

La caséine κ : quel rôle dans la structuration de la micelle de caséines ?

Joëlle Léonil^{a1}, Stéphane Marchin^a, Gwenaëlle Henry^a, Diane Jouanneau^a
et Jean-Luc Putaux^b

^a INRA - Agrocampus, UMR 1253 Science et Technologie du Lait et de l'Œuf, 65 Rue de Saint Brieu, 35042 Rennes Cedex

^b Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales, ICMG-CNRS, BP 53, 38041 Grenoble Cedex 9

Résumé – La micelle de caséines est un composant-clé du lait de par son rôle fonctionnel (digestibilité, apport de calcium, aptitudes technologiques). Malgré son importance, la structure de cet assemblage supramoléculaire n'est toujours pas élucidée. Nous avons utilisé la microscopie électronique, notamment la cryomicroscopie, pour étudier la morphologie et la structure interne de la micelle ainsi que les assemblages formés par l'un des ses constituants, la caséine κ .

1. Introduction

Les micelles de caséines sont élaborées dans la cellule épithéliale mammaire au cours d'un processus compartimenté. Celui-ci est initié dans le réticulum endoplasmique, se poursuit dans l'appareil de Golgi et se termine dans les vésicules de sécrétion où les micelles sont transportées vers la membrane apicale des cellules épithéliales mammaires [1]. Les observations morphologiques indiquent que des structures pré-micellaires semblent déjà exister dans le cis Golgi. Ces micelles sont des colloïdes édifiés à partir de quatre types de caséines (α_{s1} , α_{s2} , β et κ) en interaction avec une fraction minérale dont le composant prédominant est le phosphate de calcium. Elles se présentent sous la forme d'édifices supramoléculaires polydisperses, de 180 nm de diamètre moyen. Cette organisation propre aux caséines confère au lait des propriétés très spécifiques tant sur le plan biologique que technologique. Notre objectif est de comprendre l'organisation et le rôle des caséines au sein de cet assemblage micellaire. Sous forme individuelle, les caséines sont des protéines peu structurées [2] qui ont une forte propension à s'auto-associer et possèdent, pour certaines, comme la caséine κ , l'aptitude à former des fibrilles de type amyloïde [3]. Cette caséine a pourtant un rôle stabilisateur dans la structure micellaire. Ces informations sont à intégrer dans le processus de structuration *in vivo* de la micelle de caséines pour comprendre les règles qui président à son assemblage, sachant que la structure de la micelle n'est toujours pas clairement établie. Dans cette communication, nous présenterons les observations réalisées par microscopie électronique en transmission (TEM) sur des micelles de caséines et illustrerons l'influence des autres caséines sur la fibrillation de la caséine kappa.

2. Observation de la micelle de caséines par cryo-MET

En raison de la susceptibilité de la micelle aux facteurs environnementaux, nous avons utilisé la cryo-MET pour observer la micelle de caséines à l'état natif et modifié. Ces observations ont été réalisées au moyen d'un microscope Philips CM200 'Cryo', à une tension d'accélération de 80 kV. Les images ont été enregistrées sur plaques photographiques Kodak SO163. Afin de mieux comprendre l'organisation des caséines et du phosphate de calcium dans la micelle, les informations morphologiques et structurales ont été complétées par des données de diffusion de la lumière et diffusion des rayons X aux petits et ultra-petits angles (SAXS et USAXS) [4,5].

Les images de cryo-MET montrent que les micelles de caséines présentent une surface irrégulière avec des protubérances (Figure 1a). Selon la taille des objets, cette périphérie est plus ou moins diffuse. La confrontation des images avec les données de diffusion de rayonnements montre que la micelle est constituée d'un réseau hétérogène de caséines dans lequel sont distribués des grains nanométriques ("nanoclusters") de phosphate de calcium (Figure 1b) [6,7].

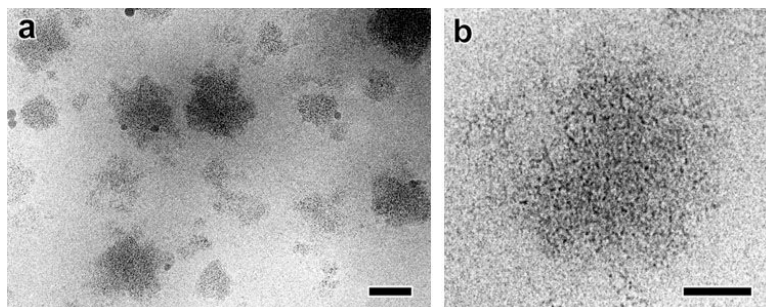


Figure 1 – Micelles de caséines (cryo-MET), en vue générale (a ; barre : 100 nm) et à plus fort grossissement (b ; barre : 50 nm). En b, les points les plus sombres correspondraient aux nanoclusters de phosphate de calcium.

