscosité du milieu (exprimée en Pa.s^{-1}). κ_m est le paramètre de Deby Hückel de la couche de polyélectrolytes.

Pour simplifier l'équation suivante (2.5), A représente $ZN/2zn$:

$$\kappa_m = \kappa [1 + A^2]^{1/4} \quad (2.5)$$

κ est le paramètre de Deby Hückel des particules et est défini par l'équation (2.6) :

$$\kappa = \left(\frac{2z^2 e^2 n}{\epsilon_0 \epsilon_r kT} \right)^{1/2} \quad (2.6)$$

z est la valence de la solution électrolytique utilisée afin de modifier la force ionique du milieu. Du chlorure de sodium a été utilisé comme électrolyte, par conséquent $z = 1$; e , est la charge électrique élémentaire ($1,6 \times 10^{-19}$ C) ; ϵ_r et ϵ_0 sont respectivement la permittivité relative de la solution d'électrolyte et la permittivité absolue du vide ($\epsilon_r = 80$ et $\epsilon_0 = 8,85 \times 10^{-23} \text{ JK}^{-1}$), T (°K) est la température thermodynamique, k la constante de Boltzmann et n est la valeur de la concentration en électrolytes (exprimée en osmoles.m^{-3}).

ψ_{DON} est le potentiel de Donnan et peut être défini par l'équation (2.7) :

$$\psi_0 = \frac{kT}{ze} \ln \{ A + (A^2 + 1)^{1/2} \} \quad (2.7)$$

ψ_0 est le potentiel à la limite de la surface. Il est représenté par l'équation (2.8) :

$$\psi_0 = \frac{kT}{ze} \left(\ln \{ A + (A^2 + 1)^{1/2} \} + \frac{1}{A} \times \{ 1 - (A^2 + 1)^{1/2} \} \right) \quad (2.8)$$

En résumé, la théorie nous permet d'établir et de tracer μ en fonction de n (Figure 2.6). La mobilité électrophorétique des particules molles tend vers des valeurs non nulles même aux concentrations limites en sel, contrairement à celles des particules dures qui elles, tendent vers zéro (Ohshima, 1995 ; Ohshima, 2007).

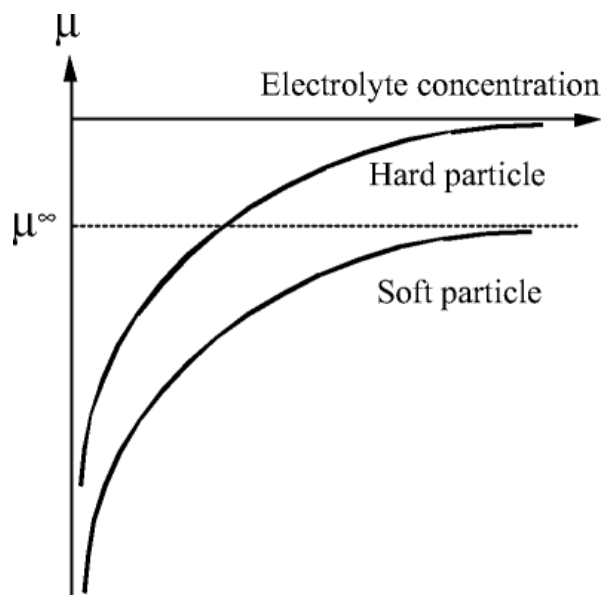


Figure 2.6: Evolution de la mobilité électrophorétique μ de particules chargées négativement en fonction de la concentration en électrolytes du milieu. La mobilité des particules molles tend vers de valeurs non nulles (μ^∞) à la limite des concentrations les plus élevées, alors que la mobilité des particules dures tend vers zéro (Ohshima, 2007).

2.2.5. Propriétés anti-oxydantes et anti-radicalaires de la quercétine nanostructurée

Grâce à leurs faibles potentiels redox, les flavonoïdes (Fl-OH) sont thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres oxydants comme le superoxyde, le peroxyde, l'alkoxyde et l'hydroxyle par transfert d'hydrogène.

Pour plus de fiabilité, l'activité anti-radicalaire a été évaluée avec deux méthodes par radiolyse pulsée. Il s'agissait d'une étude spectrophotométrique du piégeage de radicaux colorés tel que le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) ou l'acide 2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS^{•+}) (Rice-Evans *et al.*, 1996 ; Chan *et al.*, 2007).

L'activité des flavonoïdes est généralement comparée avec celle du Trolox (acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2- carboxylique), elle est exprimée en TEAC « Trolox Equivalent Antioxidant Capacity ». Il est à noter que plus la valeur de TEAC est élevée plus la molécule est active. Une méthode alternative consiste à déterminer leur aptitude à diminuer la réaction de peroxydation des lipides.

2.2.5.1. Piégeage de radicaux ABTS^{•+}

L'activité anti-radicalaire de GAQ, a été évaluée par le piégeage de radicaux ABTS^{•+}. Une solution ABTS^{•+} à 7 mM dans l'eau (3,83 g.l⁻¹) et une solution de Trolox à 2,5 mM (0,625 g.l⁻¹) dans de l'éthanol ont été préparées. Différentes dilutions de la solution de Trolox ont été préparées (de 0,5 à 2,5 mM). La solution ABTS^{•+} a été diluée dans de l'éthanol afin d'obtenir une absorbance à 734 nm de l'ordre de $0,7 \pm 0,02$. A 1 ml de solution d'ABTS^{•+}, 50 µL de solution de Trolox (à différentes dilutions) ont été ajoutés et l'absorbance a été mesurée à 734 nm après 15 minutes d'incubation à 25 °C. GAQ a été analysée de la même manière que le Trolox. L'activité anti-radicalaire de la quercétine seule avant et après homogénéisation à haute pression a aussi été mesurée.

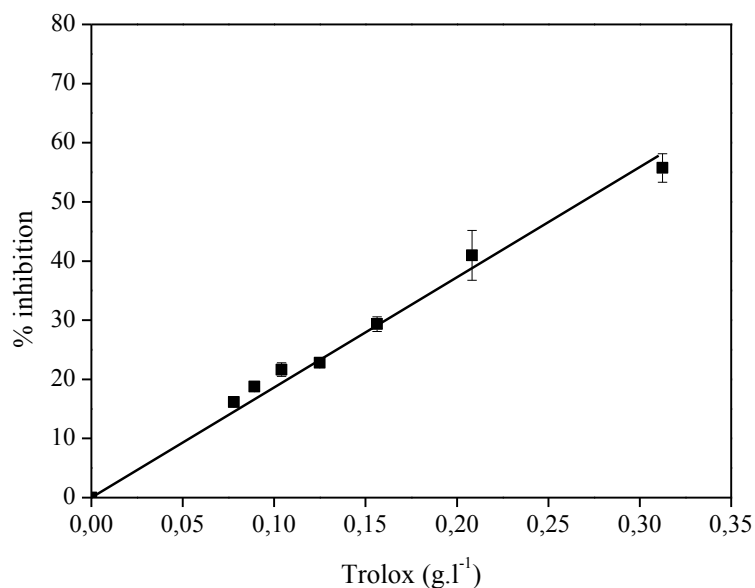


Figure 2.7 : Pourcentage d'inhibition de l'ABTS^{•+} en fonction de la concentration en Trolox.

Le pourcentage d'inhibition de l'ABTS^{•+} (Figure 2.7) a été calculé selon l'équation (2.9) :

$$\% \text{ inhibition} = (\text{Abs}_{\text{initiale}} - \text{Abs}_{\text{finale}}) \times 100 / \text{Abs}_{\text{initiale}} \quad (2.9)$$

La valeur du TEAC correspond à la concentration molaire de Trolox équivalent, permettant d'avoir le même pourcentage d'inhibition que pour 1 μM ou 1 g.l^{-1} de quercétine.

2.2.5.2. Piégeage de radicaux DPPH

L'activité anti-radicalaire de GAQ a été évaluée par le piégeage de radicaux DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle). Le test au DPPH a été effectué comme décrit par Samarth *et al*, (2008). Différentes dilutions ont été préparées dans du méthanol pur.

Les tests ont été réalisés par ajout de 50 μL des différentes dilutions à 5 mL de solution méthanolique de DPPH (0,004 %) et l'absorbance (Abs) à 517 nm a été mesurée après 30 minutes d'incubation à 25 °C. Le pourcentage d'inhibition est obtenu selon l'équation (2.10) :

$$\% \text{ inhibition} = (\text{Abs}_{\text{blanc}} - \text{Abs}_{\text{finale}}) \times 100 / \text{Abs}_{\text{blanc}} \quad (2.10)$$

L'IC₅₀ a été calculée à partir de la courbe d'inhibition en fonction de la concentration en quercétine. Il s'agit de la concentration pour laquelle il y a 50 % d'inhibition. L'activité anti-radicalaire de la quercétine seule avant et après homogénéisation à haute pression a aussi été mesurée.

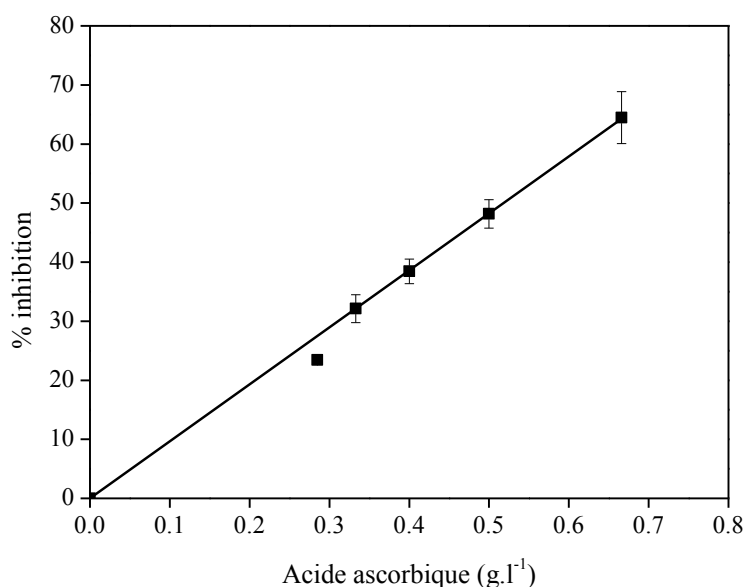


Figure 2.8 : Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction de la concentration en acide ascorbique.

L'acide ascorbique (Figure 2.8) est utilisé comme standard (Chan *et al.*, 2007 ; Lim et Murtijaya, 2007) et le pouvoir antioxydant peut être exprimé en AEAC « ascorbic acid equivalent antioxidant capacity » exprimé en mg d'acide ascorbique .100 g⁻¹ selon l'équation (2.11):

$$\text{AEAC} = [\text{IC}_{50}(\text{acide ascorbique}) / \text{IC}_{50}(\text{échantillon})] \times 100 \quad (2.11)$$

L'IC₅₀ de l'acide ascorbique utilisé pour calculer l'AEAC est de 0,52 ± 0,02 mM.

2.2.6. Microscopie électronique à transmission

Les observations ont été effectuées à l'unité BIA de l'INRA de Nantes. Des dispersions de GA et GAQ à 1 % (p / p) ont été préparées dans de l'eau ultrapure contenant 50 mM de NaCl. Une goutte de chaque dispersion a été déposée à la surface d'une grille de cuivre (Quantifoil, Jena, Allemagne) recouverte par un film continu de carbone. Les échantillons ont ensuite été négativement colorés à l'acétate d'uranyle (Merck). Pour cela, la grille recouverte par l'échantillon a été successivement placée sur une goutte d'une solution aqueuse d'acétate d'uranyle (2 % p / p) puis sur une goutte d'eau distillée. La grille est ensuite séchée à l'air avant d'être introduite dans le microscope électronique. Les échantillons ont été observés en utilisant un microscope électronique à transmission JEOL JEM-1230 (JEOL, Tokyo, Japon) fonctionnant avec une tension d'accélération de 80 kV. Les images ont été acquises sur une caméra CCD Gatan ES500W de résolution $1,35 \text{ K} \times 1,04 \text{ K}$. Le contraste et la luminosité des images ont été traités à l'aide d'un logiciel de traitement d'images ImageJ v1.4.

3. Résultats et discussion

3.1. Taille et stabilité des nanoparticules de gomme Acacia-quercétine (GAQ)

Les mesures du diamètre hydrodynamique (D_h) des particules ont été effectuées par diffusion dynamique de la lumière (Tableau 2.2). Leur potentiel Zêta a également été mesuré pour déterminer leur charge de surface (Tableau 2.2). La stabilité des particules est en corrélation avec le potentiel Zêta (Chansiri *et al.*, 1999). En effet, une valeur élevée de la densité de charges à la surface des particules conduit à des interactions répulsives entre celles-ci. Ce phénomène entraîne une répartition plus uniforme des tailles ainsi qu'une meilleure stabilité à l'agrégation (Zhang et Kosaraju, 2007). Il s'avère qu'un potentiel Zêta d'environ 30 mV minimum est nécessaire pour la stabilité des dispersions (Jacobs *et al.*, 2000).

Tableau 2.2: Diamètres hydrodynamiques et potentiels Zêta des particules de gomme d'Acacia-quercétine (GAQ).

Formulations	D _h (nm)	Potentiel Zêta (mV)
Témoin GA 5 %	37,2 ± 0,9	-34,3 ± 2,9
5% GA, 0,02 % Quercétine	245,4 ± 10,0	-44,2 ± 1,6
5% GA, 0,04 % Quercétine	430,4 ± 53,0	-42,1 ± 1,8
5% GA, 0,06 % Quercétine	621,1 ± 17,5	-28,7 ± 0,8

Les résultats obtenus (Tableau 2.2) indiquent que les particules de plus petite taille ($245,40 \pm 10,07$ nm) ont été obtenues pour une concentration de 0,02 % en quercétine. A des concentrations plus élevées, le diamètre hydrodynamique (D_h) des particules augmente et peut être multiplié par un facteur de 2,5. De récentes études (Mohan *et al.*, 2007 ; Vimala *et al.*, 2009) suggèrent que l'augmentation de la concentration en GA du milieu permet de réduire la taille de nanoparticules. La valeur maximale de 5 % en GA a été choisie par rapport à certaines contraintes matérielles. En effet, des problèmes de surpressions sont survenus au niveau de l'homogénéisateur à haute pression en essayant de travailler à des concentrations plus élevées en GA.

Vimala *et al.* (2009) ont montrés que des polysaccharides tels que la carboxyméthylcellulose, l'amidon et la gomme d'Acacia avaient la capacité de contrôler la taille de particules. Leurs travaux concernant la production et la stabilisation de nanoparticules d'argent ont permis de conclure que les nanoparticules de plus petites tailles étaient obtenues avec de la GA et que cette dernière permettait de stabiliser très fortement le système. Ce phénomène serait dû au groupement fonctionnel « 3,-OH » présent dans la GA. Des résultats obtenus par microscopie électronique à transmission (TEM) ont clairement

montré qu'une augmentation de la concentration de GA permettait de réduire la taille de nanoparticules d'argent (Mohan *et al.*, 2007).

Le potentiel Zêta des particules est négatif pour les différentes formulations utilisées en raison de la présence de résidus d'acide glucuronique dans la gomme d'Acacia. Les particules de plus petite taille possèdent une valeur élevée de potentiel Zêta ($-44,20 \pm 1,65$ mV) traduisant une bonne stabilité des particules en milieu dispersé. L'utilisation de GA permet une très bonne stabilité des dispersions de nanoparticules par le biais d'effets stériques et électrostatiques mais également par la présence de groupements carboxylates (Mohan *et al.*, 2007). L'augmentation de la concentration en quercétine a conduit à la baisse du potentiel Zêta des particules et par conséquent, de la stabilité du système. En conclusion, la formulation utilisant 0,02 % de quercétine et 5 % de GA constitue la meilleure des combinaisons testées (D_h et potentiel Zêta) afin d'obtenir des nanoparticules de quercétine possédant une bonne stabilité en milieu dispersé.

La concentration finale en quercétine des nanoparticules de GAQ obtenue par dosage sur HPLC fait état d'une perte de $15,50 \pm 0,025$ % en quercétine.

3.2. Mobilité électrophorétique et application de la théorie des particules

molles

La mobilité électrophorétique des dispersions de GA et GAQ a été mesurée en fonction de la concentration en NaCl du milieu à pH 4,8 (pH du milieu à la plus forte concentration en sel) (Figure 2.9).

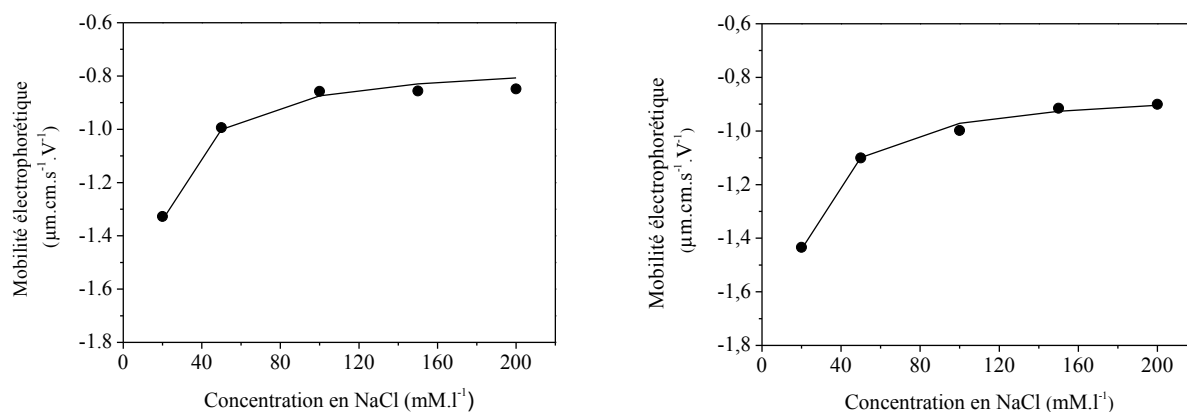


Figure 2.9 : Mobilité électrophorétique des particules de (A) gomme d'Acacia et de (B) gomme Acacia-quercétine. Les symboles représentent les valeurs expérimentales mesurées en fonction de la concentration en NaCl. Les lignes continues représentent les meilleurs ajustements théoriques.

La valeur absolue de la mobilité électrophorétique diminue avec l'augmentation de la concentration en NaCl du milieu. Ce phénomène peut être expliqué par la diminution de la longueur de Debye (Equation 2.3) suite à la réduction de l'épaisseur de la double couche électrique (Ducel *et al.*, 2005) et plus particulièrement à la compression de la couche électrique diffuse (Chandraprabha *et al.*, 2009). Par la suite, un plateau est atteint correspondant à des valeurs non nulles de mobilité. Ces résultats traduisent un comportement correspondant à celui de particules molles (Figure 2.6).

L'existence d'une mobilité électrophorétique non nulle dans un milieu à haute concentration en électrolytes est une particularité liée aux caractéristiques de surface des particules molles (Dukhin *et al.*, 2007). Selon Ohshima (1995), cet effet est causé par un flux électro-osmotique de particules au niveau de la partie molle de la particule. Dukhin *et al.* (2007) ont confirmé les conclusions d'Ohshima en s'appuyant sur des théories classiques d'électrocinétique et plus précisément sur la théorie d'Henry (Henry, 1931). Les mesures de

mobilité électrophorétique montrent que la GA et la GAQ possèdent des caractéristiques de particules molles. La théorie d'analyse des particules molles (Ohshima, 1998) a été appliquée pour déterminer la densité de charges et l'épaisseur de la couche accessible par les contre-ions.

Les résultats obtenus (Figure 2.9) montrent une bonne corrélation entre les résultats expérimentaux et théoriques ($R^2 = 0,93$ pour GA et GAQ). Les valeurs de λ pour GA et GAQ sont respectivement de 2,0 nm et de 2,1 nm. La valeur absolue de densité de charge (ZN) obtenue pour GAQ (- 19,4 mM) (Tableau 2.3) est légèrement plus élevée que celle de GA (- 18,9 mM). L'augmentation du nombre de charges négatives peut être due à l'augmentation du degré d'ionisation des groupements COOH de la gomme. Ce gain de charges négatives peut également être dû aux charges négatives portées par la quercétine. En effet, cette dernière existe à l'état anionique avec une ou deux charges en fonction du pH. Les groupements phénoliques (OH) les plus acides se trouvent en position 3 et 7 de la molécule de quercétine, ils peuvent alors être dissociés et former un mélange d'espèces neutres et anioniques (Agrawal et Schneider, 1983 ; Kitson *et al.*, 2001). Liu *et al.*, (2006) ont montré que la quercétine était chargée négativement entre pH 4,0 et pH 5,4 et Kitson *et al.*, (2001) ont rapporté le même phénomène pour des valeurs de pH allant de 6,0 à 9,0.

Tableau 2.3: Valeurs de densité de charges et d'épaisseurs de la couche accessible aux contre-ions obtenues par l'application de la théorie d'Ohshima (1995).

	ZN (mM)	λ (nm)
Gomme d'Acacia	- 18,9	2,0
Gomme d'Acacia-quercétine	- 19,4	2,1

3.3. Microscopie électronique à transmission

Les structures supramoléculaires des particules de GA et GAQ ont été caractérisées par microscopie électronique à transmission (TEM).

L'observation de la structure de la gomme d'Acacia (GA) a permis de visualiser des particules sphériques possédant un diamètre de quelques dizaines de nanomètres compris entre 10 et 40 nm (Figure 2.10, A). Ces résultats sont en accord avec le diamètre hydrodynamique de GA obtenu par diffusion dynamique de la lumière.

Au sein de ce même échantillon, l'existence d'une autre structure de type agrégats possédant une organisation particulière a été observée (Figure 2.10, B). Ces structures sont constituées de petites sous-unités sphériques et résultent de l'assemblage de petites particules de GA ou correspondent à la fraction AGP de la gomme qui a une structure similaire (Qi *et al.*, 1991).

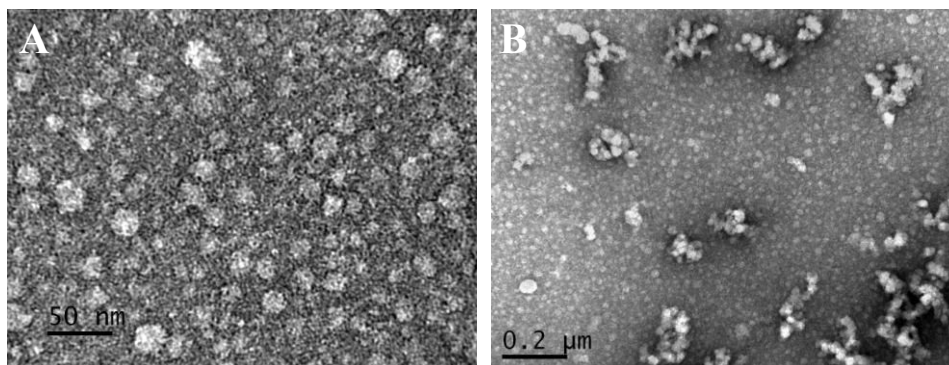


Figure 2.10 : Micrographies obtenues par microscopie électronique à transmission sur la gomme d'Acacia. Les barres d'échelle sont respectivement de 50 nm (A) et 200 nm (B).

Les résultats obtenus dans le cas des particules de gomme d'Acacia-quercétine (GAQ) ont permis d'observer deux populations de particules (Figure 2.11, A, B). La première population regroupe des particules sphériques d'un diamètre inférieur à 50 nm, elle est

représentative des particules de GA. La seconde population représente des particules ayant un diamètre qui varie de 100 à 250 nm. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par diffusion dynamique de la lumière.

Les particules appartenant à la seconde population sont caractérisées par une morphologie particulière. Une observation à plus petite échelle (Figure 2.11, C) et l'application d'un filtre FFT (Fast Fourier Transform) (Figure 2.11, D) ont permis de voir que ces particules étaient constituées de petites structures sphériques présentant un diamètre inférieur à 50 nm. Il s'agit vraisemblablement d'un regroupement de particules de GA autour d'un cœur de quercétine. Cette structure pourrait être assimilée à un assemblage « cœur-couronne ». Dans cet échantillon, quelques structures de type agrégat sont également observées (Figure 2.11, A).

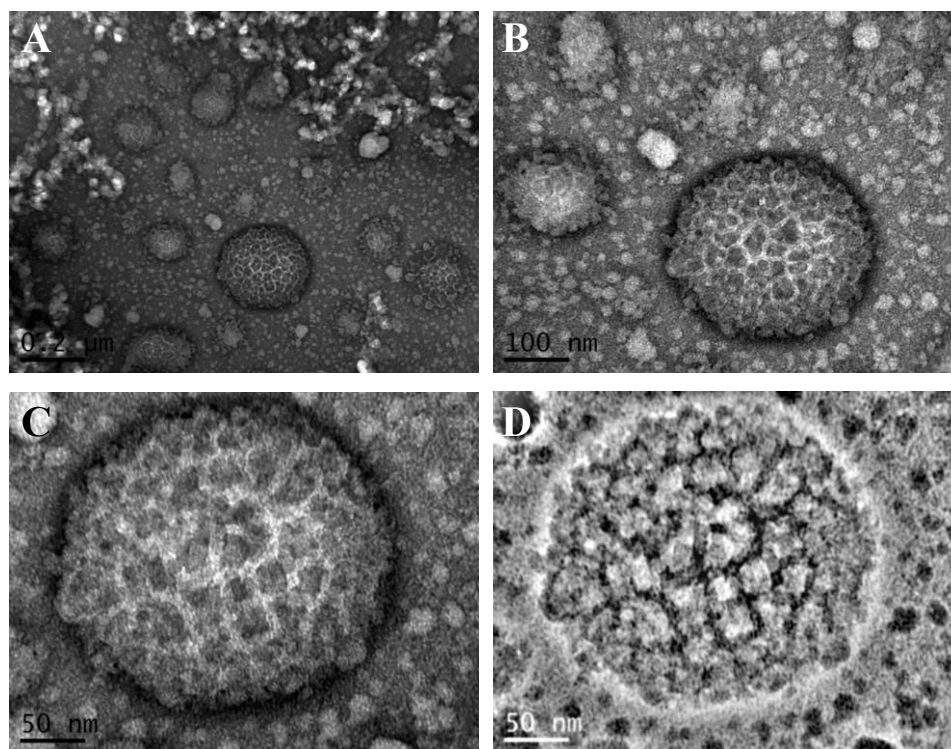


Figure 2.11: Micrographies obtenues par microscopie électronique à transmission sur des particules de gomme Acacia-quercétine à différentes échelles d'observation. Les barres d'échelle sont de 200 nm (A), 100 nm (B) et 50 nm (C, D). (D) représente l'image « C » après utilisation du logiciel de traitement d'images, ImageJ v1.4 et l'application d'un filtre FFT (Fast Fourier Transform).

3.4. Piégeage de radicaux ABTS^{•+} et DPPH

Dans notre étude, l'ABTS^{•+} et le DPPH ont été utilisés afin d'évaluer le pouvoir antioxydant de GAQ ainsi que l'effet de l'homogénéisation à haute pression sur celui de la quercétine. Les radicaux libres sont générés par des processus métaboliques normaux ou par des agents exogènes. Ils peuvent facilement amorcer la peroxydation des lipides membranaires, conduisant à l'accumulation de peroxydes lipidiques (Halliwell et Gutteridge, 1990).

Le test ABTS mesure l'habilité d'un anti-oxydant à capturer les radicaux ABTS^{•+} générés par la réaction entre un oxydant fort et le sel d'ABTS^{•+}. Aucune activité n'a été mesurée pour le témoin GA. L'application d'un traitement aux hautes pressions a conduit à une diminution du TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) de la quercétine seule allant jusqu'à $14,09 \pm 1,22$ % de perte. La présence de GA a permis de réduire les pertes du TEAC à $9,07 \pm 0,89$ %.

Tableau 2.4 : Valeurs des activités anti-radicalaires de GAQ et de la quercétine avant et après homogénéisation à haute pression évaluées par piégeage de radicaux ABTS^{•+} et DPPH.

Particules	Pouvoir antioxydant		
	Test ABTS ^{•+}		Test DPPH
	TEAC (mM)	IC50 (mg/ml)	AEAC (mg AA/100 g)
Quercétine	$3,31 \pm 0,09$	$0,35 \pm 0,02$	$149,94 \pm 9,03$
Quercétine + homogénéisation	$2,84 \pm 0,07$	$0,40 \pm 0,01$	$130,47 \pm 4,87$
Gomma Acacia-quercétine	$3,01 \pm 0,03$	$0,38 \pm 0,01$	$136,84 \pm 5,23$

Le DPPH présente un radical hydrogène libre ce qui lui confère des caractéristiques d'absorption à 517 nm (Di Mambro *et al.*, 2003 ; Lin et Chou, 2004). En présence de piègeurs de radicaux libres, la couleur pourpre de la solution de DPPH s'estompe rapidement (Yamaguchi *et al.*, 1998). L'utilisation des hautes pressions a conduit à une baisse de $12,87 \pm 3,23$ % du AEAC (ascorbic acid equivalent antioxidant capacity) de la quercétine. En présence de GA, cette baisse n'est que de $8,64 \pm 2,06$ %. Cet effet devrait être dû au pouvoir antioxydant caractérisant la GA (Ali *et al.*, 2009 ; Gils *et al.*, 2010). Ces résultats vont dans le même sens que ceux obtenus pour le potentiel de piégeage de radicaux ABTS^{•+}.

4. Conclusion

La formulation retenue pour l'élaboration des nanoparticules de GAQ est celle pour laquelle une dispersion de GA à 5 % (p / p) a été utilisée sans l'ajout de surfactant. En effet, cette formulation a permis d'obtenir les particules de plus petite taille ($D_h = 245,40 \pm 10,07$ nm) avec une concentration finale en quercétine, obtenue par dosage sur HPLC, qui fait état d'une perte de $15,50 \pm 0,02$ % en quercétine.

