

L'IMAGERIE DE LA MICELLE DE CASÉINE PAR MICROSCOPIE À FORCE ATOMIQUE (AFM)

¹Micleuşanu S., ²Croguennec T., ¹Chirsanova A.

¹Technical University of Moldova, Chisinau, Republic of Moldova

²Science et Technologie du Lait et de l'Œuf (STLO) de l'INRA et Saïd Bouhallab, Rennes, France

Micleuşanu Sanda: mixandra93@gmail.com

Abstract: Milk casein micelles are a natural colloid but it is still unknown their intimate structure. Their structure and stability determine some biological and technological properties of milk such as digestibility or its ability to form yogurt gels or cheese. The atomic force microscopy (AFM) allows to examine the appearance of micelles adsorbed on a solid surface (model for the interface of fat globules), capturing amazing images at the nanometer scale. It was found that the casein micelles are very sensitive to variations in the environmental conditions but also to the adsorption of the particle on a surface such as that used in this study. At a more acid pH, the micelle structure seems less cohesive, due perhaps to the solubilization of a portion of the calcium phosphate.

Mots clés: émulsion, micelles de caséines, microscopie à force atomique (AFM).

Introduction

Les micelles de caséine sont des ingrédients importants pour la nutrition des nouveau-nés et pour la diversification du lait en divers produits transformés, comme les émulsions alimentaires. Au cours du traitement thermique et de la modification des paramètres physico-chimiques du lait, la structure de la micelle varie, influençant ainsi les interactions qui la stabilise et respectivement le produit fini. Des techniques récentes, comme la microscopie à force atomique (AFM) nous permettent d'explorer, à l'échelle du nanomètre, les objets des systèmes alimentaires. Le but de cette recherche était d'obtenir différentes structures protéiques pour faire des observations, par l'AFM, sur l'organisation, la structure et l'aspect des micelles adsorbées sur une surface solide (modèle du globule gras).

Les micelles de caséine sont des particules qui contiennent plus de 75 % des protéines totales du lait. (Schmidt, 1982; Holt, 1992). C'est un colloïde naturel, résultant de l'assemblage de quatre protéines (caséines α S1, α S2, β , κ), de quelques fragments peptidiques (caséine γ) provenant de l'hydrolyse enzymatique de la caséine β par la plasmine et des composants salins dont les deux principaux sont le calcium et le phosphate. La répartition des caséines dans la micelle est inhomogène où la caséine κ est majoritairement positionnée à la périphérie de la micelle et assure sa stabilité. La micelle de caséine se présente sous la forme de particules plus ou moins sphériques de taille variant de 20 à 600 nm avec une moyenne autour de 100 nm, fortement hydratées (Kumosinski et al, 1991) La connaissance de cet agrégat protéique constitue ainsi un fort enjeu pour la maîtrise de la physico-chimie de ces assemblages et ses fonctionnalités.

De nombreuses études ont montré que les mélanges de protéines du lactosérum et de micelles de caséines, particulièrement la β -lactoglobuline et la caséine κ peuvent former des liaisons durant un traitement thermique. La formation d'agrégats purs de protéines du lactosérum est peu probable et la majorité des protéines du lactosérum

dénaturées interagissent avec la caséine κ pour former des agrégats mixtes (Donato et al., 2009). Il est indiqué que suivant les conditions de pH auquel est réalisé le traitement thermique, les agrégats mixtes sont localisés soit à la surface des micelles de caséines soit solubilisés dans la phase solvante (Anema, 2003). Ces réactions peuvent modifier les propriétés physico-chimiques du lait et donc jouer un rôle majeur dans la stabilité des produits laitiers chauffés (Thomson, 2009).

L'objectif principal était donc d'obtenir des micelles de caséines non-réticulées et réticulées par des protéines de lactosérum et de comprendre comment leurs caractéristiques influencent leurs propriétés d'adsorption à une surface modèle. Des micelles individuelles avec un diamètre d'environ ~ 300 nm avec une rugosité nanométrique typique sont facilement distinguées sur les surfaces d'or analysées. Selon les images tridimensionnelles on observe que les micelles ont la forme d'une calotte sphérique suite à leur adsorption sur la surface (Helstad et al. 2007). Du fait que les micelles de caséine présentent un caractère déformable, celles-ci s'étale au moment de l'adsorption sur la surface mais elles conservent le même volume. Ainsi l'AFM a tendance à surestimer légèrement le diamètre des micelles de caséines par rapport au diamètre déterminé en solution en raison de leur étalement lors du dépôt sur la surface d'observation.

