



HAL
open science

Stabilité des micelles de caséines réticulées par la génipine

Asma Bahri

► **To cite this version:**

| Asma Bahri. Stabilité des micelles de caséines réticulées par la génipine. 2013, 38 p. <hal-01209481>

HAL Id: hal-01209481

<https://hal.science/hal-01209481v1>

Submitted on 6 Jun 2020

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

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



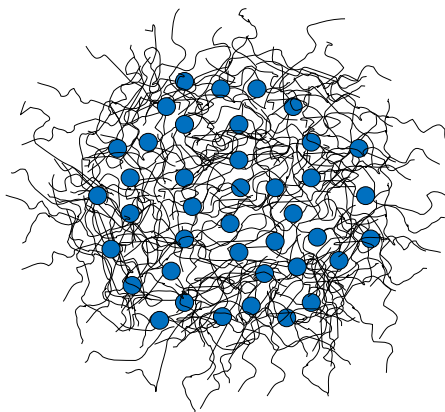
HAL Authorization

Mémoire de Fin d'études

Diplôme préparé : Ingénieur Agronome

Spécialisation : Agroalimentaire et Agro-industries

Stabilité des micelles de caséines réticulées par la génipine



Par **Asma BAHRI**

Maîtres de stage : Frédéric GAUCHERON - Naaman NOGUEIRA SILVA

Collaboration : Fanny GUYOMARC'H

Organisme d'accueil : UMR STLO - INRA

2013

SCIENCE AND
TECHNOLOGY
MILK & EGGS

 **STLO**



Remerciements

Je remercie tout d'abord Naaman NOGUEIRA SILVA pour son accompagnement, ses conseils, sa disponibilité constante et pour m'avoir fait profiter de ses connaissances lors des nombreuses discussions scientifiques. Je le remercie également pour m'avoir poussée à positiver par ses encouragements, pour avoir facilité mon intégration au sein du laboratoire et son écoute sur le plan professionnel comme personnel.

Je tiens également à remercier Frédéric GAUCHERON pour son encadrement, ses encouragements et bien évidemment pour les connaissances qu'il a pu me transmettre et qui me seront bénéfiques dans les années futures. Je tiens à lui témoigner toute ma gratitude pour m'avoir si chaleureusement recommandé auprès de ses collègues pour trouver une thèse, et souhaite lui faire part de mon regret de quitter une si belle équipe.

Un grand merci à Fanny GUYOMARC'H pour avoir suivi une grande partie de ce travail et m'avoir fait profiter de ses connaissances étendues sur l'AFM. Je la remercie aussi pour sa disponibilité et le temps consacré à m'aider et à me conseiller lors des manipulations et des réunions.

Je remercie ensuite Marie-Hélène FAMELART qui m'a accueilli au sein de l'unité de rhéologie pour sa disponibilité et ses conseils, et Michel PIOT pour m'avoir aidé à réaliser la partie Chromatographie en Phase Liquide.

Je remercie enfin toute l'équipe de l'UMR STLO à savoir les permanents, les doctorants et les stagiaires pour leur accueil et l'ambiance extraordinaire qui règne entre ses murs.

Présentation du laboratoire d'accueil

Les travaux rapportés dans le présent document ont été conduits au sein de l'unité mixte de recherche Science et Technologie du Lait et de l'œuf (STLO) de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) situé à Rennes.

Actuellement, 75 permanents, 25 doctorants et environ 10 stagiaires travaillent en étroite collaboration pour une approche pluridisciplinaire des sujets scientifiques. Ils sont répartis au sein de 6 équipes de recherche :

- Biodiversité bactérienne et interactions in situ (B2ISI)
- Bioactivité et nutrition (BN)
- Transferts et interactions dans les procédés de l'industrie laitière (TIPIL)
- Microstructure fromagère et Bactéries
- Microbiologie de l'œuf et des ovoproduits
- Physico-chimie protéines et lipides

Chacune apporte ses compétences et son expertise dans les disciplines variées de la biochimie, physico-chimie, microbiologie et des procédés.

Le laboratoire comporte également 2 plateformes certifiées ISO 9001 :

- Une plateforme technologique dédiée au lait d'une surface de 800 m², équipée en matériel de traitement et de transformation du lait permettant de conduire des essais à l'échelle pilote sur une large gamme d'opérations unitaires (écrémage, séparation membranaire, séchage...)
- Une plateforme appelée Centre International de Ressources Microbiennes (CIRM), centre de ressource biologique dédiée aux bactéries d'intérêt laitier.

Le laboratoire entretient également de nombreux partenariats avec l'industrie dont 19 des 25 premières entreprises françaises de la filière laitière et l'ensemble des acteurs de la filière œuf. Les interprofessions, comme le Centre Interprofessionnel de l'Economie Laitière (CNIEL) pour la filière laitière, sont les principaux partenaires. Le laboratoire établit aussi des partenariats avec des PME pour la réalisation de leur recherche et développement.

L'UMR est aussi très ouverte à l'international puisque 30% des publications sont co-signées avec des chercheurs étrangers et 50% des doctorants proviennent de l'étranger.

Enfin, l'ensemble est soutenu par une équipe d'appui qui apporte un soutien en termes de documentations, démarches administratives, maintenance et informatique.

Au cours de mon stage j'étais intégrée au sein de l'équipe (TIPIL). Cette équipe tente de comprendre les mécanismes physiques, mécaniques et biochimiques impliqués dans les opérations de concentration et de fractionnement des aliments. J'ai été encadrée par Frédéric GAUCHERON (Chargé de recherche) et Naaman NOGUEIRA SILVA (Doctorant). Une collaboration a été réalisée avec Fanny GUYOMARC'H (Ingénieur de recherche) pour la partie AFM.

Table des matières

Introduction générale	1
1. Synthèse bibliographique	3
1.1. Les micelles de caséines	3
1.1.1. Les caséines	3
1.1.2. Les minéraux	4
1.1.3. La structure colloïdale des micelles de caséines	5
2.2. La génipine	8
2. Matériels et méthodes	9
2.1. Matériels et préparation	9
2.1.1. Poudre de phosphocaséinate natif (PPCN)	9
2.1.2. Suspensions de phosphocaséinate natif dans le tampon HEPES	9
2.1.3. La génipine	10
2.1.4. La réaction de réticulation	10
2.2. Caractérisation Physico-chimique des micelles de caséines réticulées	11
2.2.1. La taille	11
2.2.2. La charge	12
2.2.3. Caractéristiques dimensionnelles des micelles par AFM	12
2.3. Caractérisation de la Stabilité physico-chimique des micelles réticulées	14
2.3.1. Acidification	14
2.3.2. Déminéralisation au citrate de sodium	15
2.3.3. Action de la présure	15
3. Résultats et discussion	16
3.1. Caractérisation physico-chimique des micelles de caséines réticulées	16
3.1.1. Suivi de la cinétique de réticulation	16
3.1.2. La taille	17
3.1.3. La charge	18
3.1.4. Les caractéristiques dimensionnelles (AFM)	18

3.2.	Stabilité des micelles de caséines natives et réticulées.....	20
3.2.1.	Stabilité des micelles de caséines après acidification.....	20
3.2.1.1.	Précipitation.....	20
3.2.1.2.	Caractéristiques dimensionnelles (AFM)	21
3.2.2.	Déminéralisation des micelles de caséines réticulées par le citrate de sodium	24
3.2.2.1.	La taille.....	24
3.2.2.2.	Caractéristiques dimensionnelles (AFM)	25
3.2.3.	Action de la présure.....	27
	Conclusions et perspectives	29
	Références bibliographiques	31
	Liste des figures	36
	Liste des tableaux.....	37
	Communications envisagées.....	38

Abréviations

AFM : microscopie à force atomique

CMP: caséinomacropéptide

DDP : différence de potentiel

DLS : diffusion dynamique de lumière

EDC : N-ethyl-diméthylaminopropyl carbodiimide

HEPES : 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazineéthanesulfonique

MALS : multiangle light scattering

MUA : acide mercapto-undécanoïque

NHS : N-Hydroxysuccinimide

PCA : acide perchlorique

PPCN : Poudre de phosphocaséinate natif

RP-HPLC : chromatographie liquide à haute performance en phase inverse

SAM : self-assembled monolayer

SAXS: Small Angle X-ray Scattering

SerP-x : résidu phosphoséryl

SMUF : simulated milk ultrafiltrate

TFA : acide trifluoroacétique

Notations et symboles

Symboles	Désignation
A	absorbance
ε	coefficient d'absorption molaire
L	longueur de la cuve
I_0	intensité lumineuse incidente
I_t	intensité lumineuse transmise
D_h	diamètre hydrodynamique
T	température absolue
k	constante de Boltzmann
η	viscosité dynamique
D	coefficient de diffusion
$U\varepsilon$	mobilité électrophorétique
ε_1	constante diélectrique de la phase continue
$f(\kappa a)$	fonction de Henry
μ	moyenne
σ	écart type

Introduction générale

Les protéines du lait sont probablement les mieux caractérisées de toutes les protéines alimentaires. Elles se classent en deux principales catégories : les protéines du lactosérum et les caséines qui représentent respectivement 20 et 80 % des protéines totales. Les caséines sont des phosphoprotéines qui existent sous 4 types : α_{s1} et α_{s2} , β et κ et sont présentes dans le lait dans les proportions respectives de 37, 10, 35 et 12%. Les caséines sont organisées sous forme d'un assemblage, sphérique, hydraté (4 kg d'eau/kg de protéines), poreux et granuleux appelé « micelle de caséines ». Les micelles sont des particules de taille moyenne de 150 nm polydisperses allant de 70 à 400 nm, composées d'environ 10^4 molécules de caséines.

Ces micelles ont des structures pouvant évoluer en fonction des conditions du milieu, comme la température, la pression, le pH et l'action chimique ou enzymatique. De par leurs propriétés physico-chimiques, les micelles de caséines possèdent des propriétés techno-fonctionnelles intéressantes et valorisées par l'industrie laitière. Ainsi, elles sont utilisées en tant qu'ingrédients destinés à la formulation de produits alimentaires pour leurs propriétés épaississantes, gélifiantes, émulsifiantes et moussantes qu'elles peuvent transmettre aux aliments. Depuis le début du XIXe siècle elles sont utilisées dans le domaine non alimentaire pour la fabrication d'une large gamme de produits, comme les colles, le plastique et des fibres textiles.

Cependant, les micelles de caséines à l'état natif sont des structures « dynamiques » qui échangent des ions (calcium et phosphate principalement) et des caséines avec la phase continue. En modifiant certains paramètres physico-chimiques il est possible d'induire une modification des interactions inter ou intra micellaires voire de détruire la structure colloïdale.

La réticulation est un moyen qui permet d'améliorer les propriétés physiques et mécaniques des matériaux. Parmi les voies de réticulation étudiées, il y a la réticulation chimique par le glutaraldéhyde (très toxique) et la réticulation enzymatique par la transglutaminase. Pour répondre à cette stratégie, nous avons utilisé la génipine, molécule présente dans le fruit *Gardenia jasminoides* et largement étudiée dans le domaine médical. Cette molécule est décrite comme pouvant réticuler le collagène, la gélatine et les chitosanes. Des études récentes ont également montré qu'elle a la possibilité de réticuler la β -lactoglobuline et des molécules individuelles de caséines. Au sein de l'équipe que j'ai intégrée, cette problématique de modification de la micelle de caséines par la génipine est abordée depuis quelques mois dans le cadre d'une thèse. Il est clairement démontré que la génipine réagit aussi avec des caséines présentes dans la micelle de caséines (sous forme de phosphocaseinate natif – PPCN) (essentiellement sur les résidus amines des lysines et arginines) en modifiant ses propriétés de surface mais aussi ses propriétés internes. L'unité micellaire était maintenue bien que les micelles étaient plus chargées négativement et moins hydratées. L'intégrité

micellaire était préservée même dans des conditions dissociantes (addition de l'urée par exemple). Une augmentation de la tension interfaciale et une diminution de la viscosité ont également été observées.

L'objectif de mon stage se situe donc dans cette continuité à savoir mieux comprendre la réactivité des micelles de caséines vis-à-vis de la réticulation par la génipine ainsi que la stabilité des micelles réticulées suite au changement des facteurs environnementaux. Les questions de recherche posées sont :

Quelles sont les caractéristiques du colloïde créé?

Quels sont les effets des conditions de déstabilisation sur l'objet micellaire réticulé?

Les outils utilisés pour répondre à ces questions étaient ceux classiquement utilisés pour la caractérisation des colloïdes (Diffusion dynamique de lumière DLS, Zêta,...) mais aussi un outil plus original appelé la microscopie à force atomique. Cette méthode a permis de déterminer les caractéristiques dimensionnelles des micelles de caséines normales et réticulées par la génipine dans des conditions différentes.

1. Synthèse bibliographique

1.1. Les micelles de caséines

Les protéines du lait sont probablement les mieux caractérisées de toutes les protéines alimentaires (Fox, 2003). Elles se classent en 2 principales catégories : les protéines de lactosérum et les caséines. Elles représentent respectivement 20 et 80 % des protéines totales avec une concentration de 7 et 25g.L⁻¹ (Dalglish et Corredig, 2012).

Les caséines sont associées entre elles par des interactions hydrophobes et électrostatiques ainsi que par l'intermédiaire de phosphate de calcium. L'ensemble forme des particules colloïdales appelées micelles de caséines. Ces complexes colloïdaux sont composés essentiellement de caséines (93%), de minéraux (7%) (en base sèche) et d'eau (4 kg H₂O/ kg protéine).

