



HAL
open science

Elaboration de nano et microstructures par assemblages de protéines

Said Bouhallab, Alain Riaublanc, Thomas Croguennec

► **To cite this version:**

Said Bouhallab, Alain Riaublanc, Thomas Croguennec. Elaboration de nano et microstructures par assemblages de protéines. *Innovations Agronomiques*, 2011, 13, pp.133-147. hal-01454221

HAL Id: hal-01454221

<https://hal.science/hal-01454221>

Submitted on 29 May 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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

Elaboration de nano et microstructures par assemblages de protéines

Bouhallab S.[†], Riaublanc A.[‡], Croguennec T.[†]

[†]: UMR 1253, INRA, Agrocampus Ouest, Sciences & Technologie du Lait et de l'œuf, Rue Saint Briec, F-35042 Rennes cedex

[‡]: UR 1268 Biopolymères, Interactions, Assemblages. BP 71627- 44316 Nantes cedex 3

Correspondance : Said.Bouhallab@rennes.inra.fr

Résumé

L'industrie agro-alimentaire est plus que jamais confrontée à innover dans l'usage des ingrédients générés au cours des processus de transformation des aliments. Parmi ces ingrédients, les protéines constituent des objets d'étude de nombreuses équipes de recherche. L'objectif est de maîtriser les propriétés qu'elles confèrent aux produits finis mais aussi et de plus en plus d'élaborer de nouveaux biomatériaux dotés de propriétés et de fonctionnalités spécifiques. Nous décrivons ici la nature et les propriétés des biomatériaux – nano ou microparticules- que l'on peut générer par assemblages protéiques: agrégats amorphes, fibres, nanotubes, sphères, etc. La formation de ces particules est obtenue par apport d'énergie (traitements technologiques) mais aussi dans des conditions dites spontanées et réversibles, domaine en émergence sur les protéines alimentaires. Des illustrations sont données dans les deux cas à partir de résultats récents sur les protéines du lait, caséines et protéines de lactosérum. L'utilisation de particules naturelles comme vecteur pour la protection et la libération ciblée de molécules essentielles et d'intérêt pour la santé est parmi les applications potentielles dans l'alimentaire.

Mots clés: protéines, assemblages contrôlés, nouvelles structures

Abstract: Generation of nano and microstructures from self-assembly of food proteins

The food industry is confronted more than ever with the need to innovate in the use of ingredients produced during the processing and elaboration of processed food. Among these ingredients, the proteins in particular from milk are objects of interest for many research teams. The objective is to control the properties they impart to finished products but also and increasingly to develop new biomaterials with properties and specific features. We describe here the nature and properties of biomaterials – micro and nano particles - that can be generated by controlled protein assemblies: amorphous aggregates, fibers, nanotubes, spheres, etc... The formation of these particles is obtained either by energy input (technological treatments) or throughout soft and spontaneous self-assembly to form reversible particles. This second way constitutes an innovative and emerging field for food industry. Illustrations are given in both cases from recent results on milk protein, casein and whey proteins. The use of nano and micro-particles made from natural proteins as a vehicle for the protection and release of molecules with nutritional and health benefits are among the potential applications in the food.

Keywords: proteins, controlled assembly, new structures

Généralités

Les protéines sont des hétéro-polymères chargés électriquement et constitués de différents acides aminés. Parmi ceux-ci, certains possèdent des groupements latéraux hydrophiles (chargés) et d'autres, hydrophobes. Selon la nature et la répartition de ces acides aminés dans la chaîne protéique, celle-ci

va présenter une alternance de zones plutôt hydrophiles ou plutôt hydrophobes. Cette répartition joue un rôle majeur dans la structure et le comportement physico-chimique des protéines. Si les zones hydrophobes sont nombreuses et réparties de façon plutôt aléatoire le long de la chaîne, celle-ci va se replier de façon à isoler ces zones au cœur de la pelote et laisser en périphérie les zones hydrophiles qui vont assurer une bonne solubilité dans l'eau. C'est le cas des protéines globulaires. Si les zones hydrophobes sont peu nombreuses et segmentent la chaîne protéique en blocs homogènes, le repliement de la chaîne n'est plus suffisant pour isoler les zones hydrophobes de l'eau et celles-ci vont adopter un comportement collectif pour diminuer l'énergie d'interaction avec l'eau. C'est le cas des structures oligomériques de certaines protéines mais aussi des micelles formées par les caséines. Les travaux sur l'auto-assemblage spontané des protéines pour former des objets nano et micrométriques, impliquant des liaisons de faible énergie, exploitent les propriétés bi-bloc ou encore l'opposition de charges électriques. L'assemblage par apport d'énergie ajoute des liaisons supplémentaires entre molécules de protéines beaucoup plus fortes et donc irréversibles.

Les principales liaisons de faible énergie impliquées dans l'assemblage des protéines sont les liaisons électrostatiques, les liaisons de van der Waals et les liaisons hydrogène. Elles se différencient par les valeurs d'énergie mises en œuvre, l'évolution des énergies d'interaction en fonction des distances intermoléculaires et leur sensibilité aux conditions physico-chimiques du milieu. L'apport d'énergie permet la formation de liaisons de forte énergie en particulier les ponts disulfures.

Assemblages de protéines du lait provoqués par le chauffage

Les traitements thermiques, largement utilisés dans les processus de transformation du lait (en fromage, en yaourt, en ingrédients, en lait UHT, etc) génèrent, selon leur intensité, une grande diversité d'assemblages de protéines en termes de taille et de forme. Nous nous limiterons ici à quelques exemples de nano et microparticules obtenues avec les protéines de lactosérum sachant que le traitement thermique du lait génère aussi des nano-particules ($\cong 100$ nm) impliquant les protéines de lactosérum et une des caséines (Morand et al., 2011). L'importance de ces dernières dans le processus de transformation du lait est décrite dans le même numéro par M.H. Famelart et collaborateurs (Famelart et al., 2011).

Structure des protéines du lactosérum

Les principales protéines du lactosérum sont la β -lactoglobuline, l' α -lactalbumine et la sérum albumine bovine. Ces trois protéines présentent toutes une structure globulaire stabilisée par des liaisons disulfures (SS). Elles sont toutes chargées négativement au pH du lait et sont solubles à leur point de charge nulle.

La structure de ces protéines dépend de nombreuses interactions entre chaînes latérales des acides aminés et entre ces chaînes et le solvant. Cette structure n'est stable que dans un domaine de conditions physico-chimiques et, hors de ce domaine, elle se dénature. Cette dénaturation peut être induite par l'augmentation de la température, de la pression, des pH extrêmes ou la présence de sels, d'alcool ou de tensioactifs en grande quantité. De nombreux travaux portent sur la dénaturation de la β -lactoglobuline mais ce qui nous intéresse ici est plutôt la phase d'agrégation qui fait suite à la dénaturation. L'agrégation des protéines globulaires au chauffage est un mécanisme général qui découle de leur dénaturation. En effet, celle-ci provoque la rupture de liaisons de faible énergie au sein de la molécule ce qui conduit à une réorganisation de la chaîne et généralement à l'émergence de zones hydrophobes de la protéine et de groupements sulfhydryl réactifs en surface de celle-ci. L'augmentation de l'hydrophobie de surface des protéines diminue les interactions protéine-solvant au profit des interactions protéine-protéine conduisant à la formation d'agrégats à faible concentration et d'un gel au delà d'une concentration critique.

Structure des agrégats thermo-induits de protéines du lactosérum

L'agrégation des protéines est un phénomène physique universel où des monomères initialement dispersés se rassemblent sous l'action des forces attractives, ici des interactions hydrophobes. L'agrégation peut être décrite comme une diffusion des molécules qui entrent en collision et se collent pour former des amas dont la taille augmente progressivement au cours du processus. Dans le cas de la β -lactoglobuline, un mécanisme en deux étapes a été mis en évidence (Aymard et al., 1996, Figure 1). Dans une première étape, les monomères de β -lactoglobuline se dénaturent puis s'associent de façon irréversible pour former des pré-agrégats constitués d'environ 100 unités en forme de « banane » de 50 nm de longueur. La formation de ces pré-agrégats ne dépend pas de la température, de la force ionique ni de la concentration. Cette agrégation fait intervenir des échanges entre SH libres et liaisons S-S entre protéines. Dans une deuxième étape, ces pré-agrégats s'associent entre eux si la concentration en protéine et la force ionique sont suffisantes, pour former des agrégats fractals dont la taille augmente avec le temps de chauffage.