Matériels et méthodes

Pour l'ensemble des travaux, on a utilisé le lait natif, écrémé ($\sim 3,3$ % protéines) qu'on a dispersées (40g/L) dans une solution aqueuse de perméat (PUF) (5,6%). Pour une partie des expériences on a utilisé le lait frais écrémé sans modification de la composition en protéine: le rapport micelles de caséines/protéines de lactosérum est 80/20. Pour une seconde série d'expérience, le rapport micelles de caséines/protéines de lactosérum a été modifié (avec du PUF) pour atteindre un rapport micelle de caséine/protéines de lactosérum 40/60, puis dilué trois fois avec du PUF, pour obtenir une concentration proche de celle des laits infantiles (substitut de lait maternel) (protéines 1,1 %).

Le pH des solutions a été ajusté à pH 6.8 ou 6.3 en utilisant HCl 1 M ou NaOH 1 M. Ensuite, les solutions ont été réparties dans une série de tubes de 1 mL. Un tube de chaque série a été placé à 4°C alors que les autres ont été placés dans un bain-marie réglé à 80°C. Puis, après 20 min les tubes ont été enlevés et mis tout de suite dans la glace pour stopper la réaction de dénaturation/agrégation des protéines de lactosérum.

Pour l'analyse par l'AFM, les protéines sont immobilisées sur des plaques recouvertes d'or. Afin de créer un substrat fonctionnel on a préparé une monocouche auto assemblée avec un alcanethiol nommé 11-mercapto-undecanoic acid (11-MUA). Des carrés (1×1 cm²) de verre pulvérisés d'or colloïdal (produit commercial Platypus AU.0500.ALSI), découpées au diamant, ont été collés sur des lames de verre à puits (24h de séchage de la colle en dessiccateur). Après collage, les lames sont immergées dans une solution de 11-MUA (mercaptoundecanoic acid) dissous en éthanol absolu, pendant au moins 24h.

Les micelles de caséines ont été immobilisées par réaction des groupements fonctionnels localisés sur des plaques d'or (or-COO-EDC/NHS), avec les groupements NH₂ des protéines pour former un pont covalent. Brièvement, les lames d'or greffées de COOH sont rincées à l'éthanol puis à l'eau milli-Q (ultra-pure), puis exposées pendant

15-20 min à un mélange contenant 0,4M EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide) et de 0,1M NHS (N-hydroxysuccinimide) solubilisés dans de l'eau milli-Q. L'EDC catalysé par le NHS, permet d'activer les groupements fonctionnels de la plaque d'or pour former spontanément une liaison covalente avec les groupements aminés des protéines. Cette technique a été appliquée conformément au protocole adopté par Ouanezar et al. (2012).

Après la chimie EDC/NHS, les lames sont rincées de nouveau à l'eau milli-Q et exposées aux solutions de protéines pendant ~ 30 minutes. Afin d'éliminer les micelles non immobilisées, les lames sont rincées avec les perméats de même pH que les solutions (par pipetage in-out): avec de PUF (5-6 fois) et avec du SMUF (synthetic milk ultrafiltrate) (2-3 fois). Mises dans des boîtes de Petri, les lames sont déshydratées pendant quelques heures dans un dessiccateur à silice sous vide. Une fois secs, les échantillons sont rincés avec une goutte d'eau milli-Q pour enlever les cristaux de sels provenant du SMUF et ré-séchés avant l'imagerie.