La charge de surface des nanoparticules de GAQ est négative (présence de résidus d'acide glucuronique dans la GA) et la valeur du potentiel Zêta traduit leur bonne stabilité en milieu dispersé. L'utilisation de GA permet une très bonne stabilité des dispersions de nanoparticules par le biais d'effets stériques et électrostatiques ainsi que par la présence de groupements carboxylate. Les mesures de mobilité électrophorétique montrent que les particules de GAQ possèdent des caractéristiques de particules molles. La théorie qui leur est appliquée a permis d'obtenir l'épaisseur de la couche accessible par les contre-ions qui est de 2,1 nm. L'application de cette théorie a également permis d'observer une légère augmentation

de la densité des charges négatives après formation des particules de GAQ qui serait dû aux charges négatives portées par la quercétine.

Les résultats obtenus par TEM confirment ceux obtenus par DLS. Les nanoparticules de GAQ sont caractérisées par une morphologie particulière. En effet, elles sont constituées de petites structures sphériques présentant un diamètre inférieur à 50 nm. Il s'agirait d'un regroupement de particules de GA autour d'un cœur de quercétine. Cette structure peut être assimilée à un assemblage « cœur-couronne ».

Le procédé d'homogénéisation à haute pression permet d'obtenir des particules de taille nanoscopique. Les résultats liés aux mesures du pouvoir antioxydant ont montré que le traitement par homogénéisation à haute pression induisait une certaine perte du TEAC et du AEAC de la quercétine mais qu'en présence de GA, ces pertes étaient réduites.

Références bibliographiques

- Ader, P., Wessmann, A., et Wolffram, S., 2000. Bioavailability and metabolism of the flavonol quercetin in the pig. *Free Radical Biology and Medicine*, 28, 1056-1067.
- Agrawal, P.K., et Schneider, H.J., 1983. Deprotonation induced ¹³ C NMR shifts in phenols and flavonoids. *Tetrahedron Letters*, 24, 177-180.
- Al-Mosawi, A.J., 2002. The challenge of chronic renal failure in the developing world: Possible use of acacia gum. *Pediatric Nephrology*, 17, 390-391.
- Ali, B.H., Ziada, A., et Blunden, G., 2009. Biological effects of gum arabic: A review of some recent research. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 1-8.
- Atkinson, R.M., Bedford, C., Child, K.J., et Tomich, E.G., 1962. Effect of particle size on blood griseofulvin-levels in man [5]. *Nature*, 193, 588-589.
- Bos, R., van der Mei, H.C., et Busscher, H.J., 1998. 'Soft-particle' analysis of the electrophoretic mobility of a fibrillated and non-fibrillated oral streptococcal strain: *Streptococcus salivarius*. *Biophysical Chemistry*, 74, 251-255.
- Burgess, D.J., et Carless, J.E., 1984. Microelectrophoretic studies of gelatin and Acacia for the prediction of complex coacervation. *Journal of Colloid and Interface Science*, 98, 1-8.
- Burgess, D.J., 1994. Complex coacervation : Microcapsule formation, p. 281-300, dans: P. L. Dubin, J. Bock, R. Davis, D. N. Schulz and C. Thies, Eds., *Macromolecular complexes in chemistry and Biology* Springer Verlag: Berlin.
- Chan, E.W.C., Lim, Y.Y., et Chew, Y.L., 2007. Antioxidant activity of *Camellia sinensis* leaves and tea from a lowland plantation in Malaysia. *Food Chemistry*, 102, 1214-1222.
- Chandraprabha, M.N., Natarajan, K.A., et Modak, J.M. 2007. Effect of LPS removal on electrophoretic softness of *Acidithiobacillus ferrooxidans* cells, pp. 341-344 *Biohydrometallurgy: From the Single Cell to the Environment*, IBS 2007, Vol. 20-21.
- Chandraprabha, M.N., Modak, J.M., et Natarajan, K.A., 2009. Soft-particle model analysis of effect of LPS on electrophoretic softness of *Acidithiobacillus ferrooxidans* grown in presence of different metal ions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 69, 1-7.
- Chansiri, G., Lyons, R.T., Patel, M.V., et Hem, S.L., 1999. Effect of surface charge on the stability of oil/water emulsions during steam sterilization. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 88, 454-458.

- Comalada, M., Camuesco, D., Sierra, S., Ballester, I., Xaus, J., Galvez, J., et Zarzuelo, A., 2005. In vivo quercitrin anti-inflammatory effect involves release of quercetin, which inhibits inflammation through down-regulation of the NF- κ B pathway. *European Journal of Immunology*, 35, 584-592.
- Connolly, S., Fenyo, J.C., et Vandeveld, M.C., 1988. Effect of a proteinase on the macromolecular distribution of Acacia senegal gum. *Carbohydrate Polymers*, 8, 23-32.
- Desai, M.P., Labhasetwar, V., Amidon, G.L., et Levy, R.J., 1996. Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: Effect of particle size. *Pharmaceutical Research*, 13, 1838-1845.
- Desai, M.P., Labhasetwar, V., Walter, E., Levy, R.J., et Amidon, G.L., 1997. The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco-2 cells is size dependent. *Pharmaceutical Research*, 14, 1568-1573.
- Di Mambro, V.M., Azzolini, A.E.C.S., Valim, Y.M.L., et Fonseca, M.J.V., 2003. Comparison of antioxidant activities of tocopherols alone and in pharmaceutical formulations. *International Journal of Pharmaceutics*, 262, 93-99.
- Dickinson, E., 1992. p. 85-125, dans: E. Dickinson, (Ed.), *Introduction to Food Colloids and Polymers: Stability and Mechanical Properties*, Oxford Science Publication: Oxford, GB.
- Ducel, V., Saulnier, P., Richard, J., et Boury, F., 2005. Plant protein-polysaccharide interactions in solutions: application of soft particle analysis and light scattering measurements. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 41, 95-102.
- Dukhin, S.S., Zimmermann, R., et Werner, C., 2007. Electrophoresis of soft particles at high electrolyte concentrations: An interpretation by the Henry theory. *Journal of Colloid and Interface Science*, 313, 676-679.
- Duval, J.F.L., Busscher, H.J., Van De Belt-Gritter, B., Van Der Mei, H.C., et Norde, W., 2005. Analysis of the interfacial properties of fibrillated and nonfibrillated oral streptococcal strains from electrophoretic mobility and titration measurements: Evidence for the shortcomings of the 'classical soft-particle approach'. *Langmuir*, 21, 11268-11282.
- Erden Inal, M., et Kahraman, A., 2000. The protective effect of flavonol quercetin against ultraviolet a induced oxidative stress in rats. *Toxicology*, 154, 21-29.
- Fincher, G.B., Stone, B.A., et Clarke, A.E., 1983. Arabinogalactan-proteins: structure, biosynthesis and function. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 34, 47-70.

- Formica, J.V., 1995. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food and Chemical Toxicology*, 33, 1061-1080.
- Frijlink, H.W., Eissens, A.C., Hefting, N.R., Poelstra, K., Lerk, C.F., et Meijer, D.K.F., 1991. The effect of parenterally administered cyclodextrins on cholesterol levels in the rat. *Pharmaceutical Research*, 8, 9-16.
- Gils, P.S., Ray, D., et Sahoo, P.K., 2010. Designing of silver nanoparticles in gum arabic based semi-IPN hydrogel. *International Journal of Biological Macromolecules*, 46, 237-244.
- Halliwell, B., et Gutteridge, J.M.C., 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods in Enzymology*, 186, 1-85.
- Henry, D.C., 1931. *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical & Engineering Sciences*, 133, 106.
- Hu, L., Tang, X., et Cui, F., 2004. Solid lipid nanoparticles (SLNs) to improve oral bioavailability of poorly soluble drugs. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 56, 1527-1535.
- Hunter, R.J., 1986. Transport properties of suspensions. Dans Hunter, R.J. (Eds), p. 449-536, *Foundations of Colloid Science*.
- Jacobs, C., Kayser, O., et Müller, R.H., 2000. Nanosuspensions as a new approach for the formulation for the poorly soluble drug tarazepide. *International Journal of Pharmaceutics*, 196, 161-164.
- Jani, P., Halbert, G.W., Langridge, J., et Florence, A.T., 1990. Nanoparticle uptake by the rat gastrointestinal mucosa: Quantitation and particle size dependency. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 42, 821-826.
- Kaldas, M.I., Walle, U.K., Van Der Woude, H., McMillan, J.M., et Walle, T., 2005. Covalent binding of the flavonoid quercetin to human serum albumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4194-4197.
- Kamiya, S., Nozawa, Y., Miyagishima, A., Kurita, T., Sadzuka, Y., et Sonobe, T., 2006. Physical characteristics of freeze-dried griseofulvin-lipids nanoparticles. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 54, 181-184.
- Kanadaswami, C., Lee, L.T., Lee, P.P.H., Hwang, J.J., Ke, F.C., Huang, Y.T., et Lee, M.T., 2005. The antitumor activities of flavonoids. *In Vivo*, 19, 895-910.
- Kiers, P.J.M., Bos, R., van der Mei, H.C., et Busscher, H.J., 2001. The electrophoretic softness of the surface of *Staphylococcus epidermidis* cells grown in a liquid medium and on a solid agar. *Microbiology*, 147, 757-762.

- Kim, H.N., Hong, Y., Lee, I., Bradford, S.A., et Walker, S.L., 2009. Surface characteristics and adhesion behavior of *Escherichia coli* O157:H7: Role of extracellular macromolecules. *Biomacromolecules*, 10, 2556-2564.
- Kimura, K., Takashima, S., et Ohshima, H., 2002. Molecular approach to the surface potential estimate of thiolate-modified gold nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry B*, 106, 7260-7266.
- Kitson, T.M., Kitson, K.E., et Moore, S.A., 2001. Interaction of sheep liver cytosolic aldehyde dehydrogenase with quercetin, resveratrol and diethylstilbestrol. *Chemico-Biological Interactions*, 130-132, 57-69.
- Kroll, R.A., Pagel, M.A., Muldoon, L.L., Roman-Goldstein, S., Fiamengo, S.A., et Neuwelt, E.A., 1998. Improving drug delivery to intracerebral tumor and surrounding brain in a rodent model: A comparison of osmotic versus bradykinin modification of the blood-brain and/or blood-tumor barriers. *Neurosurgery*, 43, 879-885.
- Kuo, Y.C., et Lin, S.C., 2008. Effect of glutamate on the electrical properties of cationic solid lipid nanoparticles containing stearylamine and dioctadecyldimethyl ammonium bromide. *Journal of Physical Chemistry B*, 112, 4454-4460.
- Labhasetwar, V., 1997. Nanoparticles for drug delivery. *Pharm. News* 4, 28-31.
- Lander, R., Manger, W., Scouloudis, M., Ku, A., Davis, C., et Lee, A., 2000. Gaulin homogenization: A mechanistic study. *Biotechnology Progress*, 16, 80-85.
- Lee, E.S., Lee, H.E., Shin, J.Y., Yoon, S., et Moon, J.O., 2003. The flavonoid quercetin inhibits dimethylnitrosamine-induced liver damage in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 55, 1169-1174.
- Lim, Y.Y., et Murtijaya, J., 2007. Antioxidant properties of *Phyllanthus amarus* extracts as affected by different drying methods. *LWT - Food Science and Technology*, 40, 1664-1669.
- Lin, H.Y., et Chou, C.C., 2004. Antioxidative activities of water-soluble disaccharide chitosan derivatives. *Food Research International*, 37, 883-889.
- López-Viota, J., Mandal, S., Delgado, A.V., Toca-Herrera, J.L., Möller, M., Zanuttin, F., Balestrino, M., et Krol, S., 2009. Electrophoretic characterization of gold nanoparticles functionalized with human serum albumin (HSA) and creatine. *Journal of Colloid and Interface Science*, 332, 215-223.
- Makris, D.P., et Rossiter, J.T., 2000. Quercetin and Rutin (quercetin 3O-rhamnosylglucoside) Thermal Degradation in Aqueous Media Under Alkaline Conditions. *Royal Society of Chemistry: Cambridge*

- Marie, P., Perrier-Cornet, J.M., et Gervais, P., 2002. Influence of major parameters in emulsification mechanisms using a high-pressure jet. *Journal of Food Engineering*, 53, 43-51.
- Mohan, Y.M., Raju, K.M., Sambasivudu, K., Singh, S., et Sreedhar, B., 2007. Preparation of acacia-stabilized silver nanoparticles: A green approach. *Journal of Applied Polymer Science*, 106, 3375-3381.
- Morisaki, H., Nagai, S., Ohshima, H., Ikemoto, E., et Kogure, K., 1999. The effect of motility and cell-surface polymers on bacterial attachment. *Microbiology*, 145, 2797-2802.
- Mu, X., et Zhong, Z., 2006. Preparation and properties of poly(vinyl alcohol)-stabilized liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*, 318, 55-61.
- Mucalo, M.R., Bullen, C.R., Manley-Harris, M., et McIntire, T.M., 2002. Arabinogalactan from the Western larch tree: A new, purified and highly water-soluble polysaccharide-based protecting agent for maintaining precious metal nanoparticles in colloidal suspension. *Journal of Materials Science*, 37, 493-504.
- Mulholland, P.J., Ferry, D.R., Anderson, D., Hussain, S.A., Young, A.M., Cook, J.E., Hodgkin, E., Seymour, L.W., et Kerr, D.J., 2001. Pre-clinical and clinical study of QC12, a water-soluble, pro-drug of quercetin. *Annals of Oncology*, 12, 245-248.
- Murata, C., Tabuchi, H., et Morisaki, H. 2005. A new method to analyze particle surface properties by using electrophoresis under different electric potential, pp. 3561 *Polymer Preprints, Japan*, Vol. 54, 2 ed.
- Ohshima, H., et Kondo, T., 1987. Electrophoretic mobility and Donnan potential of a large colloidal particle with a surface charge layer. *Journal of Colloid and Interface Science*, 116, 305-311.
- Ohshima, H., 1995. Electrophoretic mobility of soft particles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 103, 249-255.
- Ohshima, H., 1998. *Electrical Phenomena at Interfaces*, second ed., Marcel Dekker, New York.
- Ohshima, H., 2007. Electrokinetics of soft particles. *Colloid and Polymer Science*, 285, 1411-1421.
- Ohshima, H., 2008. Electrostatic interaction between soft particles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 328, 3-9.
- Panyam, J., et Labhasetwar, V., 2003. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55, 329-347.

- Peters, K., Muller, R.H., et Craig, D.Q.M., 1999. An investigation into the distribution of lecithins in nanosuspension systems using low frequency dielectric spectroscopy. *International Journal of Pharmaceutics*, 184, 53-61.
- Phenrat, T., Liu, Y., Kim, H.J., Saleh, N.B., Sirk, K., Tilton, R.D., et Glowry, L. 2007. Effect of adsorbed polyelectrolytes on TCE dechlorination and product distribution by Fe(0)/Fe-oxide nanoparticles ACS National Meeting Book of Abstracts.
- Picton, L., Bataille, I., et Muller, G., 2000. Analysis of a complex polysaccharide (Arabic gum) by multi-angle laser light scattering coupled on-line to size exclusion chromatography and flow field flow fractionation. *Carbohydrate Polymers*, 42, 23-31.
- Pralhad, T., et Rajendrakumar, K., 2004. Study of freeze-dried quercetin-cyclodextrin binary systems by DSC, FT-IR, X-ray diffraction and SEM analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 34, 333-339.
- Qi, W., Fong, C., et Lamport, D.T.A., 1991. Gum arabic glycoprotein is a twisted hairy rope : A new model based on *o*-galactosylhydroxyproline as the polysaccharide attachment site. *Plant Physiology*, 96, 848-855.
- Randall, R.C., Phillips, G.O., et Williams, P.A., 1988. The role of the proteinaceous component on the emulsifying properties of gum arabic. *Food Hydrocolloids*, 2, 131-140.
- Randall, R.C., Phillips, G.O., et Williams, P.A., 1989. Fractionation and characterization of gum from *Acacia senegal*. *Food Hydrocolloids*, 3, 65-75.
- Renard, D., Lavenant-Gourgeon, L., Ralet, M.C., et Sanchez, C., 2006. Acacia senegal Gum: Continuum of Molecular Species Differing by Their Protein to Sugar Ratio, Molecular Weight, and Charges. *Biomacromolecules*, 7, 2637-2649.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., et Paganga, G., 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20, 933-956.
- Rotureau, E., Thomas, F., et Duval, J.F.L., 2007. Relationship between swelling and the electrohydrodynamic properties of functionalized carboxymethyldextran macromolecules. *Langmuir*, 23, 8460-8473.
- Sanchez, C., Renard, D., Robert, P., Schmitt, C., et Lefebvre, J., 2002. Structure and rheological properties of acacia gum dispersions. *Food Hydrocolloids*, 16, 257-267.
- Sanchez, C., Schmitt, C., Kolodziejczyk, E., Lapp, A., Gaillard, C., et Renard, D., 2008. The Acacia Gum Arabinogalactan Fraction Is a Thin Oblate Ellipsoid: A New Model

- Based on Small-Angle Neutron Scattering and Ab Initio Calculation. *Biophysical Journal*, 94, 629-639.
- Schaab, M.R., Barney, B.M., et Francisco, W.A., 2006. Kinetic and spectroscopic studies on the quercetin 2,3-dioxygenase from *Bacillus subtilis*. *Biochemistry*, 45, 1009-1016.
- Schmitt, C., Sanchez, C., Thomas, F., et Hardy, J., 1999. Complex coacervation between [beta]-lactoglobulin and acacia gum in aqueous medium. *Food Hydrocolloids*, 13, 483-496.
- Street, C.A., et Anderson, D.M.W., 1983. Refinement of structures previously proposed for gum arabic and other acacia gum exudates. *Talanta*, 30, 887-893.
- Tolstoguzov, V., 2003. Some thermodynamic considerations in food formulation. *Food Hydrocolloids*, 17, 1-23.
- Tsuneda, S., Jung, J., Hayashi, H., Aikawa, H., Hirata, A., et Sasaki, H., 2003. Influence of extracellular polymers on electrokinetic properties of heterotrophic bacterial cells examined by soft particle electrophoresis theory. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 29, 181-188.
- Tsuneda, S., Aikawa, H., Hayashi, H., et Hirata, A., 2004. Significance of cell electrokinetic properties determined by soft-particle analysis in bacterial adhesion onto a solid surface. *Journal of Colloid and Interface Science*, 279, 410-417.
- Vimala, K., Samba Sivudu, K., Murali Mohan, Y., Sreedhar, B., et Mohana Raju, K., 2009. Controlled silver nanoparticles synthesis in semi-hydrogel networks of poly(acrylamide) and carbohydrates: A rational methodology for antibacterial application. *Carbohydrate Polymers*, 75, 463-471.
- Williams, P.A., Phillips, G.O., et Randall, R.C., 1990. Structure-function relationships of gum arabic, p. 25-36, dans: G. O. Phillips, D. J. Wedlock and P. A. Williams, Eds., *Gum and stabilisers for food industry*, IRL Press: Oxford.
- Windrum, P., Morris, T.C.M., Drake, M.B., Niederwieser, D., et Ruutu, T., 2005. Variation in dimethyl sulfoxide use in stem cell transplantation: A survey of EBMT centres. *Bone Marrow Transplantation*, 36, 601-603.
- Wu, T.-H., Yen, F.-L., Lin, L.-T., Tsai, T.-R., Lin, C.-C., et Cham, T.-M., 2008. Preparation, physicochemical characterization, and antioxidant effects of quercetin nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 346, 160-168.
- Yamaguchi, T., Takamura, H., Matoba, T., et Terao, J., 1998. HPLC Method for Evaluation of the Free Radical-scavenging Activity of Foods by Using 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 62, 1201-1204.

- Yuan, Z.P., Chen, L.J., Fan, L.Y., Tang, M.H., Yang, G.L., Yang, H.S., Du, X.B., Wang, G.Q., Yao, W.X., Zhao, Q.M., Ye, B., Wang, R., Diao, P., Zhang, W., Wu, H.B., Zhao, X., et Wei, Y.Q., 2006. Liposomal quercetin efficiently suppresses growth of solid tumors in murine models. *Clinical Cancer Research*, 12, 3193-3199.
- Zauner, W., Farrow, N.A., et Haines, A.M.R., 2001. *In vitro* uptake of polystyrene microspheres: effect of particle size, cell line and cell density. *Journal of Controlled Release*, 71, 39-51.
- Zhang, L., et Kosaraju, S.L., 2007. Biopolymeric delivery system for controlled release of polyphenolic antioxidants. *European Polymer Journal*, 43, 2956-2966.
- Zheng, Y., Haworth, I.S., Zuo, Z., Chow, M.S.S., et Chow, A.H.L., 2005. Physicochemical and structural characterization of quercetin- β - cyclodextrin complexes. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 94, 1079-1089.

Chapitre 3 : Caractérisation thermodynamique des complexes gomme Acacia/ β -lactoglobuline et gomme Acacia-quercétine/ β -lactoglobuline

1. Introduction

Une partie de ce travail ayant fait l'objet d'une publication, certains éléments déjà cités dans la partie bibliographique (chapitre I) ont été repris (Aberkane *et al.*, 2010).

Après avoir caractérisé les nanoparticules de gomme d'Acacia-quercétine (GAQ), les paramètres thermodynamiques d'interaction avec la β -lactoglobuline (BLG) ont été déterminés à pH 4,2 et 25 °C. La complexation entre protéines et polysaccharides de charge opposée, et plus généralement entre des macromolécules de charge opposée, est un phénomène colloïdal omniprésent impliqué dans la structuration de nombreux systèmes biologiques (Turgeon *et al.*, 2007 ; Schmitt *et al.*, 2009).

Les protéines et les polysaccharides de charge opposée interagissent principalement par le biais d'interactions électrostatiques ce qui induit la formation de différentes entités supramoléculaires (des complexes, des complexes agrégés et des coacervats). La structure et la solubilité de ces entités supramoléculaires dépendent d'un certain nombre de paramètres, notamment la flexibilité, la densité de charge des biopolymères, la qualité du solvant, la force ionique, le ratio molaire protéine : polysaccharide et la concentration totale en biopolymères (Bungenburg de Jong, 1949 ; Burgess, 1994 ; Schmitt *et al.*, 1998 ; Doublier *et al.*, 2000 ; de Kruif et Tuinier, 2001 ; Turgeon *et al.*, 2003 ; de Kruif *et al.*, 2004 ; Cooper *et al.*, 2005 ; McClements, 2006 ; Turgeon *et al.*, 2007). Fait intéressant, les propriétés fonctionnelles originales de ces différentes entités peuvent être utilisées tant dans le domaine alimentaire que

dans des applications non alimentaires (Dickinson, 2006 ; Turgeon *et al.*, 2007 ; Schmitt *et al.*, 2009).

Malgré d'importants progrès, la compréhension des multiples facettes de la complexation entre protéines et polysaccharides demeure un défi expérimental et théorique. Une meilleure compréhension des mécanismes thermodynamiques à l'origine des processus de formation et de stabilisation des assemblages macromoléculaires fait partie des problématiques les plus importantes à résoudre.

La diminution de l'énergie libre totale électrostatique du mélange est la force motrice conduisant à la formation de complexes protéines-polysaccharides (Tolstoguzov, 1997 ; de Vries et Cohen Stuart, 2006). La diminution globale de l'énergie libre résulte principalement d'une contribution enthalpique favorable découlant d'interactions électrostatiques et éventuellement non-coulombiennes entre les biopolymères, et d'une contribution entropique favorable résultant de la libération de contre-ions, (de Vries et Cohen Stuart, 2006) et de molécules d'eau (Jelesarov et Bosshard, 1999). Ces contributions favorables sont contrebalancées par une perte défavorable de l'entropie configurationnelle des macromolécules (Leavitt et Freire, 2001) et par l'organisation de l'eau à l'interface (Jelesarov et Bosshard, 1999) ainsi qu'à une enthalpie défavorable, dû à la désolvatation de groupes polaires (Freire, 2004). Néanmoins, le gain important d'entropie dû à la libération des contre-ions est considéré comme la principale force motrice dans la formation de complexes protéines-polysaccharides. Cette hypothèse s'appuie sur une suppression de la formation de complexes au delà d'une force ionique critique. Dans ce cas, le gain entropique résultant de la libération de contre-ions s'annule parce que leur concentration devient plus ou moins

équivalente dans le solvant, et au voisinage des biopolymères, (Bungenburg de Jong, 1949 ; Burgess et Carless, 1985 ; Seyrek *et al.*, 2003 ; Weinbreck *et al.*, 2003).

Alors que des réactions endothermiques ont été effectivement enregistrées par calorimétrie pour un certain nombre de systèmes comprenant des protéines et des polyélectrolytes (Ball *et al.*, 2002 ; Feng *et al.*, 2007), indiquant que la complexation est induite par un gain d'entropie, des réactions exothermiques ont été enregistrées sur l'ensemble des systèmes protéines-polysaccharides étudiés dans la littérature (Girard *et al.*, 2003b ; Ziegler et Seelig, 2004 ; Gonçalves *et al.*, 2005 ; Schmitt *et al.*, 2005 ; Harnsilawat *et al.*, 2006 ; Chung *et al.*, 2007 ; Zhu *et al.*, 2007), indiquant que la complexation est contrôlée par l'enthalpie.

Le système β -lactoglobuline (BLG) / gomme d'Acacia (GA) / eau a été caractérisé en détail dans le passé par différentes équipes de recherche (Schmitt *et al.*, 1999 ; Schmitt *et al.*, 2000 ; Schmitt *et al.*, 2001 ; Sanchez *et al.*, 2002 ; Weinbreck *et al.*, 2003 ; Weinbreck *et al.*, 2004a ; Weinbreck *et al.*, 2004b ; Mekhloufi *et al.*, 2005 ; Sanchez *et al.*, 2006), mais jamais d'un point de vue thermodynamique. Les paramètres thermodynamique d'interaction entre BLG et GA ont été déterminés par calorimétrie de titration isotherme (ITC).

2. Description de la calorimétrie de titration isotherme (ITC)

La calorimétrie de titration isotherme (ITC) est une technique permettant l'étude d'interactions de toutes sortes. Elle se base sur le fait que toute interaction libère ou absorbe une certaine quantité d'énergie. L'ITC permet de déterminer, dans une seule expérience et de façon simultanée, les paramètres thermodynamiques régissant l'interaction entre deux molécules tels que la constante d'association (K_a), l'enthalpie (ΔH), l'entropie (ΔS), l'énergie libre (ΔG) et la stœchiométrie de l'interaction (N).

Les principales composantes d'un appareil ITC sont illustrées sur la Figure 3.1. Ces composantes sont une cellule de référence, une cellule de réaction et une seringue d'injection.

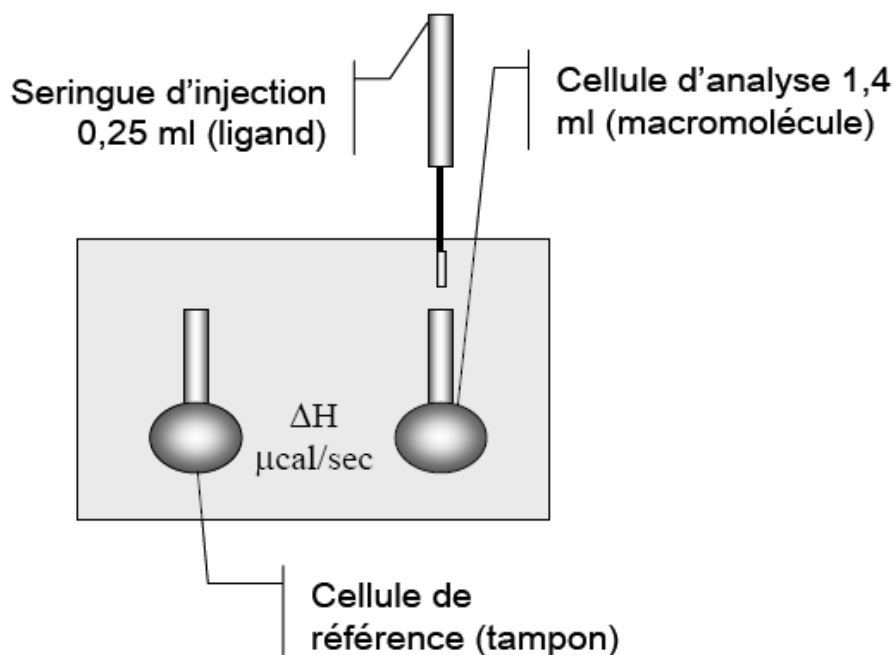


Figure 3.1 : Représentation schématique d'un calorimètre de titration isotherme.

L'ITC est utilisée pour étudier l'interaction entre différents types de molécules telles que les interactions anticorps : antigène, protéine : lipide, protéine : récepteur, protéine : ligand, protéine : glucide, protéine : acide nucléique, protéine : protéine, protéine : polysaccharide, de même qu'à l'étude de l'incorporation de petites molécules dans la membrane de vésicules et d'autres systèmes (Baker et Murphy, 1997 ; Charoenchaitrakool *et al.*, 2000 ; Girard *et al.*, 2003b ; Girard *et al.*, 2003a ; Antonov et Wolf, 2005 ; Barbosa *et al.*, 2005 ; Schmitt *et al.*, 2005 ; Guzey et McClements, 2006 ; Harnsilawat *et al.*, 2006 ; Brockhaus *et al.*, 2007 ; Cheema *et al.*, 2007 ; Andrushchenko *et al.*, 2008 ; Bordbar *et al.*, 2008 ; Olsson *et al.*, 2008). Cette technique a également été utilisée pour suivre le

changement d'enthalpie causé par la dissociation de micelles formées de surfactants ioniques. Pour ce type d'étude, l'ITC permet en outre de déterminer la concentration micellaire critique (CMC) (McClements, 2000 ; Kelley et McClements, 2003).