1.1.1. Les caséines

Les caséines sont des phosphoprotéines qui existent sous 4 types : α_{s1} , α_{s2} , β et κ et sont présentes dans le lait avec les proportions respectives de 37, 10, 35 et 12%. Ces 4 principales caséines présentent des caractéristiques physicochimiques qui leur sont propres (Walstra et Jenness, 1984). Ils existent plusieurs variants génétiques pour chacune des caséines. Des modifications post-traductionnelles par la phosphorylation des caséines α_{s1} , α_{s2} et β et une glycosylation des caséines κ présentent une source supplémentaire d'hétérogénéité. Malgré cette variabilité, les caséines présentent certaines propriétés communes. En effet, elles sont toutes phosphorylées au niveau des résidus séryles. Ce sont également des protéines riches en lysines et en résidus glutamyls et aspartyls, tous deux sous forme ionisée (pK = 4,5-4,7) au pH du lait (pH_{lait} 6,7). Ces derniers s'ajoutent aux résidus phosphoséryles et contribuent à la charge négative des caséines (Fox, 1989). Ce sont des molécules d'une taille comprise entre 20-24000 Da.

Les caséines sont fortement hydrophobes selon l'ordre $\beta > \kappa > \alpha_{s1} > \alpha_{s2}$. Cette variation est due à la répartition non homogène des résidus à la fois hydrophobes basiques et des résidus chargés à caractère acide dans la séquence d'acides aminés (Fox, 1989).

Les caséines α_{s1} et β ne contiennent pas de cystéines, contrairement aux caséines α_{s2} et κ -caseines qui possèdent 2 groupements chacune permettant d'établir des ponts disulfures intra ou intermoléculaires. Les caséines, particulièrement la caséine β , sont riches en proline, ce qui empêche la formation d'hélices α et de feuillets β (Walstra et Jenness, 1984). Les caséines sont donc amphiphiles, non structurées et à conformation ouverte, ce qui influence leurs propriétés fonctionnelles (Fox, 1989).

La caséine α_{s1} est constituée de 199 acides aminés. Elle est chargée négativement (-20,6 à pH 6,6) et fortement hydratée entre les résidus 41 et 80 qui contiennent 8 résidus phosphoséryles juxtaposés à

11 résidus glutamyls et 3 résidus aspartyls. Elle possède 3 régions hydrophobes situées entre les résidus 1-44, 90-113 et 132-199 (Fox, 1989). Elle associe 8 moles de Ca^{2+} par mole aux groupements phosphates à $\text{pH} = 7$. La présence de 2 clusters SERP-SERP-SERP-GLU-GLU justifie sa sensibilité au calcium. En effet, elle s'agrège et précipite à des concentrations de calcium relativement faibles (7 mM Ca^{2+}) (Walstra et Jenness, 1984).

La caséine α_{s2} comporte 207 acides aminés. C'est la plus hydrophile des caséines grâce à son taux élevé de phosphorylation avec 10 à 13 résidus phosphoséryls présents dans trois zones hydrophiles (8-16, 56-61 et 129-133). Ces 3 zones sont des sites privilégiés de fixation du phosphate de calcium et sont responsables de la grande sensibilité de cette caséine vis-à-vis du calcium, sensibilité potentiellement plus élevée que celle de la caséine α_{s1} (Walstra et Jenness, 1984). La partie C-terminale, positivement chargée à $\text{pH} 6,6 (+9,5)$, présente une zone hydrophobe essentiellement localisée dans le tronçon 160-207, tandis que les charges négatives sont concentrées dans la partie N-terminale (-21) (Fox, 1989).

La caséine β , la plus hydrophobe des caséines, est constituée de 209 acides aminés. Elle contient 5 résidus phosphoséryls dont 4 situés au niveau de la partie N-terminale. Cette zone contient également 12 résidus glutamyls, ce qui lui confère un caractère polaire. La partie C-terminale, comporte de nombreux résidus non chargés, est hydrophobe (Fox, 1989). En vue de son caractère hydrophobe, la caséine β a la particularité d'avoir un comportement dépendant de la température. En effet, un abaissement de la température du lait (4°C) induit une solubilisation de cette caséine dans la phase soluble (Dalglish et Corredig, 2012).

La caséine κ , peu sensible au calcium, est composée de 169 acides aminés. La partie N-terminale (1/3) contient un seul résidu phosphoséryl (SerP-149). Elle est la seule à posséder des groupements glucidiques situés sur les thréonines 131, 133, 135 et 136. Cette caséine possède un caractère amphipolaire avec une partie N-terminale hydrophobe et une partie C-terminale hydrophile (Walstra et Jenness, 1984).

1.1.2. Les minéraux

La fraction minérale du lait est importante avec une concentration de 8 à 9 g/L. Elle est constituée de cations (calcium, magnésium, sodium et potassium) et d'anions (phosphate inorganique, chlorure et citrate). Le tableau 1 indique les concentrations relatives des différents minéraux (Gaucheron, 2004 ; Walstra et Jenness, 1984). Ces ions jouent un rôle important dans la structure et la stabilité des micelles de caséines. Ils ont également un rôle crucial aussi bien sur le plan technologique (Fonctionnalité) que nutritionnel (croissance du nouveau-né).

Tableau 1 : Composition en minéraux d'un lait bovin d'après Gaucheron (2005)

Minéraux	Concentration (mmol/kg)	Concentration (mg/kg)	Quantité associée à la micelle (%)
Calcium	26-32	1043-1283	69%
Magnésium	4-6	97-146	35%
Phosphate inorganique	19-23	1805-2185	46%
Phosphore	30-32	930-992	46%
Citrate	7-11	1323-2079	11%
Sodium	17-28	391-644	0
Potassium	31-43	1212-1681	0
Chlorure	22-34	772-1207	0

Les minéraux se répartissent entre la phase soluble (aqueuse) et la phase continue (colloïdale) (figure 1). Cette répartition est dynamique et régie par les paramètres physicochimiques, tels que le pH, la température, la force ionique, l'ajout de chélatants de calcium (citrate, EDTA,...). Les ions monovalents (principalement Cl^- , K^+ et Na^+) sont essentiellement présents dans la phase aqueuse du lait alors que les ions phosphate, calcium et magnésium sont pour en partie associés à la micelle formant des nanoclusters (Gaucheron, 2005). En effet, les ions phosphate et calcium sont présents dans le lait à des concentrations supérieures à leur solubilité. Ils sont associés sous forme d'un complexe de phosphate de calcium colloïdal en forte interaction avec les résidus phosphoséryls.

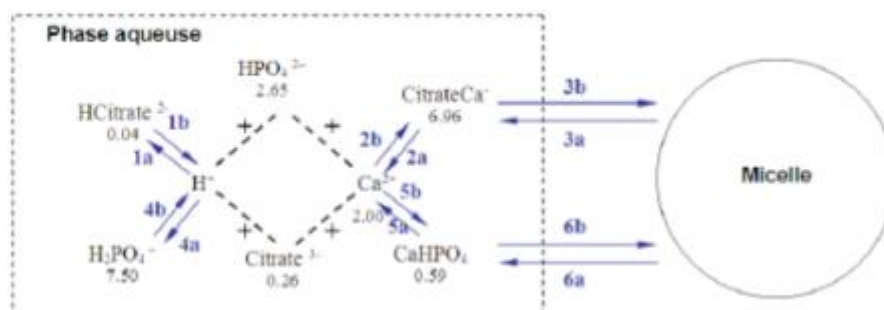


Figure 1 : Les équilibres minéraux entre la phase soluble et la phase micellaire dans le lait (Gaucheron, 2005). Les concentrations des minéraux sont indiqués en mM à pH 6,7 et à température ambiante.

2.1.3. La structure colloïdale des micelles de caséines

Les caséines se trouvent sous forme d'un assemblage, sphérique, hydraté (4 kg d'eau/kg de protéines), poreux et granuleux appelé « micelle de caséines ». Les micelles sont des particules de taille moyenne de 150 nm polydisperses allant de 70 à 400 nm, composées d'environ 10^4 molécules de caséines. Le cœur de la micelle est formé par les caséines α_s et β liées par des interactions

essentiellement hydrophobes. Des agrégations de ces polymères avec le phosphate de calcium entraînent la formation d'un macropolymère dont la surface est limitée par la caséine κ . Les micelles de caséines présentent une hydratation plus élevée que celle des autres protéines en solution (Holt, 1992). Cette caractéristique peut être attribuée au caractère poreux des micelles de caséines ainsi qu'à leur forte hydratation de surface. L'hydratation de surface est attribuée à la présence d'une « couche chevelue » constituée de chaînes peptidiques hydrophiles et chargées négativement (Walstra, 1979) issues de la partie C-terminale de la caséine κ (de Kruif et Roefs, 1996 ; Holt et Horne, 1996).

Plusieurs dizaines d'années de recherche n'ont pas encore permis d'élucider complètement la structure interne de ce colloïde. Plusieurs modèles ont été proposés afin d'expliquer l'organisation des constituants dans la micelle de caséines. Les modèles proposés les plus discutés sont les modèles sub-micellaire et ouvert.

- **Modèle sub-micellaire**

Ce modèle, issu de plusieurs modèles développés auparavant (Waugh et al., 1970 ; Slattery et Evrard, 1973 ; Schmidt et Payens, 1976 ; Schmidt, 1980), décrit les micelles de caséines comme un assemblage de sous-unités protéiques, les sub-micelles, de taille comprise entre 10 et 20 nm (figure 2). Les sub-micelles ont une composition variable en caséines α_s , β et κ . Leur association au sein des micelles est assurée par le phosphate de calcium. Les sub-micelles sont constituées d' :

- un noyau hydrophobe constitué principalement de caséines α_s
- une couche externe hydrophile dont la caséine κ forme une « chevelure » assurant la stabilité de la suspension colloïdale du fait de sa forte charge négative et de sa répulsion stérique. Les régions polaires des différentes caséines permettent un pontage entre-elles par des clusters de phosphate de calcium. Les sub-micelles les plus riches en caséine κ sont essentiellement localisées à la surface des micelles.

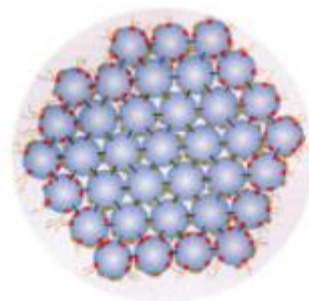


Figure 2 : Modèle submicellaire de micelles de caséines (Walstra, 1990)

- **Modèle ouvert**

Ce modèle a évolué en allant de la proposition de Rose (1969) jusqu'au dernier modèle établi par De Kruif et Holt (2003) (figure 3). Ces auteurs considèrent les micelles de caséines comme des particules plus ou moins sphériques, très hydratées et de structure ouverte. Ce modèle de structure en réseau est admis car l'hypothèse que le phosphate de calcium soit distribué dans la micelle est en accord avec la vision dynamique et les équilibres avec la phase aqueuse (ou soluble) du lait. Les micelles de caséines sont liées par des interactions hydrophobes et des interactions électrostatiques entre les caséines. Aussi par le pontage des nanoclusters de résidus phosphoséryls et le phosphate de calcium colloïdal facilitant ainsi la croissance des polymères de caséines. Les charges des résidus phosphoséryls se neutralisant pour réduire les répulsions électrostatiques et favoriser les interactions hydrophobes.

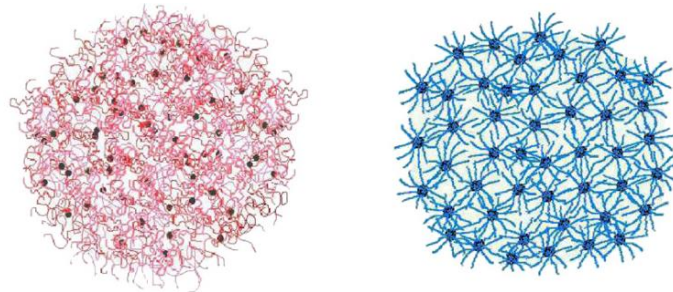


Figure 2 : Modèle de micelles de caséines à structure ouverte (Holt, 2003)

La localisation de la caséine κ est également décrite à la surface de la micelle avec notamment son fragment C-terminal hydrophile sous forme de « cheveux ». Cette couche assure la stabilité des micelles grâce à des répulsions stériques et électrostatiques empêchant l'agrégation naturelle des micelles de caséines.

Les micelles de caséines ont des structures pouvant évoluer en fonction des conditions du milieu. Parmi ces conditions, on peut citer la température, la pression, le pH et l'action d'agents chimiques ou enzymatiques. De par leurs propriétés physico-chimiques, les micelles de caséines possèdent des propriétés techno-fonctionnelles intéressantes et valorisées par l'industrie laitière. Ainsi, elles sont utilisées en tant qu'ingrédients destinés à la formulation de produits alimentaires car elles ont des propriétés épaississantes, gélifiantes, émulsifiantes et moussantes.

2.2. La génipine

La génipine est une molécule issue d'un glycoside iridoïde, appelé géniposide, présent dans le fruit *Gardenia jasminoides Ellis* (figure 3) (Park et al., 2002). Elle est obtenue par l'hydrolyse du géniposide par la β -glucosidase.

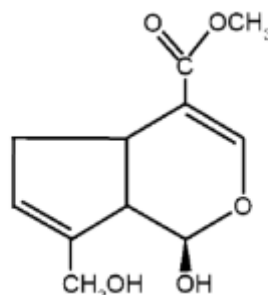


Figure 3 : La structure chimique de la molécule de génipine

Grâce à ses propriétés curatives et thérapeutiques, elle est utilisée dans la médecine traditionnelle chinoise. En effet, son action anti-inflammatoire (Koo et al., 2004), anti-cancéreux (Cao et al., 2010), curatif de gastrite (Lee et al., 2009), hypoglycémiant (Zhang et al., 2006) et antidépresseur (Thian et al., 2010) ont été démontrés. Plusieurs études (Chang et al., 2009 ; Xi-xun et al., 2010) ont souligné que cette molécule est 10 000 fois moins cytotoxique que le glutaraldéhyde lorsqu'elle est utilisée comme réticulant naturel pour la fixation de tissus biologiques et la vectorisation de molécules thérapeutiques. La génipine libre est incolore. Cependant, elle forme une coloration bleue lorsqu'elle réagit avec certains acides aminés (figure 4). Elle est utilisée dans l'industrie agroalimentaire comme colorant (Fujikama et al., 1987) surtout dans les pays de l'Asie de l'Est (Park et al., 2002).

