

Le polymorphisme au locus *CSN1S1* chez la chèvre : impact sur la composition de la fraction protéique de la membrane du globule gras

α_{s1} -casein polymorphism and protein composition of the goat milk fat globule membrane

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

(1) Unité génomique et physiologie de la lactation (GPL) - INRA - Jouy-en-Josas

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

(3) INRA-Agrocampus Rennes - UMR 1253 Science et technologie du lait et de l'œuf (STLO)

(4) Plateau d'analyse protéomique par SM et séquençage (PAPSS) - INRA - Jouy-en-Josas

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

INTRODUCTION

La caséine α_{s1} (*CSN1S1*) est l'une des lactoprotéines majeures synthétisées par la glande mammaire. Chez la chèvre, un polymorphisme important a été décrit au locus *CSN1S1* (Grosclaude et Martin, 1997) avec l'identification d'au moins seize allèles associés à des taux de synthèse différents de la protéine. Outre cet impact sur la fraction protéique, un effet a également été rapporté sur la fraction lipidique du lait (Chilliard *et al.*, 2006). La matière grasse laitière (MGL) est sécrétée sous la forme de globules gras (GG), constitués 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 accumulation de caséines immatures dans le réticulum endoplasmique (RE) et une perturbation globale du processus sécrétoire (Chanat *et al.*, 1999). Les premières étapes de synthèse de la MGL ayant lieu dans le RE, il est très probable que ce processus est affecté par le dysfonctionnement sécrétoire observé chez les animaux n'exprimant pas la caséine α_{s1} . L'impact du polymorphisme génétique au locus *CSN1S1* sur la membrane du GG et sa fraction protéique reste à préciser.

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 Saanen de génotype extrême au locus *CSN1S1* (AA vs. O1O1, 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 (Zêtasizer 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 MGL 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

Etant 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 au locus *CSN1S1*, les animaux de génotype fort ayant des GG plus gros ($d_{43} = 3,90 \mu\text{m} \pm 0,19$ pour les animaux AA vs. $3,40 \mu\text{m} \pm 0,23$ pour les animaux O1O1 ; $p < 0,0001$). Pour le potentiel zêta, on observe une différence significative entre les deux génotypes AA et O1O1 à mi-lactation ($\zeta = -10,0\text{mV} \pm 0,9$ pour les animaux AA vs. $-11,8\text{mV} \pm 0,8$ pour les animaux O1O1 ; $p < 0,0001$). Concernant l'analyse protéomique, les expériences menées jusqu'à présent n'ont pas montré de différence notable entre génotypes en ce qui concerne certaines des protéines majeures de la MGL (adipophiline, butyrophiline, MUC 1). L'analyse bidimensionnelle par des protéines de la MFGM a révélé l'expression différentielle de protéines mineures de la MFGM (ANOVA $p < 0,05$) en cours d'identification par spectrométrie de masse après digestion trypsique (spectrométrie MALDI-TOF et LC MSMS).

CONCLUSION

Les premiers résultats obtenus ont pu mettre en évidence une relation significative entre les caractéristiques des GG (taille, potentiel zêta) et le génotype au locus *CSN1S1*. Bien que les protéines majeures semblent exprimées de manière équivalente, d'autres protéines exprimées de manière différentielle entre génotypes pourraient expliquer l'impact du génotype au locus *CSN1S1* sur les mécanismes de formation des GG dans 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.

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, 241-253

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