2.1. Principe de fonctionnement

L'appareil se compose d'une seringue d'injection motorisée dans laquelle est chargé le ligand (L) et de deux cellules disposées dans une enceinte adiabatique permettant d'abolir tout échange thermique avec l'environnement extérieur (Figure 3.1). La cellule de réaction contient habituellement la macromolécule (M) étudiée, solubilisée dans un tampon, alors que la cellule de référence contient uniquement le tampon utilisé pour solubiliser la macromolécule. Après avoir équilibré le système à la température de l'étude, le ligand est injecté dans la cellule d'analyse par petites injections successives. La seringue d'injection est munie d'une pale qui permet une agitation dans la cellule d'analyse.

A chaque injection, la différence d'énergie entre la cellule de référence et la cellule de réaction est enregistrée, puis rapportée sur un thermogramme (Figure 3.2A). L'intégration de la surface de chacun des pics permet alors de tracer une isotherme de liaison, laquelle représente la variation d'enthalpie en fonction du ratio molaire des molécules en interaction (Figure 3.2B).

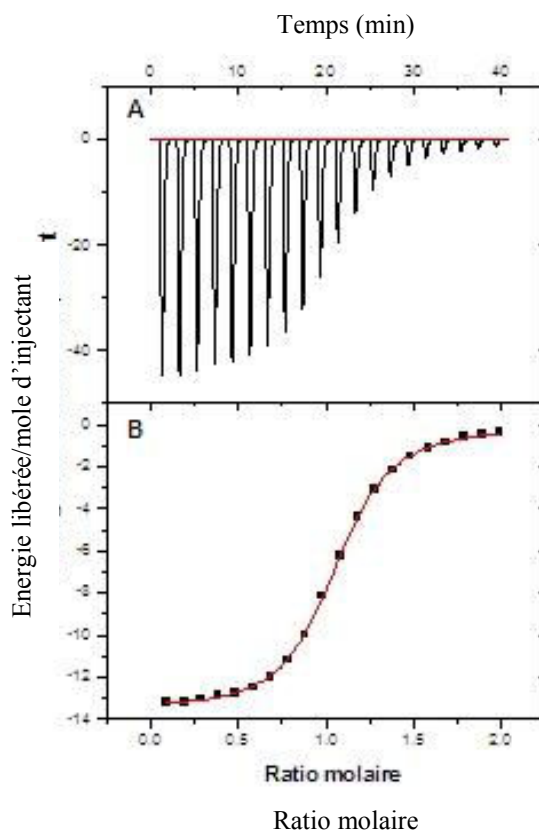


Figure 3.2 : Exemple d'un thermogramme (A) et d'une isotherme de liaison (B) obtenus par calorimétrie de titration isotherme.

L'analyse de l'isotherme de liaison à l'aide du logiciel accompagnant l'appareil permet de déterminer le modèle de sites de liaison le plus approprié et de calculer les paramètres thermodynamiques de l'interaction.

3. Présentation de la β -lactoglobuline

La β -lactoglobuline est la protéine majeure du lactosérum. En effet, elle représente environ 50 % de la matière protéique contenue dans ce dernier. La concentration moyenne de cette protéine dans le lait de vache varie de 2 à 4 g.l⁻¹. Elle a fait l'objet de très nombreuses études depuis sa découverte par Palmer en 1934 afin de déterminer sa structure, son rôle biologique ainsi que ses propriétés physico-chimiques (Mc Kenzie, 1971 ; Sawyer et Kontopidis, 2000 ; Sawyer *et al.*, 2002). Petite protéine globulaire appartenant à la famille des

lipocalines, elle provient du lactosérum du lait des ruminants et d'autres espèces monogastriques (truie, jument, chienne, ânesse), néanmoins elle est absente des laits humains et des rongeurs (Hambling, 1992). Elle est largement utilisée en industrie alimentaire en raison de ses propriétés gélifiantes, moussantes et émulsifiantes. Différents variants génétiques de la β -lactoglobuline bovine ont été identifiés (7 au total). Les plus couramment rencontrés dans le lait de vache sont les variants A et B, qui se trouvent en proportions égales (Kinsella, 1984 ; Wong *et al.*, 1996). Chaque variant contient 162 résidus d'acides aminés mais diffère par la substitution de certains résidus. Le variant génétique A (Figure 3.3) diffère du B par la substitution de deux résidus : le résidu valine 118 par le résidu alanine et l'acide aspartique en position 64 par le résidu glycine (Whitney, 1977).

La β -lactoglobuline est formée d'une seule chaîne polypeptidique possédant un poids moléculaire de $18\,400\text{ g.mole}^{-1}$. Elle contient deux ponts disulfures entre les résidus Cys₁₁₆ et Cys₁₁₉, Cys₁₀₆ et Cys₁₂₁ ou Cys₆₆ et Cys₁₆₀. Un groupement thiol libre (-SH) est positionné sur le résidu Cys₁₁₉ ou Cys₁₂₁ selon l'apparition du résidu Cys₁₂₁ dans la structure (s'il est caché, il ne participe pas au pont disulfure) (Sawyer et Kontopidis, 2000 ; Uhrinova *et al.*, 2000). Le premier pont disulfure maintient la structure tertiaire tandis que le second se situe à la surface extérieure de la molécule. Ses structures secondaires et tertiaires sont bien définies (Creamer *et al.*, 1983 ; Sawyer *et al.*, 1998).

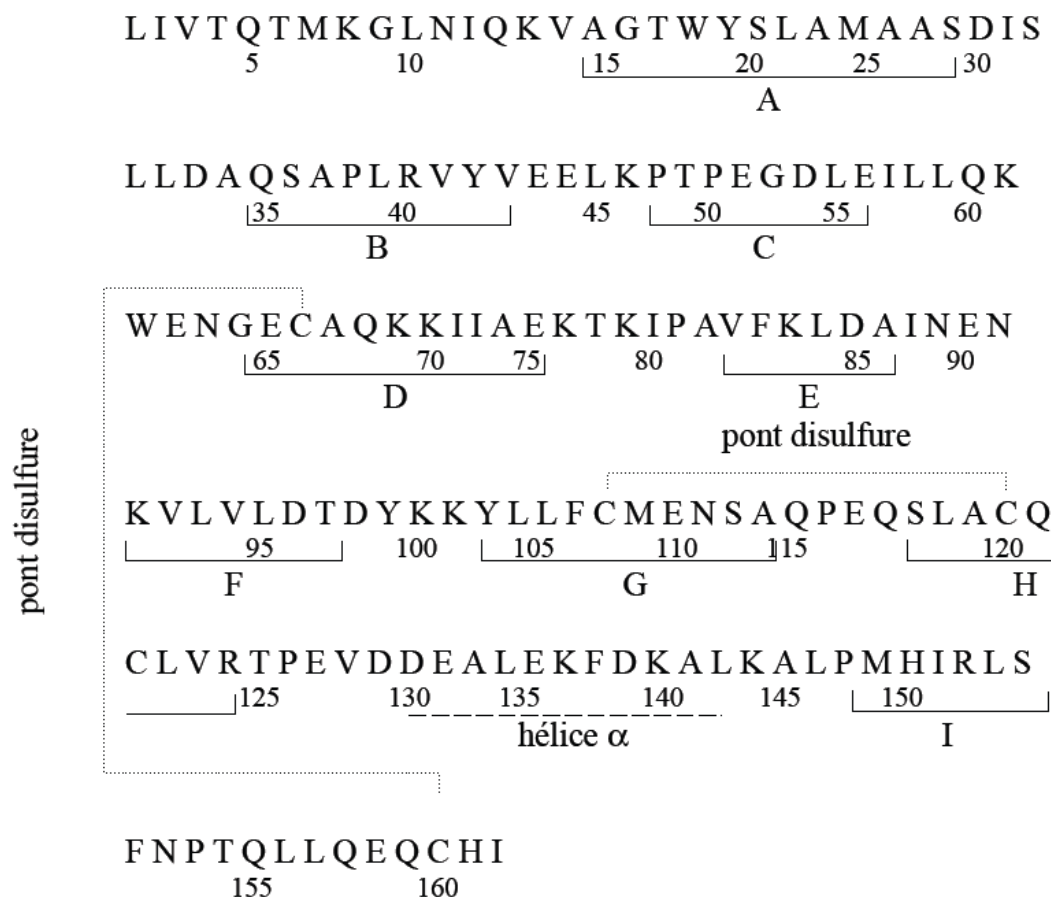


Figure 3.3 : Structure primaire et secondaire du monomère de β -lg A. ——— feuillet β , - - - - - hélices α , pont disulfure (d'après Molinari *et al.*, 1996).

La structure tridimensionnelle de la β -lactoglobuline, mise en évidence par une étude cristallographique aux rayons X à haute résolution a permis de montrer que la molécule contient 51,8 % de feuillets β antiparallèles, 6,8 % d'hélices α , 6,9 % de coudes β et 32,5 % de structures désordonnées (Papiz *et al.*, 1986 ; Molinari *et al.*, 1996). La β -lactoglobuline possède un calice intérieur hydrophobe formé par l'enroulement de huit brins de feuillets β antiparallèles. Cette forme est caractéristique des protéines de la famille des lipocalines (Flower *et al.*, 1993) et confère à la β -lactoglobuline la capacité de transporter de petites molécules hydrophobes comme le rétinol, les acides gras du lait ou encore les vitamines A et D₂ et le dodécylsulfate de sodium (Pérez et Calvo, 1995 ; Flower, 1996 ; Guichard et Langourieux, 2000 ; Yang *et al.*, 2002).

Les six brins, E, F, G, H, A et I sont encadrés sur le côté par une hélice α à trois tours (résidus 130-140) (Figure 3.4). Le brin I est impliqué dans la formation du dimère par des interactions antiparallèles avec le brin homologue du monomère voisin. L'interface entre les monomères implique également des interactions hydrophobes.

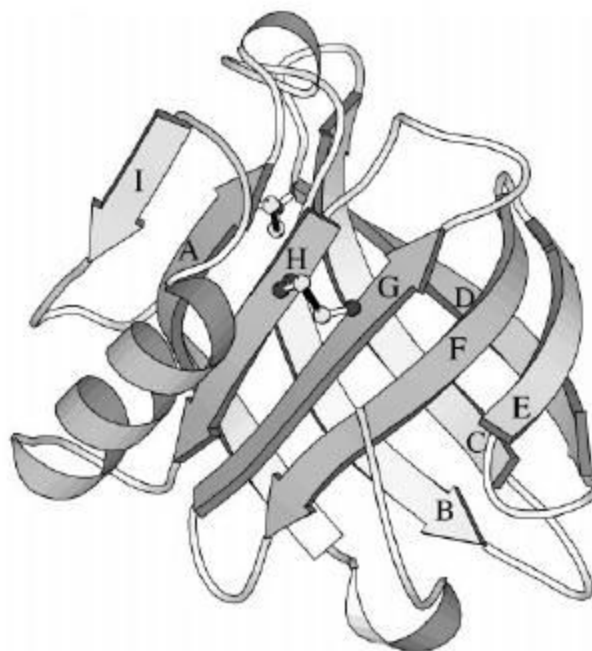


Figure 3.4 : Représentation schématique de la structure tridimensionnelle d'un monomère de β -lactoglobuline, avec les feuillets β (flèche de A à I), hélice α (rubans épais), structures désordonnées (rubans fins) et les deux ponts disulfures (représentation moléculaire), obtenue par le programme MOLSCRIPT (Kraulis, 1991 ; Kobayashi *et al.*, 2000).

La β -lactoglobuline adopte une forme monomérique, dimérique ou oligomérique en fonction du pH, de la force ionique et/ou de la concentration en la protéine. La structure quaternaire de la protéine est maintenue par des forces électrostatiques. A température ambiante et à pH physiologique, la β -lactoglobuline existe essentiellement sous forme de dimère mais peut se dissocier en monomères à des températures supérieures à 20 °C (pour une concentration en protéine de $1,5 \cdot 10^{-3}$ g.ml⁻¹, une valeur de pH égale à 7 et à une force ionique de 0,1 M) (Aymard *et al.*, 1996). Pour des températures supérieures à 70 °C, cette dissociation est suivie

rapidement d'une agrégation irréversible. En dessous d'un pH de 3,5, les forces électriques de répulsion sont importantes et provoquent une dissociation réversible des dimères en monomères (Timasheff et Townend, 1961). La conformation de la molécule est peu modifiée. Entre pH 3,5 et 5,1, une tétramérisation très rapide et réversible des dimères des deux variants génétiques A et B en octamères est possible à basse température, lorsque la concentration en protéine est supérieure à 15 g.l^{-1} . Aux valeurs proches du point isoélectrique (pH 5,1 – 5,2) et à 20°C , la β -lactoglobuline existe sous la forme d'un dimère stable. Entre le pH 5,1 et le pH 6,5, la forme dimérique domine puis commence à se dissocier à pH 6,5. A partir de cette valeur de pH, la dissociation s'accompagne de changements de conformation réversibles décrits pour la première fois par Tanford *et al.*, (1959). Ce phénomène se traduit par un réarrangement des chaînes latérales sans toutefois provoquer un grand changement dans le déploiement de la chaîne polypeptidique. Au dessus de pH 8, la monomérisation s'accompagne d'une dénaturation irréversible conduisant à une agrégation dite alcaline.

4. Matériel et méthodes

4.1. Matériel

La β -lactoglobuline (BLG) (lot JE 003-6-922) a été fournie par Davisco Foods International Inc. (Etats-Unis). La poudre contenait (en g.100g^{-1} de poudre humide) : 93,6 % de protéines, 4,6 % d'humidité et 1,8% de cendres. La composition minérale (en g.100g^{-1} de poudre) était : Mg^{2+} : 0,002 ; Ca^{2+} : 0,025 ; Na^+ : 0,90 ; K^+ : 0,007 et Cl^- : 0,05.

La gomme d'Acacia (GA) (lot no. 97 J 716) a été fournie par la société CNI (Colloïdes Naturels International, Rouen, France). La poudre contenait (en g.100g^{-1} de poudre humide) : 89,4 % de polysaccharides, 7,0 % d'humidité ; 0,60 % de protéines et 3,0 % de cendres. La

composition minérale (en g.100g⁻¹ de poudre) était : Mg²⁺ : 0,20 ; Ca²⁺ : 0,61 ; Na⁺ : 0,032 et K⁺ : 0,90.

La quercétine (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavonone) a été fournie par Sigma-Aldrich (pureté ≥ 98 %).

4.2. Préparation des dispersions de β -lactoglobuline (BLG), de gomme d'Acacia (GA) et de gomme d'Acacia-quercétine (GAQ)

Des dispersions de BLG, de GA et GAQ ont été préparées par dispersion de la quantité nécessaire de poudre pour obtenir la concentration désirée en protéine et polysaccharide dans de l'eau déionisée ultrapure (résistivité : 18,2 m Ω) sous une agitation modérée pendant 2 heures à 20 $\pm$ 1°C. Le pH de la dispersion de la BLG a été ensuite ajusté à 4,70 (pH de solubilité minimale de la BLG) avec du HCl 1N et 0,1N. Les dispersions ont été ensuite stockées sans agitation pendant 18 heures à 4°C $\pm$ 1 pour permettre une bonne hydratation des biopolymères. Les dispersions ont été ensuite centrifugées à 10 000 g (rotor Eppendorf F36-6-38) pendant 30 minutes afin d'éliminer les bulles d'air, les particules insolubles ainsi que les agrégats de la BLG. La concentration de la dispersion de la BLG a été vérifiée par spectrophotométrie à 278 nm en utilisant un coefficient d'extinction molaire de 9,6 dl.cm⁻¹.g⁻¹, déterminé expérimentalement. La densité optique à 278 nm a été corrigée par la turbidité.

La concentration finale en biopolymère dans les dispersions réalisées était de 0,6 % (p/p) de BLG et de 1,8 % (p/p) de GA et GAQ.

4.3. Calorimétrie de titration isotherme (ITC)

Un calorimètre de titration isotherme (VP-ITC, Microcal Inc, Northampton, MA) a été utilisé pour déterminer les changements enthalpiques et entropiques résultant de la titration de

la BLG (0,6 % p/p) par une dispersion de GA ou de GAQ (1,8 % p / p) à 25, 35, 45 et 50 °C. Les dispersions ont été dégazées sous vide pendant 5 min. 10 µl de la dispersion de GA ou de GAQ ont été injectés de manière séquentielle dans une cellule de titration contenant initialement 1,428 ml de la dispersion de la BLG. Chaque injection a duré 20 s avec un intervalle de temps de 150 secondes entre deux injections successives. Une micro-seringue Hamilton de 250 µl assure une agitation constante du mélange à une vitesse de 260 tr.min⁻¹ afin d'assurer une homogénéisation pendant l'injection. Les chaleurs de dilution des témoins (titration de la dispersion de BLG par de l'eau déionisée et et titration de l'eau déionisée par une dispersion de GA ou de GAQ) ont été mesurées puis soustraites des données brutes. L'acquisition des données et leur analyse ont été effectuées à l'aide du logiciel Microcal Origin (v.7.0). Le modèle de « deux sites de liaison », disponible dans le logiciel, a été utilisé pour ajuster les isothermes de liaison. Les paramètres thermodynamiques, y compris la constante d'association (K_a), la variation d'enthalpie du mélange (ΔH_m) et la stœchiométrie de liaison (N) (le rapport molaire BLG/GA) ont été calculés par l'ajustement des isothermes de liaison. Pour les sites 1 et 2, nous avons :

$$K_{a1} = \frac{\Theta_1}{(1 - \Theta_1)[X]} \quad K_{a2} = \frac{\Theta_2}{(1 - \Theta_2)[X]} \quad (3.1)$$

$$X_t = [X] + M_t(n_1\Theta_1 + n_2\Theta_2) \quad (3.2)$$

K_a = constant d'association;

N = stœchiométrie;

M_t et $[M]$ sont la concentration totale de la macromolécule et la concentration en macromolécule libre dans V_o ;

V_o = volume de la cellule de titration;

X_t et $[X]$ sont la concentration totale du ligand et la concentration en ligand libre (gomme d'Acacia);

Θ = fraction des sites occupés par le ligand X.

La résolution de l'équation (3.1) pour Θ_1 et Θ_2 et leur combinaison avec l'équation (3.2) donne :

$$X_t = [X] + \frac{N_1 M_t [X] K_{a1}}{1 + [X] K_{a1}} + \frac{N_2 M_t [X] K_{a2}}{1 + [X] K_{a2}} \quad (3.3)$$

La simplification de l'équation de compensation (3.3) des fractions conduit à une équation cubique (3.4) :

$$[X]^3 + pX^2 + q[X] + r = 0 \quad (3.4)$$

ou

$$\begin{aligned} p &= \frac{1}{K_{a1}} + \frac{1}{K_{a2}} + (N_1 + N_2)M_t - X_t \\ q &= \left(\frac{N_1}{K_{a2}} + \frac{N_2}{K_{a1}} \right) M_t - \left(\frac{1}{K_{a1}} + \frac{1}{K_{a2}} \right) X_t + \frac{1}{K_{a1}K_{a2}} \\ r &= \frac{-X_t}{K_{a1}K_{a2}} \end{aligned} \quad (3.5)$$

Les équations 4 et 5 peuvent être résolues pour $[X]$ soit en forme close ou (comme dans Origin) numériquement en utilisant la méthode de Newton si les paramètres N_1 , N_2 , K_{a1} , et K_{a2} sont attribués. Θ_1 et Θ_2 peuvent alors être obtenus à partir de l'équation 3.1.

La chaleur contenue après chaque injection est égale à :

$$Q = M_t V_0 (N_1 \Theta_1 \Delta H_{m1} + N_2 \Theta_2 \Delta H_{m2}) \quad (3.6)$$

Après une correction similaire du volume déplacé, le calcul pertinent de l'effet de la chaleur pour l'injection i est :

$$\Delta Q(i) = Q(i) + \frac{dV_i}{V_0} \left[\frac{Q(i) + Q(i-1)}{2} \right] - Q(i-1) \quad (3.7)$$

qui peuvent être utilisés dans l'algorithme de Marquardt afin d'obtenir les meilleures valeurs pour les paramètres d'ajustement (ΔH_m , K_a and N).

La variation de l'énergie libre de Gibbs du mélange (ΔG_m) a été calculée en utilisant l'équation bien connue (3.8) (Pierce *et al.*, 1999) :

$$\Delta G_m = - \ln RT K_a \quad (3.8)$$

T est la température absolue exprimée en K et R la constante des gaz parfaits ($8,3144 \text{ J.mole}^{-1}.\text{K}^{-1}$).

Les variations d'entropie ont ensuite été calculées en utilisant l'équation (3.9) :

$$\Delta G_m = \Delta H_m - T\Delta S_m \quad (3.9)$$

A partir des variations d'enthalpie (ΔH_m) mesurées à des températures allant de 298 à 323 °K, la capacité calorifique (ΔC_p) a été calculée en utilisant l'équation (3.10) :

$$\Delta C_p = d(\Delta H_m) / dt \quad (3.10)$$

5. Résultats et discussion

5.1. Caractéristiques thermodynamiques d'interaction entre la GA ou la GAQ et la BLG

La calorimétrie de titration isotherme a été utilisée afin de suivre les variations d'enthalpie associées aux interactions entre la GA et la BLG ou la GAQ et la BLG de charges opposées. Les interactions électrostatiques jouent un rôle majeur dans le mécanisme de complexation entre la GA et la BLG. La grande contribution énergétique de ces interactions peut compliquer la détection d'autres forces d'interaction contribuant à la complexation. Dans ce sens, la caractérisation de chaque biopolymère avant l'étude de leurs interactions est nécessaire. Afin de connaître l'effet de certains phénomènes (dissociation-association, changements conformationnels), impliquant ces biopolymères dans des conditions spécifiques de pH et de température. Ainsi, les chaleurs de dilution correspondant à la titration de la dispersion de BLG par de l'eau et à la titration d'eau par une dispersion de GA et de GAQ ont été mesurées.

Les thermogrammes, décrivant les propriétés thermodynamiques des dispersions de BLG, GA et GAQ à pH 4,2 (pH d'interaction maximale entre la BLG et la GA déterminé par Sanchez *et al*, 2006), qui en résultent sont présentés sur la figure 3.5.

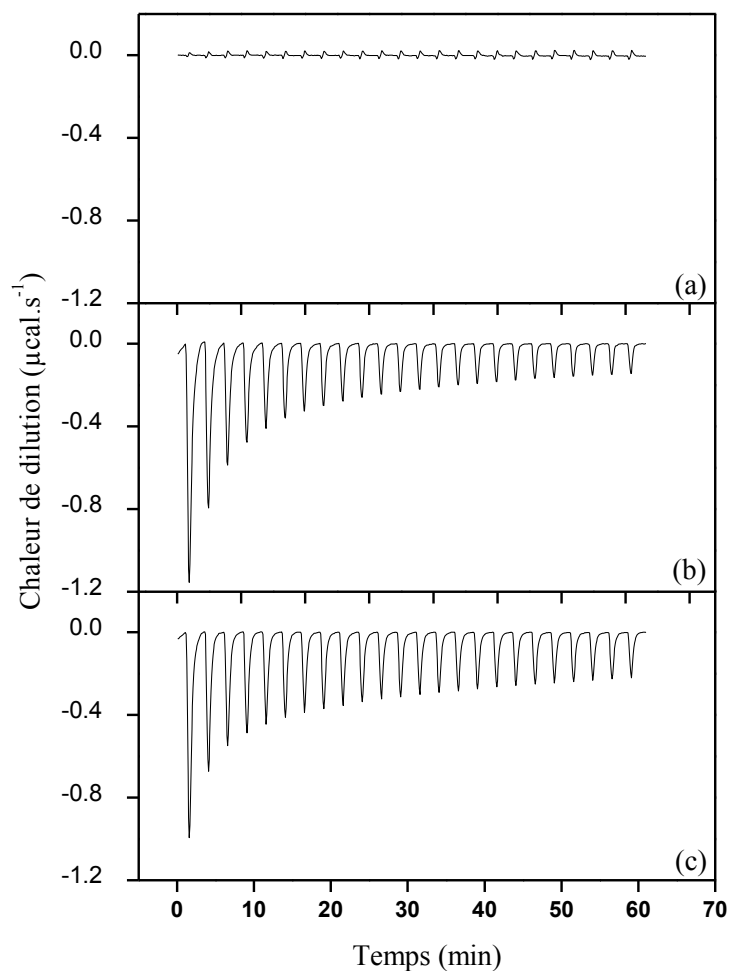


Figure 3.5 : Thermogrammes correspondant à la titration d'une dispersion de β -lactoglobuline (0,6 %, p/p) par l'eau (a), la titration de l'eau par une dispersion de gomme d'Acacia (1,8 %, p/p) (b) et la titration de l'eau par une dispersion de gomme d'Acacia-quercétine (1,8 %, p/p) (c) à pH 4,2 et à 25 °C.

Différentes caractéristiques thermodynamiques ont été observées. Les chaleurs de dilution de la GA (Figure 3.5.b) et la GAQ (Figure 3.5.c) sont similaires. Elles présentent des pics exothermiques faibles dont l'intensité diminue graduellement avec la titration. La nature exothermique des pics peut être attribuée à la désagrégation d'oligomères de GA. L'injection des dispersions de GA et de GAQ dans l'eau peut perturber la structure de la gomme et conduire à une agrégation. Cette dernière a un effet endothermique qui pourrait expliquer la diminution de l'intensité des pics (Cooper, 1999).

La chaleur de dilution, correspondant à la titration de la dispersion de la BLG par l'eau (Figure 3.5.a), présente des pics de très faible intensité en comparaison avec ceux obtenus avec la GA et la GAQ. L'addition d'eau dans la dispersion de BLG peut perturber son état d'oligomérisation et affecter l'affinité des oligomères aux molécules d'eau (Rutten *et al.*, 2002). Ce phénomène favoriserait l'agrégation des molécules de BLG et conduirait à l'apparition de pics endothermiques. L'intensité des pics enregistrés reste constante, ce qui suggère que l'ampleur de la perturbation enregistrée reste la même au bout de chaque injection. Les thermogrammes et les isothermes de liaison résultants de l'injection d'aliqotes de dispersions de GA ou de GAQ dans la dispersion de BLG à pH 4,2 et 25 °C sont présentés dans la figure 3.6. Les surfaces des pics correspondent à l'énergie libérée ou absorbée par la cellule contenant la BLG après chaque injection de GA ou de GAQ. Les courbes de titration obtenues ont la même allure dans les deux cas (GA et GAQ).

Une séquence de pics successifs, exothermiques et de forte intensité a d'abord été observée (Figure 3.6. A, C). L'énergie de liaison libérée, diminue progressivement puis s'inverse et devient endothermique au bout de 10 injections de GA (ratio molaire GA:BLG 0,0146) et de 9 injections de GAQ (ratio molaire GA:BLG 0,0131). La dernière séquence de pics d'intensité plus faible et endothermiques tend vers un état de stabilité thermodynamique à la fin des injections, tout en restant légèrement négative. À 25 °C et pH 4,2, les isothermes de liaison entre la GA ou la GAQ et la BLG sont donc caractérisées par une séquence exothermique-endothermique.

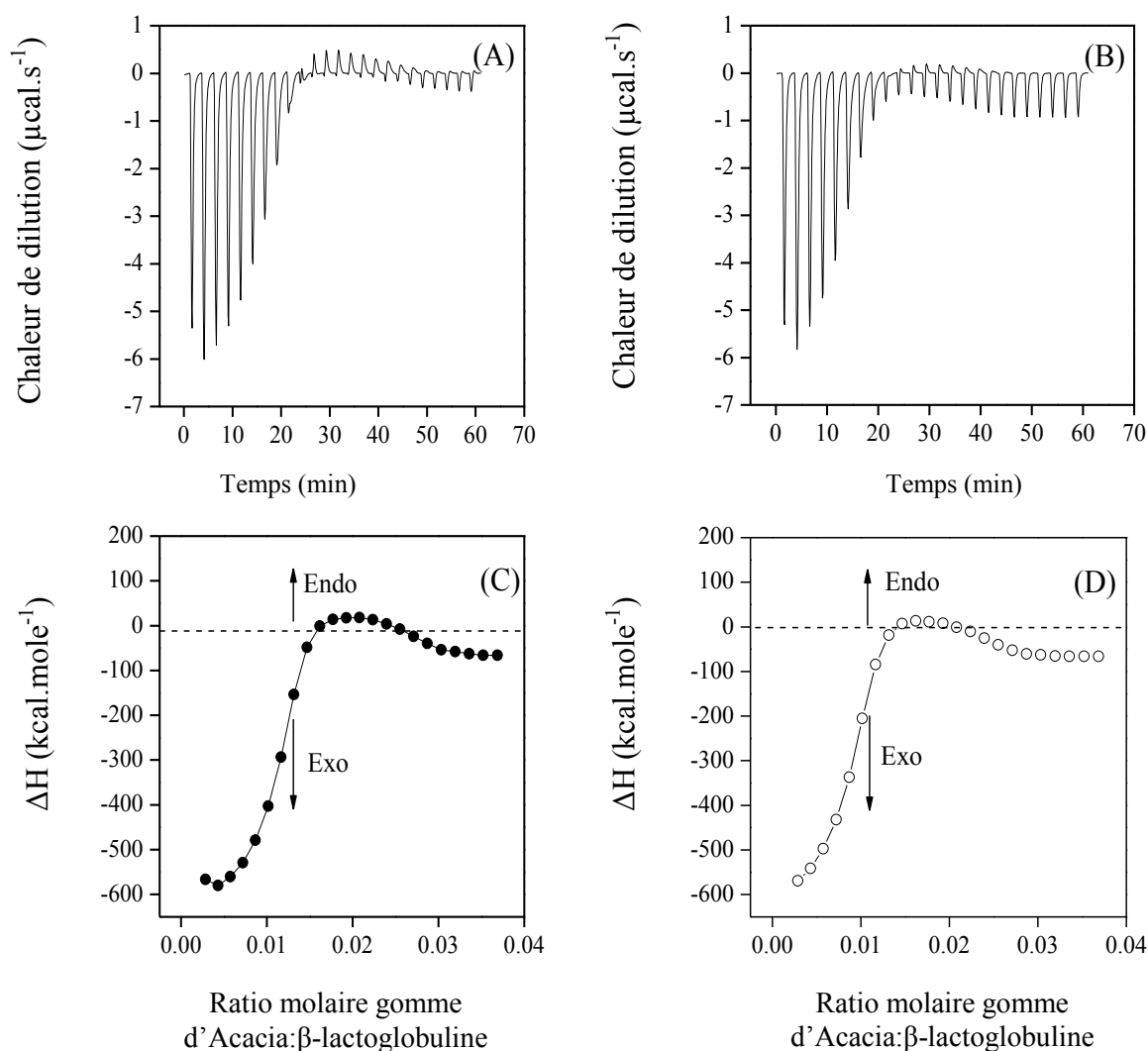


Figure 3.6 : Thermogrammes correspondant à la titration d'une dispersion de β -lactoglobuline (0,6 %, p/p) par une dispersion de gomme d'Acacia (1,8 %, p/p) (A) ou par une dispersion de gomme d'Acacia-quercétine (1,8 %, p/p) (B). Isothermes de liaison correspondant à la titration d'une dispersion de β -lactoglobuline (0,6 %, p/p) par une dispersion de gomme d'Acacia (1,8 %, p/p) (C) ou par une dispersion de gomme d'Acacia-quercétine (1,8 %, p/p) (D) à pH 4,2 et à 25 °C. Les lignes continues représentent les meilleurs ajustements théoriques.