Cette molécule est décrite comme pouvant réticuler le collagène, la gélatine et les chitosanes (Chaubaroux et al. 2012 ; Yan et al., 2010 ; 2011). Des études récentes, ont démontré qu'elle a la possibilité de réticuler la β -lactoglobuline et des molécules individuelles de caséines (Song et al., 2009 ; Phoebe et al., 2012) et les micelles de caséines (Nogueira et al., 2013). Butler et al. (2003) et Nogueira et al. (2013) ont montré que la génipine réagissait avec des acides aminés libres ou des protéines contenant des amines primaires comme la lysine et l'arginine. La réaction de réticulation proposée par Song et al. (2009) décrit l'implication de 2 groupements amines de 2 lysines et une molécule de génipine (figure 4). Elzoghby et al. (2012) ont montré que des agrégats de caséines réticulées par la génipine avaient des couleurs qui variaient suite à l'ajout de génipine. Cette couleur devenait bleue proportionnellement au degré de réticulation (figure 4).

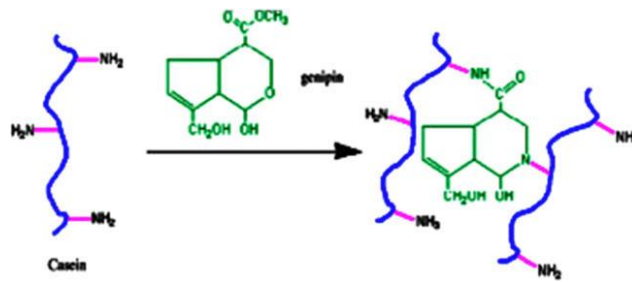


Figure 4 : Mécanisme de la réticulation des caséines par la génipine (Sollohub et al., 2010)

2. Matériels et méthodes

2.1. Matériels et préparation

2.1.1. Poudre de phosphocaséinate natif (PPCN)

Pour bien mener l'étude de des micelles de caséines réticulées séparément des autres constituants du lait, le PPCN produit par l'UMR STLO a été utilisé. Le procédé de sa préparation consiste à microfiltrer du lait écrémé cru sur une membrane de seuil de coupure de 0.1 μ m pour éliminer les protéines sériques. Puis ce lait est diafiltré à l'eau osmosée et séché par atomisation en tour de séchage (Schuck *et al.*, 1994). Cette technique de fabrication a permis d'obtenir les micelles de caséines dans un état quasi-natif ayant des propriétés physico-chimiques globalement similaires aux micelles natives. La poudre est composée de 75% de caséine (par rapport à la matière sèche), 5,5% d'eau, des minéraux et d'une fraction résiduelle de protéines solubles.

2.1.2. Suspensions de phosphocaséinate natif dans le tampon HEPES

La poudre de PPCN a été mise en suspension dans une solution tampon contenant 25 mM d'acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazineéthanesulfonique (HEPES) (SIGMA-ALDRICH, USA, annexe x) et 2mM de chlorure de calcium (CaCl_2) pour mettre en place un équilibre en calcium ionique similaire à celui du lait. Le pH a été ajusté à pH 7,15 par ajout de NaOH. Une quantité de 0,35 g.L⁻¹ d'azide de sodium (NaN_3) a été ajoutée pour inhiber la croissance bactérienne. La solution a été ensuite filtrée (filtre de taille de pore de 0,45 μ m).

La mise en suspension du PPCN a été faite sous agitation à température ambiante pendant 48 h. Toutes les expériences ont été effectuées avec des dispersions reconstituées à 50 g.L⁻¹ de caséines.

2.1.3. La génipine

La génipine utilis e a été fournie par la société Tou-liu Industrial Park bas e   Yun-lin (Taiwan). La génipine a une pureté de 98%. Elle est soluble dans l'éthanol, le méthanol et l'acétone mais faiblement soluble dans l'eau.

Une solution mère de génipine à 200 mM a été pr par e par dissolution de la génipine dans le tampon HEPES et l'éthanol 74/26 (p/p). Le volume a été compl t e par le tampon HEPES sous une forte agitation pendant 30 min, à température ambiante (Harris et al., 2010).

2.1.4. La réaction de réticulation

La solution de génipine a été ajout e à la suspension de PPCN   50 C afin d'obtenir une concentration finale de 40 mM. Les échantillons avec et sans génipine ont été placés ensuite dans un bain thermostaté à 50 C pendant 24 h. Une coloration bleue est apparue au cours de la réaction. Enfin, les échantillons ont été ensuite conservés à 4 C pendant 46 h avant la réalisation des différentes analyses. Un témoin (PPCN) sans génipine a été traité dans les mêmes conditions.

Afin de suivre la réaction de réticulation, qui se traduit par l'apparition de la coloration bleue, un spectrophotomètre UV (Uvikon) a été utilisé (Harris et al., 2010).

Le principe de mesure consiste à émettre un rayonnement électromagnétique UV (longueurs d'ondes balay es : de 550 à 650 nm) qui est absorbé par les solutions dilu es en donnant lieu à des transitions entre les différents niveaux électroniques des molécules. L'intensité de l'absorption, qui suit la loi de Beer-Lambert, est directement proportionnelle à la concentration de l'espèce absorbante.

$$A = \epsilon \cdot L \cdot c$$

où A est l'absorbance, ϵ est le coefficient d'absorption molaire de l'espèce, L est l'épaisseur longueur de la cuve et c'est la concentration de l'échantillon. L'absorbance est égale à :

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I_t}\right)$$

où I_0 est l'intensité lumineuse incidente et I_t est l'intensité lumineuse transmise.

Les mesures ont été effectu es dans des cuves en quartz après dilution des suspensions au 1/66  dans le tampon HEPES. Le tampon HEPES a été également utilisé comme un blanc. La cinétique d'absorbance a été d termin e pour les valeurs maximales d'absorbance situ es aux alentours de 605 nm correspondant au maximum d'absorbance du bleu.

2.2. Caractérisation Physico-chimique des micelles de caséines réticulées

2.2.1. La taille

La taille des micelles a été déterminée par diffusion dynamique de lumière (DLS). Les micelles de caséines sont assimilées à des particules sphériques dures.

Cette technique est basée sur la mesure de l'intensité de la lumière diffusée à un angle de détection donné, par des particules agitées d'un mouvement brownien et sans interactions entre elles. Le dispositif est composé d'une source laser monochromatique éclairant une cellule de mesure contenant l'échantillon. La lumière diffuse dans toutes les directions suite à la rencontre des particules, le rayonnement est alors recueilli au cours du temps par un détecteur (figure 5), puis traité par un système informatique doté d'un corrélateur. L'intensité de la lumière détectée fluctue constamment en raison du mouvement des particules. Plus elles sont mobiles et plus ces fluctuations sont rapides. On calcule donc la fonction d'auto corrélation de l'intensité qui correspond à la corrélation de l'intensité à intervalles de temps dt avec l'intensité mesurée aux temps précédents. On en déduit le coefficient de diffusion de la particule qui est corrélée au diamètre hydrodynamique des micelles par la relation de Stokes-Einstein :

$$D_h = \frac{k T}{3 \pi \eta D}$$

Où D_h est le diamètre hydrodynamique (m), T la température absolue en degré Kelvin (K), k la constante de Boltzmann ($J.K^{-1}$), η la viscosité dynamique ($m^{-1}.Kg.s^{-1}$) et D le coefficient de diffusion ($m^2.s^{-1}$).

Les D_h apparents ont été déterminés à l'aide d'un instrument Zetasizer nano Z de chez Malvern (Mavern Instruments SA, Orsay, France) à 20°C avec un angle de 173° sur les suspensions de caséines diluées au 1/50^e dans le tampon HEPES. Trois mesures par échantillon ont été réalisées. Les résultats obtenus sont présentés dans une courbe de distribution de taille indiquant l'intensité de la lumière diffusée en fonction du diamètre.

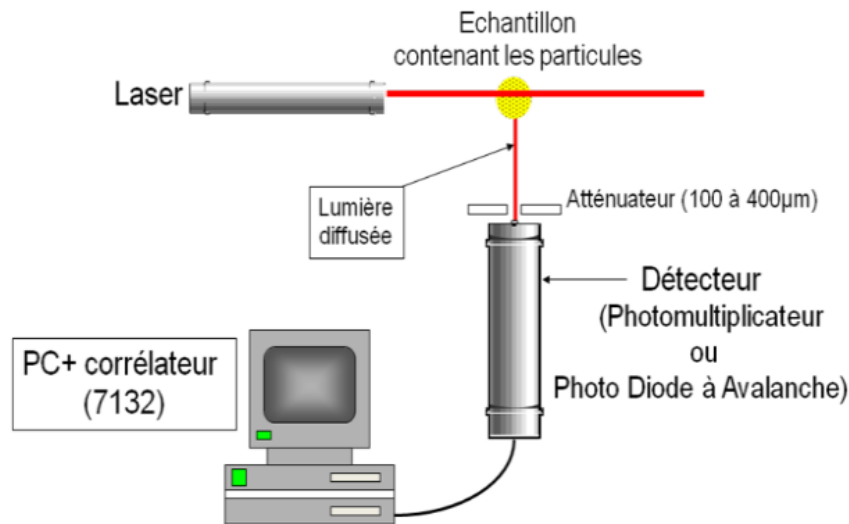


Figure 5 : Dispositif simplifié de la diffusion dynamique de lumière

2.2.2. La charge

La charge moyenne de la surface des micelles de caséines est représentée par le potentiel zêta. C'est une différence de potentiel (DDP) entre la surface des micelles et le milieu. Cette DDP est due à une concentration plus élevée en ions sur la surface de la micelle par rapport à la concentration des ions présents dans la phase continue. Cette couche électrique La technique(z) par la loi de Henry.

$$U\varepsilon = \frac{2 \varepsilon z f(\kappa a)}{3\eta}$$

Où $U\varepsilon$ est la mobilité électrophorétique, ε est la constante diélectrique de la phase continue, z est le potentiel zêta, $f(\kappa a)$ est la fonction de Henry et η est la viscosité de la phase soluble.

Les analyses ont été réalisées à 20°C, sur les suspensions de caséines diluées au 1/50^e dans le tampon HEPES et avec un champ électrique alternatif de 150 mV. Trois mesures par échantillon ont été effectuées.

2.2.3. Caractéristiques dimensionnelles des micelles par AFM

Les hauteurs et les diamètres des micelles réticulées ont été déterminés par microscopie à force atomique (AFM) dont le principe est illustré dans la figure 6.

- **Principe**

Le principe de l'AFM consiste à mesurer les forces d'interactions entre une pointe, qui se termine théoriquement par un atome et une surface de l'échantillon donnant lieu selon les distances pointe-surface à des forces répulsives ou attractives agissant sur la pointe. Ces forces d'interaction provoquent une déflexion verticale du levier qui supporte la pointe. La mesure de cette déflexion, couplée à un balayage de la surface, permet d'obtenir une image topographique de la surface analysée.

- **Protocole expérimental**

Les micelles de caséines sont immobilisées par des liaisons covalentes (chimie EDC N-ethyl-diméthylaminopropyl carbodiimide / NHS N-Hydroxysuccinimide) sur des plaques d'or. Ces plaques sont obtenues par pulvérisation d'or sur une surface de verre, découpées au diamant pour obtenir une surface de $1 \times 1 \text{ cm}^2$. L'immobilisation par la chimie EDC/NHS consiste à créer des liaisons entre les protéines (groupement amine) et les groupements $-\text{COOH}$ d'une self-assembled monolayer (SAM). L'EDC catalysé par le NHS, permet d'activer ces terminaisons pour former spontanément une liaison covalente entre les groupements carboxyliques activés et les groupements amines des protéines. Cette technique a été appliquée conformément au protocole adopté par Ouanezar et al. (2012).

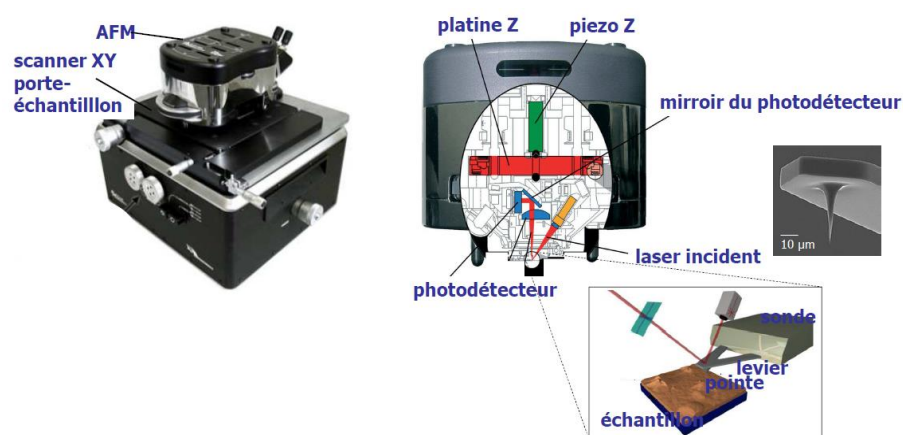


Figure 6 : Principe de l'AFM

Les lames d'or ont été immergées dans une solution alcoolique de 2 mM d'acide mercapto-undecanoïque (11-MUA). Les alkanethiols déposés forment une monocouche auto-assemblée (self-assembled monolayer ou SAM) par interaction entre leurs groupements SH et l'or pendant 48 h. Les plaques carboxylées sont, par la suite, rincées à l'éthanol, ensuite à l'eau et puis elles sont immergées dans une solution équivalente EDC (0,4M) /NHS (0,1 M) pendant 15 min. Elles sont rincées de nouveau à l'eau puis immergées dans l'échantillon pendant 1 h. Un autre rinçage a été réalisé avec le tampon HEPES afin d'éliminer les micelles non immobilisées, puis les plaques étaient déshydratées pendant quelques heures dans un dessiccateur à silice sous vide. Une fois secs, ces échantillons sont rincés lavés à l'eau milliQ afin de solubiliser les cristaux de sels présents dans le tampon HEPES, puis séchées pendant quelques heures dans le dessiccateur.

