HAL
open science

La réactivité des agrégats de b-lactoglobuline peut-elle s'expliquer par l'exposition privilégiée de certains thiols ?

Joseph J. Kehoe, André Brodkorb, Daniel Mollé, Emilie Yokoyama, Marie-Hélène Famelart, Said Bouhallab, Edwin R. Morris, Thomas Croguennec

To cite this version:

Joseph J. Kehoe, André Brodkorb, Daniel Mollé, Emilie Yokoyama, Marie-Hélène Famelart, et al.. La réactivité des agrégats de b-lactoglobuline peut-elle s'expliquer par l'exposition privilégiée de certains thiols ?. 3ème Rencontres Biologie Physique du Grand Ouest, Jun 2007, Batz-sur-mer, France. 2007. hal-02198130

HAL Id: hal-02198130

https://hal.science/hal-02198130v1

Submitted on 30 Jul 2019

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.

La réactivité des agrégats de β-lactoglobuline peut-elle s'expliquer par l'exposition privilégiée de certains thiols ?

Joseph J. Kehoe[a], André Brodkorb[a], Daniel Mollé[b], Emilie Yokoyama[b], Marie-Héléne Famelart[b], Saïd Bouhallab[b], Edwin R. Morris[c] and Thomas Croguennec[b]

[a], Moorepark Food Research Centre, Teagasc, Fermoy, Co. Cork, Ireland.
[b], UMR 1253 Science et Technologie du Lait et de l'Oeuf - INRA - Agrocampus Rennes - 65, rue de St Brieuc - 35042 Rennes Cedex – France
[c], Department of Food Chemistry, University College Cork, Cork, Ireland.

Introduction

La β-lactoglobuline (β-lg) possède un rôle fondamental dans l'expression des fonctionnalités des ingrédients à base de protéines sériques. La maitrise de ces fonctionnalités (régularité, reproductibilité) nécessite une meilleure compréhension de la réactivité chimique des protéines, en particulier de la β-lg. Au cours du traitement thermique, la β-lg (dimère à l'état natif) se dénature et la cystéine libre (Cys121) initie des réactions d'échange SH/S-S à l'origine d'agrégats covalents (Figure 1).

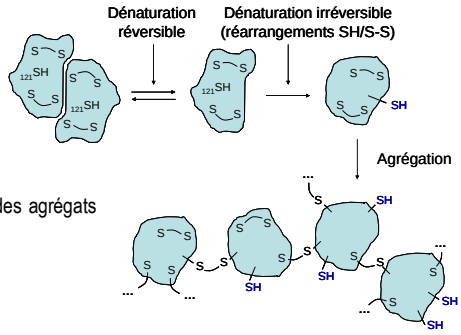


Figure 1

Contexte : Actuellement, la réactivité des cystéines de la β-lg est estimée en combinant l'hydrolyse enzymatique des agrégats protéiques et l'analyse des peptides par LC-MS avant et après réduction (identification des ponts disulfures non natifs).

Principales limites de cette stratégie expérimentale :
- Fragments résistants à l'hydrolyse enzymatique ne sont pas analysés (masse moléculaire trop élevée)
- Ouverture possible de ponts disulfures au cours de l'hydrolyse (réarrangement, etc.)
- Impossibilité d'identification des cystéines participant aux ponts disulfures si les peptides impliqués possèdent plusieurs cystéines

Objectif de l'étude : Développer une méthode d'identification des groupements thiols exposés au cours du traitement thermique (réactifs pour les réactions d'échange SH/S-S) plutôt que des cystéines impliquées dans des ponts disulfures

Stratégie expérimentale

Figure 2 :

Les groupements thiols exposés après traitement thermique ont été tout d'abord bloqués avec l'acide 5-((((2-iodoacetyl)amino) ethyl)amino) naphthalene-1-sulfonic (IAEDANS) afin de prévenir les échanges thiol/pont disulfure.

Figure 3 :

Couplée au dosage des thiols totaux (dosage d'Ellman), l'analyse par gel filtration (double détections 280/336 nm) permet d'estimer la quantité de thiols exposés sur les différentes espèces moléculaires contenues dans un mélange protéique en raison de l'absorbance spécifique du IAEDANS à 336 nm.

Figure 4 :

L'absorbance spécifique du IAEDANS permet de focaliser l'analyse de l'hydrolysat enzymatique sur les peptides d'intérêt.

Les cystéines libres et exposées après traitement thermique sont identifiées après analyse MALDI MS/MS.

L'estimation de l'abondance de chacun des thiols exposés est réalisée à partir du profil HPLC en phase inverse de l'hydrolysat peptidique.

Figure 2

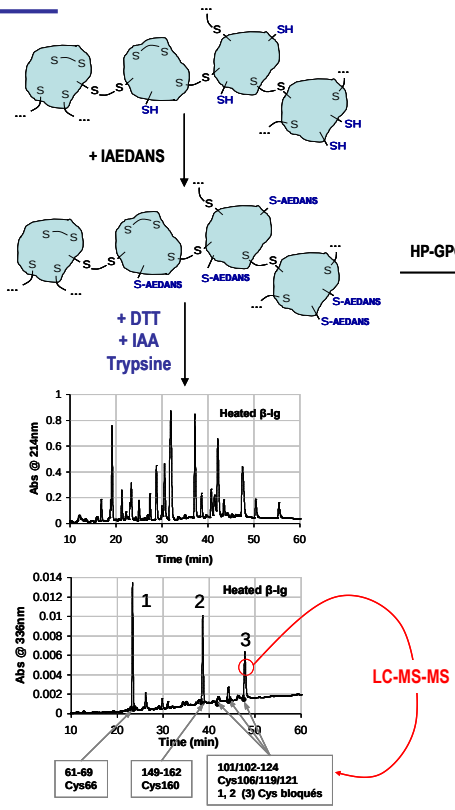
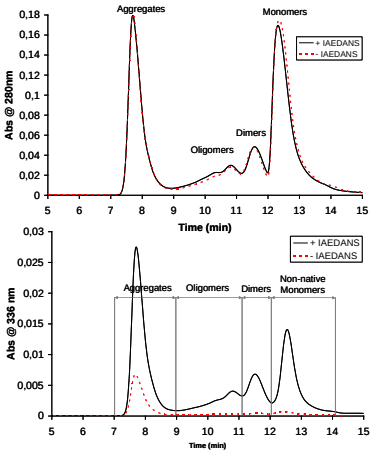


Figure 4

Figure 3



Conclusion

Les cystéines 66 et 160 sont majoritairement exposées à l'issue du traitement thermique alors que la cystéine 106 n'est jamais accessible à l'IAEDANS, suggérant son implication dans les ponts disulfures.

Cette méthode apporte une nouvelle information sur la réactivité des groupements thiols de la β-lg.