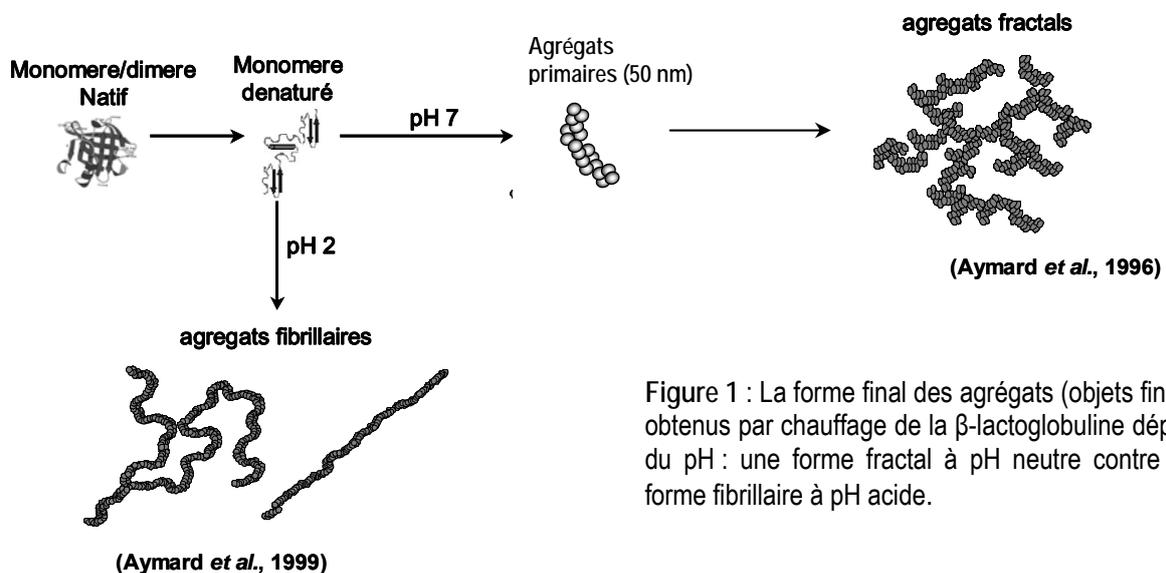


Figure 1 : La forme final des agrégats (objets finaux) obtenus par chauffage de la β -lactoglobuline dépend du pH : une forme fractal à pH neutre contre une forme fibrillaire à pH acide.

Nous avons montré que, dans des traitements thermiques similaires (80°C 16h), l'agrégation d'un mélange complexe de protéines comme celles du lactosérum suivait le même mécanisme même si les agrégats formés contenaient d'autres protéines que la β -lactoglobuline (Mahmoudi, 2007).

Sur la Figure 2, nous pouvons voir les pré-agrégats obtenus à faible concentration en protéine et sans sel (A) qui s'assemblent en structure fractales lorsque la concentration croît (B) ou qu'on augmente la concentration en sel (C). La présence de sel conduit à des agrégats plus denses comme on peut le voir entre les images B et C. Cette différence est liée aux répulsions électrostatiques qui interviennent en absence de sel. Les structures observées sont cohérentes avec les différents modèles d'agrégation pour des particules diffusantes.

Cependant, ces objets sont obtenus avec des traitements thermiques peu représentatifs de ceux rencontrés dans l'industrie qui se caractérisent par des températures hautes et des temps de chauffages courts. Nous avons donc, dans un second temps, produit des agrégats en utilisant un pilote d'échangeur thermique à plaque qui nous a permis de tester des températures de 80 à 120°C et des temps de chauffage compris entre 17 et 220 secondes. Ce type de chauffage induit également un cisaillement qui va de quelques centaines de s^{-1} entre les plaques à près d'un million dans la vanne de contre pression qui permet de dépasser 100°C.

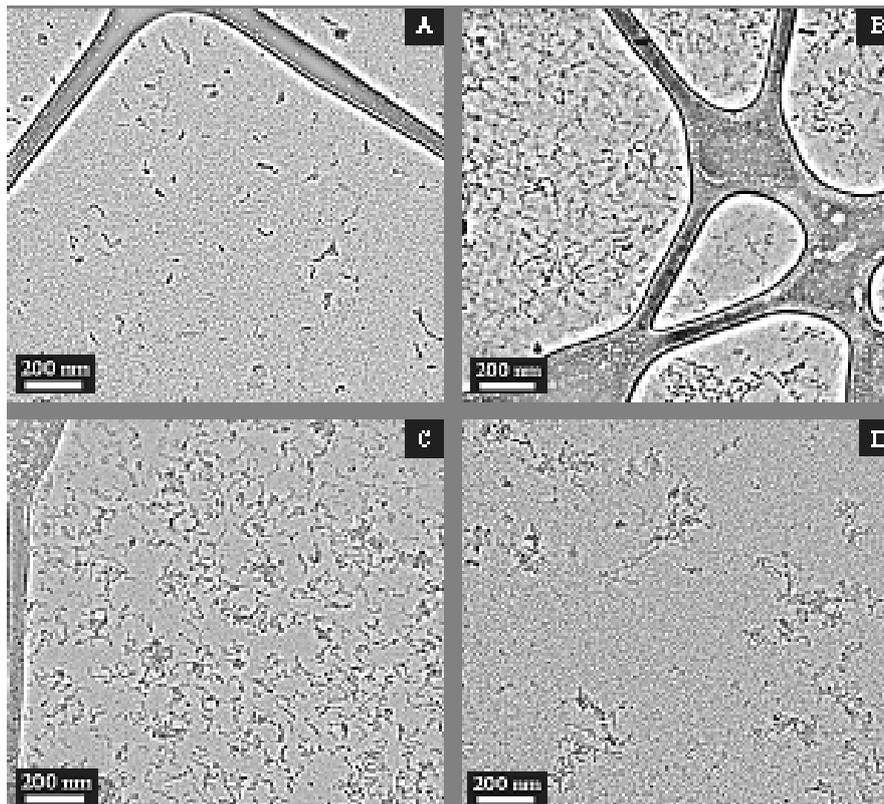


Figure 2: Images de microscopie à transmission des agrégats fractals de protéines du lactosérum obtenus par chauffage (24 h à 80 °C). (A) 3 % (w/w) de protéine sans NaCl; (B) 9.5 % (w/w) de protéines sans NaCl; (C) 0.3 % (w/w) de protéines en présence de 0.1 M NaCl; (D) 1.2 % (w/w) de protéines en présence de 0.1 M NaCl.

Une contrainte forte sur la concentration en protéine est rapidement apparue. En effet, la taille des agrégats formés dans ces conditions croît beaucoup plus vite en fonction de la concentration en protéine que pour un chauffage statique en tube et ce avec ou sans sels. Nous avons dû limiter les concentrations à 3 g/L en présence de sel et 15 g/L sans sel, à comparer à des concentrations critiques de gélification de l'ordre de 30 g/L et 95 g/L en condition statique. La taille des agrégats formés évolue très peu en fonction du temps de chauffage c'est la quantité d'agrégats qui augmente lorsque ce temps croît. La fraction agrégée croît également avec la température de traitement, de 24% à 80°C à 82% à 120°C en absence de sel et de 34% à 80°C à 95% à 120°C en présence de sel.