- **Observation**

Les images ont été acquises avec le microscope à force atomique MFP-3D-BIO, (Asylum Research, Santa Barbara, USA) en mode « tapping » (contact intermittent) dans l'air (Ouanezar et al., 2012). L'amplitude libre était de 1V, le set point initial (amplitude de contact) de 800 mV et la force

d'appui est de l'ordre de 40nN. La vitesse de balayage est de 0,8 Hz. La sonde utilisée (AC240 TM) a une constante de raideur de 2 N/m et une fréquence de résonance de 70 kHz. Le rayon de courbure est de $9 \pm 2^\circ$. Les surfaces scannées sont de 10×10 à $2 \times 2 \mu\text{m}^2$.

- **Analyses d'image**

Des images ont été réalisées à différents endroits de la plaque d'or. Pour traiter ces images, un programme spécifique (Igor, Asylum Research Santa Barbara, USA) a été utilisé. Le traitement consistait à enlever les inclinaisons des images par la fonction « planefit ». Les objets micellaires furent comptés grâce à un programme « MFP-IP ». Le programme calculait, pour chaque objet, différentes valeurs dimensionnelles parmi lesquelles le périmètre, qui permet de calculer le diamètre à la base (D), et la hauteur maximale (h). Ces données permettent de déduire l'angle de contact de chaque objet micellaire. Ce dernier rend compte de l'aptitude de la micelle à s'étaler sur la surface de la lame d'or. Cela permet d'évaluer ainsi sa rigidité (Helstad et al., 2007).

$$\Theta = \arccos\left(1 - \frac{h}{D}\right)$$

Une équation log-normale était appliquée aux données en utilisant comme valeurs initiales de μ et de σ la moyenne et l'écart type, respectivement, du logarithme népérien des données de hauteur ou de diamètre. L'ajustement est fait subjectivement de manière à en déduire la moyenne et l'écart type de la distribution.

$$f(x; \mu, \sigma) = \frac{e^{-0,5((\ln x - \mu)/\sigma)^2}}{x \sigma \sqrt{2\pi}}$$

Avec x la classe des hauteurs et des diamètres.

2.3. Caractérisation de la Stabilité physico-chimique des micelles réticulées

La stabilité des micelles de caséines modifiées par la génipine et témoin était étudiée après l'acidification, l'addition du citrate et l'action de la présure.

2.3.1. Acidification

Les micelles natives (témoin) et réticulées ont été acidifiées à pH 5,2 par l'acide chlorhydrique (HCl 1M). Cinq mL de suspension micellaire. Le volume de la suspension micellaire utilisé est de 5 mL auxquels étaient additionnés 270 μL Hcl pour les micelles natives et 260 μL pour réticulées. Les corrections de volume étaient réalisées par ajout d'eau milliQ. Les échantillons acidifiés étaient agités pendant 3 h à température ambiante. Une comparaison visuelle était effectuée entre l'échantillon traité à la génipine et le témoin. La morphologie et la rugosité des micelles natives et réticulées à pH 5,2 étaient également analysées par AFM.

2.3.2. Déminéralisation au citrate de sodium

Un volume d'échantillon de 5 mL était utilisé. Le volume de citrate de sodium ($C_6H_5Na_3O_7$) ajoutés était de 5 μ L. Les échantillons traités étaient maintenus en agitation pendant 3 h à température ambiante. Les tailles des micelles étaient déterminées par DLS. Une analyse de morphologie et de rugosité des micelles de caséines était également effectuée par AFM.

2.3.3. Action de la présure

La chymosine (*Kluyveromyces marxianus lactis*) (100%) fournie par Maxiren était utilisée avec une concentration de 0,02% (w/v) pour réaliser l'hydrolyse des caséines. Cette enzyme a été ajoutée à des suspensions micellaires de 25 $g.L^{-1}$ réticulées à 20 mM (même ratio Caséines/Génipine qu'à 50 $g.L^{-1}$ de caséines).

L'évaluation du temps de coagulation a été observée visuellement. Par ailleurs, le suivi de la libération du glycomacropéptide (CMP) au cours du temps a été réalisé. Le CMP représente le produit d'hydrolyse des caséines κ situées en surface. Le protocole de cette analyse a été obtenu à partir de la méthode de Thomä *et al* (2006). La détermination de la libération du CMP était effectuée par chromatographie liquide à haute performance en phase inverse (RP-HPLC).

• Protocole expérimental

Après une thermostatisation des 2 mL d'échantillon réticulé (20 mM) et non réticulé dans un bain marie à 32°C, 32 μ L de chymosine étaient ajoutés. Les protéines sont précipitées par un ajout de 0,5 mL d'acide perchlorique (PCA) (25% v/v) à des temps de réaction qui variaient de 15 min à 2 h.

Cette précipitation permettait la précipitation des protéines et d'arrêter la réaction d'hydrolyse par la chymosine. Les échantillons ont été ensuite centrifugés à 3000 g pendant 15 min à 20°C, puis filtrés par centrifugation pendant 10 min à 500 g. La détermination du CMP présent sur le filtrat a été effectuée par RP-HPLC à 40°C. La colonne utilisée était de type PLRP-S 300 Å 8 μ m fournie par ICS Science Groupe (France). La phase stationnaire est apolaire majoritairement composée de silices greffées par des chaînes linéaires d'atomes de carbones (C4). Deux tampons ont été utilisés : le tampon d'élution A 0,1% (v/v) d'acide trifluoroacétique (TFA) dissout dans de l'eau et le tampon d'élution B 0,0555% (v/v) composé de TFA et d'acétonitrile (80:20, v/v) (tableau 2).

Avant d'injecter 20 μ L d'échantillon dans le système, les pompes et la colonne étaient mises sous eau puis sous tampon A pour bien conditionner le système. Après injection, le gradient d'élution a été appliqué. Les tampons traversent la colonne avec des temps et des taux différents de façon à ce que les composants les moins hydrophobes (apolaires) s'éluent en premier. Les analyses étaient effectuées à 40°C avec un débit de 1 $mL.min^{-1}$.

Tableau 2 : Gradient d'élution chromatographique pour le dosage de CMP

min	% de tampon B
0	10
1	10
17	52
25,5	55
27,7	100

- **Résultats**

Le résultat est présenté par un chromatogramme comprenant autant de pics que de composés à séparer dans le mélange. Les pics étaient détectés à 214 nm correspondant à la longueur d'onde d'absorbance des liaisons peptidiques. La quantité de CMP était déterminée par les calculs des aires sous leurs pics correspondants.

3. Résultats et discussion

3.1. Caractérisation physico-chimique des micelles de caséines réticulées

3.1.1. Suivi de la cinétique de réticulation

Dans cette étude, la génipine a été utilisée pour réticuler les micelles de caséines. La réaction a été caractérisée par une analyse du spectre UV en fonction du temps à des valeurs maximales d'absorbance situées à 605 nm correspondant au maximum d'absorbance du bleu. Contrairement au témoin qui ne présente pas de variation d'absorbance, cette valeur augmente pour les micelles réticulées à 40 mM pour atteindre un maximum au bout de 24 h (figure 7).

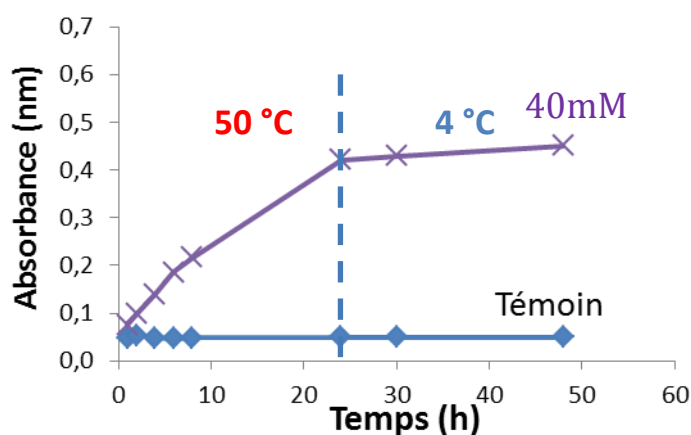


Figure 7: Cinétique de la réaction de réticulation suivie à 605 nm

La courbe observée se décompose en 2 périodes. Une période relativement linéaire jusqu'à 24 h relative à la consommation progressive des groupements NH_2 libres par la génipine suivie d'un plateau à 4°C associé à l'achèvement de la réaction.

Des analyses de la composition des acides aminés réalisées au préalable par Nogueira et al., (2013) démontrent que cette réaction impliquait majoritairement les lysines et beaucoup moins les arginines avec des taux respectifs de 92% et de 12%.

3.1.2. La taille

Les mesures par DLS ont permis de déterminer la distribution en taille des micelles de caséines réticulées et non réticulées comme témoin (figure 8). Une seule population a été observée dans l'échantillon réticulé et le témoin suggérant l'existence d'une réticulation intra-micellaire et non inter-micellaire.

Les micelles de caséines réticulées à 40 mM, ont un diamètre moyen de $156 \pm 0,5$ nm alors que celui des micelles natives est plus grand $174,2 \pm 2,7$ nm. La diminution du diamètre hydrodynamique est probablement due aux liaisons covalentes établies entre la génipine et les lysines et arginines des caséines à l'intérieur de la micelle. Une deuxième explication suggère la réticulation au niveau de la caséine κ réduirait le diamètre hydrodynamique. En effet, sa partie hydrophile s'étend dans la phase soluble sous forme de cheveux stabilisant les micelles par les phénomènes de répulsions électrostatiques et stériques (Holt et Horne, 1996). L'épaisseur de cette couche chevelue est estimée à environ 7-15 nm (Walstra et al., 1981). Les liaisons covalentes établies par la génipine suite à la réticulation de ces caséines entraineraient leur association avec la surface micellaire ce qui conduirait à une réduction du diamètre hydrodynamique.

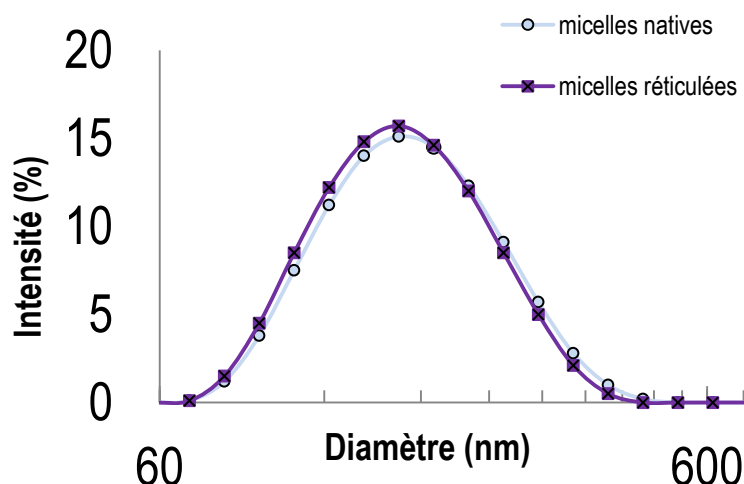


Figure 8 : Distributions de taille des micelles de caséines réticulées et natives

3.1.3. La charge

Les mesures de la mobilité électrophorétique ont permis de déterminer la charge de surface des micelles de caséines réticulées et non réticulées. Les micelles de caséines natives ont une charge moyenne de $-15 \pm 0,8$ mV alors que les micelles réticulées sont plus négatives ($-20 \pm 0,4$ mV). Cette augmentation de charge négative serait due à la réticulation des amines libres des lysines et des arginines portés par la caséine κ en surface. A pH 7,15, le ratio $[\text{NH}_3^+ / \text{NH}_2]$ est constant et supérieur à 1 (Nogueira et al., 2013). La réaction consomme la forme NH_2 ce qui favoriserait la déprotonation des groupements NH_3^+ afin de maintenir une valeur constante du ratio $[\text{NH}_3^+ / \text{NH}_2]$ à l'équilibre conduisant ainsi à une diminution des charges positives au niveau de la caséine κ et par conséquent une augmentation de la charge négative en surface.

3.1.4. Les caractéristiques dimensionnelles (AFM)

Les images obtenues par AFM permettent représenter en 3D des micelles natives et réticulées (figure 9). La barre colorée sur la droite de la figure indique la hauteur des micelles en fonction de la couleur. Les micelles ont la forme d'une calotte sphérique du fait de leur adsorption sur la surface (Helstad et al 2007).

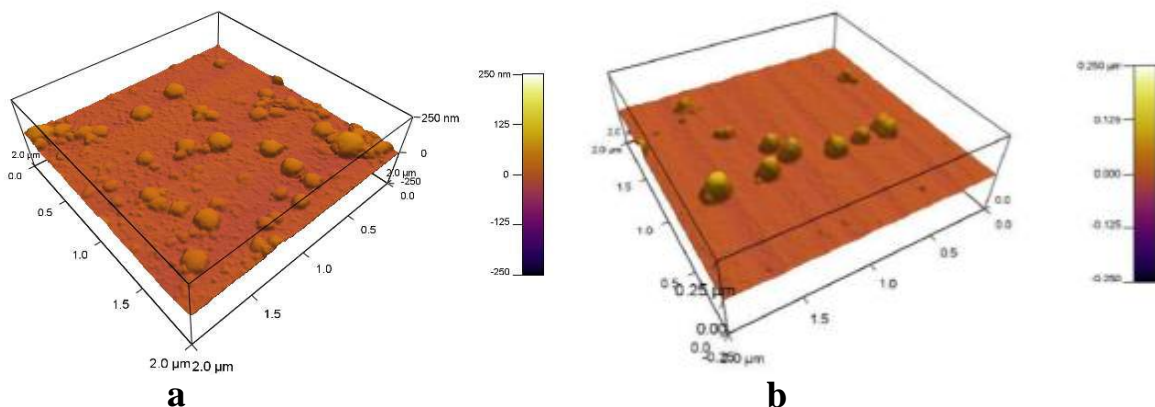


Figure 9 : Image 3D des micelles natives (a) et réticulées (b) (50g.L^{-1}) à pH 7,15, $2 \times 2 \mu\text{m}^2 \times 250$ nm

Les illustrations montrent une déformation et un aplatissement des micelles natives (figure 9a). Cette déformation est principalement due à leur nature car ce sont des agrégats protéiques mous ayant un module de Young de l'ordre de 0,5 MPa (Uricanu et al., 2004). Ces observations sont similaires aux résultats observés par Ouanezar et al. (2012) obtenus avec du PPCN (25g.L^{-1}) préparés dans du SMUF (simulated milk ultrafiltrate) et immobilisés de la même façon. Il a également montré que les micelles immobilisées se déformaient sans perdre leur volume. Les micelles restent présentes et ne se sont pas désintégrées suite à l'immobilisation, ce qui confirme que les résultats obtenus étaient représentatifs des micelles de caséines « natives ».

