

Le globule gras chez la chèvre : un modèle pour l'étude de la sécrétion de la matière grasse laitière

Goat α_{s1} -casein polymorphism: a comprehensive model for the milk fat secretion pathway

CEBO C. (1), BEAUVALLET C. (1,2), LOPEZ C. (3), HENRY C. (4), BEVILACQUA C. (1,2), CAILLAT H. (5), MARTIN P. (1,2)

(1) Unité génétique animale et biologie intégrative (GABI), équipe lait, génome et santé, INRA, Jouy-en-Josas

(2) Plateau d'instrumentation et de compétences en transcriptomique, génomique et microdissection (PICT-Gem), INRA, Jouy-en-Josas

(3) INRA-Agrocampus ouest, UMR 1253 science et Technologie du lait et de l'oeuf (STLO), Rennes

(4) Plateau d'analyse protéomique Paris sud-ouest (PAPPSO), INRA, Jouy-en-Josas

(5) Station d'amélioration génétique des animaux (SAGA), INRA, Castanet Tolosan

INTRODUCTION

La caséine α_{s1} est l'une des lactoprotéines majeures synthétisées par la glande mammaire. Chez la chèvre, un polymorphisme important a été décrit pour cette caséine (Grosclaude & Martin, 1997) avec l'identification d'au moins seize allèles associés à des taux de synthèse différents de la protéine variant de 3,6 g / l / allèle (allèles forts A, B ou C) à 0 g / l / allèle (allèles nuls, O). Outre cet impact sur la fraction protéique, un effet a également été rapporté sur la fraction lipidique du lait (réduction du taux butyreux et modification de la composition en acides gras, (Chilliard *et al.*, 2006). La matière grasse laitière (MG), sécrétée sous la forme de globules gras (GG), est constituée d'un noyau de triglycérides entouré d'une membrane complexe dérivant de la cellule épithéliale mammaire et appelée « Milk Fat Globule Membrane » ou MFGM. Chez les animaux défectifs en caséine α_{s1} , on observe une perturbation globale du processus sécrétoire (Chanat *et al.*, 1999). Le modèle caprin représente donc un modèle pertinent d'étude de la sécrétion de la matière grasse laitière chez les ruminants.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. ANIMAUX

Des prélèvements de lait ont été effectués sur des laits frais individuels (assemblages des traites du soir et du matin) issus de chèvres Alpine de génotype extrême pour la caséine α_{s1} (AA, génotype fort, vs. OO, génotype nul, trois à cinq animaux par génotype) en début, mi et fin de lactation (Unité caprine, domaine de Galle, 18250 Avord).

1.2. ANALYSE GRANULOMETRIQUE DES GLOBULES GRAS

La taille des GG (deux prélèvements indépendants par lait et trois mesures successives) a été déterminée par diffusion de lumière LASER à l'aide d'un appareil *Mastersizer* (Malvern, UK). La mesure de potentiel zêta des GG (un prélèvement par lait) a été calculée par la mesure de leur mobilité électrophorétique dans un champ électrique imposé (*Zetasizer 3000*, Malvern, UK). La composition globale des laits (MG, MP, pH) à chaque stade de lactation a été déterminée au lactoscope.

1.3. ANALYSE PROTEOMIQUE DE LA MFGM

1.3.1. Analyse monodimensionnelle

Les protéines de la MFGM ont été extraites de la MG par un tampon SDS 2 % comme décrit précédemment (Fortunato *et al.*, 2003). Les protéines majeures de la membrane du GG ont été analysées par électrophorèse SDS-PAGE couplée à la spectrométrie de masse, par immunochimie (anticorps spécifiques) ainsi que par des techniques de marquage spécifiques des glycoprotéines pour l'étude de MUC-1 (techniques de Schiff, utilisation de lectines).

1.3.2. Analyse bidimensionnelle

Étant donné la présence de protéines membranaires fortement hydrophobes qui ne peuvent être visualisées par des techniques bidimensionnelles classiques (focalisation isoélectrique puis SDS-PAGE), nous avons utilisé une approche d'électrophorèse bidimensionnelle non conventionnelle sur les protéines de la MFGM (16-BAC/SDS-PAGE ; Hartinger *et al.*, 1996) couplée à la technologie DIGE (*Differential Gel Electrophoresis*). Les données issues de huit animaux en début de lactation (quatre par génotype) ont été analysées par le logiciel *Samespots (Nonlinear Dynamics)*.

2. RESULTATS

Les analyses granulométriques ont montré qu'à mi-lactation, la taille des globules gras peut être reliée de manière significative au génotype α_{s1} -caséine, les animaux de génotype fort ayant des GG plus gros (diamètre modal = 3,65 μm +/- 0,19 pour les animaux AA vs. 3,10 μm +/- 0,24 pour les animaux OO ; $p < 0,0001$). Cette observation est à mettre en corrélation avec la production journalière de MG, les animaux de génotype fort (AA) et qui produisent plus de MG ayant des GG de diamètre plus important. Notre analyse protéomique nous a permis d'identifier les principales protéines de la MFGM caprine et d'observer des différences notables avec la MFGM bovine (Cebo *et al.*, sous presse). Notre analyse a également révélé que deux protéines de la MFGM (la lactadhérine et la stomatine) étaient surexprimées chez les individus de génotype nul, produisant des GG plus petits. Nos données suggèrent donc pour ces protéines un rôle dans les mécanismes de formation des GG dans la cellule épithéliale mammaire et/ou un rôle dans la libération des GG dans le lait.

CONCLUSION

Les résultats obtenus ont pu mettre en évidence une relation significative entre les caractéristiques des GG (taille, potentiel zêta) et le génotype pour la caséine α_{s1} . Bien que la plupart des protéines majeures semblent exprimées de manière équivalente, d'autres protéines (lactadhérine, stomatine) sont exprimées de manière différentielle entre génotypes extrêmes. Ces protéines pourraient donc jouer un rôle actif dans les mécanismes de sécrétion de la matière grasse laitière au sein de la cellule épithéliale mammaire.

Ce projet, partie intégrante du programme « Genomilk Fat: Biologie intégrative de la fonction mammaire » est financé par l'ANR (Genanimal 2006) et le groupement professionnel APIS Gene, représentant la filière bovine.

Cebo *et al.*, *J. Dairy Sci.*, sous presse

Chanat *et al.*, (1999) *J. Cell Sci.*, 112, 3399-3412

Chilliard *et al.*, (2006) *Anim. Feed Sci. Technol.* 131: 474-487

Fortunato *et al.*, (2003) *Proteomics* 3(6):897-905

Grosclaude et Martin (1997) *Milk Protein Polymorphism II*, IDF Palmerston North, New Zealand, pp 241-253

Hartinger *et al.*, (1996) *Anal. Biochem.* 240 : 126-133