Comme on peut le voir sur la Figure 3, la forme des agrégats est différente de celle obtenue en conditions statiques. A 80°C, on retrouve des structures fractales mais pour des températures supérieures à 100°C, les agrégats ont un aspect sphérique et tendent à s'associer en structure plus grosse lorsque les interactions électrostatiques sont écrantées par la présence de sel. L'utilisation de la diffusion de neutron aux petits angles (SANS) a permis de mettre en évidence d'autres différences de structure interne pour ces objets. Les agrégats obtenus par chauffage de longue durée en condition statique présentent une structure fractale construite par assemblage de pré-agrégats alors que ceux obtenus avec l'échangeur à plaque sont constitués par assemblage de monomères protéiques. Même s'ils ont un aspect sphérique à grande échelle, les agrégats obtenus à plus de 100°C présentent tout de même une structure interne fractale. L'agrégation dans ces conditions ne mettrait en jeu qu'une seule étape. Ce changement pourrait être dû à une diminution de l'énergie d'activation pour la dénaturation de la β -lactoglobuline qui a été observé au dessus de 95°C (de la Fuente, 2002).

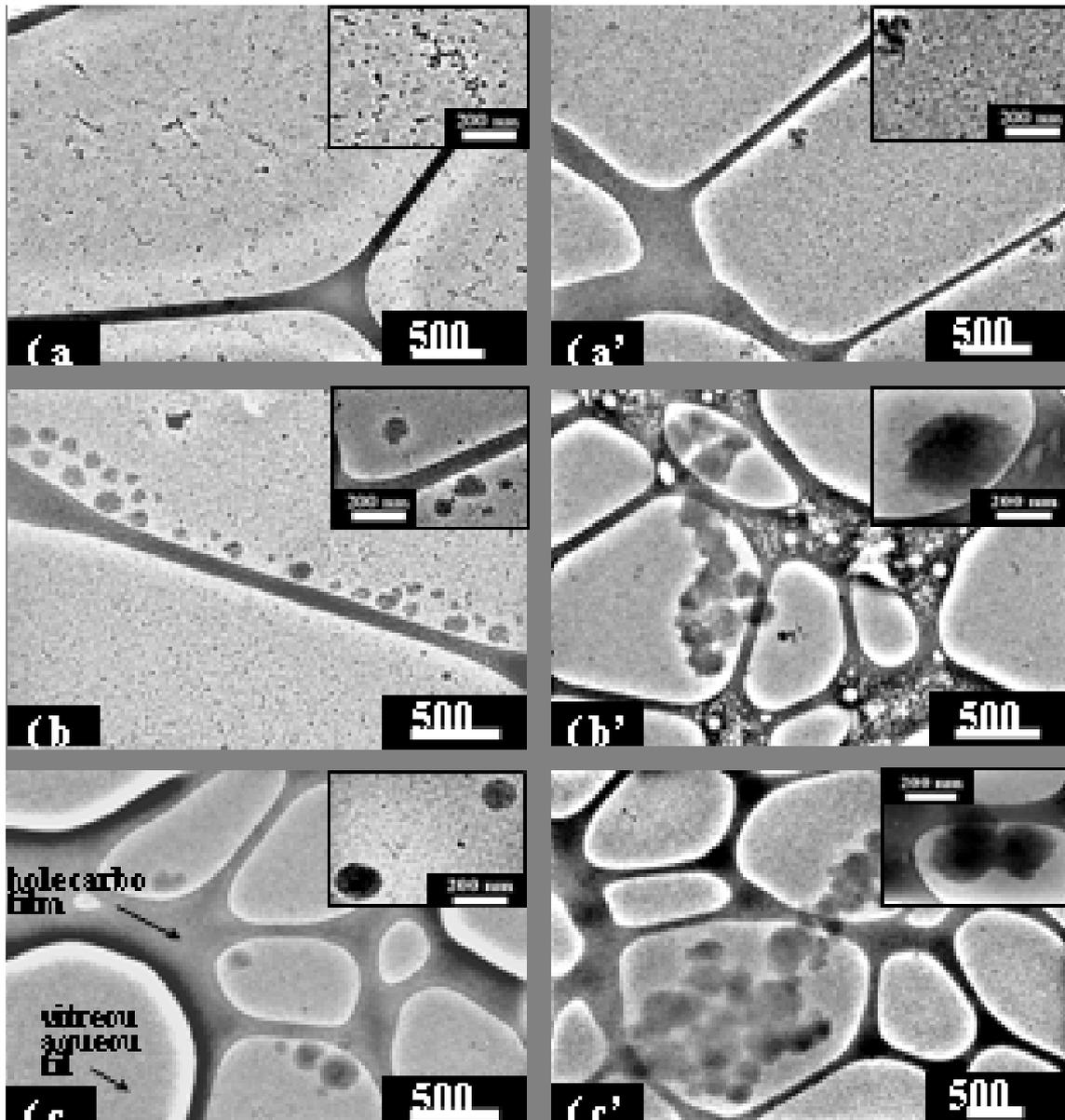


Figure 3: Images de microscopie à transmission des agrégats de protéines du lactosérum obtenus par chauffage 135 s en absence (a, b,c) ou en présence de 0.1 M NaCl (a', b', c') a trois températures : a et a' 80°C ; b et b' 100°C ; c et c' 120°C.

Les traitements thermiques permettent également de structurer les protéines en structures fibrillaires. A titre d'exemple, un chauffage à 80°C à pH 2 d'une solution contenant 2,5% d'un mélange β -lactoglobuline et α -lactalbumine génère les fibres présentées dans la Figure 4 (Bolder et al., 2006). Ces fibres ont un diamètre très fin de quelques nm et une longueur pouvant atteindre quelques μm . Ces structures fibrillaires sont très importantes pour la consistance et la viscosité des produits.

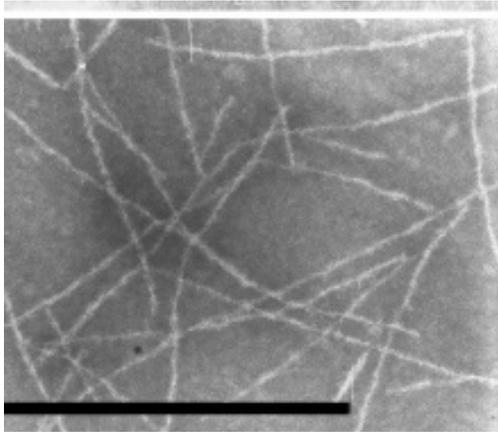


Figure 4: Image de microscopie électronique de fibres d'un mélange de β -lactoglobuline (90%) et d' α -lactalbumine (10%). La barre d'échelle représente 1 μ m.

Il est également possible d'utiliser le traitement thermique pour former des structures sphériques. A titre d'exemple, des travaux récents rapportent la formation de nanoparticules sphériques (35-40 nm) entre le lysozyme et la caséine β après traitement thermique à 90°C (Wu et al., 2010). La Figure 5 montre que la forme finale des particules peut être contrôlée par le rapport entre les deux protéines. Le cœur des nanoparticules est formé par la région hydrophobe de la caséine β (partie noire de la molécule). La partie hydrophile de la caséine (partie rouge) interagit en surface avec le lysozyme pour occuper un volume variable selon le rapport molaire entre les deux protéines.