L'apparition d'une séquence exothermique-endothérique lors d'interactions entre une protéine et un polysaccharide a été précédemment rapportée (Ziegler et Seelig, 2004 ; Schmitt *et al.*, 2005). Ces modèles de complexation sont très difficiles à interpréter, mais semblent être favorisés par l'augmentation des forces d'interaction entre les biopolymères lors du processus de titration, comme le montre la simulation dynamique de Langevin (Ou et Muthukumar, 2006). Cette hypothèse est étayée par des expériences qui ont montré que le signal endothermique est induit, au moins en partie, directement ou indirectement, par

l'agrégation ou la coacervation des complexes (Ziegler et Seelig, 2004 ; Gonçalves *et al.*, 2005).

Afin de mieux comprendre les changements thermodynamiques se produisant durant la titration, les isothermes de liaison ont été ajustés en utilisant différents modèles fournis par le logiciel « Origin MicroCal ». Les meilleurs résultats ont été obtenus avec le modèle à « deux sites de liaison ». Toutefois, l'existence de deux sites de liaison différents et indépendants n'a pas de bases physiques claires lorsqu'on traite des interactions entre deux macromolécules. Ce modèle pourrait être interprété par la présence de deux phases de structuration distinctes au cours de l'interaction entre la GA et la BLG ou la GAQ et la BLG. Il est intéressant de noter que le modèle à « deux sites de liaison » a également été appliqué pour l'étude des interactions entre BLG et pectine. Cependant, les résultats obtenus ont été exclusivement discutés en termes de modèle à « deux étapes de structuration » (Girard *et al.*, 2003b).

Les stoechiométries de liaison (N), les constantes d'association (K_a), les variations d'enthalpie (ΔH_m), d'entropie (ΔS_m) et de l'énergie libre de Gibbs (ΔG_m) obtenues sont indiqués dans le tableau 3.1 (première phase) et le tableau 3.2 (seconde phase).

Durant la première phase de structuration (Tableau 3.1), la GA et la GAQ interagissent avec une très forte affinité ($K_{a1} = (48,4 \pm 3,6) \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ pour la GA et $K_{a1} = (44,6 \pm 1,6) \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ pour la GAQ) pour la BLG. La complexation est principalement contrôlée par l'enthalpie avec des valeurs élevées de ΔH_m ($\Delta H_{m1} = -578,7 \pm 7,6 \text{ kcal.mole}^{-1}$ pour GA et $\Delta H_{m1} = -549,2 \pm 16,3 \text{ kcal.mole}^{-1}$ pour la GAQ) en raison d'une forte contribution exothermique, principalement induite par des interactions électrostatiques entre la GA ou la GAQ et la BLG.

Certains travaux suggèrent que d'autres types d'interactions tels que les liaisons hydrogène et les interactions de Van der Waals pourraient être associées aux valeurs négatives de ΔH_m et ΔS_m (Sakka *et al.*, 2003 ; Barratt *et al.*, 2005). Sur cette base, il a été suggéré que l'étape exothermique comprend, en plus des interactions électrostatiques, la contribution des liaisons hydrogène. Toutefois des contributions entropiques défavorables et de valeurs équivalentes ont été enregistrées ($T\Delta S_{m1} = -566,4 \pm 8,4$ kcal.mole⁻¹ pour la GA et $T\Delta S_{m1} = -536,6 \pm 16,8$ kcal.mole⁻¹ pour la GAQ), indiquant que l'équilibre entre les contributions enthalpiques et entropiques prévaut dans cette première phase.

Tableau 3.1 : Paramètres d'interaction correspondant à la première phase de complexation entre la gomme d'Acacia ou la gomme d'Acacia-quercétine et la β -lactoglobuline, obtenus lors de la titration d'une dispersion de β -lactoglobuline (0,6 % p/p) par une dispersion de gomme d'Acacia (1,8 % p/p) ou par une dispersion de gomme d'Acacia-quercétine (1,8 % p/p) à 25 °C et à pH 4,2. N : stoechiométrie, K_a : constante d'association, ΔH_m : variation d'enthalpie, ΔS_m : variation d'entropie et ΔG_m : variation de l'énergie libre de Gibbs.

Mélange	$N_1 \times 10^4$	$Ka_1 (M^{-1}) \times 10^7$	$\Delta H_{m1} (kcal.mole^{-1})$	$T\Delta S_{m1} (kcal.mole^{-1})$	$\Delta G_{m1} (kcal.mole^{-1})$
GA/BLG	$110,5 \pm 0,2$	$48,4 \pm 3,6$	$- 578,7 \pm 7,6$	$- 566,4 \pm 8,4$	$- 12,2 \pm 0,7$
GAQ/BLG	$87,5 \pm 0,7$	$44,9 \pm 1,6$	$- 549,2 \pm 16,3$	$- 536,6 \pm 16,8$	$- 12,5 \pm 0,5$

A partir de la stoechiométrie (N), nous avons constaté que près de 90 et 114 dimères de BLG ont respectivement interagit avec la GA et la GAQ au cours de la première étape de structuration. En effet un déplacement de l'isotherme de liaison vers des valeurs de ratio molaires GA:BLG moins élevées a été observé (Figure 3.7). Cela pourrait signifier que la GAQ possède un plus grand nombre de charges négatives en comparaison avec la GA. La GAQ requerrait ainsi un plus grand nombre de molécules de BLG afin d'être saturée. Cette différence s'expliquerait par la densité de charges négatives plus élevée observée pour la GAQ (chap. II, § 3.2) et confortant ainsi l'idée de la prédominance des interactions électrostatiques.

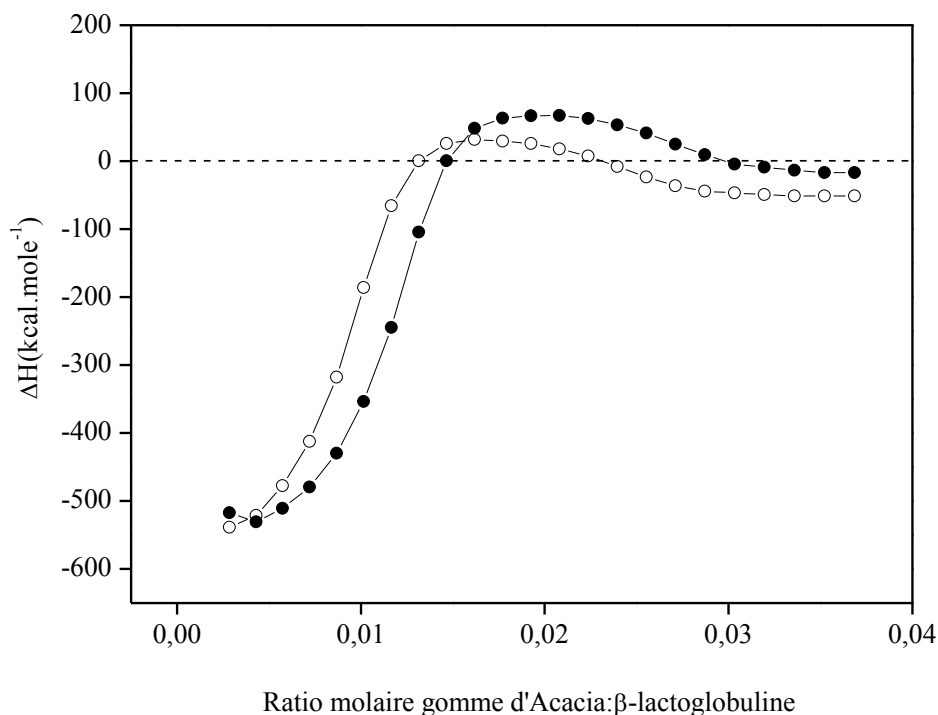


Figure 3.7 : Isothermes de liaison correspondant à la titration d'une dispersion de β -lactoglobuline (0,6 %, p/p) par une dispersion de gomme d'Acacia (1,8 %, p/p) (●) ou par une dispersion de gomme d'Acacia-quercétine (1,8 %, p/p) (○) à pH 4,2 et à 25 °C.

La seconde phase de structuration (Tableau 3.2) est caractérisée par une entropie de liaison favorable ($T\Delta S_{m2} = 158,5 \pm 4,3$ kcal.mole⁻¹ pour la GA et $T\Delta S_{m2} = 151,5 \pm 2,0$ kcal.mole⁻¹ pour la GAQ) et une enthalpie défavorable ($\Delta H_{m2} = 145,8 \pm 8,9$ kcal.mole⁻¹ pour la GA et $\Delta H_{m2} = 140,5 \pm 4,1$ kcal.mole⁻¹ pour la GAQ). Environ 80 dimères de BLG ont été impliqués dans le processus d'interaction avec la GA et la GAQ, mais avec des affinités plus faibles que celles observées lors de la première étape ($K_{a2} = (1,1 \pm 0,1) \times 10^7$ M⁻¹ pour la GA et $K_{a2} = (1,1 \pm 0,1) \times 10^7$ M⁻¹ pour la GAQ).

Tableau 3.2 : Paramètres d'interaction correspondant à la seconde phase de complexation entre gomme d'Acacia ou gomme d'Acacia-quercétine et β -lactoglobuline, obtenus lors de la titration d'une dispersion de β -lactoglobuline (0,6 % p/p) par une dispersion de gomme d'Acacia (1,8 % p/p) ou une dispersion de gomme d'Acacia-quercétine (1,8 % p/p) à 25 °C et à pH 4,2. N : stoechiométrie, K_a : constante d'association, ΔH_m : variation d'enthalpie, ΔS_m : variation d'entropie et ΔG_m : variation de l'énergie libre de Gibbs.

Mélange	$N_2 \times 10^4$	$K_{a2} (M^{-1}) \times 10^7$	$\Delta H_{m2} (kcal.mole^{-1})$	$T\Delta S_{m2} (kcal.mole^{-1})$	$\Delta G_{m2} (kcal.mole^{-1})$
GA/BLG	$127,0 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,1$	$145,8 \pm 8,9$	$158,5 \pm 4,3$	$-12,7 \pm 4,5$
GAQ/BLG	$126,0 \pm 5,6$	$1,2 \pm 0,1$	$140,5 \pm 4,1$	$151,5 \pm 2,0$	$-11,0 \pm 2,1$

La variation de l'énergie libre de Gibbs est négative dans les deux systèmes étudiés (GA/BLG et GAQ/BLG) et pour chaque phase de structuration. Les valeurs sont équivalentes dans les deux systèmes étudiés et ne varient pas significativement de la première à la seconde phase de structuration ($\sim 11-13 \text{ kcal.mole}^{-1}$) (Tableaux 3.1 et 3.2).

Les variations d'enthalpie observées lors de cette seconde phase de complexation endothermique pourraient être dues à des changements survenus dans les forces d'interactions intermoléculaires, à la présence d'un réseau de complexes inter-polymériques, à des changements de conformation ou à l'agrégation des biopolymères (Schmitt *et al.*, 2000 ; Rutten *et al.*, 2002 ; Girard *et al.*, 2003b ; Wangsakan *et al.*, 2003 ; Bordbar *et al.*, 2008). De plus, on pourrait aussi s'attendre à ce qu'il y ait condensation des agrégats à ce stade de la complexation, en parallèle avec une libération de molécules d'eau. Cela pourrait provoquer la rupture de liaisons hydrogène et conduire à l'apparition de pics endothermiques (Girard *et al.*, 2003b ; Wangsakan *et al.*, 2003). Selon la théorie de Tainaka (1979), le processus appelé complexation commence à ce stade de la structuration, lorsqu'il y a agrégation des complexes intrapolymériques qui se réorganisent lentement afin de former des coacervats. Ce mécanisme s'appuie sur une augmentation de l'entropie configurationnelle par formation d'une phase concentrée en coacervats et sur la dilution de la phase contenant les agrégats (Veis et Aranyi, 1960). Il y a d'abord formation de complexes intrapolymériques solubles conduite par une enthalpie favorable en raison essentiellement d'interactions électrostatiques. Cette étape était suivie par une agrégation en complexes interpolymériques insolubles, résultat de paramètres enthalpiques défavorables et de paramètres entropiques favorables.

5.2. Effet de la température sur les caractéristiques thermodynamiques

L'effet de la température a été étudié dans une gamme de températures allant de 25 °C à 50 °C. Le premier objectif de cette expérimentation était de vérifier si d'autres interactions de faible énergie (interactions hydrophobes et liaisons hydrogène) auraient pu jouer un rôle important dans la complexation de la GA ou la GAQ avec la BLG. Le second objectif était le calcul de la capacité calorifique ΔC_p , fortement sensible aux interactions entre les résidus des macromoléculaires et les molécules de solvant (Jelesarov et Bosshard, 1999 ; Ladbury et Williams, 2004 ; Olsson *et al.*, 2008).

Deux étapes de structuration ont été observées durant le titrage de la BLG par la GA et par la GAQ et cela quelle que soit la température appliquée (Figures 3.8 et 3.9). La prévalence des contributions enthalpiques ou entropiques au cours des deux étapes a été fortement tributaire de la température. A 25 °C et à 35 °C, une séquence exothermique-endothermique a été enregistrée durant la titration. Ces résultats indiquent que la première étape de structuration est contrôlée par l'enthalpie tandis que la seconde est contrôlée par l'entropie. Il est aussi intéressant de noter que l'intensité des pics des thermogrammes plus faible à 35 °C.

Les thermogrammes obtenus à 45 °C et à 50 °C ont révélé qu'il y avait d'abord absorption puis libération de chaleur pendant la titration (Figure et 3.8).

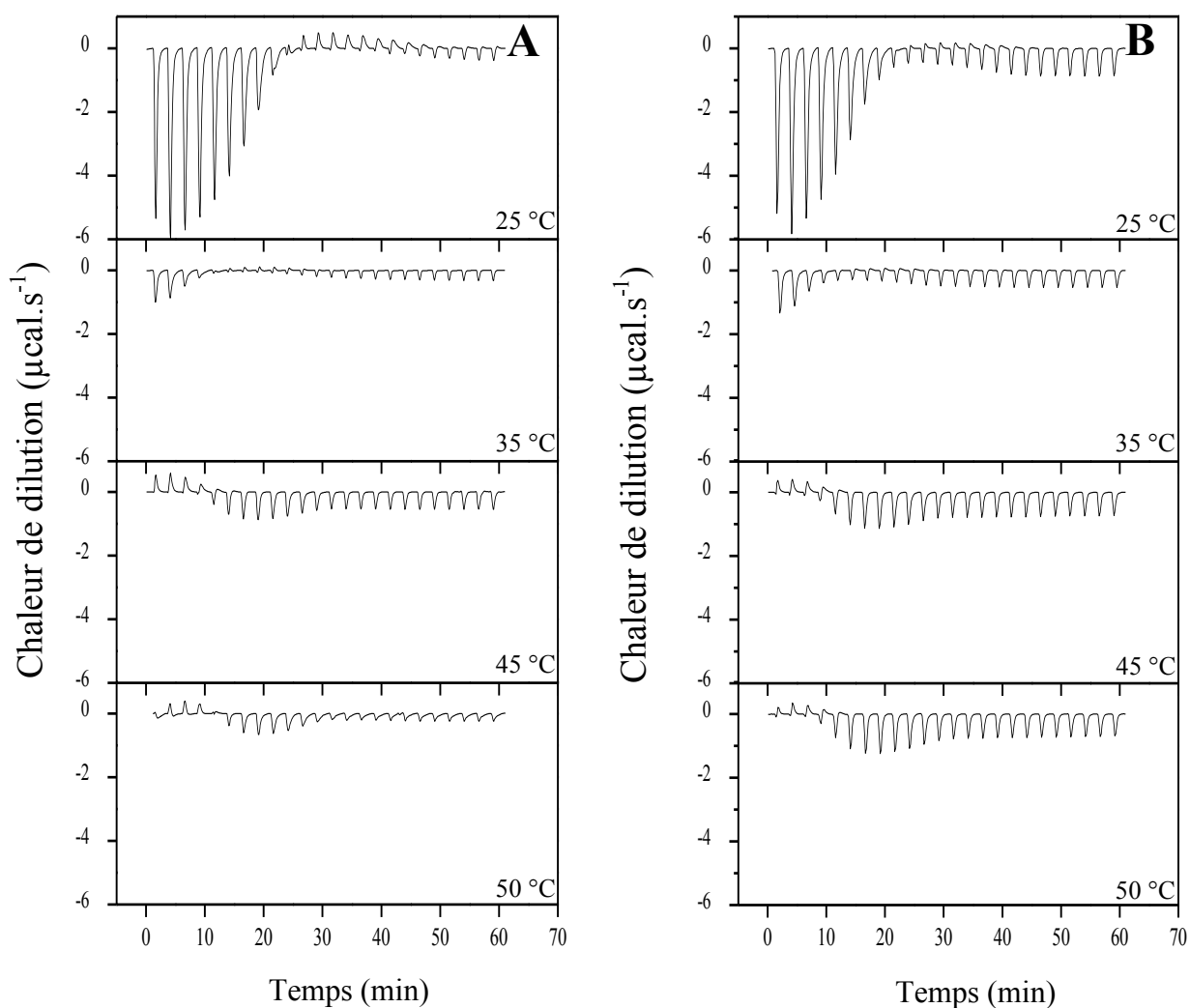


Figure 3.8 : Thermogrammes correspondant à la titration d'une dispersion de β -lactoglobuline (0,6 %, p/p) par une dispersion de gomme d'Acacia (1,8 %, p/p) (A) ou par une dispersion de gomme d'Acacia-quercétine (1,8 %, p/p) (B) à différentes températures : 25 °C, 35 °C, 45 °C et 50 °C.

Les isothermes de liaison affichent alors une séquence endothermique-exothermique (Figure 3.9). L'enthalpie de liaison est positive et défavorable durant la première phase de structuration (Tableaux 3.3 et 3.5) alors qu'elle est négative et favorable au cours de la seconde phase (Tableaux 3.4 et 3.6). D'autre part, l'entropie de liaison est favorable (positive) au cours de la première phase de structuration et est défavorable (négative) au cours de la seconde phase. Un autre point intéressant concerne l'enthalpie de liaison enregistrée en fin de

titration. Comme observé à 25 °C, les valeurs d'enthalpie de liaison obtenues étaient négatives pour toutes les températures étudiées (Figure 3.9).

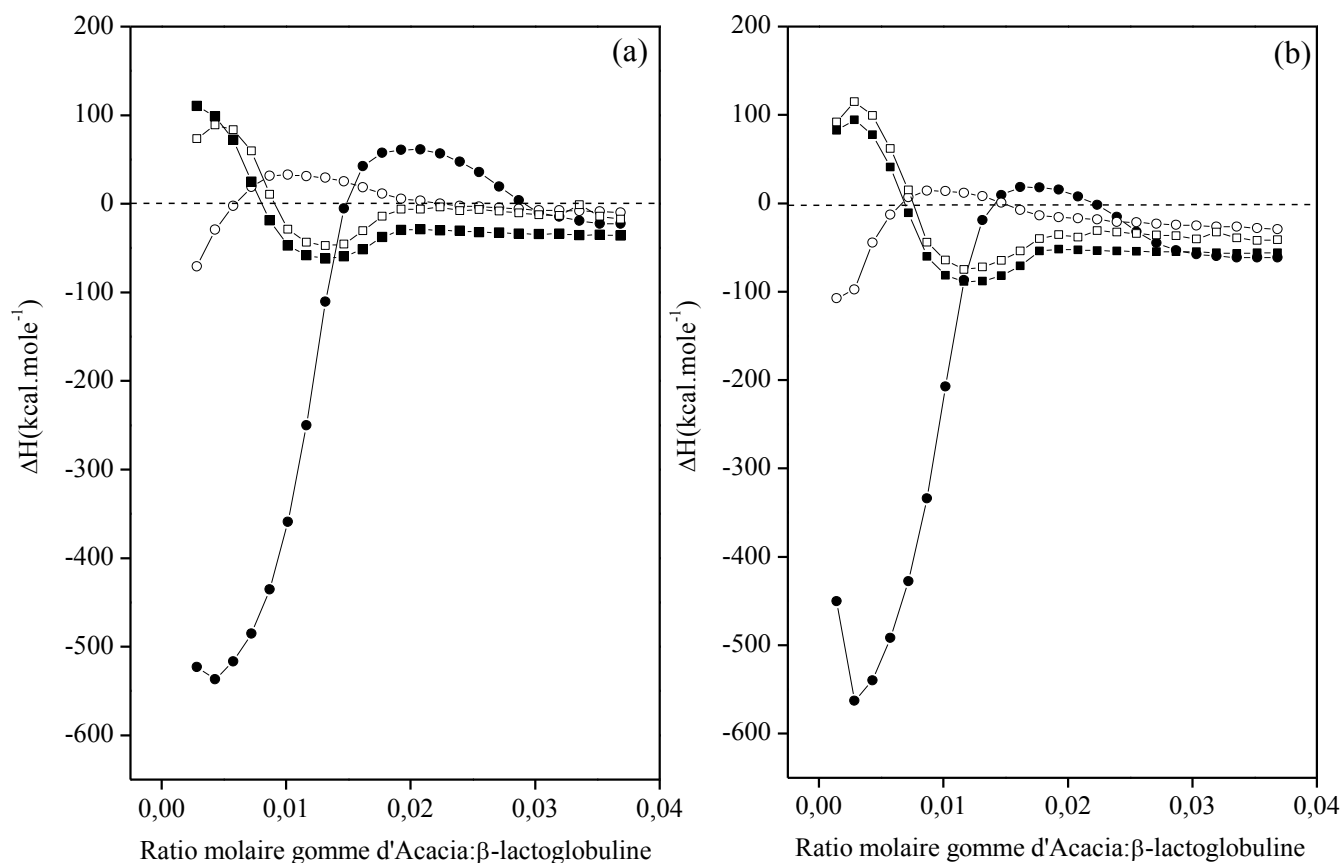


Figure 3.9 : Isothermes de liaison correspondant à la titration d'une dispersion de β -lactoglobuline (0,6 %, p/p) par une dispersion de gomme d'Acacia (1,8 %, p/p) (a) ou par une dispersion de gomme d'Acacia-quercétine (1,8 %, p/p) (b) à différentes températures : 25 °C (●), 35 °C (○), 45 °C (■) et 50 °C (□).

Tableau 3.3 : Paramètres d'interaction correspondant à la première phase de complexation entre la gomme d'Acacia et la β -lactoglobuline, obtenus lors de la titration d'une dispersion de β -lactoglobuline (0,6 %, p/p) par une dispersion de gomme d'Acacia (1,8 %, p/p) à 25 °C, 35 °C, 45 °C ou 50 °C et à pH 4,2. N : stoechiométrie, K_a : constante d'association, ΔH_m : variation d'enthalpie, ΔS_m : variation d'entropie et ΔG_m : variation de l'énergie libre de Gibbs.

Temperature (°C)	$N_1 \times 10^4$	$K_{a1} (M^{-1}) \times 10^7$	$\Delta H_{m1} (kcal.mole^{-1})$	$T\Delta S_{m1} (kcal.mole^{-1})$	$\Delta G_{m1} (kcal.mole^{-1})$
25	$110,5 \pm 0,2$	$48,4 \pm 3,6$	$-578,7 \pm 7,6$	$-566,4 \pm 8,4$	$-12,2 \pm 0,7$
35	$41,5 \pm 0,2$	$19,0 \pm 3,6$	$-90,8 \pm 12,8$	$-79,2 \pm 13,0$	$-11,6 \pm 0,2$
45	$65,0 \pm 0,2$	$244,5 \pm 15,9$	$157,4 \pm 3,3$	$171,0 \pm 2,9$	$-13,5 \pm 0,4$
50	$75,0 \pm 0,0$	$852,0 \pm 43,5$	$107,4 \pm 9,4$	$122,3 \pm 8,9$	$-14,8 \pm 0,5$

Tableau 3.4 : Paramètres d'interaction correspondant à la seconde phase de complexation entre la gomme d'Acacia et la β -lactoglobuline, obtenus lors de la titration d'une dispersion de β -lactoglobuline (0,6 %, p/p) par une dispersion de gomme d'Acacia (1,8 %, p/p) à 25 °C, 35 °C, 45 °C ou 50 °C et à pH 4,2. N : stoechiométrie, K_a : constante d'association, ΔH_m : variation d'enthalpie, ΔS_m : variation d'entropie et ΔG_m : variation de l'énergie libre de Gibbs.

Temperature (°C)	$N_2 \times 10^4$	$Ka_2 (M^{-1}) \times 10^7$	$\Delta H_{m2} (kcal.mole^{-1})$	$T\Delta S_{m2} (kcal.mole^{-1})$	$\Delta G_{m2}(kcal.mole^{-1})$
25	127,0 $\pm$ 0,1	1,1 $\pm$ 0,1	145,8 $\pm$ 8,9	158,5 $\pm$ 4,3	-12,7 $\pm$ 4,5
35	121,5 $\pm$ 0,3	0,6 $\pm$ 0,0	63,3 $\pm$ 4,7	71,3 $\pm$ 2,4	-8,0 $\pm$ 2,3
45	90,0 $\pm$ 0,1	6,9 $\pm$ 0,4	-44,3 $\pm$ 0,8	-33,3 $\pm$ 0,5	-11,0 $\pm$ 0,2
50	78,0 $\pm$ 0,4	19,0 $\pm$ 1,4	-48,4 $\pm$ 2,6	-37,4 $\pm$ 1,5	-11,0 $\pm$ 1,1

Tableau 3.5 : Paramètres d'interaction correspondant à la première phase de complexation entre la gomme d'Acacia-quercétine et la β -lactoglobuline, obtenus lors de la titration d'une dispersion de β -lactoglobuline (0,6 %, p/p) par une dispersion de gomme d'Acacia-quercétine (1,8 %, p/p) à 25 °C, 35 °C, 45 °C ou 50 °C et à pH 4,2. N : stoechiométrie, K_a : constante d'association, ΔH_m : variation d'enthalpie, ΔS_m : variation d'entropie et ΔG_m : variation de l'énergie libre de Gibbs.

Temperature (°C)	$N_1 \times 10^4$	$Ka_1 (M^{-1}) \times 10^7$	$\Delta H_{m1} (kcal.mole^{-1})$	$T\Delta S_{m1} (kcal.mole^{-1})$	$\Delta G_{m1} (kcal.mole^{-1})$
25	87,5 $\pm$ 0,7	44,9 $\pm$ 1,6	- 549,2 $\pm$ 16,3	- 536,6 $\pm$ 16,8	- 12,5 $\pm$ 0,5
35	38,0 $\pm$ 2,8	18,5 $\pm$ 2,8	-97,8 $\pm$ 11,2	-86,1 $\pm$ 11,1	-11,7 $\pm$ 0,1
45	60,5 $\pm$ 0,7	440,0 $\pm$ 14,1	165,7 $\pm$ 3,8	179,9 $\pm$ 3,8	-14,1 $\pm$ 0,1
50	61,5 $\pm$ 0,7	187,0 $\pm$ 21,2	165,6 $\pm$ 0,0	179,3 $\pm$ 0,0	-13,7 $\pm$ 0,0

Tableau 3.6 : Paramètres d'interaction correspondant à la seconde phase de complexation entre la gomme d'Acacia-quercétine et la β -lactoglobuline, obtenus lors de la titration d'une dispersion de β -lactoglobuline (0,6 %, p/p) par une dispersion de gomme d'Acacia-quercétine (1,8 %, p/p) à 25 °C, 35 °C, 45 °C ou 50 °C et à pH 4,2. N : stoechiométrie, K_a : constante d'association, ΔH_m : variation d'enthalpie, ΔS_m : variation d'entropie et ΔG_m : variation de l'énergie libre de Gibbs.