Des micelles étaient présentes également après traitement à la génipine (figure 9b). Les images 3D obtenues indiquent qu'elles sont plus hautes que les micelles natives en dépit de la consommation des NH_2 .

Suite aux traitements des données, les fréquences de diamètres et de hauteurs des micelles natives (N=732) et réticulées (N=632) ont été déterminées (figure 10) et présentées sous forme de distributions. Un modèle de distribution Log-normale est ensuite ajusté manuellement aux données afin d'en extraire une valeur moyenne du diamètre et de la hauteur. Les courbes sont également présentées sur la figure 10.

Les calculs des angles de contact donnent des valeurs significativement différentes ($p < 0,05$) avec 60° (Ecart type = 12) en moyenne pour les micelles réticulées, contre 42° (Ecart type = 6) pour les micelles natives. Cette valeur concorde avec les résultats obtenus par Ouanezar *et al.*(2012).

Une fois, immobilisées, les micelles natives présentent un diamètre de $90 \pm 1,64$ nm et une hauteur moyenne de $27 \pm 1,78$ nm.

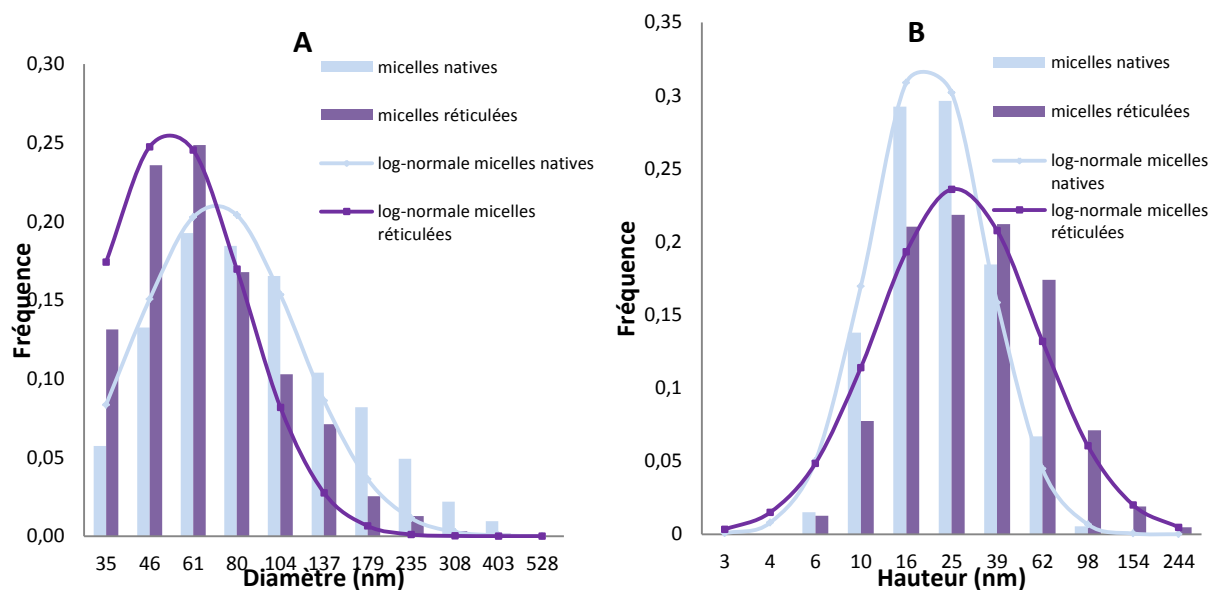


Figure 10 : Distribution des diamètres (A) et des hauteurs (B) de micelles natives et réticulées

Les données obtenues sur les micelles réticulées montrent qu'elles sont moins sensibles aux déformations et résistent à l'étalement sur le support. Elles sont moins écrasées sur la surface d'or fonctionnalisée. A pH 7,15, elles ont un diamètre et une hauteur moyens respectifs de $65 \pm 1,56$ nm et $49 \pm 2,22$ nm. Ainsi, les diamètres des micelles natives sont significativement plus élevés que ceux des micelles réticulées ($p < 0,05$). Par contre les micelles réticulées sont significativement plus hautes ($p < 0,05$).

3.2. Stabilité des micelles de caséines natives et réticulées

3.2.1. Stabilité des micelles de caséines après acidification

3.2.1.1. Précipitation

- Micelles de caséines natives

Les micelles de caséines réticulées et natives ont été acidifiées par HCl à pH 5,2. Suite à cette acidification, les micelles natives précipitent et forment un dépôt (figure 11).

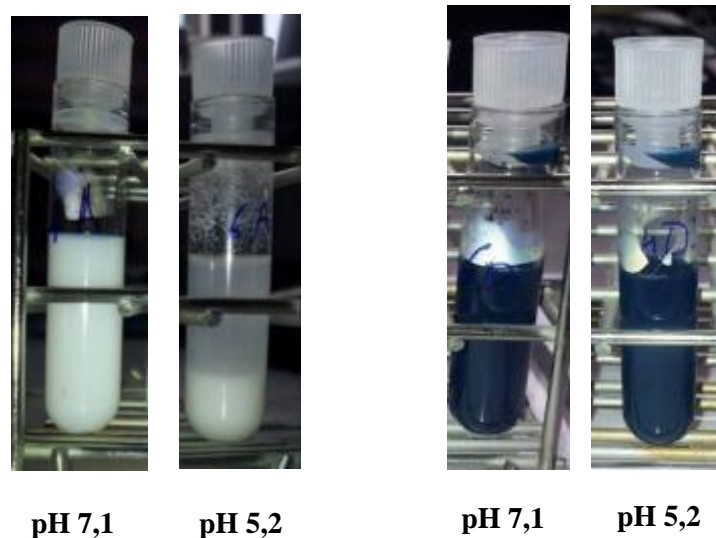


Figure 11 : Aspect des suspensions de micelles natives et réticulées à pH 7,1 et 5,2

La diminution du pH au cours d'une acidification affecte la fraction minérale des micelles de caséines et neutralise les charges par les ions H^+ (Le Graët et Brulé, 1993). Au pH du lait, le phosphate de calcium ($CaHPO_4$) de la phase soluble se trouve à l'état saturé. A pH à 5,2, les ions phosphate HPO_4^{2-} sont protonés ce qui induit le déplacement de l'équilibre des minéraux de la phase micellaire vers la phase soluble qui n'est plus à saturation (figure 1) (Brulé, 1981 ; Holt, 1985). A pH 5,2 la majorité du phosphate (85%) et du calcium (73%) est solubilisée (Gaucheron, 2005). Des résultats obtenus par SAXS (Small Angle X-ray Scattering) (Marchin et al, 2007) montrent que la diminution du pH à 5,2 entraîne la solubilisation du phosphate calcium colloïdal et un maintien de l'intégrité micellaire grâce à la subsistance des interactions hydrophobes intermoléculaires (Holt et Horne, 1996 ; Lucey et al., 1997 ; Marchin et al., 2007). La diminution du pH au-dessous de 5 entraîne la perte des forces répulsives en surface et conduit à l'agrégation des micelles (De la Fuente, 1998).

- **Micelles de caséines réticulées**

Contrairement aux micelles de caséines natives présentant une précipitation à pH 5,2, les micelles de caséines réticulées par la génipine ne présentent pas de précipité visible (figure 11). Le maintien de la stabilité micellaire malgré une solubilisation du phosphate de calcium serait du à la création des liaisons covalentes suite à la réticulation en interne et des répulsions électrostatiques présentes en surface. Une autre explication serait également liée l'augmentation de la charge négative en surface qui contribue à cette stabilité (paragraphe 4.1.3).

3.2.1.2. Caractéristiques dimensionnelles (AFM)

- **Effet du pH 5,2 sur les micelles natives**

Des images AFM après greffage carbodiimide sur plaque d'or ont été réalisées pour comparer les structures de micelles de caséine traitées ou non à la génipine à pH 5,2. Afin d'éviter l'agrégation, les micelles de caséines ont été immobilisées à l'état natif (pH 7,15) le pH du tampon a été par la suite modifié (HEPES à pH 5,2) comme décrit par Ouanezar et al. (2012).

Une image 3D (figure 12) réalisée sur des micelles acidifiées montre une déformation et un aplatissement plus importants pour les micelles natives à pH 5,2 (figure 12 b) que pour les micelles à pH 7,15 (figure 12 a).

Les échelles de hauteurs présentées montrent des objets plus foncés, donc de hauteurs plus petites que les micelles à pH 7,15 (voir les échelles de hauteurs représentées par des couleurs à droite des images).

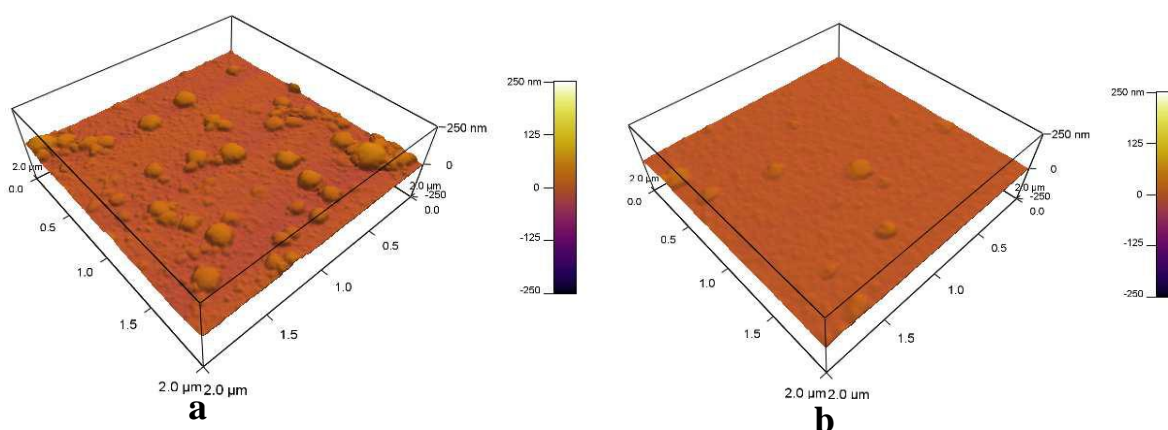


Figure 12 : Image 3D des micelles natives (50g.L^{-1}) à pH 7,15 (a) et à pH 5,2 (b), $2 \times 2 \mu\text{m}^2 \times 250$ nm

Les fréquences de diamètres et de hauteurs des micelles natives à pH 7,15 (N=733) et acidifiées à pH 5,2 (N=582) ont été calculées et une distribution Log-normale a été ajustée manuellement à ces données (figure 13).

Les micelles natives acidifiées sont significativement moins hautes et plus larges que les micelles natives à pH neutre avec un diamètre moyen de $81 \pm 1,63$ nm ($p < 0,05$) et une hauteur moyenne de $18 \pm 1,68$ nm ($p < 0,05$). Leur diamètre hydrodynamique n'a pas pu être déterminé par DLS à cause de la précipitation et des agrégats formés suite à l'acidification. Le calcul de l'angle de contact donne des valeurs significativement différentes avec 33° (Ecart type = 6) en moyenne pour les micelles acidifiées, contre 42° (Ecart type = 6) pour les micelles natives ($p < 0,05$).

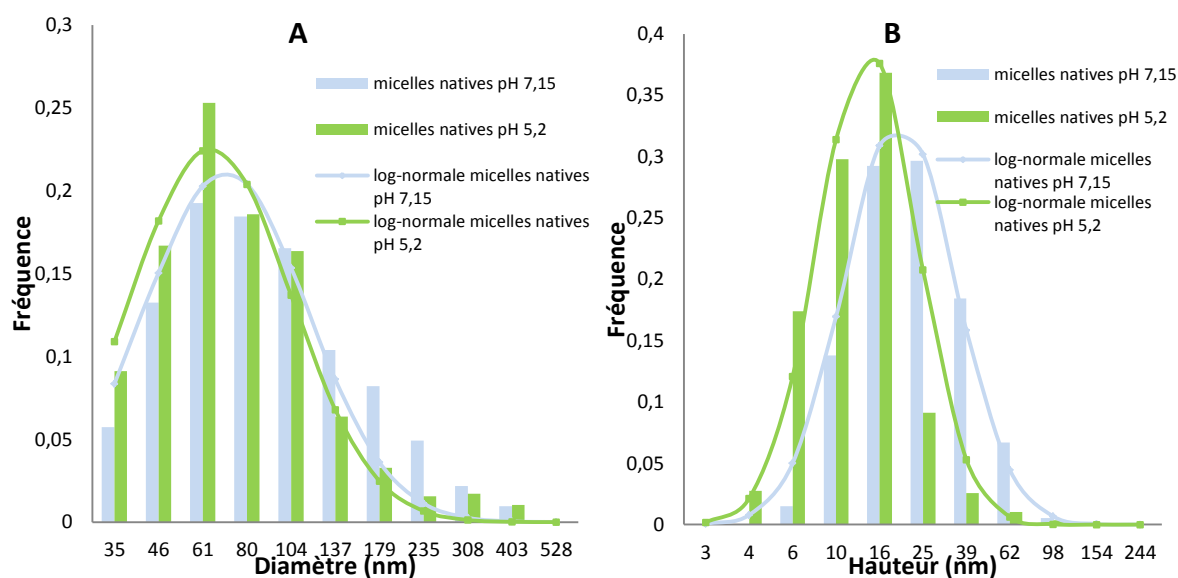


Figure 13 : Distribution des diamètres (A) et des hauteurs (B) de micelles natives à pH 7,15 et à pH 5,2

Les micelles acidifiées ayant des dimensions plus faibles ont subi une rétraction plus prononcée dans le sens de la hauteur. Cette différence de topographie est expliquée par l'effet du changement des interactions à l'intérieur des micelles et au niveau de leur environnement ionique natif. Dans un premier temps, la charge nette des micelles de caséines diminue et les nanoclusters de phosphate de calcium se solubilisent graduellement et passent dans la phase soluble pour un pH compris entre 6 et 5,2 (Le Graët et Brulé, 1993). Les charges négatives ne sont pas le seul facteur de stabilité micellaire. Une diminution des valeurs du pH jusqu'à 4,6 (pH_i des caséines κ) affaiblirait leur affinité avec l'eau et conduirait un collapse de ses terminaisons saillantes qui assurent la stabilité électrostatique et stérique des micelles de caséines (Holt et Horne, 1996 ; Tuinier et De Kruif, 2002).