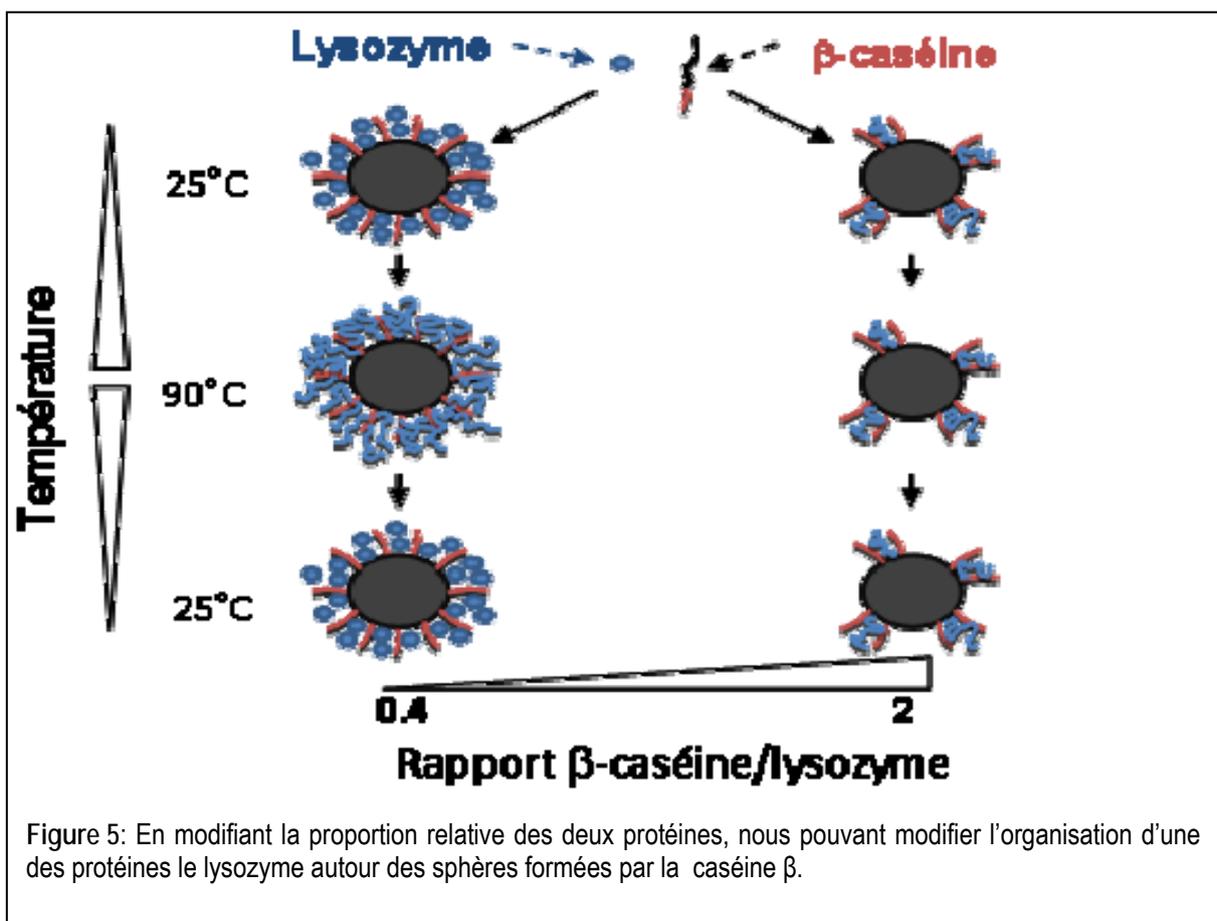


Figure 5: En modifiant la proportion relative des deux protéines, nous pouvons modifier l'organisation d'une des protéines le lysozyme autour des sphères formées par la caséine β .

Auto-assemblage spontané des protéines

Contrairement au cas précédent dans lequel l'exposition de groupements hydrophobes enfouis au cœur de la structure native de la protéine par apport d'énergie thermique est la force motrice de l'agrégation, l'auto-assemblage spontané est caractérisé par une diffusion des molécules suivie d'une association réversible impliquant des groupements majoritairement localisés à la surface des protéines natives. En contrôlant les conditions physicochimiques et biochimiques du milieu, cette étape d'association est dirigée par des forces d'interaction non covalentes menant à des suprastructures d'architecture ordonnée, thermodynamiquement favorable. L'état final correspond à un équilibre entre interactions attractives et répulsives entre molécules au sein de l'assemblage formé. Selon le système considéré (monoprotéique ou mélange de protéines), les règles physicochimiques de formation des assemblages changent. En effet, dans les systèmes monoprotéiques, les protéines portent une même charge globale sur l'ensemble de la gamme de pH. Elles ont une tendance naturelle à se repousser (répulsions électrostatiques) et l'auto-assemblage est favorisé en augmentant la part des interactions attractives au détriment des répulsions (augmentation de la force ionique). Dans les mélanges de protéines *a fortiori* dans les systèmes protéiques binaires, il existe une gamme de pH pour laquelle les deux protéines portent des charges nettes opposées. Ceci est particulièrement vrai lors du mélange d'une protéine basique et d'une protéine acide, ce qui se présente dans le lait (Tableau 1). Dans ces conditions, les interactions électrostatiques entre deux protéines de signe opposé sont attractives et favorisées en réduisant la force ionique. L'auto-assemblage des protéines en suprastructure est alors favorisé. Pour une illustration visuelle, la Figure 6 résume comment la force ionique affecte d'une manière opposée l'assemblage de protéines dans un système mono-protéique (ou contenant diverses protéines de même charge quelque soit le pH) *versus* des systèmes contenant des protéines aux charges opposées.

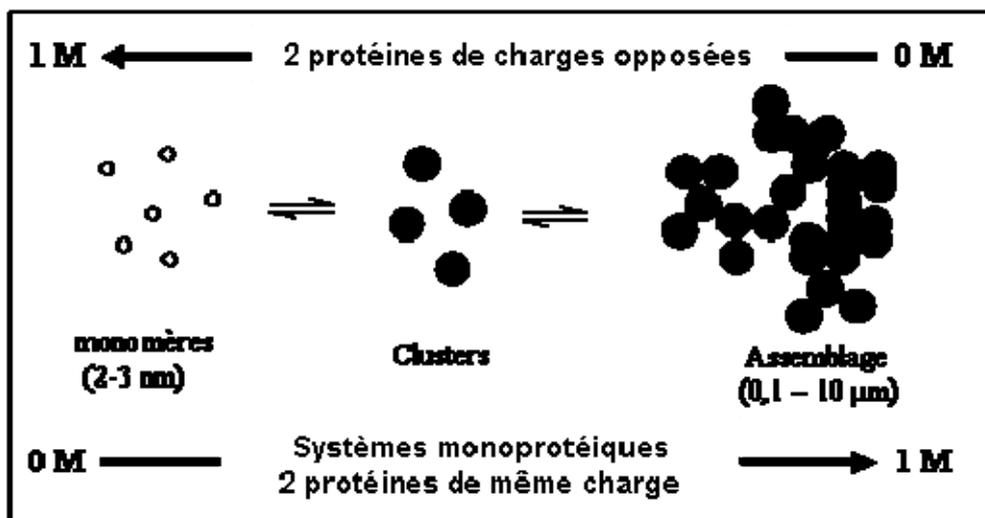


Figure 6 : Comment la concentration saline affecte l'auto-assemblage des protéines ? Dans le cas d'une solution contenant une seule protéine ou plusieurs ayant exactement la même charge électrique nette, l'auto-assemblage est favorisée par l'augmentation de la concentration en sel. L'inverse se produit dans une solution contenant des protéines de charge électrique opposée.

En outre, la forme et la taille des objets obtenus peuvent varier en fonction des systèmes considérés et des conditions physicochimiques ou biochimiques appliqués. L'auto-assemblage contrôlé peut conduire à de très petites particules (10-20 nm), à des nano-objets (50-200 nm) ou à des méso-microparticules (de 0.5 à quelques μm). Contrairement aux assemblages en conditions avec apport d'énergie, l'avantage des conditions douces est la possibilité de fabriquer des assemblages moléculaires réversibles puisque seules les interactions de faible énergie, non covalentes, sont impliquées. Ceci offre

une réelle opportunité de contrôle du processus d'assemblage des protéines en nano- et microstructures ainsi que du processus de leur dissociation. Ces structures pourraient même être utilisées pour protéger et véhiculer des molécules thermosensibles (Chen et al., 2006).

Que peut-on faire avec une seule protéine ?

Dans les systèmes monoprotéiques, il existe une forte corrélation entre une diminution de la stabilité des formes natives et la tendance de la protéine à s'auto-assembler en structures supramoléculaires. D'autres observations suggèrent que, dans de nombreux cas, une étape d'oligomérisation de la protéine native intervient avant toute modification conformationnelle (Chiti et Dobson, 2006).