Temperature (°C)	$N_2 \times 10^4$	$Ka_2 (M^{-1}) \times 10^7$	$\Delta H_{m2} (kcal.mole^{-1})$	$T\Delta S_{m2} (kcal.mole^{-1})$	$\Delta G_{m2}(kcal.mole^{-1})$
25	126,0 $\pm$ 5,6	1,2 $\pm$ 0,1	140,5 $\pm$ 4,1	151,5 $\pm$ 2,0	-11,0 $\pm$ 2,1
35	112,0 $\pm$ 1,4	0,4 $\pm$ 0,1	67,1 $\pm$ 2,4	77,4 $\pm$ 1,1	-10,2 $\pm$ 1,2
45	86,5 $\pm$ 0,7	11,5 $\pm$ 0,9	-44,1 $\pm$ 1,0	-31,8 $\pm$ 0,5	-12,2 $\pm$ 0,4
50	82,5 $\pm$ 0,7	5,3 $\pm$ 0,8	-55,6 $\pm$ 0,4	-44,3 $\pm$ 0,3	-11,2 $\pm$ 0,1

La dépendance de la variation d'enthalpie ΔH_m à la température a été déterminée au cours des deux étapes de structuration pour le mélange BLG:GA et la mélange BLG:GAQ (Figure 3.10).

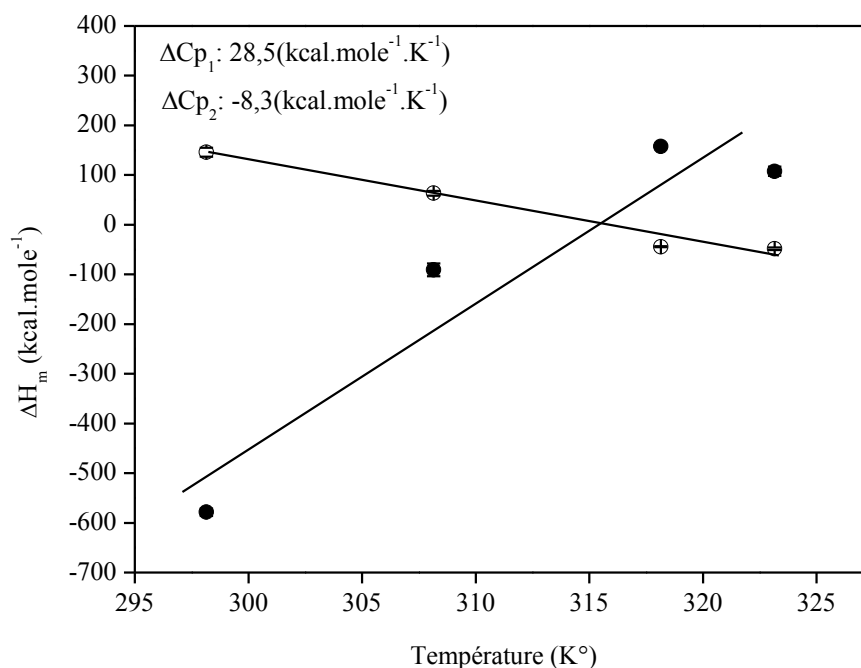


Figure 3.10 : Dépendance des variations d'enthalpie ΔH_{m1} (●) et ΔH_{m2} (○) à la température durant la titration d'une dispersion de β -lactoglobuline (0,6 %, p/p) par une dispersion de gomme d'Acacia (1,8 %, p/p).

Les pentes des droites obtenues dans la figure 3.10 (ΔH_m en fonction de la température) représentent la variation de capacité calorifique (ΔC_p) pour chaque mélange et pour les deux phases de structuration. Dans le cas du mélange BLG:GA, le ΔC_p était de 28,5 kcal.mole⁻¹.K⁻¹ pour la première phase et de -8,3 kcal.mole⁻¹.K⁻¹ pour la seconde, avec respectivement, des coefficients de corrélation de 0,88 et 0,97.

Pour le mélange BLG : GAQ, le $\Delta C'_p$ était de 30,4 kcal.mole⁻¹.K⁻¹ pour la première phase et de -8,1 kcal.mole⁻¹.K⁻¹ pour la seconde, avec respectivement, des coefficients de corrélation de 0,92 et 0,97. Les coefficients étaient moins bons pour la première phase de structuration, mais il n'y a aucun doute sur le fait que les valeurs de ΔC_p soient élevées et positives.

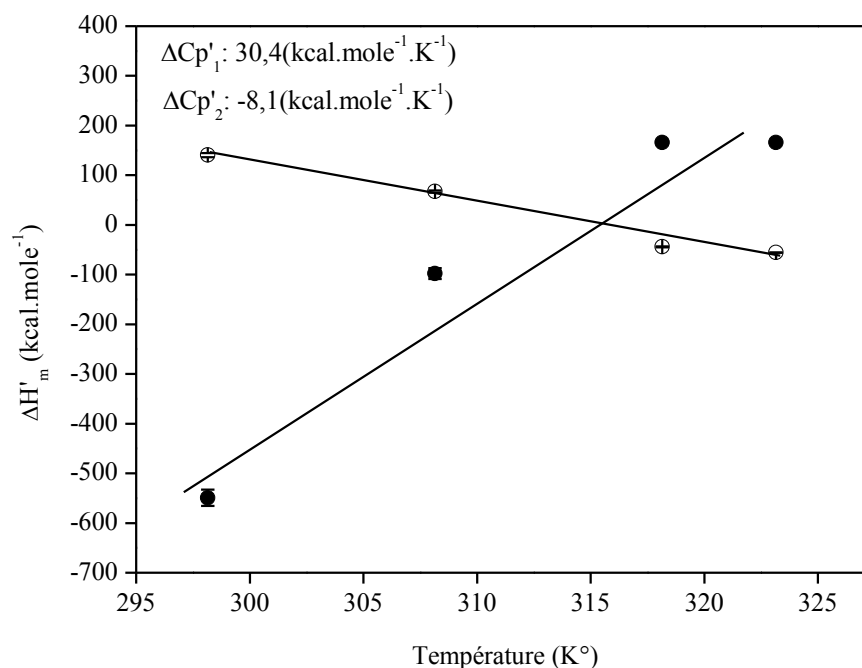


Figure 3.11 : Dépendance des variations d'enthalpie ΔH_{m1} (●) et ΔH_{m2} (○) à la température durant à la titration d'une dispersion de β -lactoglobuline (0,6 %, p/p) par une dispersion de gomme d'Acacia-quercétine (1,8 %, p/p).

Dans la plage de température considérée (Figures 3.10 et 3.11), ΔC_p n'était pas dépendante de la température. Les différents signes portés par ΔC_p indiquent qu'il existe différents mécanismes d'interaction entre les macromolécules ou les complexes macromoléculaires et le solvant. Une élévation de la température conduit à une diminution de la force d'interaction au cours de la première phase de structuration et à une augmentation de cette force au cours de la seconde phase.

Les basses températures sont propices à la formation des liaisons hydrogènes. Une élévation de température conduit à l'augmentation des interactions hydrophobes et des liaisons covalentes par l'exposition des sites réactifs par dénaturation thermique des protéines globulaires et par les changements conformationnels des structures de polysaccharides (Kelly *et al.*, 1994). La diminution des forces d'interaction et la disparition des pics endothermiques avec l'augmentation de la température pourraient être attribuées à la rupture des liens hydrogène.

La capacité calorifique est le résultat de changement du degré d'hydratation de surface des molécules libres et complexées (Jelesarov et Bosshard, 1999). Les valeurs élevées et positives de ΔC_p obtenues pour la première phase de structuration (Figures 3.10 et 3.11) sont la signature typique d'une réaction de neutralisation de charges (Gomez *et al.*, 1995 ; Ziegler et Seelig, 2004 ; Gonçalves *et al.*, 2005 ; Chung *et al.*, 2007 ; Kloczek et Seelig, 2008). Ces résultats confirment la réduction du nombre de résidus polaire exposés à la surface (Hileman *et al.*, 1998).

Divers travaux ont été menés afin d'étudier l'effet de la température sur la formation de complexes protéines / polysaccharides (Harding *et al.*, 1993 ; Sanchez *et al.*, 2001 ; Fang *et al.*, 2006). L'influence de la température sur la cinétique de coacervation complexe entre BLG et GA (pH 3,6, ratio massique GA:BLG de 1:1 et une concentration totale en biopolymère de 2 %), a été étudiée par Sanchez *et al.*, (2001) à 25 et à 50 ° C. La séparation de phase était plus rapide à 50 ° C et la taille des coacervats était différente pour les deux températures étudiées. L'influence de la température pourrait s'expliquer par la présence d'agrégats de protéines dans la dispersion de BLG. Ces agrégats peuvent être plus sensibles aux températures élevées et accélérer la séparation de phase. Harding *et al.*, (1993) ont montré l'effet de la température sur les changements de conformation de BSA (sérum albumine bovine) et les complexes qui en résultent après association avec de l'alginate. Aucun complexe n'a été détecté entre 35 et 70 °C. La complexation n'a été effective qu'à partir de 70 °C. La formation de complexes sérum albumine bovine / alginate est principalement liée aux modifications conformationnelles de la BSA aux alentours de sa température de dénaturation (55 °C). D'autres groupes hydrophobes peuvent être exposés, favorisant ainsi la formation de complexes. Des effets similaires concernant la température ont été observés durant la formation de complexes entre la gélatine et le κ -carraghénane (Fang *et al.*, 2006).

Lors de la seconde phase de structuration (Figures 3.10 et 3.11), les valeurs de ΔC_p étaient négatives. Ce phénomène est dû à des contributions hydrophobes au processus d'interaction (Gomez *et al.*, 1995 ; Hileman *et al.*, 1998) et au changement de la surface accessible au solvant lors de la complexation (Baker et Murphy, 1998 ; Cooper, 2000). L'effet hydrophobe conduisant à l'obtention d'une ΔC_p négative résulte de la libération de molécules d'eau, les zones accessibles au solvant se réunissent alors pour former un complexe purement hydrophobe (Brockhaus *et al.*, 2007).

Une valeur élevée de ΔC_p , qu'elle soit positive ou négative, conduit à des variations importantes de ΔH_m mesurées et ΔS_m calculées en fonction de la température. Une relation a été établie entre les enthalpies et les entropies de liaison pour les deux phases de structuration et pour les deux systèmes étudiés (Figures 3.12 et 3.13).

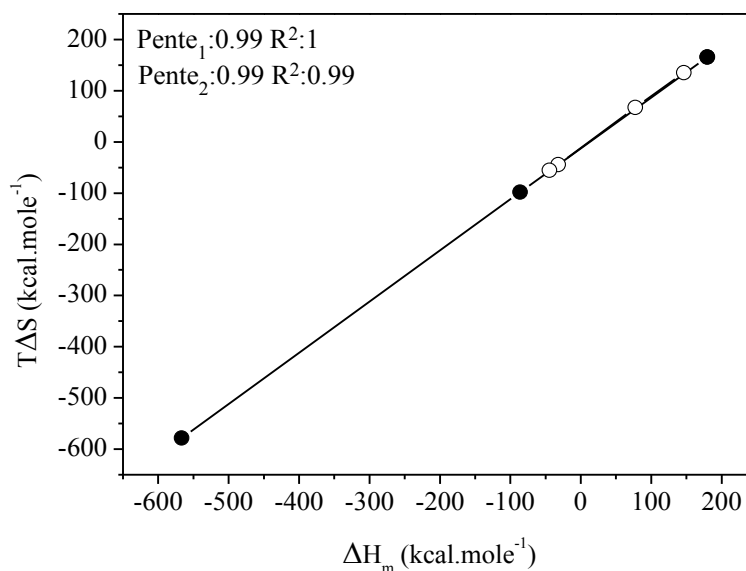


Figure 3.12 : compensation enthalpie-entropie durant la titration d'une dispersion de β -lactoglobuline (0,6 %, p/p) par une dispersion de gomme d'Acacia (1,8 %, p/p) à pH 4,2. (●) première phase de structuration, (○) seconde phase de structuration.

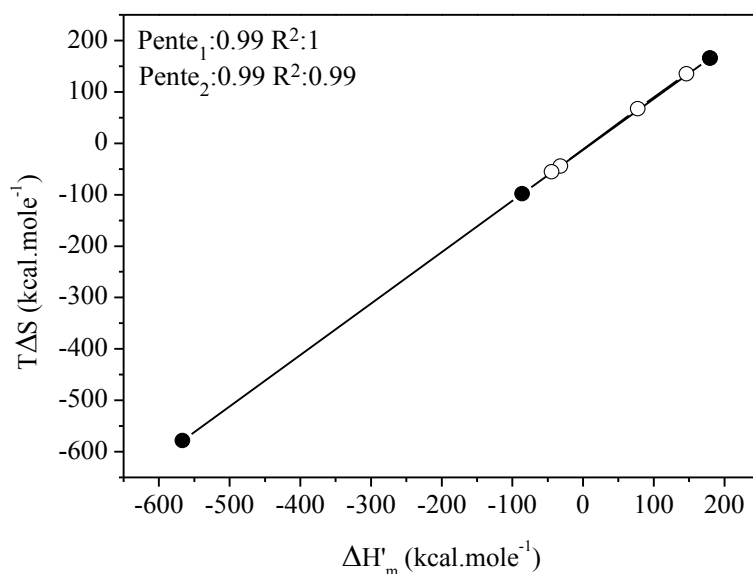


Figure 3.13 : compensation enthalpie-entropie durant la titration d'une dispersion de β -lactoglobuline (0,6 %, p/p) par une dispersion de gomme d'Acacia-quercétine (1,8 %, p/p) à pH 4,2. (●) première phase de structuration, (○) seconde phase de structuration.

Une relation presque parfaite et linéaire a été obtenue. Tout changement d'enthalpie est accompagné par une variation similaire de l'entropie. Une compensation entropie-enthalpie a donc lieu. ΔH_m et ΔS_m ont tendance à se compenser afin de minimiser les variations de l'énergie libre de Gibbs ΔG_m (Tableaux 3.3, 3.4, 3.5 et 3.6), qui est alors moins sensible aux fluctuations de température (Cooper, 2000).

6. Conclusion

Les caractéristiques thermodynamiques des interactions de la GA avec la BLG et de la GAQ avec la BLG ont été étudiées par calorimétrie de titration isotherme, en dispersion aqueuse et à pH 4,2. Des résultats similaires ont été obtenus pour les deux systèmes étudiés. Les résultats obtenus indiquent qu'il existe deux étapes distinctes de structuration au cours de l'interaction entre la GA et la BLG et entre la GAQ et la

BLG. Il y a apparition d'une séquence exothermique-endothermique qui s'inverse avec l'élévation de la température.

La première étape est contrôlée par l'enthalpie avec une entropie de liaison défavorable, principalement en raison des interactions électrostatiques entre la GA et la BLG ou entre la GAQ et la BLG. La ΔC_p positive obtenue à cette étape est la signature d'interactions électrostatiques, en raison de la réduction du nombre de résidus polaires exposés en surface. En plus de ces interactions électrostatiques, il y a des contributions liées aux liaisons hydrogène.

Au cours de la seconde étape de structuration, la réaction est contrôlée par l'entropie. Les complexes intra-polymériques s'agrègent et se condensent pour former des structures supramoléculaires denses. Un changement dans l'accessibilité du solvant à la surface durant le processus de complexation est le premier facteur contribuant aux valeurs négatives de ΔC_p obtenues. Cela indique qu'il y a contribution de liaisons hydrophobes au processus de complexation.

La séquence exothermique-endothermique observée suggère d'autres contributions énergétiques telles que la libération d'ions et de molécules d'eau, des changements de conformation des biopolymères et / ou agrégation de complexes protéine-polysaccharide formés.

La présente étude avait pour but, une meilleure compréhension des mécanismes thermodynamiques à l'origine du processus de complexation entre GA et BLG et entre GAQ et BLG. Néanmoins, l'utilisation de méthodes complémentaires serait utile pour mieux comprendre la nature des interactions en jeu entre et l'ampleur des complexes formés. L'étape suivante de l'étude est de caractériser les différentes entités structurales formées durant la

complexation entre la GA et la BLG ou la GAQ et la BLG en utilisant la même approche par titration.

Références bibliographiques

- Aberkane, L., Jasniewski, J., Gaiani, C., Scher, J., et Sanchez, C., 2010. Thermodynamic characterization of acacia gum- β -Lactoglobulin Complex Coacervation. *Langmuir*, 26, 12523-12533.
- Andrushchenko, V.V., Aarabi, M.H., Nguyen, L.T., Prenner, E.J., et Vogel, H.J., 2008. Thermodynamics of the interactions of tryptophan-rich cathelicidin antimicrobial peptides with model and natural membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1778, 1004-1014.
- Antonov, Y.A., et Wolf, B.A., 2005. Calorimetric and structural investigation of the interaction between bovine serum albumin and high molecular weight dextran in water. *Biomacromolecules*, 6, 2980-2989.
- Aymard, P., Durand, D., et Nicolai, T., 1996. The effect of temperature and ionic strength on the dimerisation of β -lactoglobulin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 19, 213-221.
- Baker, B.M., et Murphy, K.P., 1997. Dissecting the energetics of a protein-protein interaction: the binding of ovomucoid third domain to elastase. *Journal of Molecular Biology*, 268, 557-569.
- Baker, B.M., et Murphy, K.P., 1998. Prediction of binding energetics from structure using empirical parameterization. *Methods in Enzymology*, 295, 294-315.
- Ball, V., Winterhalter, M., Schwinte, P., Lavalle, P., Voegel, J.C., et Schaaf, P., 2002. Complexation mechanism of bovine serum albumin and poly(allylamine hydrochloride). *Journal of Physical Chemistry B*, 106, 2357-2364.
- Barbosa, S., Taboada, P., et Mosquera, V., 2005. Analysis of the interactions between human serum albumin/amphiphilic penicillin in different aqueous media: an isothermal titration calorimetry and dynamic light scattering study. *Chemical Physics*, 310, 51-58.
- Barratt, E., Bingham, R.J., Warner, D.J., Laughton, C.A., Phillips, S.E.V., et Homans, S.W., 2005. Van der Waals interactions dominate ligand-protein association in a protein binding site occluded from solvent water. *Journal of the American Chemical Society*, 127, 11827-11834.
- Bordbar, A.-K., Taheri-Kafrani, A., Mousavi, S.H.-A., et Haertlé, T., 2008. Energetics of the interactions of human serum albumin with cationic surfactant. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 470, 103-110.

- Brockhaus, M., Ganz, P., Huber, W., Bohrmann, B., Loetscher, H.R., et Seelig, J., 2007. Thermodynamic studies on the interaction of antibodies with β -amyloid peptide. *Journal of Physical Chemistry B*, 111, 1238-1243.
- Bungenberg de Jong, H.G., 1949. Crystallisation-coacervation-flocculation, p. 232-258, dans: H. G. Kruyt, (Ed.), *Colloid Science Elsevier* :Amsterdam.
- Burgess, D.J., et Carless, J.E., 1985. Manufacture of gelatin/gelatin coacervate microcapsules. *International Journal of Pharmaceutics*, 27, 61-70.
- Burgess, D.J., 1994. Complex coacervation : Microcapsule formation, p. 281-300, dans: P. L. Dubin, J. Bock, R. Davis, D. N. Schulz and C. Thies, Eds., *Macromolecular complexes in chemistry and Biology Springer Verlag*: Berlin.
- Charoenchaitrakool, M., Dehghani, F., Foster, N.R., et Chan, H.K., 2000. Micronization by rapid expansion of supercritical solutions to enhance the dissolution rates of poorly water-soluble pharmaceuticals. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 39, 4794-4802.
- Cheema, M.A., Taboada, P., Barbosa, S., Castro, E., Siddiq, M., et Mosquera, V., 2007. Energetics and conformational changes upon complexation of a phenothiazine drug with human serum albumin. *Biomacromolecules*, 8, 2576-2585.
- Chung, K., Kim, J., Cho, B.K., Ko, B.J., Hwang, B.Y., et Kim, B.G., 2007. How does dextran sulfate prevent heat induced aggregation of protein?: The mechanism and its limitation as aggregation inhibitor. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1774, 249-257.
- Cooper, A., 1999. Thermodynamic analysis of biomolecular interactions. *Current Opinion in Chemical Biology*, 3, 557-563.
- Cooper, A., 2000. Heat capacity of hydrogen-bonded networks: an alternative view of protein folding thermodynamics. *Biophysical Chemistry*, 85, 25-39.
- Cooper, C.L., Dubin, P.L., Kayitmazer, A.B., et Turksen, S., 2005. Polyelectrolyte-protein complexes. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 10, 52-78.
- Creamer, L.K., Parry, D.A.D., et Malcolm, G.N., 1983. Secondary structure of bovine β -lactoglobulin B. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 227, 98-105.
- de Kruif, C.G., et Tuinier, R., 2001. Polysaccharide protein interactions. *Food Hydrocolloids*, 15, 555-563.
- de Kruif, C.G., Weinbreck, F., et de Vries, R., 2004. Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 9, 340-349.

- de Vries, R., et Cohen Stuart, M., 2006. Theory and simulations of macroion complexation. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 11, 295-301.
- Dickinson, E., 2006. Colloid science of mixed ingredients. *Soft Matter*, 2, 642-652.
- Doublier, J.L., Garnier, C., Renard, D., et Sanchez, C., 2000. Protein-polysaccharide interactions. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 5, 202-214.
- Fang, Y., Li, L., Inoue, C., Lundin, L., et Appelqvist, I., 2006. Associative and segregative phase separations of gelatin/ κ -carrageenan aqueous mixtures. *Langmuir*, 22, 9532-9537.
- Feng, X., Pelton, R., Leduc, M., et Champ, S., 2007. Colloidal complexes from poly(vinyl amine) and carboxymethyl cellulose mixtures. *Langmuir*, 23, 2970-2976.
- Flower, D.R., North, A.C.T., et Attwood, T.K., 1993. Structure and sequence relationships in the lipocalins and related proteins. *Protein Science*, 2, 753-761.
- Flower, D.R., 1996. The lipocalin protein family: Structure and function. *Biochemical Journal*, 318, 1-14.
- Freire, E. 2004. Thermodynamic in Drug Design. High Affinity and Selectivity, pp. 1-13 *Proceedings of The Chemical Theatre of Biological Systems*. Beilstein-Institut, Bozen, Italy.
- Girard, M., Turgeon, S.L., et Gauthier, S.F., 2003a. Quantification of the Interactions between β -Lactoglobulin and Pectin through Capillary Electrophoresis Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6043-6049.
- Girard, M., Turgeon, S.L., et Gauthier, S.F., 2003b. Thermodynamic Parameters of β -Lactoglobulin-Pectin Complexes Assessed by Isothermal Titration Calorimetry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 4450-4455.
- Gomez, J., Hilser, V.J., Xie, D., et Freire, E., 1995. The heat capacity of proteins. *Proteins*, 22, 404-412.
- Gonçalves, E., Kitas, E., et Seelig, J., 2005. Binding of oligoarginine to membrane lipids and heparan sulfate: Structural and thermodynamic characterization of a cell-penetrating peptide. *Biochemistry*, 44, 2692-2702.
- Guichard, E., et Langourieux, S., 2000. Interactions between β -lactoglobulin and flavour compounds. *Food Chemistry*, 71, 301-308.
- Guzey, D., et McClements, D.J., 2006. Characterization of [β]-lactoglobulin-chitosan interactions in aqueous solutions: A calorimetry, light scattering, electrophoretic mobility and solubility study. *Food Hydrocolloids*, 20, 124-131.

- Hambling, S.G., 1992. β -lactoglobulin, dans: P. F. Fox, (Ed.), *Advanced Dairy Chemistry*, Elsevier Science Publisher Ltd: Londres.
- Harding, S., Jumel, K., Kelly, R., Gudo, E., Horton, J.C., et Mitchell, J.R., 1993. The structure and the nature of protein-polysaccharide complexes, p. 216-226, dans: K. D. S. a. R. Mothes, (Ed.), *Food proteins, structure and functionality*, VCH: Weinheim.
- Harnsilawat, T., Pongsawatmanit, R., et McClements, D.J., 2006. Characterization of [beta]-lactoglobulin-sodium alginate interactions in aqueous solutions: A calorimetry, light scattering, electrophoretic mobility and solubility study. *Food Hydrocolloids*, 20, 577-585.
- Hileman, R.E., Jennings, R.N., et Linhardt, R.J., 1998. Thermodynamic analysis of the heparin interaction with a basic cyclic peptide using isothermal titration calorimetry. *Biochemistry*, 37, 15231-15237.
- Jelesarov, I., et Bosshard, H.R., 1999. Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition. *Journal of Molecular Recognition*, 12, 3-18.
- Kelley, D., et McClements, D.J., 2003. Interactions of bovine serum albumin with ionic surfactants in aqueous solutions. *Food Hydrocolloids*, 17, 73-85.
- Kelly, R., Gudo, E.S., Mitchell, J.R., et Harding, S.E., 1994. Some observations on the nature of heated mixtures of bovine serum albumin with an alginate and a pectin. *Carbohydrate Polymers*, 23, 115-120.
- Kinsella, J.E., 1984. Milk proteins: physicochemical and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 21, 197-262.
- Klocek, G., et Seelig, J., 2008. Melittin interaction with sulfated cell surface sugars. *Biochemistry*, 47, 2841-2849.
- Kobayashi, T., Ikeguchi, M., et Sugai, S., 2000. Molten globule structure of equine β -lactoglobulin probed by hydrogen exchange. *Journal of Molecular Biology*, 299, 757-770.
- Kraulis, P.J., 1991. MOLSCRIPT. A program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *Journal of Applied Crystallography*, 24, 947-950.
- Ladbury, J.E., et Williams, M.A., 2004. The extended interface: measuring non-local effects in biomolecular interactions. *Current Opinion in Structural Biology*, 14, 562-569.
- Leavitt, S., et Freire, E., 2001. Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry. *Current Opinion in Structural Biology*, 11, 560-566.

- Mc Kenzie, H.A., 1971. β -lactoglobulins, p. 257-330, dans: H. A. Mc Kenzie, (Ed.), *Milk proteins Chemistry and Molecular Biology*, Academic Press: London.
- McClements, D.J., 2000. Isothermal titration calorimetry study of pectin - Ionic surfactant interactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5604-5611.
- McClements, D.J., 2006. Non-covalent interactions between proteins and polysaccharides. *Biotechnology Advances*, 24, 621-625.
- Mekhloufi, G., Sanchez, C., Renard, D., Guillemin, S., et Hardy, J., 2005. pH-Induced Structural Transitions during Complexation and Coacervation of β -Lactoglobulin and Acacia Gum. *Langmuir*, 21, 386-394.
- Molinari, H., Ragona, L., Varani, L., Musco, G., Consonni, R., Zetta, L., et Monaco, H.L., 1996. Partially folded structure of monomeric bovine β -lactoglobulin. *FEBS Letters*, 381, 237-243.
- Olsson, T.S.G., Williams, M.A., Pitt, W.R., et Ladbury, J.E., 2008. The Thermodynamics of Protein-Ligand Interaction and Solvation: Insights for Ligand Design. *Journal of Molecular Biology*, 384, 1002-1017.
- Ou, Z., et Muthukumar, M., 2006. Entropy and enthalpy of polyelectrolyte complexation: Langevin dynamics simulations. *Journal of Chemical Physics*, 124.
- Papiz, M.Z., Sawyer, L., et Eliopoulos, E.E., 1986. The structure of β -lactoglobulin and its similarity to plasma retinol-binding protein. *Nature*, 324, 383-385.
- Pérez, M.D., et Calvo, M., 1995. Interaction of beta-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.
- Pierce, M.M., Raman, C.S., et Nall, B.T., 1999. Isothermal Titration Calorimetry of Protein-Protein Interactions. *Methods*, 19, 213-221.
- Rutten, A.A.C.M., Bouwman, W.G., et van der Leeden, M.C., 2002. [β]-Lactoglobulin as an ideal random polymer coil. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 210, 243-252.
- Sakka, K., Nakanishi, M., Sogabe, M., Arai, T., Ohara, H., Tanaka, A., Kimura, T., et Ohmiya, K., 2003. Isothermal titration calorimetric studies on the binding of a family 6 carbohydrate-binding module of *Clostridium thermocellum* XynA with xyloligosaccharides. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 67, 406-409.
- Sanchez, C., Despond, S., Schmitt, C., et Hardy, J., 2001. Effect of heat and shear on β -lactoglobulin-acacia gum complex coacervation, p. 332-341, dans: E. Dickinson and

- R. Miller, Eds., Food Colloids : Fundamentals of Formulation, Royal Society of Chemistry: Chambridge.
- Sanchez, C., Renard, D., Robert, P., Schmitt, C., et Lefebvre, J., 2002. Structure and rheological properties of acacia gum dispersions. *Food Hydrocolloids*, 16, 257-267.
- Sanchez, C., Mekhloufi, G., et Renard, D., 2006. Complex coacervation between [beta]-lactoglobulin and Acacia gum: A nucleation and growth mechanism. *Journal of Colloid and Interface Science*, 299, 867-873.
- Sawyer, L., Brownlow, S., Polikarpov, I., et Wu, S.Y., 1998. β -lactoglobulin: Structural studies, biological clues. *International Dairy Journal*, 8, 65-72.
- Sawyer, L., et Kontopidis, G., 2000. The core lipocalin, bovine β -lactoglobulin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1482, 136-148.
- Sawyer, L., Barlow, P.N., Boland, M.J., Creamer, L.K., Denton, H., Edwards, P.J.B., Holt, C., Jameson, G.B., Kontopidis, G., Norris, G.E., Uhrinova, S., et Wu, S.Y., 2002. Erratum: Milk protein structure - What can it tell the dairy industry? (*International Dairy Journal* (2002) 12:4 (299-310) PII: S0958694602000250). *International Dairy Journal*, 12, 709.
- Schmitt, C., Sanchez, C., Désobry-Banon, S., et Hardy, J., 1998. Structure and technofunctional properties of protein-polysaccharide complexes : A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38, 689-753.
- Schmitt, C., Sanchez, C., Thomas, F., et Hardy, J., 1999. Complex coacervation between [beta]-lactoglobulin and acacia gum in aqueous medium. *Food Hydrocolloids*, 13, 483-496.
- Schmitt, C., Sanchez, C., Despond, S., Renard, D., Thomas, F., et Hardy, J., 2000. Effect of protein aggregates on the complex coacervation between [beta]-lactoglobulin and acacia gum at pH 4.2. *Food Hydrocolloids*, 14, 403-413.
- Schmitt, C., Sanchez, C., Lamprecht, A., Renard, D., Lehr, C.-M., de Kruif, C.G., et Hardy, J., 2001. Study of [beta]-lactoglobulin/acacia gum complex coacervation by diffusing-wave spectroscopy and confocal scanning laser microscopy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 20, 267-280.
- Schmitt, C., Palma Da Silva, T., Rami-Shojaei, C.B.S., Frossard, P., Kolodziejczyk, E., et Leser, M.E., 2005. Effect of time on the interfacial and foaming properties of β -lactoglobulin/acacia gum electrostatic complexes and coacervates at pH 4.2. *Langmuir*, 21, 7786-7795.