¹ Auteur à contacter : joelle.leonil@rennes.inra.fr – Tél. : 02 23 48 53 40

3. Fibrillation de la caséine κ

Il est généralement admis que la caséine κ est préférentiellement localisée à la périphérie de la micelle, jouant un rôle à la fois de limitation dans la croissance de la micelle et de maintien de celle-ci en suspension dans le lait. Cette protéine possède deux résidus dans sa séquence et a pour caractéristique d'être la seule caséine glycosylée. Lorsque les cystéines sont réduites ou carboxyméthylées, la caséine κ forme des fibrilles de type amyloïde d'une largeur de 12 nm mais dont la longueur varie en fonction des conditions environnementales (pH, force ionique, température) ou de paramètres intrinsèques de la protéine (taux de glycosylation, troncation N-ter). La Figure 2 montre des images de caséines κ carboxyméthylée avant (Figure 2a) et après (Figure 2b) traitement à 37°C et 50°C (Figure 2c). Nous avons également montré que la fibrillation de la caséine κ était inhibée par les autres caséines α_{s1} et β (Figure 3).

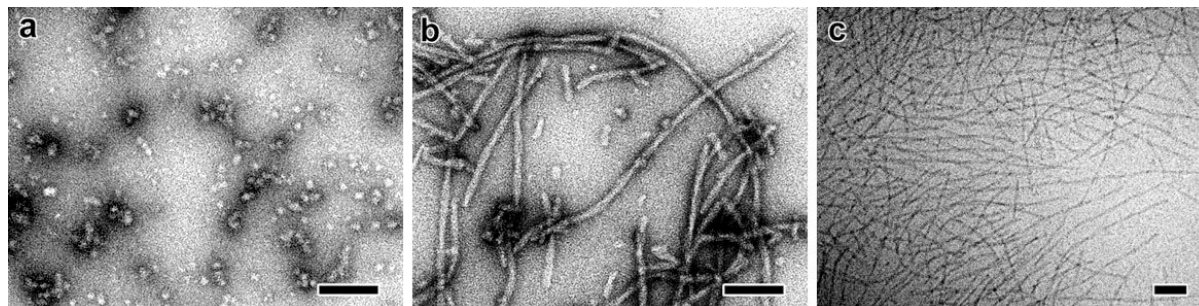


Figure 2 – Fibrillation de la caséine κ carboxyméthylée : a) état initial ; b) après incubation 18 h à 37°C (MET, coloration négative - barre : 100 nm) ; c) après incubation 5 h à 50°C (cryo-MET – barre : 100 nm).

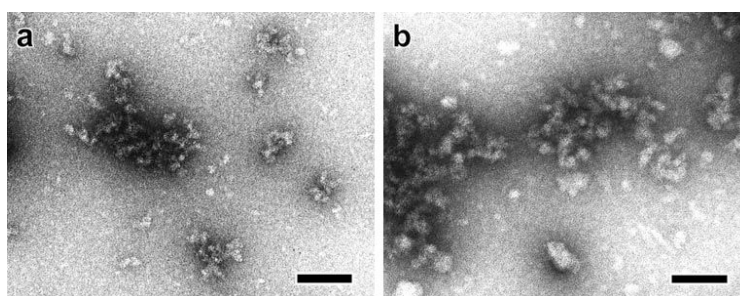


Figure 3 – Inhibition de la fibrillation de la caséine κ carboxyméthylée par les caséines α_{s1} (a) et β (b) à 37°C (MET, coloration négative - barres : 100 nm).

4. Conclusion

Nos résultats suggèrent que les étapes précoces d'interaction entre les caséines définissent la morphologie de l'assemblage. A cet égard, la caséine κ semble jouer un rôle déterminant dans la structuration de l'assemblage, voire même dans sa viabilité cellulaire.

5. Références

- [1] E. Chanat, P. Martin et M. Ollivier-Bousquet, *Alpha (S1)-casein is required for the efficient transport of beta- and kappa-casein from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus of mammary epithelial cells*. J. Cell. Sci. **112** (1999) 3399
- [2] C. D. Syme, E. W. Blanch, C. Holt, R. Jakes, M. Goedert, L. Hecht et L. D. Barron, *A raman optical activity study of rheomorphism in caseins, synucleins and tau: New insight into the structure and behaviour of natively unfolded proteins*. Eur. J. Biochem. **269** (2002) 148-156
- [3] D.C. Thorn, S. Meehan, M. Sunde, A. Rekas, S.L. Gras, C.E MacPhee, C.M. Dobson, M.R. Wilson et J.A. Carver, *Amyloid fibril formation by bovine milk κ -casein and its inhibition by the molecular chaperones α_s - and β -casein*. Biochemistry **44** (2005) 17027-17036
- [4] F. Pignon, G. Belina, T. Narayanan, X. Paubel, A. Magnin et G. Gesan-Guiziu, *Structure and rheological behavior of casein micelle suspensions during ultrafiltration process*. J. Chem. Physics. **121** (2004) 8138
- [5] C.G. De Kruif et C. Holt. *Casein micelle structure, functions and interaction*. Advances in Dairy Chemistry I, Part A. Proteins (2003) 233
- [6] S. Marchin, *Dynamique de la Micelle de Caséines: Caractérisation Structurale*. Thèse de doctorat de l'Agrocampus de Rennes (2007)
- [7] S. Marchin, J.L. Putaux, F. Pignon, J. Léonil, *Effects of the environmental factors on the casein micelle structure studied by cryo-TEM and SAXS/USAXS*. J. Chem. Phys. **126** (2007) 045101