Cas de l' α -lactalbumine, protéine structurée

L'exemple de α -lactalbumine illustre la diversité des structures supramoléculaires que nous pouvons générer par le contrôle des conditions physico-chimiques et biochimiques (Figure 7). L' α -lactalbumine, est une petite protéine acide ayant un site spécifique pour la fixation d'un ion calcium. Elle a été très étudiée du fait de la possibilité de moduler sa conformation en état « globule fondu » par simple élimination du calcium à pH neutre ou encore en la plaçant à pH acide. L' α -lactalbumine forme des fibres de type amyloïde in vitro à pH acide. D'autres conformations de l' α -lactalbumine induites à pH neutre, par élimination du calcium ou fixation de zinc à la forme holo forment en revanche plutôt des structures agrégées. Ainsi, une transformation substantielle de la forme spatiale de la protéine conduit à la formation de fibres alors qu'une légère transformation de cette forme spatiale favorise essentiellement la génération d'agrégats amorphes (Goers et al., 2002). Des travaux récents ont montré que l' α -lactalbumine partiellement hydrolysée par une protéase s'assemble pour former des structures originales dites nanotubes (Graveland-Bikker et de Kruif, 2006). Les nanotubes sont des assemblages linéaires présentant une cavité centrale au sein de leur structure ; ils sont classiquement rencontrés lors des assemblages de carbone ou de molécules inorganiques, mais très peu lors des assemblages protéiques. Une concentration minimale de 20 g/l d' α -lactalbumine est requise pour former les nanotubes dont les dimensions sont un diamètre de 10-20 nm pour une longueur de quelques μ m. En dessous de cette concentration, la formation de structures fibrillaires et agrégées est favorisée. Par ailleurs, la présence de certains ions divalents (calcium, cuivre, zinc) est indispensable à la formation des nanotubes ; ils établissent des ponts salins entre l'ion et des groupements carboxyliques de la protéine (Graveland-Bikker et al., 2004). Un rapport molaire calcium/ α -lactalbumine compris entre 1,5 et 4 est requis pour la formation des nanotubes ; pour des rapports molaires inférieurs à 1,5 et supérieurs à 4, des structures de types agrégats sont formées (Graveland-Bikker et al., 2004). Par conséquent, selon le rapport molaire calcium/ α -lactalbumine, il est possible d'orienter l'assemblage de l' α -lactalbumine partiellement hydrolysée. Les nanotubes obtenus sont par ailleurs stables vis-à-vis de certains traitements industriels tels que la pasteurisation ou la lyophilisation. Ils sont notamment proposés comme vecteurs potentiels de molécules bioactives d'intérêt. Comme l'illustre la Figure 7, il est donc possible de générer une diversité de structures réversibles à partir d'une même protéine.

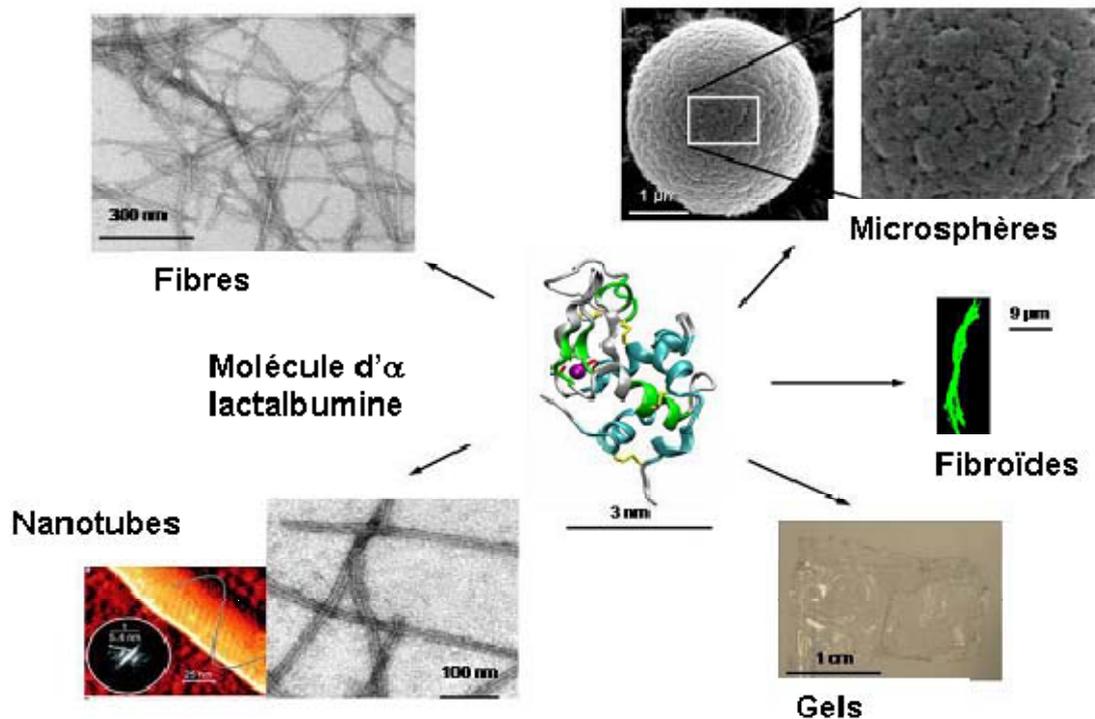


Figure 7: Selon les conditions physico-chimiques (pH, présence de certaines molécules tels que enzymes, acides gras, ions) l' α -lactalbumine forme une diversité d'objets nano ou micrométriques.

Cas de la caséine β , protéine non structurée

Comme on l'a vu précédemment, la caséine β présente deux régions (Figure 8: une région hydrophile, la partie N-terminale de la protéine avec une forte électronégativité due aux phosphosérines (-12 mV à pH 6,6) et une région hydrophobe du côté C-terminal très peu chargée.