- Schmitt, C., Aberkane, L., et Sanchez, C., 2009. Protein-polysaccharide complexes and coacervates., p. 421- 476., dans: G. O. Phillips and P. A. Williams, Eds., Handbook of Hydrocolloids, Glyndwr University: UK.
- Seyrek, E., Dubin, P.L., Tribet, C., et Gamble, E.A., 2003. Ionic Strength Dependence of Protein-Polyelectrolyte Interactions. *Biomacromolecules*, 4, 273-282.
- Timasheff, S.N., et Townend, R., 1961. Molecular interactions in β -lactoglobulin. VI. The dissociation of the genetic species of β -lactoglobulin at acid pH's. *Journal of the American Chemical Society*, 83, 470-473.
- Tolstoguzov, V.B., 1997. Food Proteins and Their Application, p. 171-198, dans: S. Damodaran and A. Paraf, Eds., Food Proteins and Their Applications, Marcel Dekker, Inc: New York.
- Turgeon, S.L., Beaulieu, M., Schmitt, C., et Sanchez, C., 2003. Protein-polysaccharide interactions: phase-ordering kinetics, thermodynamic and structural aspects. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 8, 401-414.
- Turgeon, S.L., Schmitt, C., et Sanchez, C., 2007. Protein-polysaccharide complexes and coacervates. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 12, 166-178.
- Uhrinova, S., Smith, M.H., Jameson, G.B., Uhrin, D., Sawyer, L., et Barlow, P.N., 2000. Structural changes accompanying pH-induced dissociation of the β - lactoglobulin dimer. *Biochemistry*, 39, 3565-3574.
- Veis, A., et Aranyi, C., 1960. Phase separation in polyelectrolyte systems. I. Complex coacervates of gelatin. *Journal of Physical Chemistry*, 64, 1203-1210.
- Wangsakan, A., Chinachoti, P., et McClements, D.J., 2003. Effect of Different Dextrose Equivalent of Maltodextrin on the Interactions with Anionic Surfactant in an Isothermal Titration Calorimetry Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 7810-7814.
- Weinbreck, F., de Vries, R., Schrooyen, P., et de Kruif, C.G., 2003. Complex Coacervation of Whey Proteins and Gum Arabic. *Biomacromolecules*, 4, 293-303.
- Weinbreck, F., Nieuwenhuijse, H., Robijn, G.W., et de Kruif, C.G., 2004a. Complexation of Whey Proteins with Carrageenan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3550-3555.
- Weinbreck, F., Rollema, H.S., Tromp, R.H., et deKruif, C.G., 2004b. Diffusivity of Whey Protein and Gum Arabic in Their Coacervates. *Langmuir*, 20, 6389-6395.
- Whitney, R.M., 1977. Milk proteins, p. 66-151, dans: H. D. Graham, (Ed.), Food Colloids, The Avi Publishing Company INC.: Connecticut.

- Wong, D.W.S., Camirand, W.M., et Pavlath, A.E., 1996. Structures and Functionalities of Milk Proteins. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36, 807-844.
- Yang, J., Powers, J.R., Clark, S., Dunker, A.K., et Swanson, B.G., 2002. Hydrophobic probe binding of β -lactoglobulin in the native and molten globule state induced by high pressure as affected by pH, KIO₃ and N-ethylmaleimide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5207-5214.
- Zhu, J., Zhang, X., Li, D., et Jin, J., 2007. Probing the binding of flavonoids to catalase by molecular spectroscopy. *Journal of Molecular Structure*, 843, 38-44.
- Ziegler, A., et Seelig, J., 2004. Interaction of the Protein Transduction Domain of HIV-1 TAT with Heparan Sulfate: Binding Mechanism and Thermodynamic Parameters. *Biophysical Journal*, 86, 254-263.

Chapitre 4 : Etude mésoscopique des complexes formés lors de la titration de la β -lactoglobuline par la gomme d'Acacia et la gomme Acacia-quercétine

1. Introduction

Les résultats obtenus lors de l'étude des mécanismes thermodynamiques à l'origine du processus de complexation entre la GA et la BLG et entre la GAQ et la BLG (Chapitre III), ont fait apparaître la nécessité d'adopter une approche à plusieurs niveaux d'observation afin de mieux caractériser les différentes phases de complexation. L'étude qui suit avait pour objectif de comprendre les transitions structurales à différentes échelles lors de la complexation entre la BLG et la GA ou la GAQ dispersées dans l'eau déionisée.

Des informations sur la complexation, la séparation de phase et même la redissolution dans des solutions polyélectrolyte – macroion ont été étudiées par des simulations numériques de Monte Carlo (Carlsson *et al.*, 2003 ; Skepö et Linse, 2003) pour en décrire le mécanisme et les conditions de formation ainsi que les structure des complexes formés (Akinchina et Linse, 2002). Les transitions structurales et morphologiques ont été déterminées dans les systèmes polymère – polymère et protéine – polyélectrolyte essentiellement par l'utilisation de techniques expérimentales telles que la titration turbidimétrique (Dubin et Murrell, 1988 ; Park *et al.*, 1992 ; Xia *et al.*, 1993a ; Mattison *et al.*, 1995 ; Kaibara *et al.*, 2000 ; Weinbreck *et al.*, 2003) la diffusion quasi-élastique et statique de la lumière (Dubin et Davis, 1984 ; Dubin et Murrell, 1988 ; Park *et al.*, 1992 ; Xia *et al.*, 1993a ; Xia *et al.*, 1993b ; Kaibara *et al.*, 2000 ; Weinbreck *et al.*, 2003) et la mobilité électrophorétique (Xia *et al.*, 1993a ; Xia *et al.*, 1993b). Dans ce travail, des méthodes complémentaires ont été utilisées pour mieux identifier les différentes entités structurales formées durant la complexation entre la GA et la

BLG ou la GAQ et la BLG. Cette caractérisation a été effectuée en utilisant la même approche par titration que pour l'ITC.

Des mesures de taille par diffusion dynamique de la lumière, de turbidité et de mobilité électrophorétique ont permis de déterminer les transitions structurales des complexes formés par la titration de la BLG par la GA ou la GAQ. La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier a été utilisée par la suite afin d'étudier l'effet de la complexation sur la structure secondaire de la BLG.

2. Matériels et méthodes

2.1. Matériels

La β -lactoglobuline (BLG) (lot JE 003-6-922) a été fournie par Davisco Foods International Inc. (Etats-Unis). La poudre contenait (en g/100g de poudre humide) : 93,6% de protéines, 4.6% d'humidité, et 1.8% de cendres. La composition minérale (en g/100g de poudre) était : Mg^{2+} : 0,002, Ca^{2+} : 0,025, Na^+ : 0,9, K^+ : 0,007, Cl^- : 0,05.

La gomme d'Acacia (GA) (lot no. 97 J 716) a été fournie par la société CNI (Colloïdes Naturels International, Rouen, France). La poudre contenait (en g/100g de poudre humide) : 89.4% de polysaccharides, 7,0% d'humidité, 0,6 % de protéines et 3.0% de cendres. La composition minérale (en g/100g de poudre) était : Mg^{2+} : 0,2, Ca^{2+} : 0,61, Na^+ : 0,032, K^+ : 0,9.

La quercétine (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavonone) a été fournie par Sigma-Aldrich (pureté $\geq$ 98 %)

2.2. Préparation des dispersions de β -lactoglobuline (BLG), de gomme d'Acacia (GA) et de gomme d'Acacia-quercétine (GAQ)

Des dispersions de BLG, de GA et GAQ ont été préparées par dispersion de la quantité nécessaire de poudre pour obtenir la concentration désirée en protéine et polysaccharide dans de l'eau déionisée ultrapure (résistivité : 18,2 m Ω) sous une agitation modérée pendant 2 heures à $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Le pH de la dispersion de BLG a été ensuite ajusté à 4,80 (pH de solubilité minimale de la BLG) avec du HCL 1N et 0,1N. Les dispersions ont été ensuite stockées sans agitation pendant 18 heures à $4 \pm 1^\circ\text{C}$ pour permettre une bonne hydratation des biopolymères. Les dispersions ont été ensuite centrifugées à 10 000g pendant 30 minutes afin d'éliminer les bulles d'air, les particules insolubles ainsi que les agrégats de BLG. La concentration de la dispersion de BLG a été vérifiée par spectrophotométrie à 278 nm en utilisant un coefficient d'extinction molaire de 9,6 dl/cm.g, déterminé expérimentalement. La densité optique à 278 nm a été corrigée par la turbidité. La concentration finale en biopolymère dans les dispersions réalisées était de 0,6 % (p/p) de BLG et de 1,8 % (p/p) de GA et GAQ.

2.2.1. Taille et distribution de taille des particules

Les mesures de taille des particules formées lors de la titration de la dispersion de BLG par les dispersions de GAQ ou de GA à pH 4,2 ont été réalisées sur un appareil de diffusion dynamique de la lumière type Nanosizer ZS (HPPS 5001, Malvern Instruments, Angleterre), ayant une gamme de mesure de taille allant de 0,6 nm à 6 μm . Il est équipé d'un faisceau laser de type He/Ne (puissance 4 mW) de longueur d'onde 633 nm, d'un détecteur à photodiode, d'un photomultiplicateur et d'un corrélateur. Les mesures ont été effectuées dans les mêmes conditions expérimentales que pour l'ITC à l'exception de la concentration en biopolymères qui a été réduite au dixième afin d'éviter la saturation au niveau du détecteur.

Des cuvettes verticales de 10 mm de trajet optique ont été utilisées comme cellules de mesure. Les mesures ont été effectuées à un angle de diffusion de 173° et à une température de 25°C . Les fonctions d'autocorrélation ont été analysées par l'algorithme d'analyse CONTIN (modèle de calcul intégré dans le logiciel Malvern) permettant de déterminer la distribution des coefficients de diffusion translationnelle (D_T). Le coefficient de diffusion D_T ($\text{m}^2.\text{s}^{-1}$) est relié au rayon hydrodynamique (R_h) des particules qui diffusent selon la relation de Stokes-Einstein:

$$D_T = k_B T / 6\pi\eta R_h$$

avec η la viscosité du solvant (Pa.s) et $k_B T$ l'énergie thermique. Les résultats obtenus par l'algorithme CONTIN permettent de déterminer les distributions de R_h et l'amplitude respective de chaque population de particules.

2.2.2. Mobilité électrophorétique

Les mesures de mobilité électrophorétique des particules formées lors de la titration de la dispersion de BLG par les dispersions de GAQ ou de GA à pH 4,2 ont été réalisées sur un Nanosizer ZS (HPPS 5001, Malvern Instruments, Angleterre) équipé d'un faisceau laser de type He/Ne (puissance 4 mW) de longueur d'onde 633 nm. Les mesures de mobilité électrophorétique sont alors effectuées par Electrophorèse Laser Doppler (ELD). Le principe de l'ELD est de provoquer la migration des particules d'un échantillon contenue dans la cellule de mesure en appliquant une tension alternative avec deux électrodes. Les particules sont en mouvement dans un réseau d'interférences généré par le croisement des deux faisceaux laser. La vitesse des particules est ainsi évaluée par mesure de fluctuation temporelle de l'intensité diffusée par la particule en mouvement. La mobilité

électrophorétique est calculée à partir de la vitesse des particules en appliquant la théorie de von Smoluchowski modifiée par Henry (Hunter, 1986) selon l'équation :

$$\mu_E = v / E$$

où v est la vitesse des particules ($\mu\text{m.s}^{-1}$), E le champ électrique appliqué par unité de longueur (V.cm^{-1}) et μ_E la mobilité électrophorétique ($\mu\text{m.cm.s}^{-1}.\text{V}^{-1}$, abrégé dans la suite du texte par e.m.u. pour unité de mesure électrophorétique). L'appareil a d'abord été étalonné avec une solution standard DTS005 de latex (potentiel Zêta de -50 mV). Les mesures ont été effectuées à une température de 25°C.

La mobilité électrophorétique d'une particule est considérée comme sa vitesse par unité de champ électrique. Elle est convertie en valeur de potentiel zêta en la multipliant par un facteur dépendant de la permittivité et de la nature du milieu, comme cela est décrit par l'équation Henry:

$$\zeta = \frac{3\eta f(\kappa a)}{2\varepsilon} \mu_E$$

où ε est la permittivité, η la viscosité du milieu de dispersion, $f(\kappa a)$ est une fonction liée à la proportion entre la taille (a) caractéristique du système et la longueur de Debye ($1/\kappa$) (Kimura et al., 2002).

2.2.3. Mesure de la turbidité

Un spectrophotomètre Ultrospec 4000 UV/Visible (Pharmacia Biotech, Angleterre) a été utilisé pour suivre l'évolution de la turbidité lors de la titration de la dispersion de BLG par les dispersions de GAQ ou de GA à une longueur d'onde de 633 nm. Les échantillons ont été placés dans des cuvettes en plastique de 10 mm de trajet optique. Les mesures ont été effectuées à 25°C et à pH 4,2. La turbidité a été calculée suivant :

$$\tau = (-1/L) \ln(I_0/I_t)$$

avec L le trajet optique (cm), I_t l'intensité lumineuse transmise et I_0 l'intensité lumineuse incidente.

2.2.4. Microscopie optique

Un microscope à épi-fluorescence (Leica DMRB, Wetzlar, Germany) a été utilisé pour étudier les changements structuraux dans les mélanges BLG/GA et BLG/GAQ lors de la titration d'une dispersion de BLG à 4,5% (p/p) par des dispersions de GA ou de GAQ à 1,5% (p/p) à 25°C et pH 4,2. Le microscope était relié à une caméra CCD (Kappa opto-electronics GmbH, Allemagne) contrôlé par un logiciel d'acquisition d'image (Kappa ImageBase 2.5). Un échantillon de 10 μ l a été prélevé dans les mélanges à différents ratios molaires et mis entre lame et lamelle et des micrographies ont été prises à un agrandissement de $\times 40$. Le contraste et la luminosité des images ont été traités à l'aide d'un logiciel de traitement d'images ImageJ v1.4.

2.2.5. Spectroscopie Infra-Rouge à Transformée de Fourier

La structure secondaire de la BLG (2 % p/p) durant la titration par la GA (6 % p/p) ou la GAQ (6 % p/p) a été étudiée par spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier (FTIR) utilisé dans la configuration d'atténuation totale de réflectance (ATR), qui est bien adaptée aux échantillons liquides.

Les mesures ont été effectuées à 25 °C avec un spectromètre Bruker Tensor 27 (Bruker, Karlsruhe, Allemagne) équipé d'une cellule optique en cristal (en ZnSe) Bio-ATR II et d'un détecteur MCT (mercure-cadmium-tellure) refroidi à l'azote liquide (Bruker, Karlsruhe, Allemagne). Pour chaque spectre (témoins et échantillons), 128 scans ont été collectés entre

4000 et 500 cm^{-1} avec une résolution de 4 cm^{-1} et une vitesse de balayage de 20 kHz. Le traitement des données a été effectué en utilisant le logiciel OPUS (Bruker, Karlsruhe, Allemagne). Les spectres d'absorption brutes ont été lissés au moyen d'une fonction Savitsky-Golay à neuf points. Une correction élastique de la ligne de base a été appliquée aux spectres ainsi que la soustraction du spectre du solvant, les spectres ont ensuite été coupés entre 1720 et 1580 cm^{-1} puis normalisés.

La quantification de l'effet de la titration de la BLG par la GA et la GAQ sur la structure secondaire de la protéine a été étudiée par déconvolution de la bande amide I par calcul de la dérivée seconde du signal d'absorbance et par l'ajustement (fit) des courbes obtenues. Le pourcentage de chaque composant de la structure secondaire (feuillets- β , structure en hélice- α , coudes β et structure désordonnée) a été déterminée comme suit (Ngarize *et al.*, 2004) :

$$\% \text{ en structures secondaire} = \frac{\text{aire de la structure secondaire}}{\text{aire de la bande amide I}}$$

3. Résultats et discussion

3.1. Taille et distribution de taille des particules

Les mesures par DLS ont données des informations sur l'évolution du diamètre hydrodynamique lors de la titration de la BLG par la GA et la GAQ (Figures 4.1 et 4.2). Le D_h de BLG, de GA et de GAQ a été déterminé à pH 4,2 et 25 ° C avant la titration (résultats non présentés). La dispersion de BLG est caractérisée par un seul pic monodisperse avec un diamètre hydrodynamique de 4,8 nm. Des valeurs similaires de D_h ont été précédemment mesurées (Renard, 1994 ; Schmitt *et al.*, 2000 ; Schmitt *et al.*, 2005). Schmitt *et al.*, (2000 ; 2005) ont montré que cela était représentatif de l'équilibre entre les formes monomériques et dimériques de la BLG, la différence de diamètre hydrodynamique entre ces deux espèces

étant trop faible pour permettre de les discriminer. L'échantillon de GA a révélé la présence de macromolécules polydisperses. Ceci est principalement dû à la nature complexe de la gomme qui est composée de différentes fractions moléculaires (Renard *et al.*, 2006). Bien que la polydispersité implique de considérer les résultats de DLS avec prudence, le diamètre hydrodynamique moyen mesuré était autour de 30 à 40 nm. Ces résultats sont comparables avec les valeurs rapportées par (Renard *et al.*, 2006). Concernant la GAQ, les mesures du D_h à pH 4,2 ont donné des valeurs tournant autour de 250 nm. Les mêmes résultats ont été obtenus dans le chapitre II.

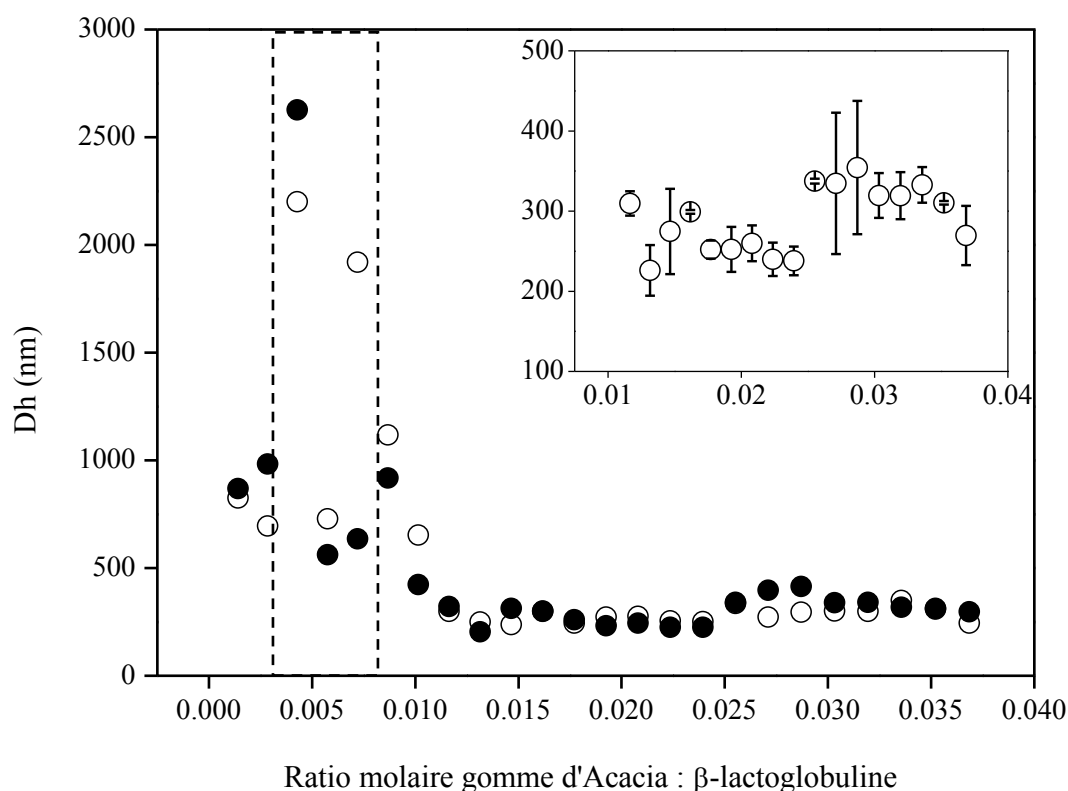


Figure 4.1 : Evolution du diamètre hydrodynamique (D_h) des particules en fonction du ratio molaire gomme d'Acacia : β -lactoglobuline durant la titration d'une dispersion de β -lactoglobuline (0,06 % p/p) par une dispersion de gomme d'Acacia (0,18 % p/p) à pH 4,2 et à 25 °C. (●) et (○) représentent deux expériences indépendantes.

Les D_h des particules obtenues par la titration de la BLG par la GA sont représentés par la figure 4.1. A la première injection de la GA dans la BLG, à un ratio molaire GA:BLG

de 0,001, le D_h des complexes était d'environ ~ 850 nm. Ce diamètre ne varie pas après la seconde injection, mais augmente considérablement après la troisième, les valeurs de D_h atteignant plus de 2000 nm (Figure 4.1). Les valeurs de D_h obtenues entre la troisième et la cinquième injection étaient peu fiables (non répétables), ce qui explique la présence d'un rectangle en pointillés intégré à la figure 4.1. Ces résultats montrent la présence, dans cette gamme de ratios molaires, d'un phénomène de structuration important. La stabilité et la polydispersité en taille des particules obtenues sont donc très variables.

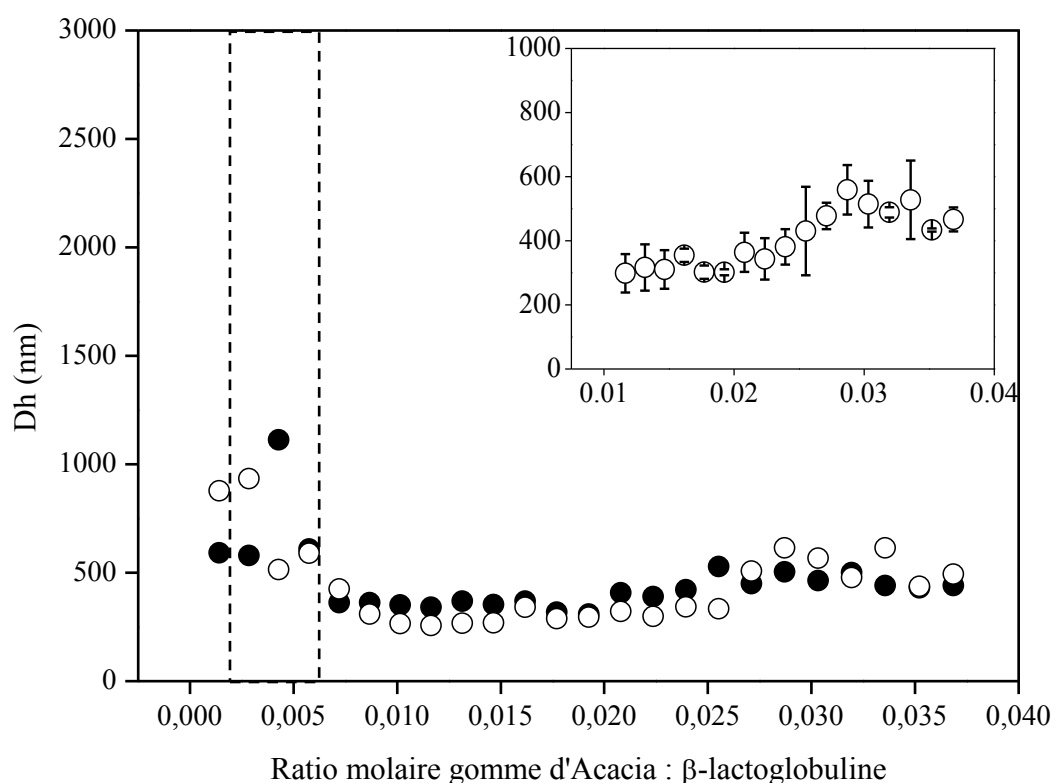


Figure 4.2 : Evolution du diamètre hydrodynamique (D_h) des particules en fonction du ratio molaire gomme d'Acacia : β -lactoglobuline durant la titration d'une dispersion de β -lactoglobuline (0,06 % p/p) par une dispersion de gomme d'Acacia-quercétine (0,18 % p/p) à pH 4,2 et à 25 °C. (●) et (○) représentent deux expériences indépendantes.

Pour des ratios molaires GA:BLG plus élevés, le D_h diminue jusqu'à atteindre une valeur minimale de ~ 250 nm après neuf-dix injections. Cette valeur reste plus ou moins

stable jusqu'à la seizième injection ($GA:BLG = 0,024$), puis augmente jusqu'à atteindre un nouveau plateau (300-340 nm) qui se prolonge jusqu'à la fin de l'expérience de titration (voir la figure insérée dans la figure 4.1). Il est également important de noter qu'une seconde population (minoritaire) de particules (10-30% de l'intensité totale) est apparue après la quatrième injection, avec une D_h supérieur à 5000 nm (résultats non présentés). Cette valeur de D_h diminue lors de la titration de la BLG par la GA jusqu'à, approximativement, la seizième injection puis on observe la disparition de la seconde population de particules.

L'évolution du D_h des particules obtenues par titration de la BLG par la GAQ est présentée par la figure 4.2. Le même phénomène de structuration importante des complexes (vu précédemment pour le système BLG/GA) a été observé pour les complexes BLG-GAQ (rectangle en pointillés intégré à la figure 4.2). Contrairement au système BLG-GA, ce phénomène apparaît dès le début de la titration de la BLG par la GAQ, entre la première et la troisième injection (ratio molaire GAQ:BLG allant de 0,001 à 0,006). Les valeurs de D_h des complexes variaient de 500 à 1200 nm et restent donc inférieurs à celles obtenues pour le système BLG/GA. Pour des ratios molaires GAQ:BLG plus élevés, le D_h diminue jusqu'à atteindre une valeur minimale de ~ 300 nm après huit-neuf injections. Cette valeur reste plus ou moins stable jusqu'à la quinzième injection ($GAQ:BLG = 0,022$), puis augmente jusqu'à atteindre un nouveau plateau (400-550 nm) qui se prolonge jusqu'à la fin de l'expérience de titration (voir la figure insérée dans la figure 4.2). Une seconde population (minoritaire) de particules (5-25% de l'intensité totale) est apparue après la cinquième injection, avec un D_h supérieur à 5000 nm (résultats non présentés). Cette valeur de D_h diminue lors de la titration de la BLG par la GAQ jusqu'à, approximativement, la douzième injection puis on observe la disparition de la seconde population de particules comme vu précédemment pour le système BLG/GA.

Les résultats de mesure de taille indiquent qu'un phénomène de structuration assez important a lieu en tout début de titration, cependant, il se produit de manière plus précoce dans le système BLG/GAQ. Il est important de noter que la conséquence de la complexation de la BLG avec la GA ou la GAQ est l'homogénéisation progressive de la taille des particules dans les dispersions mixtes. En effet, de D_h des complexes reste stable (de 300 à 340 nm pour le système BLG/GA et de 400 à 550 nm pour le système BLG/GAQ) jusqu'à la fin de l'expérience de titrage et la deuxième population de particules disparaît.

3.2. Mobilité électrophorétique

Comme la formation de complexes entre protéines et polysaccharides est principalement contrôlée par des interactions électrostatiques, des mesures de mobilité électrophorétique (μ_E) ont été utilisées afin d'extraire des informations sur l'évolution des charges de surface totale de BLG, GA, GAQ et des complexes BLG-GA, BLG-GAQ en fonction du ratio molaire (Figures 4.3 et 4.4). Les mesures ont été déterminées à pH 4,2 et à 25 °C. Les valeurs absolues de la mobilité électrophorétique ont été jugées nettement plus faibles pour la BLG que pour la GA et la GAQ. La μ_E du témoin BLG est positive et reste relativement stable (entre $0,320 \pm 0,015$ et $0,420 \pm 0,018 \mu\text{m.cm.s}^{-1}.\text{v}^{-1}$) durant la titration. La variation de la μ_E de la BLG dépend de l'équilibre de charges entre les groupements amines et carboxyliques portés par la protéine. Les mobilités électrophorétiques des témoins GA et GAQ sont négatives dans le pH considéré (pH 4,2) et pendant toute la durée de la titration (Figures 4.3 et 4.4), en raison de la présence de résidus d'acide glucuronique dans la gomme ($\text{pK}_a < 3,6$). Il est aussi intéressant de noter que la μ_E augmente légèrement avec l'augmentation de la concentration en GA et en GAQ. Elle passe de $-1,47 \pm 0,21$ à $-1,97 \pm 0,12 \mu\text{m.cm.s}^{-1}.\text{v}^{-1}$ pour la GA et de $-1,51 \pm 0,07$ à $-2,30 \pm 0,28 \mu\text{m.cm.s}^{-1}.\text{v}^{-1}$ pour la GAQ. Les valeurs obtenues dans le cas de la

GAQ sont plus élevées et confirment les résultats de densité de charges obtenus dans le chapitre II (§ 2.3).