Plusieurs études (Moitzi et al., 2011 ; Ouanezar et al., 2012) ont déjà montré que la perte des charges durant l'acidification des micelles entraînent une diminution de leur taille par compaction. Moitzi (2011) a démontré par MALS (multiangle light scattering) que le diamètre des micelles

diminuait de 15% à pH 5,4 avec une perte de 40% du volume total. Dans l'étude réalisée par Ouanezar et al. (2012), il a été démontré que la perte de volume peut atteindre 75% à pH 5. Les résultats AFM obtenus dans cette étude concordent avec ces constatations.

- **Effet du pH 5,2 sur les micelles réticulées**

Des images AFM ont été également réalisées afin de comparer les structures de micelles de caséine réticulées à pH 7,15 et à pH 5,2 ($p < 0,05$). Une image 3D (figure 14b) réalisée sur ces micelles réticulées acidifiées ne montre pas de différence avec les micelles réticulées non acidifiées (figure 14a).

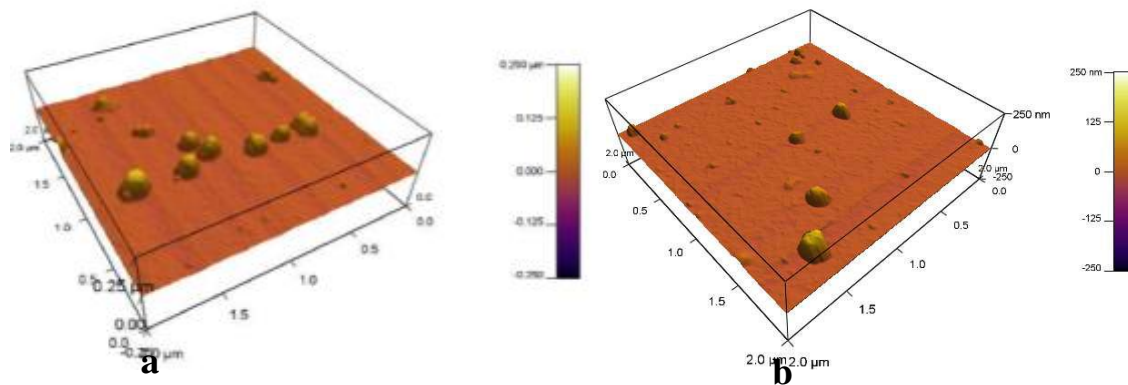


Figure 14 : Image 3D des micelles ($50\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) réticulées à pH 7,15 (a) et à pH 5,2 (à droite), $2 \times 2 \mu\text{m}^2 \times 250 \text{ nm}$

Les fréquences de diamètres et de hauteurs des micelles réticulées à pH 7,15 ($N=633$) et à pH 5,2 ($N=920$) ont été calculées et une distribution Log-normale a été ajustée manuellement à ces données. Les résultats sont représentés graphiquement dans la figure 15. Ils ne montrent pas de différences significatives ($p > 0,05$). Le calcul de l'angle de contact donne 62° (Ecart type = 12) en moyenne pour les micelles réticulées acidifiées, et 60° (Ecart type = 14) pour les micelles réticulées à pH 7,15 ($p > 0,05$).

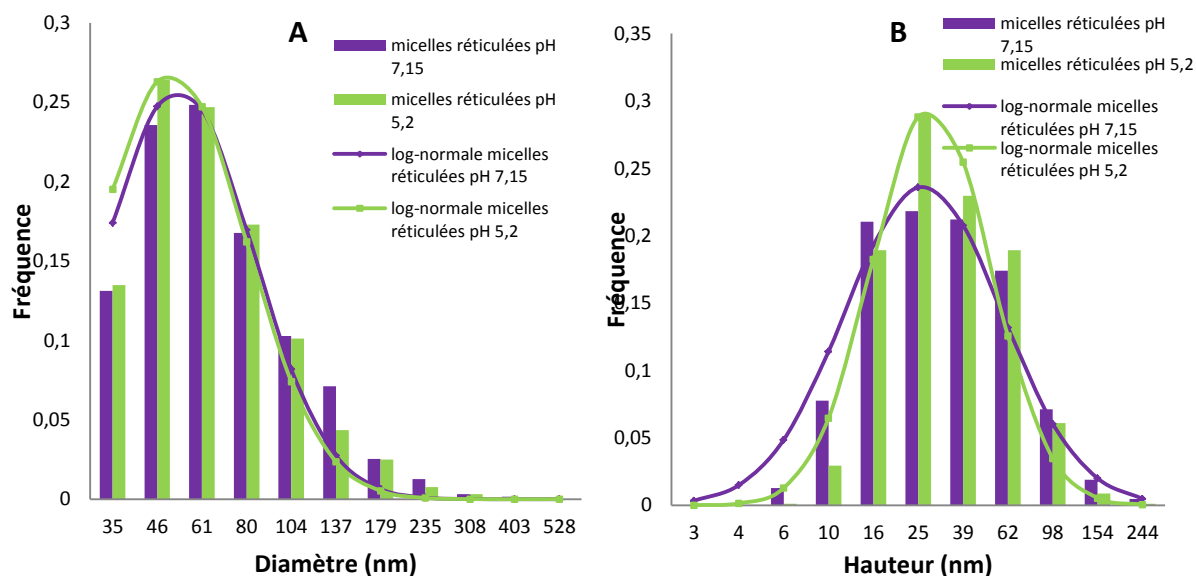


Figure 15 : Distribution des diamètres (A) et des hauteurs (B) de micelles réticulées à pH 7,15 et à pH 5,2

Quand les micelles réticulées sont acidifiées, les diamètres et les hauteurs sont similaires aux micelles réticulées à pH 7,15 et la structure micellaire est bien maintenue. La mise en place des liaisons covalentes suite à la réticulation avec la génipine empêche la dissociation des caséines malgré la solubilisation du phosphate de calcium.

3.2.2. Déminéralisation des micelles de caséines réticulées par le citrate de sodium

L'effet de la déminéralisation par le citrate de sodium (100 mM) sur les micelles de caséines a été étudié par mesures de la diffusion dynamique de la lumière et par observation AFM sur des micelles de caséines réticulées ou pas.

La chélation du calcium ionique dans la phase soluble par l'ajout du citrate induit la dissociation totale des micelles de caséines natives (Lin et al., 1972 ; Griffin et al., 1988 ; Ward et al., 1997 ; Udabage et al., 2000). Le citrate de calcium complexe le calcium ionique de la phase continue (colloïdale) et induit un déplacement de l'équilibre minéral dans le sens d'une solubilisation du phosphate de calcium colloïdal (Lin et al., 1972 ; Holt, 1982 ; Munyua et Larsson-Raznikiewicz, 1980 ; Griffin et al., 1988 ; Udabage et al., 2000).

3.2.2.1. La taille

La figure 16 représente les distributions de taille des micelles de caséines réticulées obtenues par DLS avant et après traitement au citrate. En absence de citrate, la taille des micelles présente une moyenne de $156,8 \text{ nm} \pm 0,5$. L'addition de citrate de sodium (100 mM) entraîne une apparition d'un

pic à $174,6 \text{ nm} \pm 0,7 \text{ nm}$. Ces résultats montrent que contrairement aux micelles de caséines natives déstructurées suite à l'ajout du citrate, les micelles de caséines réticulées maintiennent leur structure et leur taille.

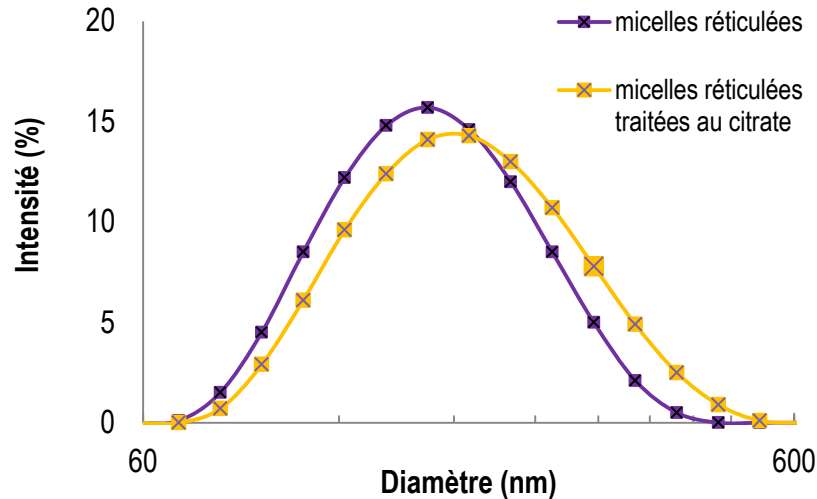


Figure 16 : Distributions de taille des micelles de caséines réticulées et natives traitées et non traitées au citrate

Cette augmentation de taille pour les micelles réticulées est due à la répulsion électrostatique à l'intérieur de la micelle. La solubilisation totale du phosphate de calcium colloïdal induit à l'accumulation des charges négatives au niveau des phosphosérines. Les liaisons covalentes établies grâce à la génipine empêcheraient la désintégration des micelles.

3.2.2.2. Caractéristiques dimensionnelles (AFM)

Une image 3D (figure 17) réalisée sur des micelles réticulées et traitées au citrate confirme le maintien de l'intégrité micellaire malgré la perte du phosphate de calcium colloïdal (figure 17 b). Cette structure colloïdale est maintenue grâce aux liaisons covalentes pontées par la génipine entre les lysines et/ou arginines (Taylor, 2008 ; Nogueira et al., 2013).

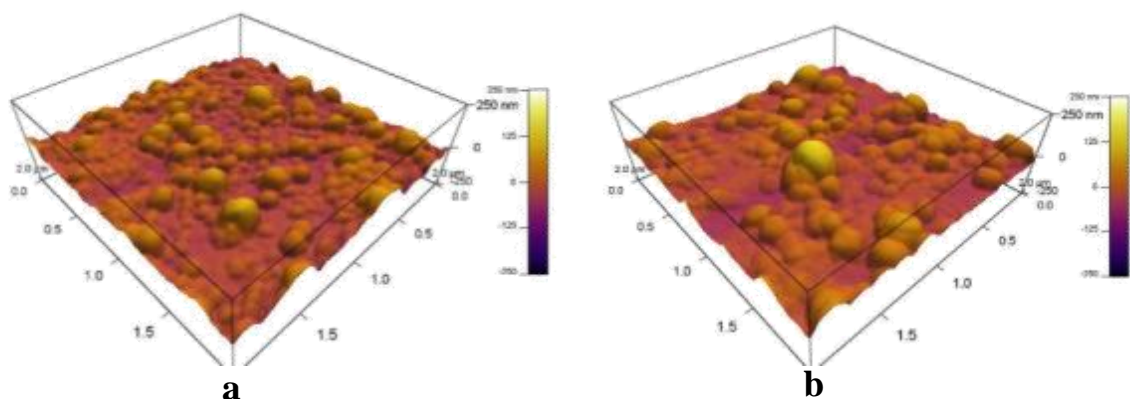


Figure 17 : Image 3D des micelles réticulées ($50\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) avec citrate (a) et sans citrate (b), $2 \times 2 \mu\text{m}^2 \times 250 \text{ nm}$

Les fréquences de diamètres et de hauteurs des micelles réticulées traitées (N=837) ou non au citrate (N=608) ont été calculées et une distribution Log-normale a été ajustée manuellement à ces données (figure 18). Les résultats sont représentés graphiquement dans la figure 18. Les hauteurs moyennes calculées sont significativement plus importantes pour les micelles non traitées au citrate que pour les micelles traitées ($p < 0,05$). Cette observation a été également démontrée par le calcul de l'angle de contact qui donne 48° (Ecart type = 10) en moyenne pour les micelles réticulées traitées au citrate, contre 61° (Ecart type = 13) pour les micelles réticulées sans citrate ($p < 0,05$).