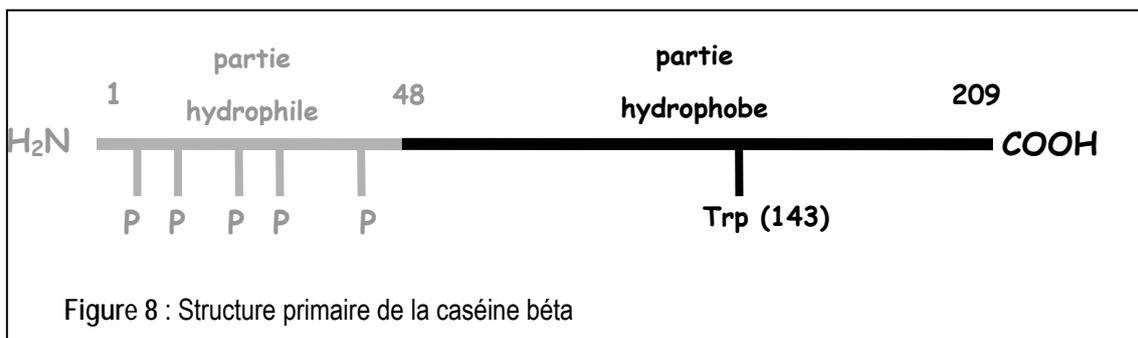
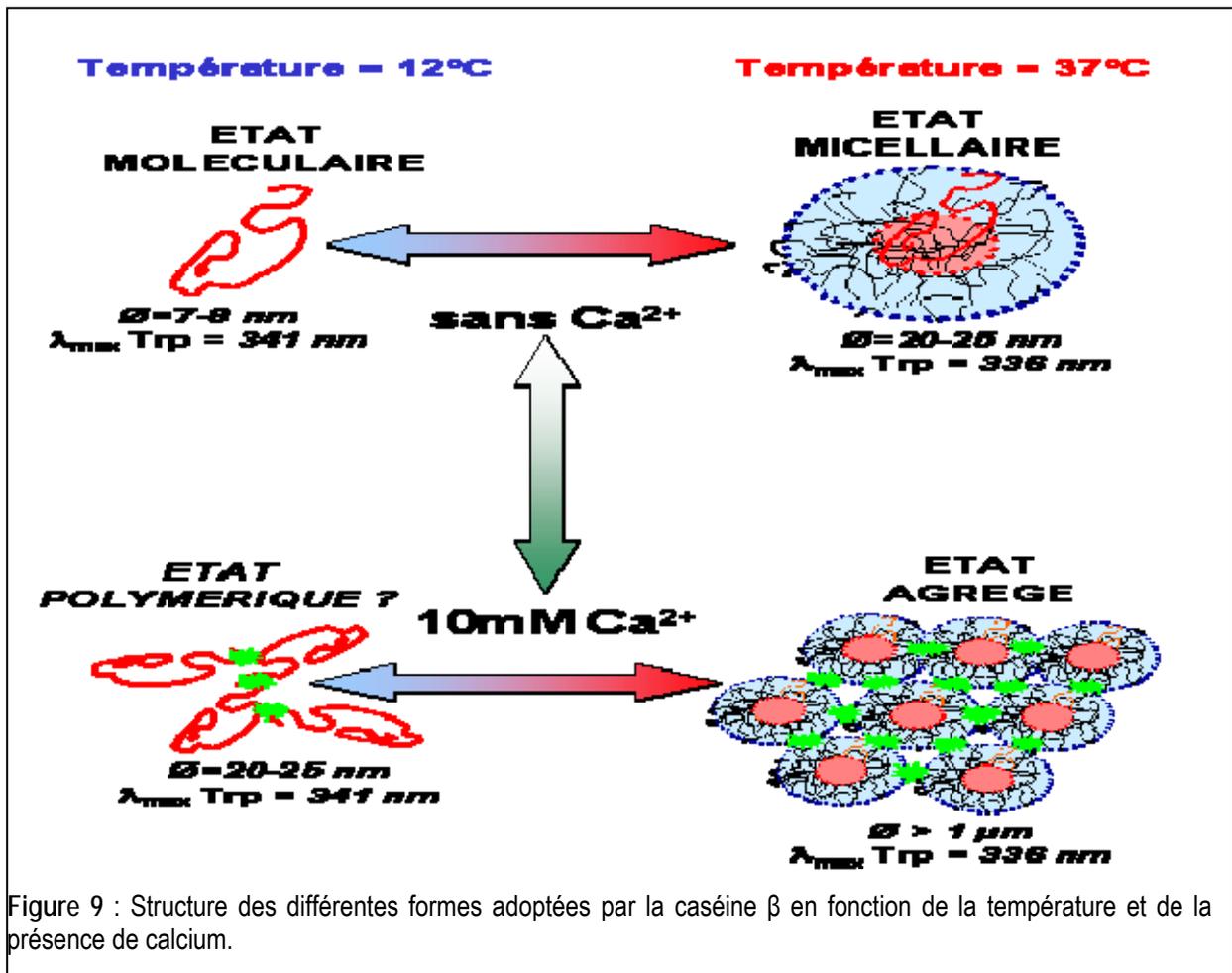


Figure 8 : Structure primaire de la caséine bêta

Cette structure en bi-bloc est assez proche de celle des tensioactifs et cette protéine forme des micelles en solution aqueuse (Leclerc et Calmettes, 1997 & 1998). Plusieurs monomères de caséine β rassemblent leurs parties hydrophobes dans une structure sphérique avec les parties hydrophiles orientées vers le solvant. La formation de ces structures dépend des interactions protéine-protéine et protéine-solvant qui sont modulées par la concentration en protéine, la température (interaction hydrophobe), la force ionique (répulsion électrostatique) et la présence d'ions divalents comme le calcium. En fonction de ces différents paramètres, la caséine β va se présenter sous quatre formes différentes (Dauphas et al., 2005). La Figure 9 présente ces différentes formes pour une concentration de 1 g/L.



A basse température et en absence de calcium, la caséine β est sous forme monomérique mais elle forme des micelles quand la température augmente au delà d'un certain seuil. Cette température de micellisation diminue lorsque la concentration en protéine augmente.

En présence de calcium, les caséines β sont sous forme de polymères liés par des ponts calciques à faible température mais en augmentant la température, on observe l'apparition de structures sphériques de taille supérieure à 1 μm liées par des interactions hydrophobes.

Grâce à la présence d'un tryptophane, acide aminé fluorescent, localisé dans la partie hydrophobe de la caséine β , il est possible de suivre la micellisation car la longueur d'onde du maximum d'émission de fluorescence change quand le tryptophane se trouve en contact avec l'eau ou dans une poche hydrophobe au sein des micelles. (341 nm \rightarrow 336 nm). Comme on peut le voir sur la Figure 9, l'ajout de calcium induit des interactions de nature électrostatique entre les zones hydrophiles des caséines β alors que la température joue sur les interactions hydrophobes. Ces deux mécanismes agissent de façon indépendante mais également réversible. En augmentant puis en diminuant la température, on peut faire des allers-retours entre les différentes formes. Il en est de même si on ajoute du calcium et qu'on le piège ensuite avec un complexant comme l'EDTA. Cette réversibilité est possible parce que les interactions qui stabilisent ces différentes structures sont de faible énergie et que ce sont des objets dynamiques au sein desquels les molécules de caséines s'échangent rapidement avec une fraction monomérique soluble.

Autres protéines, autres structures

Comme avec le traitement thermique, il est également possible de former des structures fibrillaires de 5 à 10 nm de diamètre et jusqu'à quelques μm de long en absence d'apport d'énergie. Ceci a été particulièrement montré dans le cas des solutions pures de caséine kappa (Léonil et al., 2008) et de caséine $\alpha\text{s}1$ (Wu et al., 2011). La forme et les propriétés des fibres dépendent de la protéine utilisée (Figure 10). La formation des fibres par une protéine ainsi que leur nature sont fortement sensibles à l'agitation.

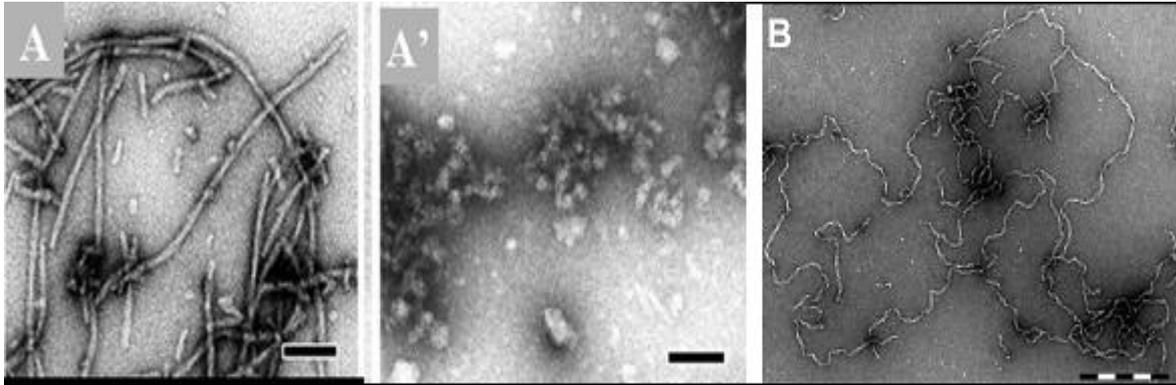


Figure 10 : Formation des fibres par incubation de la caséine kappa (A) ou la caséine $\alpha\text{s}2$ à 37°C. L'image A' montre l'inhibition de la fibrillation de la caséine kappa par ajout de la caséine β . La barre d'échelle représente 100 nm pour les images A et A' (Léonil et al., 2008) et 500 nm pour l'image B (Wu et al., 2011).

Et avec plusieurs protéines en mélange ?