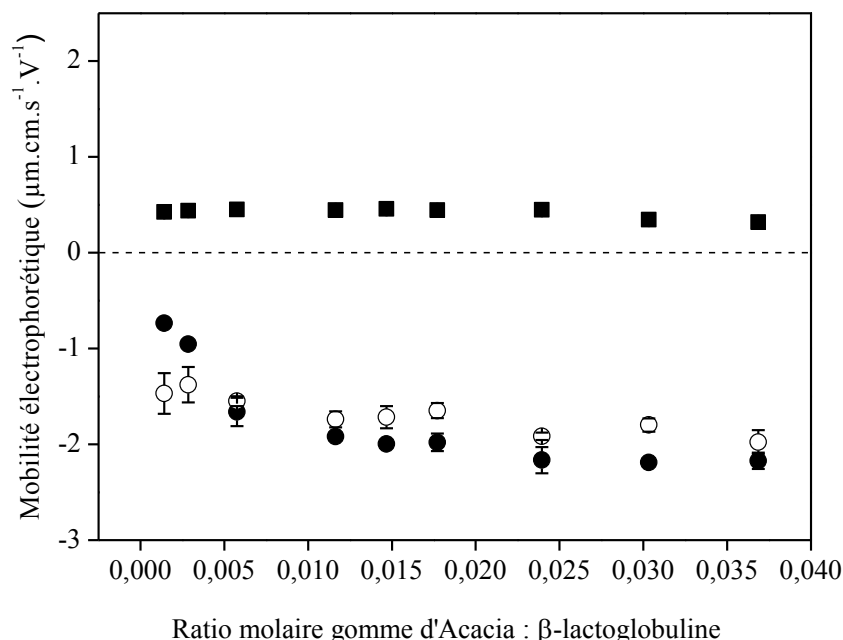


Figure 4.3 : Evolution de la mobilité électrophorétique en fonction du ratio molaire gomme d'Acacia : β -lactoglobuline durant la titration d'une dispersion de β -lactoglobuline (0,06 % p/p) par une dispersion de gomme d'Acacia (0,18 % p/p) (●), la titration d'une dispersion de β -lactoglobuline (0,06 % p/p) par de l'eau (■) et la titration de l'eau par une dispersion de gomme d'Acacia (0,18 % p/p) (○) à pH 4,2 et à 25 °C.

Les valeurs de la μ_E des mélanges obtenues lors de la titration de la BLG par la GA et par la GAQ sont également négatives (Figures 4.3 et 4.4). Les deux systèmes (BLG/GA et BLG/GAQ) suivent la même évolution en fonction du ratio massique. La μ_E augmente jusqu'à l'injection huit (ratio molaire: 0,012). A partir de ce point, elle affiche une évolution similaire à celles de la GA ou de la GAQ seules, ce qui indique une bonne accessibilité du polysaccharide au solvant. Cela met en évidence la contribution majeure de la GA à l'évolution de la μ_E des mélanges. Cette dernière reste stable jusqu'à la douzième injection (ratio molaire: 0,017), puis augmente et reste constante jusqu'à la fin de l'expérience de titration.

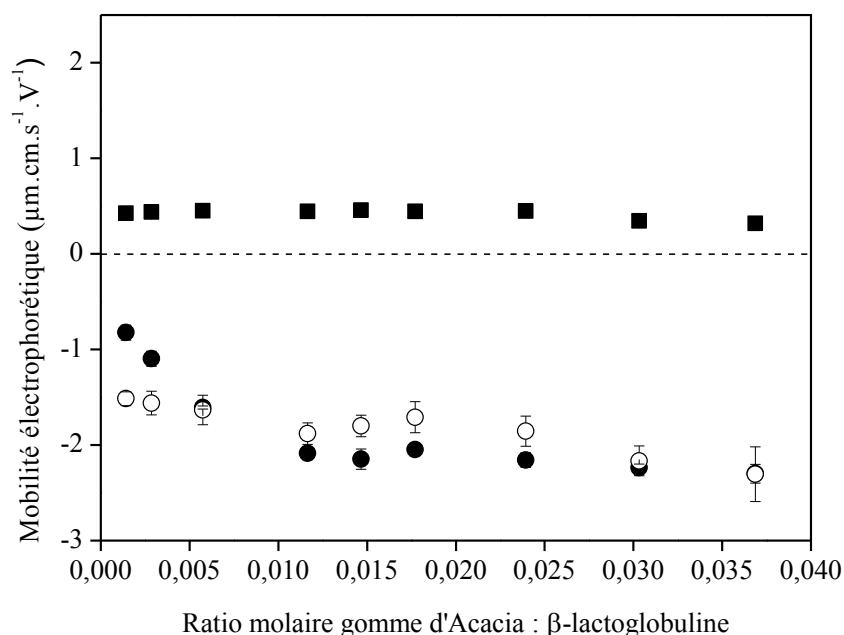


Figure 4.4 : Evolution de la mobilité électrophorétique en fonction du ratio molaire gomme d'Acacia : β -lactoglobuline durant la titration d'une dispersion de β -lactoglobuline (0,06 % p/p) par une dispersion de gomme d'Acacia-quercétine (0,18 % p/p) (●), la titration d'une dispersion de β -lactoglobuline (0,06 % p/p) par de l'eau (■) et la titration de l'eau par une dispersion de gomme d'Acacia-quercétine (0,18 % p/p) (○) à pH 4,2 et à 25 °C.

L'effet marquant dans les résultats obtenus est le fait que l'évolution de la μ_E soit plutôt contrôlée par la BLG en début de titration (ratios molaires bas) et par la GA à des ratios molaires plus élevés. Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par Schmitt *et al.*, (2000). La charge totale nette des complexes BLG-GA et BLG-GAQ est négative et une augmentation de ces charges négatives a été observée. L'explication la plus probable concerne la dissociation des agrégats de la GA conduisant à la mise à nu de groupes masqués chargés négativement. Mekhloufi, *et al.*, (2005) ont indiqué que le gain de charges négatives dans les complexes BLG-GA est entièrement attribuable à des changements chimiques ou structuraux affectant la GA. Les interactions entre biopolymères de charges opposées, à la suite de fortes interactions attractives, donnent généralement lieu à une séparation de phase et à la formation de complexes agrégés neutres. Néanmoins, Xia, *et al.*, (1993) ont constaté que la neutralité à

la séparation de phase n'était pas une règle générale. Elle n'a été observée que pour les complexes formés par des protéines et des polymères polycationiques. Pour les systèmes protéines-polymères polyanionique, la séparation de phase se produite pour des complexes ayant une charge totale négative. Aucune explication n'a été fournie et des résultats similaires ont été observés par Mekhloufi *et al.*, (2005).

Il est important de noter que les données de mobilité électrophorétique ne reflètent que les propriétés de surface d'une partie peu profonde de la couche de charges fixes. Certains (Sanchez *et al.*, 2002) ont indiqué que la gomme Arabique est en forme de pelote à pH 4,2 possédant une couche perméable aux ions au niveau de la surface extérieure exposée au milieu continu (Rutten *et al.*, 2002 ; Bai *et al.*, 2005). C'est une caractéristique liée aux particules molles. La BLG est une protéine globulaire compacte d'un diamètre hydrodynamique d'environ 4,8 nm avec une valeur absolue de mobilité électrophorétique inférieur à celle de la GA. Ce résultat pourrait être lié à la faible charge de la BLG. Dans cette situation, la protéine doit s'insérer profondément dans la structure du polysaccharide pour qu'il y ait une forte interaction avec la BLG, en favorisant un chevauchement dans la structure de la GA. Cela pourrait aider à expliquer pourquoi la mobilité électrophorétique des complexes BLG-GA et BLG-GAQ ne converge pas vers zéro.

3.3. Evolution micro-structurale des complexes BLG/GA et BLG/GAQ

Les mesures de turbidité (τ) ont été effectuées en suivant la même procédure de titration que pour l'ITC afin de recueillir plus d'informations sur les points de transition durant la complexation entre la BLG et la GA ou la BLG et la GAQ. Une dispersion de GA ou de GAQ a été ajoutée progressivement à une dispersion de BLG et la turbidité (τ), liée à la formation de complexes, a été mesurée (Figure 5.4).

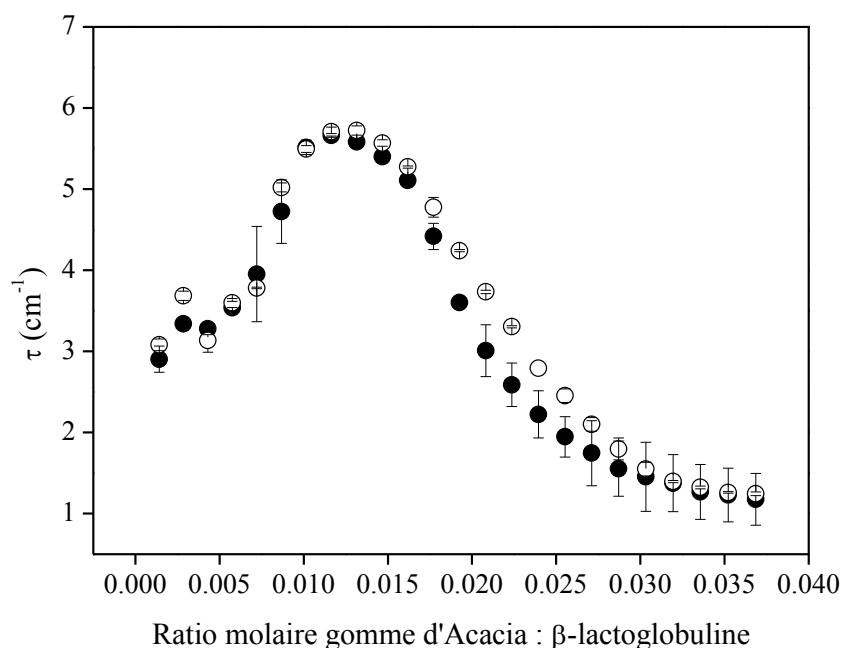


Figure 4.5 : Evolution de la turbidité (τ) en fonction du ratio molaire gomme d'Acacia : β -lactoglobuline durant la titration d'une dispersion de β -lactoglobuline (0,06 % p/p) par une dispersion de gomme d'Acacia (0,18 % p/p) (●) et la titration d'une dispersion de β -lactoglobuline (0,06 % p/p) par une dispersion de gomme d'Acacia-quercétine (0,18 % p/p) (○) à pH 4,2 et à 25 °C.

Les résultats ont montré une dépendance du phénomène de complexation avec le ratio molaire et une évolution similaire de la turbidité dans les deux systèmes. Le premier ajout de la GA ou de la GAQ dans la BLG induit une légère augmentation de la turbidité. Cette dernière reste plus ou moins constante jusqu'à la quatrième injection (ratio molaire : 0,0057). Nous avons vu précédemment qu'à cette étape de la titration, le D_h les particules formées augmente considérablement. Cela peut indiquer que certains objets disparaissent et que d'autres apparaissent lors de la complexation. A partir de cette étape, la turbidité augmente jusqu'à atteindre un maximum après environ huit à neuf injections. La polydispersité des particules augmente et il y a apparition d'une seconde population de particules a été montrée par DLS. Ces résultats suggèrent une augmentation de la quantité de matériaux particuliers insolubles formés dans les solutions. Une nouvelle augmentation de la concentration en GA

ou en GAQ cause une diminution de la turbidité. Cela était dû à une diminution de taille des particules (résultats montrés par DLS). Un excès de GA dans les mélanges provoque une augmentation du nombre de charges négatives induisant une plus grande répulsion électrostatique et stérique. Cela conduit à une diminution de l'aggrégation et à la formation de particules de plus petite taille.

La microscopie optique a été utilisée en parallèle pour suivre les changements de microstructures des complexes formés en fonction du ratio molaire. Afin d'observer distinctement la structure et la taille des particules, des milieux plus concentrés (1,5% de BLG et 4,5% GA et GAQ) ont dû être utilisés pour mieux comprendre le mécanisme de complexation. Des micrographies ont été prises à différents ratios molaires durant la titration de la dispersion de BLG par une dispersion de GA ou de GAQ à pH 4,2 et à 25 ° C (Figures 4.6 et 4.7). Une première observation des micrographies, révèle que les microstructures des dispersions obtenues sont très différentes et un effet très net du ratio molaire a été observé.

A de faibles ratios molaires et pour les deux systèmes étudiés (Figures 4.6a, 4.6b, 4.6c et 4.7a, 4.7b, 4.7c), l'apparition d'un grand nombre de coacervats, induits par séparation de phase, est observée. Ils ont un diamètre apparent (d_a) variant approximativement de 1 à 10 μm . Cependant, à un ratio molaire de 0,0086 les micrographies (Figures 4.6c et 4.7c) montrent l'apparition de plus gros coacervats après coalescence ($d_a \sim 10\text{-}25 \mu\text{m}$). La polydispersité et l'hétérogénéité du milieu augmentent avec l'élévation du ratio molaire de mélange. Le nombre de coacervats vésiculaires augmente considérablement et un nombre beaucoup plus élevé de coacervats apparait pour un ratio molaire de 0,0146 (Figures 4.6d et 4.7d). Ce nombre est beaucoup plus important dans le système BLG/GA (Figure 4.6d) que dans le système BLG/GAQ (Figure 4.7d).

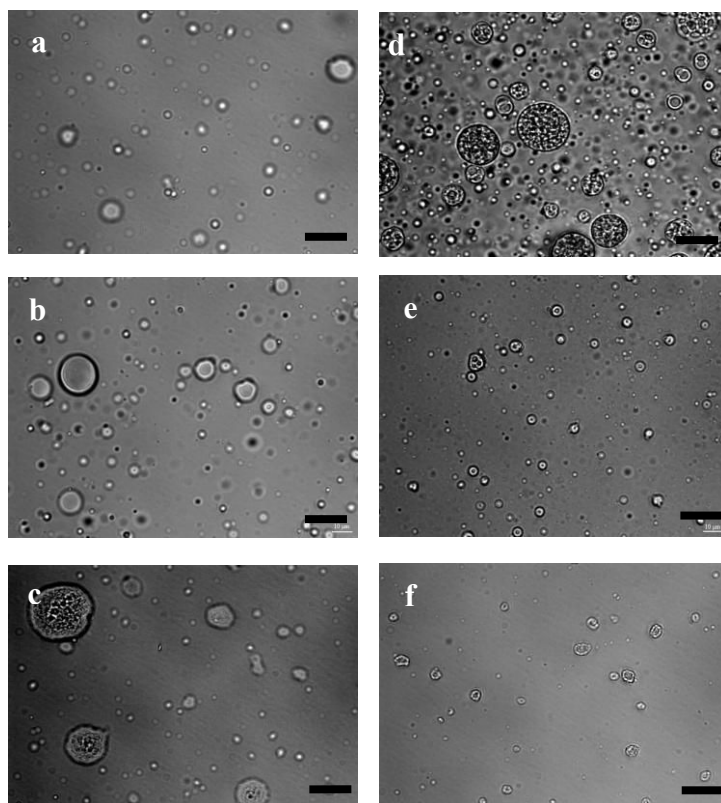


Figure 4.6 : Micrographies obtenues par microscopie optique durant la titration d'une dispersion de β -lactoglobuline (0,06 % p/p) par une dispersion de gomme d'Acacia (0,18 % p/p) à pH 4,2, 25 °C et à différents ratios molaires gomme d'Acacia : β -lactoglobuline. (a) 0,0014 ; (b) 0,0043 ; (c) 0,0086 ; (d) 0,0146 ; (e) 0,0271 ; (f) 0,0335. La barre représente 20 μ m. Le contraste et la luminosité ont été traité par le logiciel ImageJ (version 1.40)

Un certain nombre de coacervats vésiculaires fusionnent partiellement ou entièrement, favorisant la formation de structures multivésiculaires. Il s'agit de vacuoles de solvant pouvant résulter de la coalescence des coacervats de petite taille, constitués eux même d'une vacuole de solvant (Burgess, 1990). Pour les grands coacervats, deux types de morphologies ont été observés. La première consiste en une grande vacuole centrale ($d_a \sim 1-4 \mu$ m), entourée par la phase contenant à son tour de plus petites vacuoles. L'autre type de morphologie est un ensemble homogène de vacuoles. Dans le cas des complexes BLG-GAQ (Figure 4.7d), les gros coacervats formés paraissent moins denses et moins structurés. Ceci est dû au fait qu'ils paraissent être constitués d'un nombre, moins élevé, de coacervats vésiculaires.

A la fin du processus de titration, la principale caractéristique structurale des systèmes est la présence dominante de coacervats de petite taille ($d_a \sim 1-5 \mu\text{m}$) et la disparition presque complète des grandes vésicules (Figures 4.6e, 4.6f, 4.7e et 4.7d).

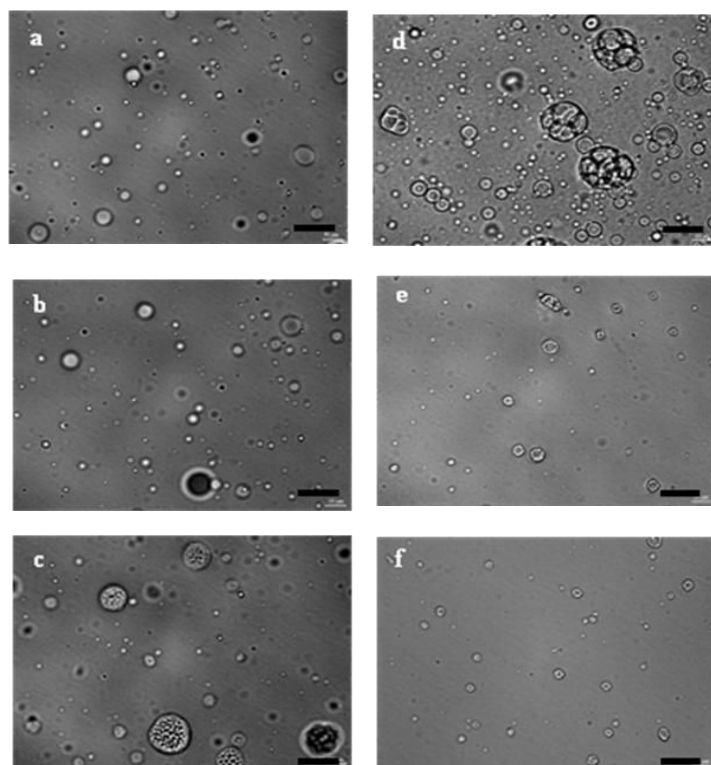


Figure 4.7 : Micrographies obtenues par microscopie optique durant la titration d'une dispersion de β -lactoglobuline (0,06 % p/p) par une dispersion de gomme d'Acacia-quercétine (0,18 % p/p) à pH 4,2, 25 °C et à différents ratios molaires gomme d'Acacia : β -lactoglobuline. (a) 0,0014 ; (b) 0,0043 ; (c) 0,0086 ; (d) 0,0146 ; (e) 0,0271 ; (f) 0,0335. La barre représente 20 μm . Le contraste et la luminosité ont été traité par le logiciel ImageJ (version 1.40)

3.4. Spectroscopie Infra-Rouge à Transformée de Fourier. Détermination des changements de la structure secondaire de la BLG durant la titration par la GA ou la GAQ

La structure secondaire de la BLG (2 % p/p) durant la titration par la GA (6 % p/p) ou la GAQ (6 % p/p) a été étudiée par spectroscopie infra-Rouge à Transformée de Fourier (FTIR) en mode ATR. Pour cela, les variations d'absorbance de la bande amide I ont été étudiées.

Cette méthode analytique est basée sur l'absorption d'une onde électromagnétique par un dipôle oscillant (groupement chimique). Les vibrations atomiques des molécules ont lieu dans le domaine infrarouge du spectre électromagnétique, mais la fréquence d'absorption dépend du type de liaison chimique et de son mode de vibration (Lefèvre et Subirade, 2001). Pour les protéines, le signal infrarouge est principalement dû aux vibrations des groupements amides de la chaîne polypeptidique, chaque groupement donnant lieu à des modes de vibration spécifiques. L'étude de la structure secondaire de la protéine est principalement basée sur l'intérêt porté à la vibration d'élongation de C = O des groupements amides dans la région amide I du spectre, comprise entre 1600 et 1700 cm^{-1} (Casal *et al.*, 1988 ; Boye *et al.*, 1996 ; Lefèvre et Subirade, 1999). La spectroscopie infrarouge est très sensible à l'arrangement spatial de ce type de liaison. Elle permet donc de distinguer une structure en hélices- α d'une structure en feuillets- β , qui est le type de structure secondaire pour laquelle cette méthode est la plus sensible (Byler et Susi, 1986 ; Surewicz et Mantsch, 1988).

Dans la figure 4.8 est présentée la région de la bande amide I du spectre d'absorbance infra-rouge de la BLG seule (Figure 4.8.a) et après titration par la GA (Figure 4.8.b) et la GAQ (Figure 4.8.c) à pH 4,2 et à 25 °C.

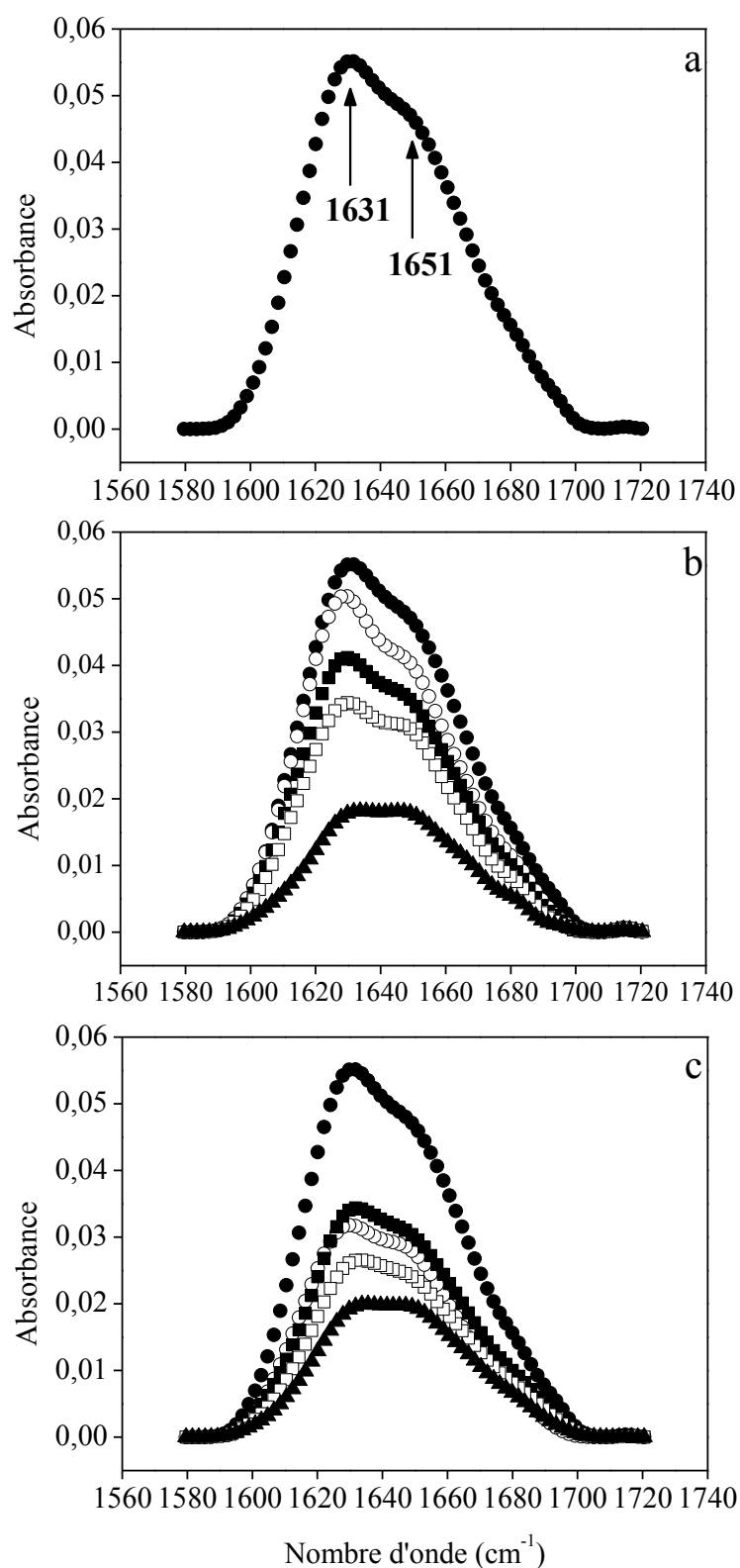


Figure 4.8 : Spectres infrarouge à transformée de Fourier de la région amide I d'une dispersion de β -lactoglobuline (2 % p/p) seule (a) et après titration par une dispersion de gomme d'Acacia (6 %, p/p) (b) ou une dispersion de gomme d'Acacia-quercétine (6 %, p/p) (c) à pH 4,2, à 25 °C et à différents ratios molaires : 0,00 (●), 0,0057 (○), 0,0131 (■), 0,0146 (□) et 0,030 (▲).

L'analyse de cette région du spectre fait apparaître un large pic caractérisé par un maximum à 1631 cm^{-1} et un léger épaulement à 1651 cm^{-1} . Ces caractéristiques spectrales sont indicatives d'une structure secondaire composée principalement de feuillets- β conjugués à la présence d'hélices- α (Bandekar, 1992 ; Hamada *et al.*, 1995 ; Molinari *et al.*, 1996 ; Dong *et al.*, 1998).

Pour les mélanges BLG/GA (Figure 4.8.b) et BLG/GAQ (Figure 4.8.c), une diminution de l'absorbance a lieu durant la titration. Cette observation est le résultat d'une diminution de la concentration en BLG du milieu.

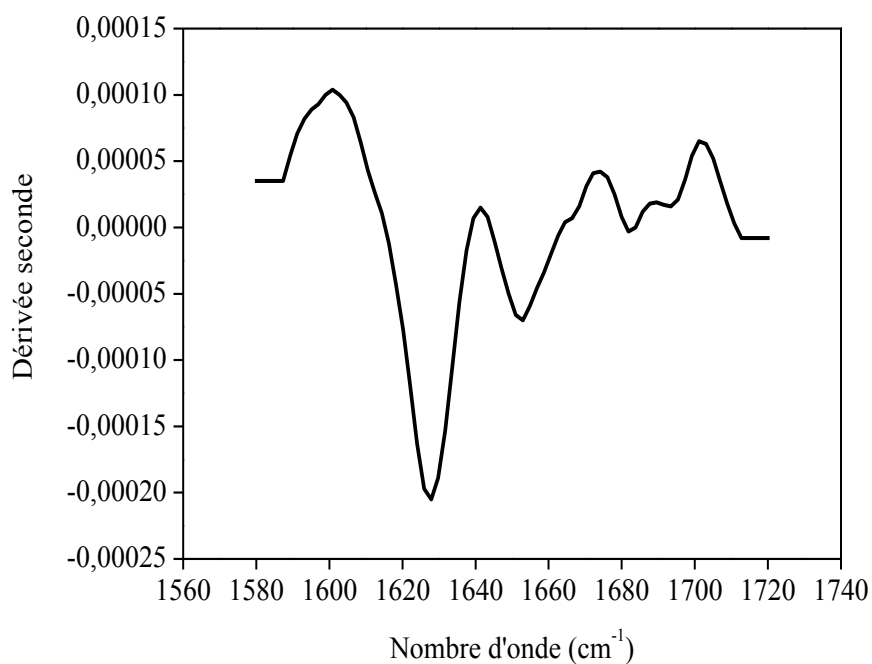


Figure 4.9 : Spectre de la dérivée seconde de la bande amide I d'une dispersion de β -lactoglobuline (2 % p/p) à pH 4,2 et à 25 °C.

Dans cette étude, l'analyse quantitative de la structure secondaire de la BLG seule, ou après complexation avec la GA et la GAQ a été déterminée à partir de la forme de la bande amide I. Une déconvolution spectrale par calcul de la dérivée seconde du signal d'absorbance ainsi que l'ajustement (fit) des courbes obtenues ont été utilisés pour augmenter la résolution

spectrale afin d'estimer le nombre, la position et l'aire des bandes correspondants aux différents constituants de la bande amide I.

La dérivée seconde des spectres (Figure 4.9) a été calculée à partir de la bande amide I. Le calcul de la dérivée seconde des spectres permet d'augmenter la résolution spectrale par la détection des épaulements présents lors de recouvrements spectraux importants entre les bandes. Les fréquences des bandes obtenues ont été utilisées afin de définir la position des pics pendant l'ajustement des courbes (Figure 4.10). Neuf pics ont été obtenus et leur identification a été effectuée en se basant sur de précédentes études spectroscopiques de la

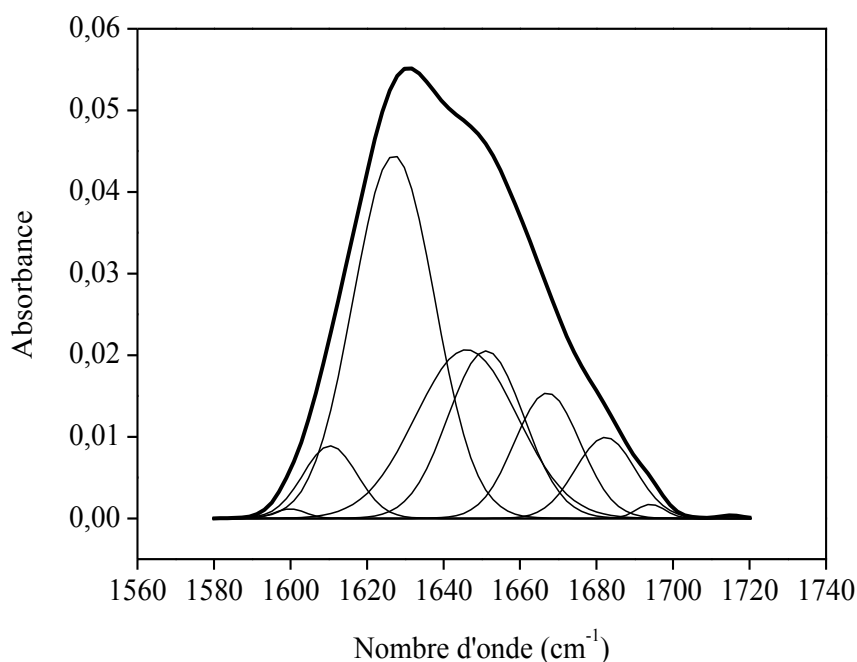


Figure 4.10 : Ajustement de la courbe de la région amide I de la β -lactoglobuline seule.