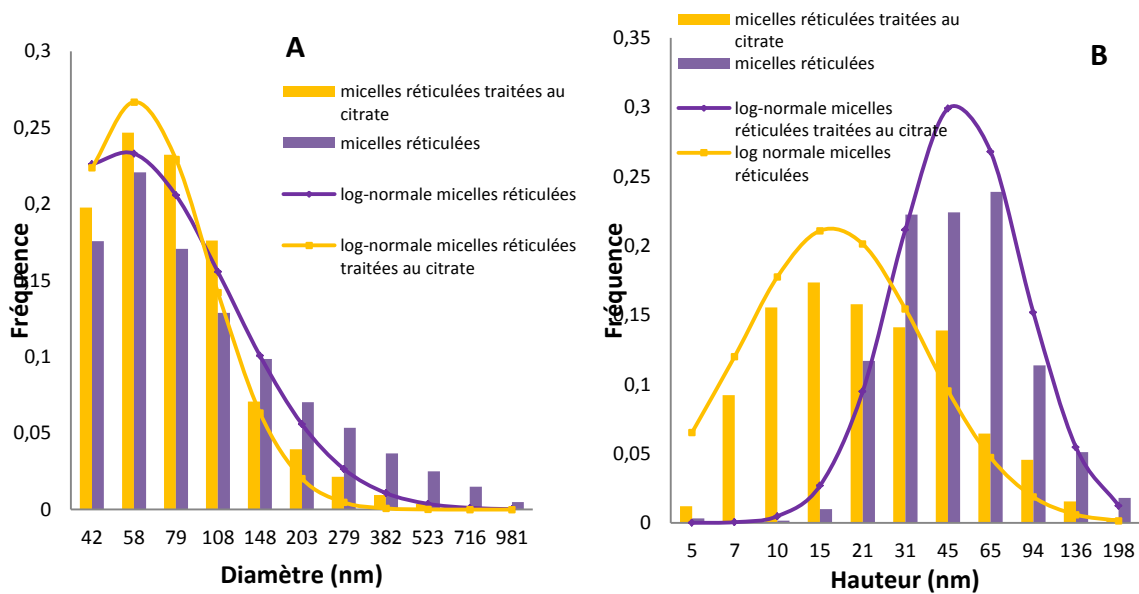


Figure 18 : Distribution des diamètres (A) et des hauteurs (B) de micelles réticulées avec et sans citrate

La diminution de taille ne serait pas due à la dissociation d'une partie des caséines. Des résultats obtenus par SDS-PAGE (Nogueira et al., 2013), montrent qu'après la réticulation des micelles par la génipine, aucune caséine n'a été solubilisée suite au traitement au citrate, à l'EDTA et au DTT. Ces résultats sont surprenants car on a démontré à pH 5,2 que des micelles réticulées et déminéralisées pouvaient conserver leur structure et leur volume. Dans le cas du citrate, la DLS a cependant montré une expansion du volume des micelles réticulées en dépit de leur réticulation par la génipine. A pH 5,2, le calcium non solubilisé dans la phase soluble serait à l'origine du maintien de cette structure. Une étude réalisée par Le Graët et Brulé (1993) montre qu'à pH 5,2, 30% du calcium colloïdal restent liés aux phosphosérines à l'intérieur de la micelle. Ce calcium pourrait s'associer à d'autres résidus phosphoséryls ou à des résidus carboxyliques chargés négativement empêchant l'effondrement de la structure.

3.2.3. Action de la présure

La chymosine est un agent utilisé pour la coagulation du lait en vue de la fabrication de la majorité des fromages. Le mécanisme de la coagulation se fait en deux phases. Durant la première, s'effectue l'hydrolyse enzymatique de la caséine κ . La chymosine hydrolyse les caséines κ au niveau de la liaison peptidique Phe₁₀₅-Met₁₀₆, conduisant à la formation de la para-caséine κ et à la libération d'un peptide nommé caséinomacropeptide (CMP) chargé négativement et correspondant à la partie de la protéine responsable des répulsions stériques et électrostatiques des micelles. L'action de la chymosine correspond ainsi à la suppression de cette « couche chevelue » stabilisante, induisant par conséquent une diminution de la charge globale et de la taille des particules de 7 à 15 nm (Walstra et al., 1981). La deuxième étape est la phase d'agrégation des micelles de caséines. Les micelles s'agrègent entre elles par l'intermédiaire des ponts de calcium, des forces de van der Waals et des interactions hydrophobes (Walstra, 1990 ; Mellema et al., 1999). Les micelles déstabilisées et agrégées forment un réseau macroscopique soumis à une réorganisation structurale (Mellema et al., 2000, 2002).

Contrairement aux micelles de caséines natives, les micelles réticulées ne coagulent pas. Cette observation indique que la surface des micelles a été affectée par la réticulation. Une étude de l'influence de la réticulation avec génipine sur la libération du glycomacropeptide a été donc envisagée par la réalisation de la cinétique de sa libération après l'ajout de la présure afin caractériser les propriétés de surface du colloïde créé (figure 19).

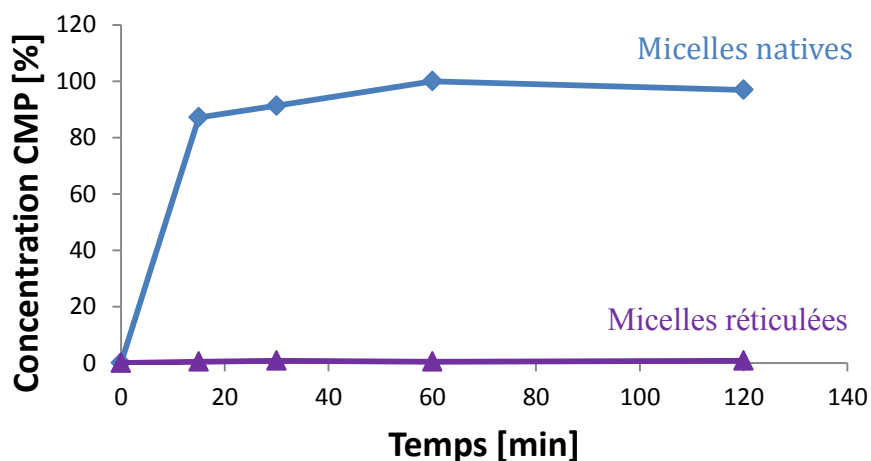


Figure 19 : Influence de la réticulation avec la génipine sur la libération du glycomacropeptide

Si on considère que la quantité de CMP libérée suite à l'hydrolyse de la caséine κ des micelles de caséines natives correspond à 100%, on constate que le CMP n'a pas été libéré pour les micelles de caséines réticulées, c'est ce qui explique l'absence de coagulation.

L'inhibition de la libération du CMP serait probablement due à la présence des lysines au niveau des sites (111-112-126) (figure 20). Leur réticulation pourrait bloquer l'accessibilité de la chymosine au site (105-106) de la caséine κ . Lucey (2002) a montré que la séquence His₉₈-Lys₁₁₁ affecte la capacité d'hydrolyse de la liaison (105-106) par la chymosine.

Une deuxième interprétation suggère que le CMP serait coupé mais non libéré à cause des liaisons covalentes établies au niveau des NH₂ libres présents sur ses lysines et des NH₂ libres de lysines et arginines de la même micelle empêchant ainsi sa libération.

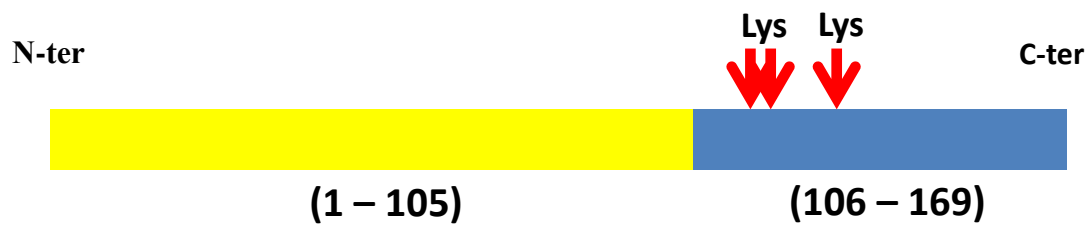


Figure 20 : Présentation schématique de la caséine κ

Conclusions et perspectives

L'objectif de travail était de répondre aux questions suivantes :

- Quelles sont les caractéristiques du colloïde créé?
- Quels sont les effets des conditions de déstabilisation sur l'objet micellaire réticulé?

Comme nous venons de le voir au travers les résultats obtenus, la stabilité des micelles de caséines natives dépend des facteurs environnementaux. Les micelles de caséines sont des structures dynamiques qui échangent du calcium et du phosphate avec la phase soluble. Ces équilibres entre phase soluble et phase micellaire sont régis par des paramètres thermodynamiques tels le pH et la concentration des différentes entités. La modification d'un ou plusieurs de ces paramètres entraîne des déplacements d'équilibre en faveur soit de la phase micellaire soit de la phase soluble. En fonction des modifications des paramètres physicochimiques on peut induire sélectivement des changements de composition au niveau minéral (acidification, chélation du calcium) et des changements de structure liés à l'organisation des caséines entre elles et des interactions caséines-minéraux.

La réticulation des micelles de caséines natives par la génipine donne un nouveau colloïde ayant des caractéristiques différentes des micelles natives. Les micelles réticulées sont dotées d'une stabilité plus importante vis-à-vis des changements de leur environnement. Elles maintiennent leur intégrité et restent stables malgré les modifications affectant la fraction minérale et la stabilité en surface assurée par la caséine κ . Le CMP n'est plus disponible à l'action de la chymosine et l'acidification à pH 5,2 n'induit pas une précipitation des micelles. Ce colloïde réticulé est également moins sensible à la déminéralisation par le citrate et garde son intégrité.

Les principales caractéristiques dimensionnelles obtenues par AFM sont synthétisées dans le tableau 3.

Tableau 3 : Angles de contact obtenus par AFM

	Angle de contact		
	pH 7,15	pH 5,2	Citrate de sodium
Micelles natives	42	33	x
Micelles réticulées	60	62	48

Perspectives scientifiques

Suite à ce travail, de nombreuses questions restent à résoudre afin d'apporter des informations complémentaires. Les études réalisées se sont focalisées sur les différents états micellaires induits par les modifications des paramètres physico-chimiques qui régissent leur stabilité. Cependant, une analyse de la composition minérale de la phase soluble après les traitements serait intéressante afin d'apporter des réponses sur l'aspect qualitatif et quantitatif de la fraction minérale du colloïde suite à

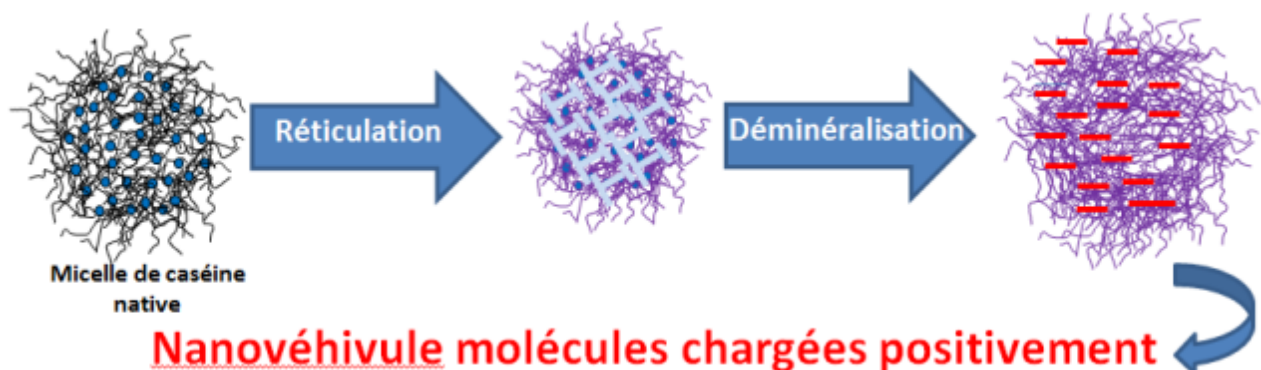
la déstabilisation. Il serait également intéressant d'apporter des informations sur la structure et l'organisation interne de ces micelles réticulées. Nous avons envisagé d'étudier le comportement des micelles réticulées à la gélification, notamment acide afin de comprendre leur réactivité et les propriétés du réseau formé. Une étude des gels acides par ajout de glucono-delta-lactone (GDL) a été initiée afin de déterminer les propriétés des gels obtenus par rhéologie oscillatoire. Ces travaux nécessitent des développements. Des premiers essais ont été réalisés par AFM afin de d'évaluer l'élasticité des micelles réticulées. L'étude les forces appliquées sur les micelles et leur aptitude à adhérer sur la pointe montrent qu'une fois acidifiées, les micelles natives sont légèrement plus rigides qu'à pH 7,15 tandis que les micelles traitées à la génipine à pH 5,2, sont nettement plus élastiques qu'à pH 7,15. Ces travaux méritent des mises au point.

Perspectives d'utilisation du colloïde réticulé

Tous ces travaux contribuent à une meilleure connaissance des micelles de caséines ainsi réticulées et permettront de proposer des voies de valorisation innovantes.

Cette structure est plus stable et se garde à une gamme de pH plus large. Elle est résistante à la dissociation suite à la solubilisation du phosphate de calcium colloïdal. Une fois déminéralisée, nous avons constaté que ces micelles réticulées augmentent de diamètre suite à l'accumulation des charges négatives en interne. Il est donc envisageable d'utiliser cette structure comme un nanovecteur de cations, de protéines comme les lactoferrines ou d'enzymes tel que les lysozymes. En effet, il a été démontré que les micelles de caséines réticulées par le glutaraldéhyde sont plus résistantes à la protéolyse dans le tractus et assurent la libération de molécules actives pour plus de 24 h après administration orale chez le lapin. Cependant le glutaraldéhyde est très cytotoxique.

Cette micelle réticulée pourrait également être utilisée dans le domaine non alimentaire pour le traitement des déchets pour la purification de matériaux par la chélation de métaux toxiques chargés positivement.



Références bibliographiques

Brulé, G. (1981) Les minéraux du lait. *Rev. Lait. Fr.*, 400 : 61-65.

Butler, M.F.; Ng, Y.F.; Pudney, P.D.A. (2003) Mechanism and kinetics of the crosslinking reaction between biopolymers containing primary amine groups and genipin. *J. Pol. Sci: Part A: Pol. Chem*, 41 : 3941–3953.

Cao, H., Feng, Q., Xu, W., Li, X.R., Kang, Z., Ren, Y. et Du, L.(2010) Genipin induced apoptosis associated with activation of the c-Jun NH2-terminal kinase and p53 protein in HeLa cells. *Biol. Pharm. Bull*, 33, 1343-1348.