Contrairement aux systèmes monoprotéiques, l'interaction et l'assemblage entre protéines de signe opposé dans des conditions douces sont très peu décrits.

| Protéine | pH de charge nulle | Masse moléculaire (kDa) | Oligomère natif |
|-------------------------|--------------------|-------------------------|-----------------|
| α -lactalbumine | 4,5 | 14,2 | Monomère |
| β -lactoglobuline | 5,2 | 2x 18,3 | Dimère |
| Sérum albumine | 4,9 | 66,5 | Monomère |
| Lysozyme | 10,5 | 14,3 | Monomère |
| Lactoferrine | 8,5 | 80 | Monomère |

Tableau 1 : Protéines globulaires utilisées pour les études d'interaction-assemblage

Nous avons initié un programme de recherche sur ce thème afin de comprendre les mécanismes de formation de ces structures à l'aide de diverses protéines globulaires (Tableau 1). Les propriétés intrinsèques des structures formées ont été évaluées à différentes échelles. Nous avons ainsi étudié d'une manière approfondie le processus d'interaction-assemblage entre l' α -lactalbumine du lait bovin et le lysozyme. L'utilisation de l' α -lactalbumine sous ses deux formes holo (avec calcium) et apo (dépourvue en calcium) permet de préciser le rôle de la conformation protéique dans le processus d'assemblage. A l'échelle moléculaire, le lysozyme interagit aussi bien avec la forme holo qu'avec la forme apo de l' α -lactalbumine à pH 7,5 pour former des structures oligomériques de type hétérodimères avec une constante de dissociation de l'ordre du μM (Nigen et al., 2009a). La constante d'affinité entre les deux protéines diminue avec l'augmentation de la force ionique traduisant une contribution des interactions électrostatiques. En revanche, seul le mélange apo α -lactalbumine/lysozyme donne naissance à un assemblage supramoléculaire dont la nature dépend de

la température : des agrégats amorphes bien caractérisés sont obtenus par mélange des deux protéines à une température inférieure à 25°C contre des structures bien ordonnées, de nature sphérique lorsque le mélange est effectué au-delà de 30°C (Nigen et al., 2007a). Or, il est connu que l'apo α -lactalbumine change de conformation à une température voisine de 27°C en passant d'une forme « native-like » à une forme dite « globule fondu ». Ainsi, la structure tridimensionnelle de l'apo α -lactalbumine oriente la nature des structures supramoléculaires résultant de son assemblage avec le lysozyme. Il est maintenant admis que les potentialités des protéines à s'auto-assembler dépendent soit de la conformation des protéines, soit de la formation d'un oligomère précurseur à l'association.

Cette étude est la première à montrer la possibilité de former des structures sphériques entre deux protéines de charge opposée. La quantification des protéines dans les microsphères formées montre une parfaite stœchiométrie avec un rapport molaire α -lactalbumine/lysozyme de 1. Par ailleurs, l'effet de la force ionique aussi bien sur la formation que sur la stabilité des microsphères a été décrit (Nigen et al., 2009b). Une force ionique au-delà de 100 mM inhibe totalement l'assemblage entre les deux protéines. En revanche, des concentrations salines beaucoup plus élevées sont nécessaires pour dissocier les microsphères une fois formées. Dans ce sens, les ions divalents (calcium, magnésium) sont plus efficaces que les monovalents dans la dissociation des microsphères.

Quel que soit le système binaire considéré (Tableau 1), un phénomène de compensation de charge de surface semble prévaloir dans la formation de ces structures sphériques à l'échelle du μm (microsphères), avec cependant des similarités et des différences selon le système étudié (Tableau 2).

| Similarités | Différences |
|---|--|
| Il existe un pH optimal pour un bon rendement en microsphères | La valeur de ce pH optimal |
| La formation des microsphères est fortement sensible à la force ionique | la concentration totale requise pour la formation des microsphères |
| | La proportion relative des deux protéines dans les microsphères |
| | La température optimale de formation des microsphères |

Tableau 2 : Similarités et différences observées lors de la formation de microsphères dans plusieurs systèmes contenant différentes protéines.

La visualisation par microscopie confocale des particules formées a permis de montrer que pour tous les systèmes que nous venons de décrire, les deux protéines mélangées se retrouvent parfaitement colocalisées dans le volume de la microsphère formée (Nigen et al., 2007b). Ceci s'explique probablement par le fait que les unités de base de l'auto-assemblage sont des hétéro-oligomères entre les deux protéines comme montré expérimentalement pour le couple apo α -lactalbumine/lysozyme dans le cadre du projet ANR Laclys 2008-2010 (Nigen et al., 2009a). Sur le plan cinétique, les microsphères générées dans les systèmes étudiés ne sont pas formées immédiatement après mélange des deux protéines. A une concentration protéique donnée, la structuration en microsphère est un phénomène dynamique, cinétiquement contrôlé. La Figure 11 montre l'évolution au cours du temps des suprastructures formées entre l' α -lactalbumine et le lysozyme, observées par microscopie confocale. Les microsphères, qui ne sont pas formées immédiatement après mélange des deux protéines, constituent une étape finale d'un processus de réorganisation « de clusters » de sphères de plus petite taille, « clusters de nano-sphères » (Nigen et al., 2010).

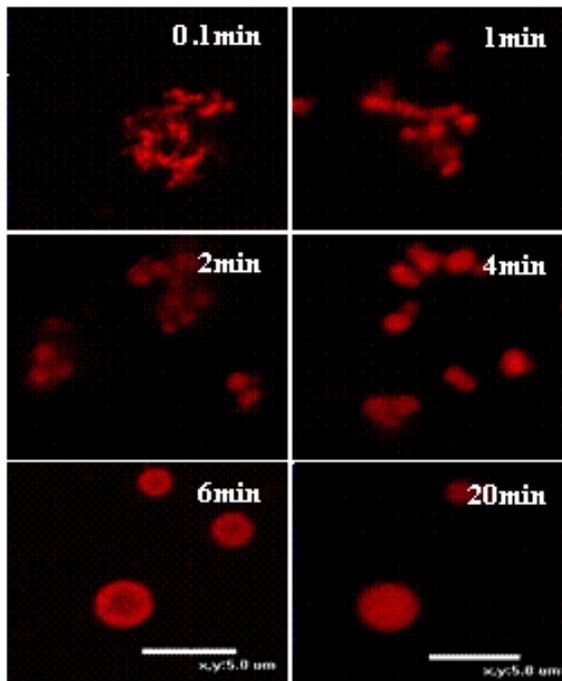


Figure 11 : Observation par microscopie confocale du processus de réorganisation cinétique des structures supramoléculaires formées entre l' α -lactalbumine et le lysozyme. Barre d'échelle = 5 μm . (D'après Nigen et al., 2010).

Conclusion

L'élaboration de nouvelles structures avec de nouvelles applications est possible au travers du contrôle des interactions mises en jeu et de la nature et la taille des objets formés. En modulant la température, le temps de chauffage, le cisaillement et la force ionique, il est possible de produire des assemblages protéiques présentant des tailles et des structures variées dont on peut moduler la cohésion interne en favorisant certains types d'interactions au détriment d'autres. Ces assemblages vont présenter des propriétés techno-fonctionnelles qui peuvent être très variables. Selon leur taille et leur forme, ils vont par exemple permettre de connecter des gouttelettes d'émulsion ou des bulles dans une mousse et d'apporter une texturation au produit.

Par opposition aux assemblages irréversibles que l'on peut induire par des traitements technologiques (traitement thermique, hautes pressions, etc.), il est également possible de produire des assemblages aux tailles et formes variées par contrôle des interactions de faible énergie. Les structures nano ou micrométriques obtenues ont la particularité d'être réversibles, ce qui peut être exploité pour envisager de nouvelles applications : par exemple la protection et la libération dirigée et contrôlée de molécules d'intérêt pour la santé comme, vitamines, oligoéléments, arômes (Figure 12). L'intérêt est de protéger les molécules sensibles et fragiles par exemple vis-à-vis de la lumière et de l'oxydation ou encore masquer le goût désagréable en bouche de certaines molécules. Ces assemblages constituent en ce sens des vecteurs adéquats répondant à la fois aux attentes des consommateurs (produits d'origine biologiques, sains, non-toxiques et à haute valeur nutritionnelle) et aux exigences environnementales (biodégradabilité, éco-toxicité). Parce que la structure (taille, forme) conditionne, à différents degrés, le goût, la perception, la digestibilité et les propriétés physiques des aliments, le challenge des futures recherches réside dans la connaissance et le contrôle de ces structures et de leur comportement et stabilité dans les matrices alimentaires.