Les images sont obtenues avec le microscope à force atomique MFP-3D-BIO, (Asylum Research, Santa Barbara, USA) en mode contact intermittent ou «tapping» (mode AC), avec la sonde AC240TS. Chaque échantillon a été étudié en choisissant au minimum 5 emplacements différents, et en appliquant différents grossissements: dimensions des images variant de 10 x 10 µm à 1 x 1 µm. La résolution a été fixée à 256 x 256 pixel. Les images sont analysées grâce au logiciel MFP3D. Le logiciel nous a permis de mesurer à la main (pour plus de précision), le diamètre et la hauteur au sommet des objets. A partir de la mesure du diamètre et de la hauteur, on a calculé le volume de la calotte sphérique par:

$$V = \pi/2 \times H \times (H^2 + d^2) \quad (1)$$

Ces données permettent aussi de calculer l'angle de contact de chaque objet micellaire par:

$$\theta = \arccos \times (1 - H/2d) \quad (2)$$

où H est la hauteur et d est le diamètre.

L'angle de contact rend compte de l'aptitude de la micelle à s'étaler à la surface de la lame d'or et d'évaluer ainsi sa rigidité (Helstad et al., 2007). Cependant, ce n'est qu'une approximation et l'étalement pourrait aussi différer selon la densité de pontage et pas selon les propriétés des interfaces.

Résultats et discussions

L'AFM a permis de calculer l'angle de contact et d'obtenir une information en 2 (Fig. 1) ou en 3 dimensions des micelles de caséines (Fig. 2, 3, 4, 5). Sur les figures, la barre positionnée à droite de l'observation microscopique indique la hauteur des micelles.

Suite aux résultats obtenus, dans le lait (rapport CM/PS 80/20), ajusté à pH 6.8 le diamètre des micelles de caséine non réticulées (sans chauffage) est de 385 ± 53 nm. Cette valeur provient de la mesure de 12 micelles de caséine prises au hasard afin d'avoir une image représentative de la surface d'or analysée. Pour toutes les observations, un nombre similaire de micelles de caséine a été mesuré. Le diamètre des

micelles de caséine non réticulées est supérieur à celui des micelles réticulées par les protéines de lactosérum (après chauffage) (238 ± 31 nm).

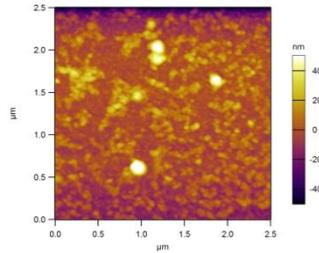


Fig. 1. Image en 2D réalisée par l'AFM. L'immobilisation des micelles de caséines natives (ratio CM/PS 80/20) à pH 6,3.

A l'inverse, les micelles de caséine réticulées à pH 6,8 étaient plus saillantes (hauteur de 94 ± 25 nm) que les micelles non réticulées (hauteur de 57 ± 15 nm) (Fig. 2 a. et b.). Elles présentent donc une moindre aptitude à l'étalement probablement par le renforcement de la cohésion de la micelle. Il se pourrait que la fixation de protéines de lactosérum sur la micelle soit responsable de cette cohésion accrue. Ce résultat est cohérent avec une contraction des micelles et une réduction du volume de celles-ci à pH 6.3. Cela montre que des protéines de lactosérum se sont associées avec la phase colloïdale suite au traitement thermique. Il n'est pas à exclure qu'une partie des caséines, en particulier de la caséine k, soit arrachée par les protéines de lactosérum dénaturées et soit entraînée dans la phase soluble. Cette possibilité rapportée à pH 6.8 (Donato et Guyomarc'h, 2009) pourrait aussi expliquer que le diamètre moyen et le volume des micelles de caséine réticulées soit moindre à pH 6.3.

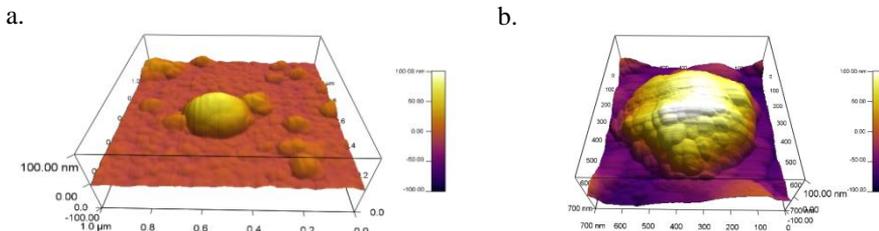


Fig. 2 Images en 3D, réalisées par l'AFM. Micelles de caséines (ratio CM/PS 80/20) à pH 6,8: a. micelle non chauffées (non réticulées); b. micelles traités thermiquement 20 min. à 80°C .