Chaubaroux, C., Vrana, E., Debry, C., Schaaf, P., Senger, B., Voegel, J-C., Haikel, Y., Ringwalt, C., Hemmerle, J., Lavalle, P. et Boulmedais, F. (2012) Collagen-Based Fibrillar Multilayer Films Cross-Linked by a Natural Agent. *Biomacromolecules*, 13 : 2128–2135.

Chang, C. (2009) Effects of nerve growth factor from genipincrosslinked gelatin in polycaprolactone conduit on peripheral nerve regeneration □ In vitro and in vivo. *J. Biomed. Mater. Res., Part A*, 91 (2): 586–596.

Chen, Y., Chang, J., Cheng, C., Tsai, F., Yao, C. et Liu, B. (2005) An in vivo evaluation of a biodegradable genipin-cross-linked gelatin peripheral nerve guide conduit material. *Biomaterials*, 26 (18): 3911–3918.

Dalgleish, D. et Corredig, M. (2012) The structure of the casein micelle of milk and its changes during processing. *The annual Review of Food Science Technology*, 3:449-467.

De Kruif, C. G. et Holt, C. (2003) Dans : Fox, P.F. et McSweeney, P.L.H. *Advanced Dairy Chemistry*. I. Part A. Proteins, New York, 233-276.

De Kruif, C.G., Huppertz, T., Urban, V.S., Petukhov, A.V. (2012) Casein micelles and their internal structure. *Advances in Colloid and Interface Science*, 171-172: 36-52.

De Kruif, C. G. et Roefs, S. P. F. M. (1996) Skim milk acidification at low temperatures: a model for the stability of casein micelles. *Neth. Milk Dairy J.*, 50 : 113-120

De La Fuente, M. A. (1998) Changes in the mineral balance of milk submitted to technological treatments. *Trends in Food Science & Technology*, 9 : 281-288.

Elzoghby, AO., Samy, WM. et Elgindy NA.(2010) Protein-based nanocarriers as promising drug and gene delivery systems. *J Control Release*, 161:38–49.

- Fox, P. F. (1989) The milk protein system. Dans *Developments in dairy chemistry*, P.F. Fox, (pp. 1-54). London : Elsevier.
- Fujikama S., Fukui Y., Koga K. et Kumada J. (1987) Brilliant skyblue pigment formation from Gardenia fruits. *Journal of Fermentation Technology*, 65: 419–424.
- Gaucheron F. (2004) Minéraux et produits laitiers. Technique et Documentation, Lavoisier. Paris, France.
- Gaucheron, F., (2005) The minerals of milk, *Reprod. Nutr. Dev.*, 45 : 473-483.
- Griffin, M. C. A. et Anderson, M. (1983) The determination of casein micelle size distribution in skim milk by chromatography and photon correlation spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, 748 : 453-459.
- Harris, R., Lecumberri, H., et Heras, A. (2010) Chitosan-Genipin Microspheres for the Controlled Release of Drugs: Clarithromycin, Tramadol and Heparin. *Mar. Drugs* , 8 : 1750-1762.
- Holt, C. (1992) Structure stability of bovine casein micelles. Dans *Advanced in Protein Chemistry*, 43 : 63-151.
- Holt, C. (1982) Inorganic constituents of milk. III. The colloidal calcium phosphate of cow's milk. *J. Dairy Res.*, 49 : 29-38.
- Holt, C. (1985) The size distribution of bovine casein micelles : a review. *Food microstruct.*, 4 : 1-10.
- Holt, C. et Horne, D. S. (1996) The hairy casein micelle : evolution of the concept and its implications for dairy technology. *Neth. Milk Dairy J.*, 50 : 85-111.
- Helstad, K., Rayner, M., van Vliet, T., Paulsson, M., Dejmek, P. (2007) Liquid droplet-like behaviour of whole casein aggregates adsorbed on graphite studied by nanoindentation with AFM. *Food Hydrocolloids*, 21: 726-738.
- Koo, H.-J., Song, Y.-S., Kim, H.-J., Lee, Y.-H., Hong, S.-M., Kim, S.-J., Kim, B.-C., Jin, C., Lim, C.-J. et Park, E.-H. (2004) Antiinflammatory effects of genipin, an active principle of gardenia. *Eur. J. Pharmacol*, 495 (2–3): 201–208.
- Lee, J.H., Lee, D.U. et Jeong, C.S. (2009) Gardenia jasminoides Ellis ethanol extract and its constituents reduce the risks of gastritis and reverse gastric lesions in rats. *Food Chem. Toxicol.*, 47: 1127-1131.
- Le Graët, Y. et Brulé, G. (1993) Les équilibres minéraux du lait : influence du pH et de la force ionique. *Lait*, 73 : 51-60.

- Lin, S. H. C., Leong, S. L., Dewan, R. K., Bloomfield, V. A., et Morr, C. V. (1972) Effect of calcium ion on the structure of native bovine casein micelles. *Biochemistry*, 11 : 1818-1821
- Lucey, J. A., Dick, C., Singh, H., et Munro, P. A. (1997) Dissociation of colloidal calcium phosphate-depleted casein particles as influenced by pH and concentration of calcium and phosphate. *Milchwissenschaft*, 52 : 603-606
- Lucey J.A. (2002) Formation and physical properties of milk protein gels. *Journal of Dairy Science*, 85, 281-294.
- Marchin S., Putaux J.L., Pignon F., Léonil J. (2007) Effects of the environmental factors on the casein micelle structure studied by cryo transmission electron microscopy and small-angle x-ray scattering/ultrasmall-angle x-ray scattering. *Journal of Chemical Physics*, 126, 045101
- Mellema M., Heesackers J.W.M., Van Opheusden J.H.J., Van Vliet T. (2000) Structure and scaling behavior of aging rennet-induced casein gels examined by confocal microscopy and permeametry. *Langmuir*, 16, 6847-6854.
- Mellema M., Walstra P., Van Opheusden J.H.J., Van Vliet T. (2002) Effects of structural rearrangements on the rheology of rennet-induced casein particle gels. *Advances in Colloid and Interface Science*, 98, 25-50.
- Munyua, J. K. et Larsson-Raznikiewicz, M. (1980) The influence of Ca²⁺ on the size and light scattering properties of casein micelles. 1 Ca²⁺ removal. *Milchwissenschaft*, 35 : 604-606
- Nogueira, N., Saint-Jalmes, A. et Gaucheron, F. (2013) Biosourced microgels particles prepared from crosslinking of casein micelles by genipin. *Biomacromolecules* (not published)
- Ouanezar, M., Guyomarc'h F., Bouchoux, A. (2012) AFM imaging of milk casein micelles : evidence for structural rearrangement upon acidification. *Langmuir*, 28: 4915-4919.
- Park J.E., Lee J.Y., Kim H.G., Hahn T.R. et Paik Y.S. (2002) Isolation and characterization of water-soluble intermediates of blue pigments transformed from geniposide of *Gardenia jasminoides*. *J Agric Food Chem*, 50: 6511–6514.
- Phoebe, X-Qi., Alberto, Nuñez., et Wickham, E-D. (2012) Reactions between β -Lactoglobulin and Genipin: Kinetics and Characterization of the Products. *J. Agric. Food Chem.*, 60 : 4327–4335
- Pitkowski, A, Durand, D., Nicolai, T. (2008) Scattering and turbidity study of the dissociation of casein by calcium chelation. *Biomacromolecules*, 9 : 369-375.

- Rose, D. (1969) A proposed model of micelle structure in bovine milk. *Dairy Science Abstracts*, 31 : 171-175
- Schmidt D.G. (1980) Colloidal aspects of casein. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 34, 42-64.
- Schmidt, D. G. et Payens, T.A . J. (1972) The evaluation of the positive and negative contributions to the second virial coefficient of some milk proteins. *J. Colloid Interface Sci.*, 39 : 655-662
- Schuck P., Piot M., Méjean S., Fauquant J., Brulé G., Maubois J.L. (1994) Dehydration of micellar casein-enriched milks by microfiltration; comparison of the properties of the resulting powders with those of an ultra-clean milk powder. *Lait*, 74, 47-63.
- Slattery, C. W. et Evard, R. (1973) A model for the formation and structure of casein micelles from subunits of variable composition. *Biochim. Biophys. Acta*, 317 : 529-538
- Sollohub K. et Cal K. (2010) Spray drying technique: II. Current applications in pharmaceutical technology. *J Pharm Sci.*, 99:587–97..
- Song, F., Zhang, L-M., Yang, C. et Yan, L. (2009) Genipin-crosslinked casein hydrogels for controlled drug delivery. *Int J Pharm.*;373:41–47.
- Tian, J., Cui, Y., Hu, L., Gao, S., Chi, W., Dong, T. et Liu, L. (2010) Antidepressant-like effect of genipin in mice. *Neurosci. Lett*, 479 : 236-239.
- Thomä, C., Krause, I. et Kulozik, U. (2006) Precipitation behaviour of caseinomacropptides and their simultaneous determination with whey proteins by RP-HPLC. *International Dairy Journal*, 16: 285–293.
- Tuinier, R., De Kruif, C.G. (2002) Stability of casein micelles in milk. *Journal of Chemical Physics*, 117: 1290-1295.
- Udabage, P., McKinnon, I. R., et Augustin, M. A. (2000) Mineral and casein equilibria in milk: effects of added salts and calcium-chelating agents. *J. Dairy Res.*, 67 : 361-370.
- Uricanu, V.I., Duits, M.H.G., Mellema, J. (2004) Hierarchical networks of casein proteins: an elasticity study based on atomic force microscopy. *Langmuir*, 20 : 5079-5090.
- Walstra, P. et Jenness, R. (1984). Dans *Dairy Chemistry and Physics*, John Wiley & Sons, New york, USA .
- Walstra, P. (1979) The voluminosity of bovine casein micelles and some of its implications. *J. Dairy Res.*, 46 : 317-323.

Walstra P., Bloomfield V.A., Wei G.J., Jenness R. (1981) Effect of chymosin action on the hydrodynamic diameter of casein micelles. *Biochimica et Biophysica Acta*, 669, 258-259.

Walstra P. (1990) On the stability of casein micelles. *Journal of Dairy Science*, 73, 1965-1979.

Xi-xun Y., Fei L., Yuan-ting X. et Chang-xiu W. (2010) *In vitro* study in the endothelial cell compatibility and endothelialization of genipin-crosslinked biological tissues for tissue-engineered vascular scaffolds. *J Mater Sci Mater Med*, 21:777-85.

Yan, S., Le-Ping, Wang., Li, Y-J., Gang, R., , Caridade, S. et Jia-Bing, Fan. (2010). Genipin-cross-linked collagen/chitosan biomimetic scaffolds for articular cartilage tissue engineering applications. *Journal of Controlled Release*, 152 :e192–e269

Yan, S. et Xiumei, M.(2011) Genipin crosslinked gelatin nanofibers for tissue engineering *Journal of Controlled Release*, 152 : e192–e269.

Zhang, C.Y., Parton, L.E., Ye, C.P., Krauss, S., Shen, R., Lin, C.T., Porco, J.A. et Lowell, B.B. (2006) Genipin inhibits UCP2-mediated proton leak and acutely reverses obesity- and high glucose-induced cell dysfunction in isolated pancreatic islets. *Cell Metab.*, 3: 417-427.

Liste des figures

- Figure 1** : Les équilibres minéraux entre la phase soluble et la phase micellaire dans le lait (Gaucheron, 2005)
- Figure 1** : Modèle submicellaire de micelles de caséines (Walstra, 1990)
- Figure 2** : Modèle de micelles de caséines à structure ouverte (Holt, 2003)
- Figure 3** : La structure chimique de la molécule de génipine
- Figure 4**: Mécanisme de la réticulation des caséines par la génipineRéf Figure 4: Mécanisme de la réticulation des caséines par la génipine (Sollohub et al., 2010)
- Figure 5** : Dispositif simplifié de la diffusion dynamique de lumière
- Figure 6** : Principe de l'AFM
- Figure 7**: Cinétique de la réaction de réticulation suivie à 605 nm
- Figure 8** : Distributions de taille des micelles de caséines réticulées et natives
- Figure 9** : Image 3D des micelles natives (a) et réticulées (b) (50g.L^{-1}) à pH 7,15, $2 \times 2 \mu\text{m}^2 \times 250 \text{ nm}$
- Figure 10** : Distribution des diamètres (A) et des hauteurs (B) de micelles natives et réticulées
- Figure 11** : Aspect des suspensions de micelles natives et réticulées à pH 7,1 et 5,2
- Figure 12** : Image 3D des micelles natives (50g.L^{-1}) à pH 7,15 (à gauche) et à pH 5,2 (à droite), $2 \times 2 \mu\text{m}^2 \times 250 \text{ nm}$
- Figure 13** : Distribution des diamètres (A) et des hauteurs (B) de micelles natives à pH 7,15 et à pH 5,2
- Figure 14** : Image 3D des micelles (50g.L^{-1}) réticulées à pH 7,15 (à gauche) et à pH 5,2 (à droite), $2 \times 2 \mu\text{m}^2 \times 250 \text{ nm}$
- Figure 15** Distribution des diamètres (A) et des hauteurs (B) de micelles réticulées à pH 7,15 et à pH 5,2
- Figure 16** : Distributions de taille des micelles de caséines réticulées et natives traitées et non traitées au citrate
- Figure 17** : Image 3D des micelles réticulées (50g.L^{-1}) avec citrate (à droite) et sans citrate (à gauche), $2 \times 2 \mu\text{m}^2 \times 250 \text{ nm}$
- Figure 18** Distribution des diamètres (A) et des hauteurs (B) de micelles réticulées avec et sans citrate
- Figure 19** : Influence de la réticulation avec la génipine sur la libération du glycomacropéptide
- Figure 20** : Présentation schématique de la caséine κ

Liste des tableaux

Tableau 1 : Composition en minéraux d'un lait bovin d'après Gaucheron (2005)

Tableau 2 : Gradient d'élution chromatographique pour le dosage de CMP

Tableau 3 : Angles de contact obtenus par AFM

Communications envisagées

- Deuxième symposium sur "*Minéraux et Produits Laitiers*"
- Article