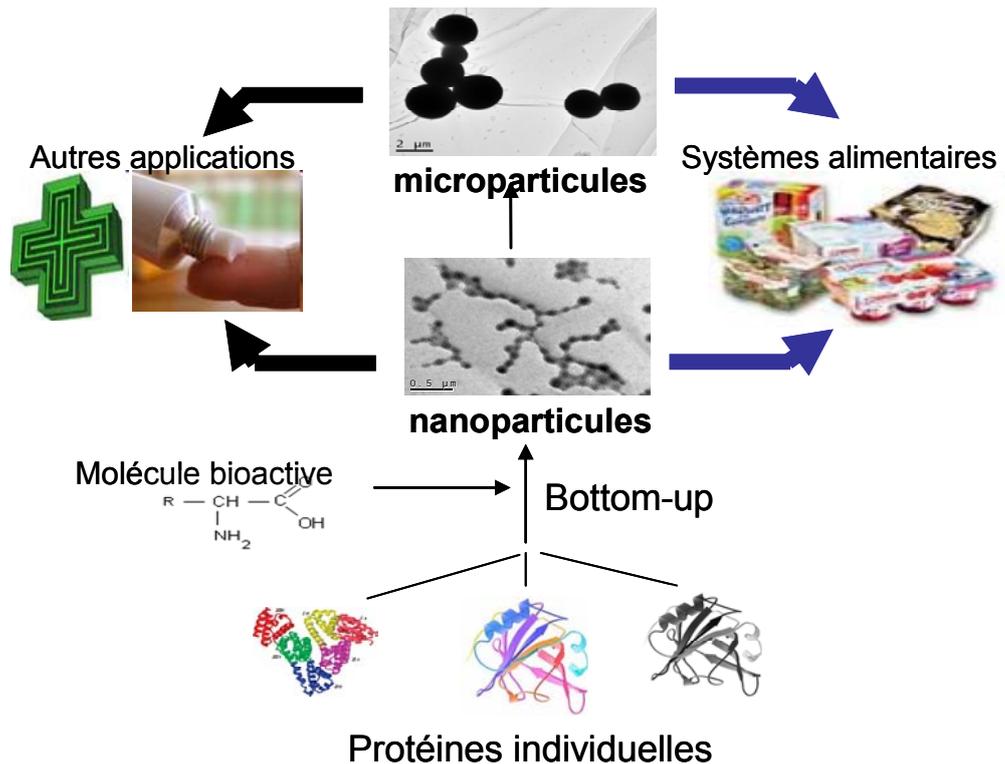


Figure 12 : Exemple d'application des nano- et microparticules de protéines alimentaires obtenues par auto-assemblage contrôlé : potentialités comme vecteur de nutriments (adapté de Chen et al., 2006).

Références bibliographiques

- Aymard P., Gimel J.C., Nicolai T., Durand, D., 1996. Experimental evidence for a two-step process in the aggregation of beta-lactoglobulin at pH 7. *Journal de Chimie physique et de physico-chimie biologique* 93, 987-997.
- Aymard P., Nicolai T., Durand D., Clark A., 1999. Static and dynamic scattering of beta-lactoglobulin aggregates formed after heat-induced denaturation at pH 2. *Macromolecules* 32, 2542-2552.
- Bolder S.G., Hendricks H., Sagis L.M.C., Van Der Linden E., 2006. Fibril Assemblies in Aqueous Whey Protein Mixtures. *J. Agric. Food Chem.* 54, 4229-4234.
- Chen L., Remondetto G.E., Subirade M., 2006. Food-protein based materials as nutraceutical delivery systems. *Trends Food Sci. Technol.* 17, 272-283.
- Chiti F., Dobson C.M., 2006. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Ann. Rev. Biochem.* 75, 333-366.
- Dauphas S., Mouhous-Riou N., Metro B., Mackie A.R., Wilde P.J., Anton M., Riaublanc A., 2005 The supramolecular organisation of b-casein: Effect on interfacial properties. *Food hydrocolloids* 19, 387-393.
- de la Fuente M.A., Singh H., Hemar Y., 2002. *Trends in Food Science & Technology* 13, 262-274.
- Famelart M.H., Guyomarc'h F., Morand M., Novales B., 2011. Agrégation protéique et propriétés gélifiantes et moussantes des protéines laitières – quoi de neuf sur le plan des connaissances ? *Innovations Agronomiques* 13, 119-134.
- Goers J., Permyakov S.E., Permyakov E.A., Uversky V.N., Fink A.L., 2002. Conformational prerequisites for a-lactalbumin fibrillation. *Biochemistry* 41, 12546-12551.
- Graveland-Bikker J.F., de Kruif C.G., 2006. Unique milk protein based nanotubes: Food and nanotechnology meet. *Trends in Food Science & Technology* 17, 196-203.

- Graveland-Bikker J. F., Ipsen R., Otte J, de Kruif C.G., 2004. Influence of calcium on the self-assembly of partially hydrolyzed α -lactalbumin. *Langmuir* 20, 6841-6846.
- Leclerc E., Calmettes P., 1998. Structure of β -casein micelles. *Physica B*. (241-243), 1141-1143.
- Leclerc E., Calmettes. P., 1997. Interactions in micellar solutions of b-casein. *Physica B*, (234-236), 207-209.
- Léonil J., Henry G., Jouanneau D., Delage M.M., Forge V., Putaux J.L., 2008. Kinetics of fibril formation of bovine κ -casein indicate a conformational rearrangement as a critical step in the process. *Journal of Molecular Biology* 381, 1267-1280.
- Mahmoudi N., Mehalebi S., Nicolai T., Durand D., Riaublanc A., 2007. Light-scattering study of the structure of aggregates and gels formed by heat-denatured whey protein isolate and beta-lactoglobulin at neutral pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 3104-3111.
- Morand M., Guyomarc'h F., Famelart M.H., 2011, How to tailor heat-induced whey protein/ κ -casein complexes, as a means to investigate the acid gelation of milk – a review, *Dairy Sci. Technol.*, DOI 10.1007/s13594-011-0013-x.
- Nigen M., Croguennec T, Madec M N, Bouhallab S., 2007a. Apo α -lactalbumin and lysozyme are colocalized in their subsequently formed spherical supramolecular assembly. *Febs Journal* 274, 6085-6093.
- Nigen M., Gaillard C., Croguennec T., Madec M.N., Bouhallab S., 2010. Dynamic and supramolecular organisation of α -lactalbumin/lysozyme microspheres: A microscopic study. *Biophysical Chemistry* 146, 30-35.
- Nigen M., Le Tilly V., Croguennec T., Drouin-Kucma D., Bouhallab S., 2009a. Molecular interaction between apo or holo α -lactalbumin and lysozyme: Formation of heterodimers as assessed by fluorescence measurements. *Biochimica et Biophysica Acta* 1794, 709-715.
- Nigen M., Croguennec T., Bouhallab S., 2009b. Formation and stability of α -lactalbumin-lysozyme spherical particles: Involvement of electrostatic forces. *Food Hydrocolloids* 23, 510-518.
- Nigen M., Croguennec T., Renard D., Bouhallab S., 2007b. Temperature affects the supramolecular structures resulting from α -lactalbumin-lysozyme interaction. *Biochemistry* 46, 1248-1255.
- Wu F.G., Luo J.J., Yu Z.W., 2011. Unfolding and refolding details of lysozyme in the presence of β -casein micelles. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13, 3429-3436.