À pH 6,3 la taille des micelles non réticulées semble diminuer par rapport aux micelles non réticulées à pH 6,8 (270 ± 58 nm). Des études (Moitzi et al., 2011; Ouanezar et al., 2012) concordent avec ces constatations; il a été montré que durant une acidification il y a une perte de charge et d'hydratation des micelles de caséine se traduisant par une légère diminution de leur taille par compaction. Ce résultat est en accord avec une diminution du volume des micelles de caséine. Par contre leur hauteur (61 ± 14 nm) n'est pas significativement différente de la hauteur des micelles de caséines non réticulées à pH 6.8. A l'inverse, le volume et le diamètre des micelles réticulées sont supérieurs à pH 6,3 (diamètre de 373 ± 59 nm) que ceux des micelles non réticulées. En revanche la hauteur des micelles de caséine non réticulées et

réticulées est peu différente et l'angle de contact entre la micelle de caséine et la surface est inférieur après réticulation.

Dans un milieu plus acide les micelles réticulées sont significativement plus larges et ont un diamètre plus important que les micelles non réticulées (Fig. 3 a. et b.). Il est évident que les protéines de lactosérum dénaturées s'associent mieux à la micelle de caséine à pH 6,3, formant ainsi une structure de taille plus importante. Ces micelles ont une hauteur similaire mais l'angle de contact des micelles chauffées est plus faible. Les photos (Fig. 3) semblent montrer que les micelles de caséines réticulées sont associées à d'autres entités de plus petites tailles, vraisemblablement des agrégats de protéines sériques. L'angle de contact mesuré serait donc celui des agrégats de protéines de lactosérum micellaires et expliquerait la faible valeur observée.

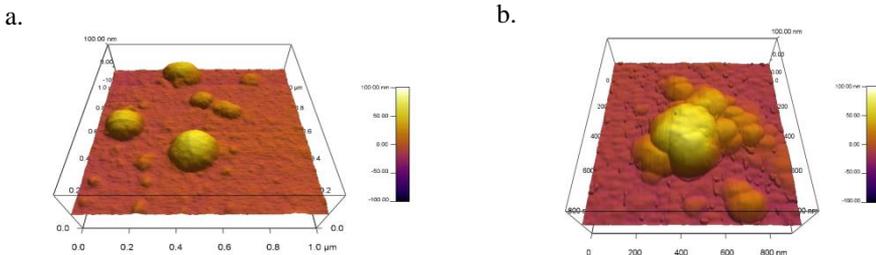


Fig. 3 Images en 3D, réalisées par l'AFM. Micelles de caséines (ratio CM/PS 80/20) à pH 6,3: a. micelle non chauffées (non réticulées); b. micelles traités thermiquement 20 min. à 80°C.

Dans le lait type «humain» dont le rapport CM/PS est 40/60, les caractéristiques dimensionnelles des micelles de caséine sont légèrement différentes du lait dont le rapport CM/PS est 80/20. La taille des micelles non réticulées et réticulées sont entre 200 et 300 nm. Pour un rapport CM/PS 40/60 le traitement thermique induit une augmentation de la taille des micelles de caséine à pH 6,8 et 6,3. À pH 6,8 les micelles réticulées ont une hauteur et un angle de contact plus élevé que les micelles natives traduisant un étalement moindre sur la surface d'or (Figure 4 a. et b.). En augmentant la proportion de protéine de lactosérum, il y vraisemblablement plus de protéines de lactosérum fixées sur la surface des micelles de caséine par le traitement thermique ce qui expliquerait l'augmentation de la taille des micelles de caséine même à pH 6.8.