BLG (Allain *et al.*, 1999 ; Panick *et al.*, 1999 ; Kang *et al.*, 2004 ; Schmitt *et al.*, 2009). Les feuillets- β , de 1615 à 1640 cm^{-1} ; les structures désordonnées, de 1640 à 1650 cm^{-1} ; les hélices- α , de 1650 à 1658 cm^{-1} et les coudes- β , de 1660 à 1700 cm^{-1} . Les spectres ont été, par la suite, ajustés avec une fonction Gaussienne. Les pourcentages des différentes structures secondaires ont été calculés par l'intégration des aires des pics correspondants. Le tableau 4.1

montre la composition de la structure secondaire de la BLG seule et après interaction avec la GA ou la GAQ à différents ratios molaires.

Les résultats obtenus pour la composition de la bande amide I de la BLG seule (Tableau 4.1) sont en accord avec ceux trouvés dans la littérature (Panick *et al.*, 1999 ; Ngarize *et al.*, 2004).

Tableau 4.1 : Pourcentage en structure secondaire de la β -lactoglobuline avant et après interaction avec la gomme d'Acacia et la gomme d'Acacia-quercétine

		% en structures secondaires			
	Ratio molaire	Feuillets- β	Hélices- α	Coudes- β	Structures désordonnées
BLG seule		50,0	16,5	11,3	22,2
GA/BLG	0,0057	50,2	17,0	11,3	21,5
	0,0131	47,4	10,0	15,0	28,0
	0,0146	42,7	4,5	14,7	38,1
	0,030	40,4	3,5	8,0	48,1
GAQ/BLG	0,0057	51,0	16,0	10,0	23,0
	0,0131	39,0	13,3	12,4	35,3
	0,0146	32,0	5,0	11,0	52,0
	0,030	31,2	5,0	13,7	51,1

La BLG est composée de 50 % de feuillets- β , de 16 % d'hélices- α , de 11 % de coudes- β et de 22 % de structures désordonnées. Lors de sa complexation avec la GA et la GAQ, la composition de la structure secondaire de la BLG diminue avec l'augmentation du ratio molaire (Tableau 4.1). Ce phénomène est associé à une augmentation du pourcentage en structures désordonnées qui atteint 50 % en fin de titration, alors que la composition en coudes- β évolue légèrement durant tout le processus de titration.

A la lumière de ces résultats, il apparaît que l'interaction entre la BLG et la GA induit une modification de la structure en hélices- α de la BLG. Des résultats similaires ont été observés par Schmitt (2000) et révèlent une forte diminution de la longueur de l'hélice- α externe de la BLG après interaction avec la GA. L'explication la plus probable réside dans la localisation et la composition de l'hélices- α de la BLG. Cette dernière est localisée à l'extérieur du calice hydrophobe, et donc totalement exposée au solvant (Hambling, 1992 ; Sawyer *et al.*, 1998). La déprotonation des résidus basiques contenus dans l'hélice- α entraîne la formation d'une zone de forte densité de charges positives. Comme cette région est située en périphérie de la BLG, elle est facilement accessible à la GA, et par conséquent, les interactions électrostatiques sont favorisées.

Les résultats en infra-rouge montrent aussi des pertes importantes en feuillets- β indiquant un changement de l'environnement des acides aminés hydrophobes de la BLG. La structure secondaire de la BLG est majoritaire en feuillets- β . Les neuf brins présents forment une cavité centrale hydrophobe en forme de calice (Papiz *et al.*, 1986 ; Molinari *et al.*, 1996 ; Sawyer *et al.*, 1998). Les pertes en feuillets- β étaient beaucoup plus importantes dans le système BLG/GAQ. Cela est donc dû à l'augmentation de la concentration en quercétine et traduit la formation, entre la protéine et le flavonoïde, de complexes stabilisés par des associations hydrophobes. Des résultats similaires ont été observés lors d'une étude des interactions entre le sérum albumine humain et un flavonoïde, la morine (Xie *et al.*, 2006). De précédentes recherches sur les interactions protéines-polyphénols (Oh *et al.*, 1980 ; Siebert *et al.*, 1996 ; Baxter *et al.*, 1997) suggèrent que les protéines et les polyphénols forment des complexes stabilisés par des associations hydrophobes et des liens hydrogène. Une réduction significative du pourcentage en structures régulières (hélices- α et feuillets- β), ainsi qu'une augmentation du pourcentage en structures désordonnées indiquent que les groupes hydroxyles actifs du flavonoïde interagissent avec le groupement C=O ou N-H de la chaîne

polypeptidique principale de la protéine durant le processus de complexation. Il y a formation de liens hydrogène conduisant à une réduction des hélices- α et des feuillets- β (Xie *et al.*, 2006).

4. Conclusion

Les transitions structurales, à différentes échelles d'observation, lors de la complexation entre la BLG et la GA ou la GAQ ont été déterminées à pH 4,2 et à 25 °C par diffusion dynamique de la lumière, mesures de turbidité et de mobilité électrophorétique, microscopie et par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier.

Les résultats obtenus montrent que le processus de complexation est largement influencé par le ratio molaire GA : BLG. Le diamètre hydrodynamique, la mobilité électrophorétique et la turbidité augmentent en fonction du ratio molaire suggérant une augmentation du nombre de complexes insolubles formés. Le ratio molaire pour lequel les différents paramètres étudiés atteignent des valeurs maximales, correspond à celui pour lequel l'énergie de liaison libérée (Chapitre III), s'inverse et passe d'un état exothermique à un état endothermique. Les mesures du diamètre hydrodynamique enregistrent des valeurs minimales, la turbidité subit une forte accélération et la polydispersité du milieu augmente avec l'apparition d'une seconde population de particules. Cela révèle une instabilité du système causée par l'agrégation ou la coalescence des particules formées. Les résultats infrarouge montrent qu'il y a, dans cette gamme de ratios molaires, un gain en structures secondaires impliquant un phénomène de structuration assez important. Il y a un processus de condensation durant la coacervation ayant pour conséquence un arrangement structurel des molécules de protéines sous une forme compacte dans les coacervats, c'est-à-dire localement

plus concentrées. Il y a augmentation de la concentration locale de la BLG pouvant induire des changements de conformation, plus particulièrement une augmentation de l'agrégation.

A des concentrations plus élevées en GA, la turbidité des milieux diminue traduisant une réduction de la taille ou de la fraction volumique des particules. La mobilité électrophorétique des mélanges montre la même évolution que celle de la GA seule. Ces résultats indiquent qu'il y a une bonne accessibilité du polysaccharide au solvant et montrent la majeure contribution de la GA à la mobilité électrophorétique des mélanges. Des résultats similaires ont été enregistrés pour le système BLG/GAQ et le même phénomène de structuration des complexes a été observé. Cependant, ces événements arrivent de manière plus précoce, à des ratios molaires moins élevés, en comparaison avec le système BLG/GA.

Les mesures par FTIR montrent une perte en structures secondaires et indiquent que la région composant l'hélice- α externe de la protéine est spécifiquement modifiée lors de la complexation avec la GA. L'explication de ces résultats réside dans la forte densité de charges positives caractérisant la structure en hélice- α au pH étudié, ce qui favorise l'interaction avec la GA anionique.

Les résultats en infra-rouge montrent des pertes beaucoup plus importantes en feuillets- β indiquant un changement de l'environnement des acides aminés hydrophobes de la BLG. Cela traduit une formation, entre la protéine et le flavonoïde, de complexes stabilisés par des associations hydrophobes.

Références bibliographiques

- Akinchina, A., et Linse, P., 2002. Monte Carlo simulations of polyion-macroion complexes: 1. Equal absolute polyion and macroion charges. *Macromolecules*, 35, 5183-5193.
- Allain, A.F., Paquin, P., et Subirade, M., 1999. Relationships between conformation of β -lactoglobulin in solution and gel states as revealed by attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy. *International Journal of Biological Macromolecules*, 26, 337-344.
- Bai, G., Nichifor, M., Lopes, A., et Bastos, M., 2005. Thermodynamic characterization of the interaction behavior of a hydrophobically modified polyelectrolyte and oppositely charged surfactants in aqueous solution: Effect of surfactant alkyl chain length. *Journal of Physical Chemistry B*, 109, 518-525.
- Bandekar, J., 1992. Amide modes and protein conformation. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1120, 123-143.
- Baxter, N.J., Lilley, T.H., Haslam, E., et Williamson, M.P., 1997. Multiple interactions between polyphenols and a salivary proline-rich protein repeat result in complexation and precipitation. *Biochemistry*, 36, 5566-5577.
- Boye, J.I., Ismail, A.A., et Alli, I., 1996. Effects of physicochemical factors on the secondary structure of β -lactoglobulin. *Journal of Dairy Research*, 63, 97-109.
- Burgess, D.J., 1990. Practical analysis of complex coacervate systems. *Journal of Colloid and Interface Science*, 140, 227-238.
- Byler, D.M., et Susi, H., 1986. Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra. *Biopolymers*, 25, 469-487.
- Carlsson, F., Malmsten, M., et Linse, P., 2003. Protein-polyelectrolyte cluster formation and redissolution: A Monte Carlo study. *Journal of the American Chemical Society*, 125, 3140-3149.
- Casal, H.L., Kohler, U., et Mantsch, H.H., 1988. Structural and conformational changes of β -lactoglobulin B: An infrared spectroscopic study of the effect of pH and temperature. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 957, 11-20.
- Czarnik-Matusiewicz, B., Murayama, K., Wu, Y., et Ozaki, Y., 2000. Two-dimensional attenuated total reflection/infrared correlation spectroscopy of adsorption-induced and concentration-dependent spectral variations of β -lactoglobulin in aqueous solutions. *Journal of Physical Chemistry B*, 104, 7803-7811.

- Dong, A., Matsuura, J., Manning, M.C., et Carpenter, J.F., 1998. Intermolecular β -sheet results from trifluoroethanol-induced nonnative α -helical structure in β -sheet predominant proteins: Infrared and circular dichroism spectroscopic study. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 355, 275-281.
- Dubin, P.L., et Davis, D.D., 1984. Quasi-elastic light scattering of polyelectrolyte-micelle complexes. *Macromolecules*, 17, 1294-1296.
- Dubin, P.L., et Murrell, J.M., 1988. Size distribution of complexes formed between poly(dimethyldiallylammonium chloride) and bovine serum albumin. *Macromolecules*, 21, 2291-2293.
- Hamada, D., Kuroda, Y., Tanaka, T., et Goto, Y., 1995. High helical propensity of the peptide fragments derived from β -lactoglobulin, a predominantly β -sheet protein. *Journal of Molecular Biology*, 254, 737-746.
- Hambling, S.G., 1992. β -lactoglobulin, dans: P. F. Fox, (Ed.), *Advanced Dairy Chemistry*, Elsevier Science Publisher Ltd: Londres.
- Hunter, R.J., 1986. Transport properties of suspensions. Dans Hunter, R.J. (Eds), p. 449-536, *Foundations of Colloid Science*.
- Kaibara, K., Okazaki, T., Bohidar, H.B., et Dubin, P.L., 2000. pH-Induced Coacervation in Complexes of Bovine Serum Albumin and Cationic Polyelectrolytes. *Biomacromolecules*, 1, 100-107.
- Kang, J., Liu, Y., Xie, M.-X., Li, S., Jiang, M., et Wang, Y.-D., 2004. Interactions of human serum albumin with chlorogenic acid and ferulic acid. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1674, 205-214.
- Kimura, K., Takashima, S., et Ohshima, H., 2002. Molecular approach to the surface potential estimate of thiolate-modified gold nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry B*, 106, 7260-7266.
- Lefèvre, T., et Subirade, M., 1999. Structural and interaction properties of β -lactoglobulin as studied by FTIR spectroscopy. *International Journal of Food Science and Technology*, 34, 419-428.
- Lefèvre, T., et Subirade, M., 2001. Molecular structure and interaction of biopolymers as viewed by Fourier transform infrared spectroscopy: Model studies on β -lactoglobulin. *Food Hydrocolloids*, 15, 365-376.
- Leisner, D., et Imae, T., 2003. Interpolyelectrolyte complex and coacervate formation of poly(glutamic acid) with a dendrimer studied by light scattering and SAXS. *Journal of Physical Chemistry B*, 107, 8078-8087.

- Mattison, K.W., Brittain, I.J., et Dubin, P.L., 1995. Protein-polyelectrolyte phase boundaries. *Biotechnology Progress*, 11, 632-637.
- Molinari, H., Ragona, L., Varani, L., Musco, G., Consonni, R., Zetta, L., et Monaco, H.L., 1996. Partially folded structure of monomeric bovine β -lactoglobulin. *FEBS Letters*, 381, 237-243.
- Ngarize, S., Herman, H., Adams, A., et Howell, N., 2004. Comparison of changes in the secondary structure of unheated, heated, and high-pressure-treated β -lactoglobulin and ovalbumin proteins using Fourier transform Raman spectroscopy and self-deconvolution. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 6470-6477.
- Oh, H.I., Hoff, J.E., Armstrong, G.S., et Haff, L.A., 1980. Hydrophobic interaction in tannin-protein complexes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28, 394-398.
- Panick, G., Malessa, R., et Winter, R., 1999. Differences between the pressure- and temperature-induced denaturation and aggregation of β -lactoglobulin A, B, and AB monitored by FT-IR spectroscopy and small-angle X-ray scattering. *Biochemistry*, 38, 6512-6519.
- Papiz, M.Z., Sawyer, L., et Eliopoulos, E.E., 1986. The structure of β -lactoglobulin and its similarity to plasma retinol-binding protein. *Nature*, 324, 383-385.
- Park, J.M., Muhoberac, B.B., Dubin, P.L., et Xia, J., 1992. Effects of protein charge heterogeneity in protein-polyelectrolyte complexation. *Macromolecules*, 25, 290-295.
- Renard, D., 1994. Etude de l'agrégation et de la gélification des protéines globulaires: application à la betalactoglobuline, Thèse de doctorat de l'Université de Nantes, Nantes.
- Renard, D., Lavenant-Gourgeon, L., Ralet, M.C., et Sanchez, C., 2006. Acacia senegal Gum: Continuum of Molecular Species Differing by Their Protein to Sugar Ratio, Molecular Weight, and Charges. *Biomacromolecules*, 7, 2637-2649.
- Rutten, A.A.C.M., Bouwman, W.G., et van der Leeden, M.C., 2002. [beta]-Lactoglobulin as an ideal random polymer coil. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 210, 243-252.
- Sawyer, L., Brownlow, S., Polikarpov, I., et Wu, S.Y., 1998. β -lactoglobulin: Structural studies, biological clues. *International Dairy Journal*, 8, 65-72.
- Schmitt, C., Sanchez, C., Despond, S., Renard, D., Thomas, F., et Hardy, J., 2000. Effect of protein aggregates on the complex coacervation between [beta]-lactoglobulin and acacia gum at pH 4.2. *Food Hydrocolloids*, 14, 403-413.

- Schmitt, C., Palma Da Silva, T., Rami-Shojaei, C.B.S., Frossard, P., Kolodziejczyk, E., et Leser, M.E., 2005. Effect of time on the interfacial and foaming properties of β -lactoglobulin/acacia gum electrostatic complexes and coacervates at pH 4.2. *Langmuir*, 21, 7786-7795.
- Schmitt, C., Bovay, C., Vuilliamenet, A.M., Rouvet, M., Bovetto, L., Barbar, R., et Sanchez, C., 2009. Multiscale characterization of individualized β -lactoglobulin microgels formed upon heat treatment under narrow pH range conditions. *Langmuir*, 25, 7899-7909.
- Siebert, K.J., Carrasco, A., et Lynn, P.Y., 1996. Formation of Protein-Polyphenol Haze in Beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 1997-2005.
- Skepö, M., et Linse, P., 2003. Complexation, phase separation, and redissolution in polyelectrolyte - Macroion solutions. *Macromolecules*, 36, 508-519.
- Surewicz, W.K., et Mantsch, H.H., 1988. New insight into protein secondary structure from resolution-enhanced infrared spectra. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 952, 115-130.
- Weinbreck, F., de Vries, R., Schrooyen, P., et de Kruif, C.G., 2003. Complex Coacervation of Whey Proteins and Gum Arabic. *Biomacromolecules*, 4, 293-303.
- Weinbreck, F., Rollema, H.S., Tromp, R.H., et deKruif, C.G., 2004. Diffusivity of Whey Protein and Gum Arabic in Their Coacervates. *Langmuir*, 20, 6389-6395.
- Xia, J., Dubin, P.L., et Dautzenberg, H., 1993a. Light scattering, electrophoresis, and turbidimetry studies of bovine serum albumin-poly(dimethyldiallylammonium chloride) complex. *Langmuir*, 9, 2015-2019.
- Xia, J., Dubin, P.L., Kim, Y., Muhoberac, B.B., et Klimkowski, V.J., 1993b. Electrophoretic and quasi-elastic light scattering of soluble protein-polyelectrolyte complexes. *Journal of Physical Chemistry*, 97, 4528-4534.
- Xie, M.X., Long, M., Liu, Y., Qin, C., et Wang, Y.D., 2006. Characterization of the interaction between human serum albumin and morin. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1760, 1184-1191.

Conclusion générale

Les principaux objectifs de cette thèse étaient d'étudier les mécanismes d'interaction et d'assemblage entre les flavonoïdes et des complexes protéines-polysaccharides et d'améliorer nos connaissances sur les assemblages protéines-polysaccharides, en particulier d'un point de vue thermodynamique. Notre stratégie a tout d'abord été de se limiter à étudier un seul flavonoïde, la quercétine, et de choisir comme biopolymères le système BLG/GA, largement étudié dans mon laboratoire d'accueil. De plus, nous avons exclusivement travaillé en milieu aqueux, à 25 °C et à pH 4,2.

Dans ce travail, nous avons utilisé des outils adéquats et complémentaires pour la caractérisation des complexes étudiés. Nous avons ainsi pu mettre au point des assemblages gomme d'Acacia-quercétine (GAQ) de petite taille (245 nm) par homogénéisation dynamique à haute pression. Leur structure peut être assimilée à un assemblage « cœur-couronne » possédant les caractéristiques de particules molles avec une densité de charges négatives semblable à celle de la gomme seule. Ces assemblages sont composés d'un regroupement de particules de GA autour d'un cœur de quercétine. Nous avons pu étudier les caractéristiques thermodynamiques d'interaction entre la BLG et la GA, qui se sont avérées semblables en présence de la quercétine. L'utilisation de méthodes complémentaires nous a permis d'identifier les différentes entités structurales formées durant la complexation entre la GA et la BLG ou la GAQ et la BLG ainsi que l'effet produit sur la structure secondaire de la BLG.

Les résultats obtenus ont montré que lors de la complexation entre la BLG et la GA, il y a d'abord formation de complexes intrapolymériques solubles conduite par une enthalpie favorable en raison essentiellement d'interactions électrostatiques. Cette étape était suivie par

une agrégation en complexes interpolymériques insolubles, résultat de paramètres enthalpiques défavorables et de paramètres entropiques favorables. Les résultats ont aussi montré que la présence de la quercétine n'influe pas sur les propriétés thermodynamiques d'interaction. Cependant, les complexes formés ont une stoechiométrie, une constante d'association et une enthalpie dégagée moins élevées lors de la première étape de complexation. En effet un déplacement de l'isotherme de liaison vers des valeurs de ratio molaires moins élevées a été observé. Ce dernier serait attribué à une densité de charges négatives, portées par la GAQ, plus élevée.

En modulant la température du milieu, nous avons également montré l'implication d'interactions autres qu'électrostatiques. Les valeurs positives de ΔC_p obtenue lors de la première étape de complexation sont la signature d'interactions électrostatiques et de contributions liées aux liaisons hydrogène. Un changement dans l'accessibilité du solvant à la surface durant le second processus de complexation est le premier facteur contribuant aux valeurs négatives de ΔC_p obtenues indiquant une contribution de liaisons hydrophobes au processus de complexation. La séquence exothermique-endothémique observée suggère d'autres contributions énergétiques telles que la libération d'ions et de molécules d'eau, des changements de conformation des biopolymères et / ou agrégation de complexes protéine-polysaccharide formés. La prévalence des contributions enthalpiques ou entropiques au cours des deux étapes a été fortement tributaire de la température.

La détermination des transitions structurales à différentes échelles lors de la complexation entre la BLG et la GA a montré une dépendance du phénomène de complexation au ratio molaire. Les résultats de turbidité et de mesure de taille des particules par DLS indiquent qu'un phénomène de structuration assez important a lieu lors de la première phase de complexation et suggèrent une augmentation du nombre de complexes

insolubles formés. L'apparition d'un nombre croissant d'objets a été confirmée par microscopie optique. Cette technique a aussi montrée une augmentation de la polydispersité et de l'hétérogénéité du milieu avec l'élévation du ratio molaire de mélange. Les résultats de la seconde phase de complexation indiquent que le D_h des particules formées diminue avant d'atteindre des valeurs stables. Une homogénéisation progressive de la taille des particules dans les dispersions mixtes est donc observée.

Les mesures par FTIR montrent une perte en structures secondaires et indiquent que la région composant l'hélice- α externe de la protéine est spécifiquement modifiée lors de la complexation avec la GA. L'explication de ces résultats réside dans la forte densité de charges positives caractérisant la structure en hélice- α au pH étudié, ce qui favorise l'interaction avec la GA anionique.

Des résultats similaires ont été enregistrés en présence de la quercétine. Cependant, ces événements arrivent de manière plus précoce, à des ratios molaires moins élevés, en comparaison avec le système BLG/GA. Les résultats en infra-rouge montrent des pertes beaucoup plus importantes en feuillets- β indiquant un changement de l'environnement des acides aminés hydrophobes de la BLG. Cela traduit une formation, entre la protéine et le flavonoïde, de complexes stabilisés par des associations hydrophobes.

Perspectives de cette étude

Malgré les difficultés rencontrées pour attribuer un modèle thermodynamique au système BLG/GA, l'ITC s'est avérée fructueuse pour étudier les caractéristiques thermodynamiques d'interaction. Comme les résultats ont montré que la complexation entre BLG et GA n'était pas seulement le résultat d'interactions électrostatiques, étudier l'influence

de certains paramètres comme la force ionique est à envisager afin de mettre en évidence les différents types d'interactions mises en jeu.

L'amélioration des techniques microscopiques utilisée est aussi à envisager. En effet, l'utilisation de la microscopie confocale à balayage laser permettrait d'améliorer les observations effectuées par microscopie optique. Cette technique nous permettrait aussi de localiser les deux biopolymères ainsi que le flavonoïde.

Cette étude a été effectuée dans le cadre d'un projet plus vaste, visant à développer de nouveaux ingrédients fonctionnels combinant des flavonoïdes et des AGPI (acides gras polyinsaturés). Le principal objectif de ce projet est d'incorporer des flavonoïdes et de l'acide docosahexaénoïque (DHA) dans des nano-microparticules à base de biopolymères, stables et fonctionnelles. La structuration des flavonoïdes et du DHA est de nature à améliorer leur solubilité en solvant aqueux et leur stabilité, mais également leur biodisponibilité en facilitant leur transport à travers les membranes cellulaires.

L'approche méthodologique concernant l'étude à venir consiste à introduire le DHA dans les complexes β -lactoglobuline/gomme d'Acacia/quercétine en formant, dans un premier temps, des complexes primaires avec la BLG. Dans un second temps, des complexes supramoléculaires nanoscopiques sont formés en faisant interagir la GA et la BLG. Chaque étape nécessitera une étude fondamentale des mécanismes de structuration, incluant la quantification thermodynamique des interactions, le mécanisme dynamique d'interaction, la structure à différentes échelles, incluant celle des biopolymères, et la stabilité structurale et chimique des nanostructures, en relation avec leurs propriétés de surface, l'interaction avec le solvant, et l'environnement physico-chimique (pH, température, force ionique).

En parallèle, une approche de méso-modélisation sera mise en place afin de mieux comprendre les mécanismes de formation et la structure des nanoparticules, en relation avec les paramètres environnementaux (pH, température, force ionique, cisaillement). L'objectif à terme est d'établir les lois physiques multi-échelles permettant la structuration des systèmes à l'échelle mésoscopique, échelle pertinente pour décrire les principales propriétés des systèmes colloïdaux. Cette modélisation permettra ensuite de mieux piloter la formation, la structure et les propriétés d'usage des systèmes nano-structurés.

D'un point de vue application, il serait intéressant d'étudier les propriétés fonctionnelles des différentes entités structurales formées lors de la complexation entre la β -lactoglobuline et la gomme d'Acacia avec ou sans la présence de quercétine suivant les conditions expérimentales, en vue de leur utilisation dans différentes applications industrielles.

Etude des mécanismes de structuration d'assemblages β -lactoglobuline-gomme d'Acacia en présence d'un flavonoïde, la quercétine

Les flavonoïdes sont des ingrédients prometteurs pour différentes applications alimentaires et non alimentaires, grâce à leurs propriétés antioxydantes et biologiques. Cependant, la formulation de ces molécules est difficile à réaliser en raison de leur faible solubilité dans la plupart des solvants. Afin de remédier à cette difficulté, l'approche suivie dans cette étude est l'incorporation des flavonoïdes dans des particules à base de biopolymères (protéine-polysaccharide), stables et fonctionnelles. Le principal objectif de cette thèse était d'acquérir des connaissances à différentes échelles d'étude sur les mécanismes d'interaction et d'assemblage entre un flavonoïde, la quercétine, et deux biopolymères, la β -lactoglobuline (BLG) et la gomme d'Acacia (AG). Dans une première étape, nous avons pu mettre au point des particules submicroniques (D_h : ~ 250 nm) de gomme d'Acacia-quercétine (GAQ) possédant une structure assimilée à un assemblage « cœur-couronne » et traduisant un comportement correspondant à celui de particules molles. Dans une seconde étape, nous avons étudié les mécanismes d'assemblage des particules de GAQ avec la BLG à pH 4,2 et à 25 °C. Les paramètres thermodynamiques d'interaction ont été déterminés par calorimétrie de titration isotherme (ITC) et montrent des isothermes de liaison caractérisées par une séquence exothermique-endothémique. Les différentes entités structurales formées durant la complexation entre la GA et la BLG ou la GAQ et la BLG ont été caractérisées en utilisant la même approche par titration que pour l'ITC. Enfin, des mesures par spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier (FTIR) ont montré une modification de la structure secondaire de la BLG après interaction avec la GA et la GAQ. D'importantes pertes de structures (hélices- α et feuillets- β), encore plus marquées en présence de quercétine.

Mots-clé: assemblages protéine-polysaccharide, flavonoïde, β -lactoglobuline, gomme d'Acacia, caractérisation thermodynamique, transitions structurales.

Structuration mechanism study of protein-polysaccharide assemblies in presence of flavonoid, quercetin

Flavonoids are promising ingredients in food and non food applications through their antioxidative and biological properties. However, their negligible solubility in most solvent renders problematic technological developments. In order to overcome this drawback, the approach followed in this study was the incorporation of flavonoids in stable and functional particles based on biopolymers (protein-polysaccharide). The main objective of this thesis was to acquire knowledge at different scales to study the mechanisms of interaction and linkage between a flavonoid, quercetin, and two biopolymers, β -lactoglobulin (BLG) and Acacia gum (AG). In a first step, we were able to develop submicronic particles (D_h : ~ 250 nm) of quercetin-Acacia gum (GAQ) based on a core of quercetin and a shell of Acacia gum, reflecting a behavior of soft particles. In a second step, we investigated the assembly mechanisms GAQ with BLG at pH 4.2 and 25 °C. The thermodynamic parameters of interaction were determined by isothermal titration calorimetry (ITC) and show binding isotherm characterized by an exothermic-endothemic sequence. The various structural entities formed during the complexation between GA and BLG or BLG and GAQ were characterized using the same approach as for the ITC titration. Finally, measurements using infra-red Fourier transform (FTIR) showed changes in the secondary structure of BLG after interaction with the GA and the GAQ. There was a significant loss of secondary structures (α -helices and β -sheets), even more pronounced in presence of quercetin.

Keywords: protein-polysaccharide assemblies, flavonoid, β -lactoglobulin, Acacia gum, thermodynamic characterization, structural transitions.

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Monsieur Denis RENARD, Directeur de Recherche, INRA, Nantes

Madame Marie-Hélène MOREL, Directeur de Recherche, INRA-SupAgro-Cirad, Montpellier

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Madame ABERKANE Leïla

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

**"Etude des mécanismes de structuration d'assemblages protéines-polysaccharides en
présence de flavonoïdes"**

NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 54501
VANDŒUVRE CEDEX

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « **Procédés Biotechnologiques et Alimentaires** »

Fait à Vandoeuvre, le 23 septembre 2010

Le Président de l'I.N.P.L.,

F. LAURENT