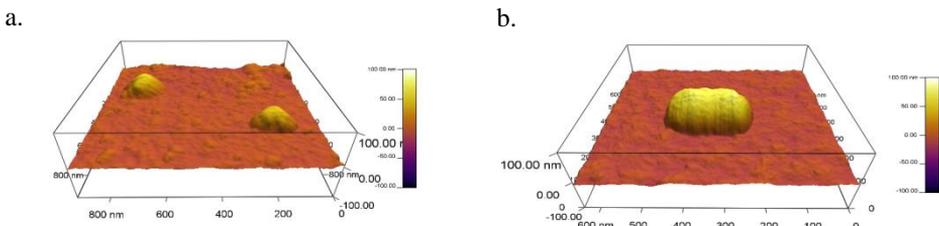


Fig. 4 Images en 3D, réalisées par l'AFM. Micelles de caséines (ratio CM/PS 40/60) à pH 6,8: a. micelle non chauffées (non réticulées); b. micelles traités thermiquement 20 min. à 80°C.

À pH 6,3 traitées ou non traitées thermiquement les micelles s'étaient beaucoup, cependant les micelles réticulées semblent un peu plus larges et plus hautes (Fig. 5 a. et b). Cette tendance est identique à ce qui avait été observé pour le rapport CM/PS 40/60.

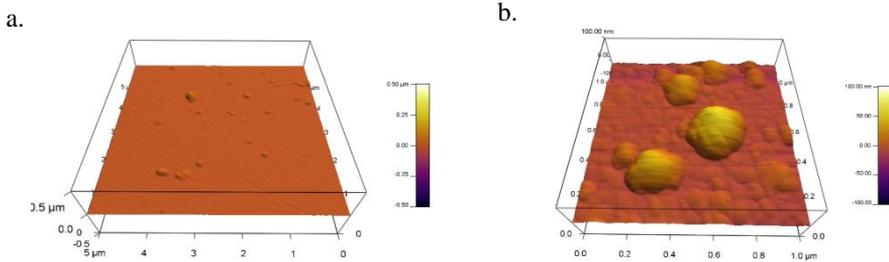


Fig. 5 Images en 3D, réalisées par l'AFM. Micelles de caséines (ratio CM/PS 40/60) à pH 6,3: a. micelle non chauffées (non réticulées); b. micelles traités thermiquement 20 min. à 80°C.

Selon les résultats obtenus, pour les 2 rapports CM/PS étudiés à pH 6,8 les micelles réticulées sont plus cohésives et ont un angle de contact plus important. Au contraire, à pH 6,3 on observe une augmentation de la proportion des protéines de lactosérum associées à la micelle mais celles-ci empêchent peut-être l'étalement des micelles sur la surface d'or. Ceci est peut-être dû à la solubilisation d'une partie du phosphate de calcium qui participe à la cohésion de la structure micellaire. Finalement, les micelles de caséines présentant une réticulation plus faible avec des agrégats de protéines de lactosérum (pH 6,8) sont malgré tout plus rigides, ayant une hauteur et un angle de contact plus importants. Elles constituent des objets intéressants pour l'étude de leur aptitude à stabiliser des systèmes alimentaires, comme les émulsions.

Références bibliographiques

1. **Anema, S. G.** (2007). Role of κ - Casein in the Association of Denatured Whey Proteins with Casein Micelles in Heated Reconstituted Skim Milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 3635-3642.
2. **Anema, S. G., Lowe E. K., Kim Lee S.** (2004). Effect of pH at heating on the acid-induced aggregation of casein micelles in reconstituted skim milk. *Swiss Society of Food Science and Technology*, 37, 779-787.
3. **Croguennec T., Leng N., Hamon P., Rousseau F., Jeantet R., Bouhallab S.** (2014). Caseinomacropéptide modifies the heat-induced denaturation-aggregation process of β -lactoglobulin. *International Dairy Journal*, 36, 55-64.
4. **Donato L., Guyomarc'h F.** (2009). Formation and properties of the whey protein/kappa-casein complexes in heated skim milk – A review. *Dairy Science and Technology*, 89, 3-29. DOI : 10.1051/dst:2008033
5. **Francius G.**, 2011, AFM Express. Guide pratique pour la Microscopie à Force Atomique - exploration du « nanoMonde » Les Cahiers de l'Ecole Doctorale Lorraine de Chimie et Physique Moléculaires, Presses universitaires de Nancy, 38 p.
6. **Nogueira Silva N., Bahri A., Guyomarc'h F., Beaucher E., Gaucheron F.** (2015). AFM study of casein micelles cross-linked by genipin : effects of acid pH and citrate. *Dairy Science and Technology*, 95:75-86.