Interactions et assemblages entre l'alpha lactalbumine et le lysozyme: mécanismes, structures et stabilité

Michaël Nigen

▶ **To cite this version:**

Michaël Nigen. Interactions et assemblages entre l'alpha lactalbumine et le lysozyme: mécanismes, structures et stabilité. Biochimie [q-bio.BM]. Agrocampus - Ecole nationale supérieure d'agronomie de rennes, 2008. Français. NNT : . tel-00438402

HAL Id: tel-00438402

https://theses.hal.science/tel-00438402

Submitted on 3 Dec 2009

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.

Numéro d'ordre : 2008-16
Numéro de série : B-189

THESE

Présentée devant

AGROCAMPUS OUEST

Pour obtenir le titre de :

Docteur de l'ENSAR

Mention : Physico-chimie et Qualité des Bioproduits

Par

Michaël NIGEN

Interactions et assemblages entre l'α-Lactalbumine et le Lysozyme : mécanismes, structures et stabilité

Préparée à l'INRA-Agrocampus, UMR1253 Science et Technologie du Lait et de l'Œuf
65, rue de Saint-Brieuc – 35000 Rennes

Soutenue le 8 juillet 2008 devant le jury composé de :

M. André MATAGNE, Chercheur qualifié, Université de Liège	Rapporteur
M. Christian SANCHEZ, Professeur, ENSAIA-INPL de Nancy	Rapporteur
M. Paul COLONNA, Directeur de recherche, INRA de Nantes	Membre
M. Fabrice COUSIN, Chargé de Recherches, CEA de Saclay	Membre
M. Jean-François HUBERT, Professeur, Université de Rennes 1	Membre
Mme Françoise NAU, Professeur, Agrocampus de Rennes	Membre
M. Gérard BRULE, CEREL, Rennes	Membre invité
M. Saïd BOUHALLAB, Directeur de recherche, INRA de Rennes	Directeur de thèse

Remerciements

Je ne peux commencer ce chapitre sans remercier l'INRA, au travers le département CEPIA, de m'avoir donné la possibilité de mener à bien ce travail en accordant un financement durant ces trois années. Ce travail de thèse a été effectué au sein de l'UMR Sciences et Technologie du Lait et de l'Oeuf à Rennes dans de bonnes conditions tant sur le plan scientifique qu'humain, je tiens donc à exprimer toute ma gratitude envers Sylvie Lortal de m'avoir accueilli au sein du laboratoire.

Je n'aurai évidemment pas pu mener à bien ce projet de thèse sans Saïd Bouhallab. Pour m'avoir accordé sa confiance sur une nouvelle thématique développée au laboratoire, pour sa disponibilité, pour ses qualités tant scientifiques qu'humaines, pour nos discussions scientifiques assidues et pour ses nombreux encouragements, je tiens donc à lui exprimer tous mes remerciements. Je tiens également à remercier très sincèrement Thomas Croguennec pour sa disponibilité, ses encouragements, ses conseils et les nombreux échanges scientifiques qui ont contribués à l'avancement de ce travail. Un grand merci aussi à Joëlle Léonil pour ses précieux conseils scientifiques et ses encouragements.

Je souhaite particulièrement remercier André Matagne et Christian Sanchez pour avoir accepté d'être rapporteur de ce travail ainsi que Paul Colonna, Fabrice Cousin, Jean-François Hubert, Françoise Nau et Gérard Brulé pour l'ensemble des remarques pertinentes et des discussions qui ont contribué à l'enrichissement scientifique de ce manuscrit.

Cette thèse a fait l'objet de plusieurs collaborations, à la fois internes et externes au laboratoire, qui ont permis mon initiation à de nouvelles méthodes d'étude et à l'avancement de ce travail. Je tiens donc à remercier tout particulièrement Véronique Le Tilly de m'avoir familiarisé aux mesures d'anisotropie de fluorescence et de temps de vie de fluorescence ainsi qu'à l'analyse et l'interprétation des résultats. Je remercie Cédric Gaillard pour l'acquisition des clichés d'assemblages protéiques par microscopie électronique à transmission et microscopie de force atomique. Mes remerciements sont également destinés à Valérie Gagnaire et Didier Dupont pour leur initiation aux techniques d'électrophorèse et d'immunomarquage. Merci aussi à Marie-Madeleine Delage pour son initiation aux logiciels de modélisation moléculaire. Enfin, un immense merci à Marie-Noëlle Madec pour le temps

partagé à l'utilisation d'un appareil au départ obscur, le microscope confocal à balayage laser, dans une salle encore plus obscure.

Je tiens également à remercier Denis Renard, Ken-Hun Mok, Vincent Forge et Christopher Dobson qui de part les conseils, les échanges et les discussions scientifiques ont contribué à la réalisation de ce manuscrit.

Je tiens à chaleureusement remercier Rachel Boutrou pour ses conseils tout au long de ces trois années et pour son soutien matinal durant la période de rédaction. Je remercie aussi les membres de l'équipe biochimie, puis ISF-PL, ainsi que l'ensemble du personnel du laboratoire pour leur bonne humeur quotidienne qui contribue à générer une ambiance conviviale et chaleureuse au laboratoire.

Une thèse s'accompagne également de moments de détente. Je remercie donc les vétérans et les juniors du baby-foot (je ne cite personne, chacun saura à quelle catégorie il appartient!!!!!) pour les nombreuses parties enflammées du midi.

J'adresse un merci des plus sincères à Stéphane, Isabelle G, Gwenaëlle, Didier et Yann, mes colocataires de bureau, pour leur sympathie et leur bonne humeur perpétuelles durant ces trois années. Je remercie aussi Isabelle DF pour ses conseils.

La concrétisation de ce travail n'aurait pas eu lieu sans l'entourage amical et familial. Je tiens donc à remercier Eric, Fred, Céline, Eric, Johanna, Mag, Julie, Brice, Christian, Carole, Taïs, Erwan, Chrystel, Antoine, Bernard, Mich, Carine, Christine, Jean-Mich, Aurélie… pour leur soutien et leurs encouragements. Un grand merci aussi à mes parents et ma sœur pour leurs conseils, leur soutien et leurs encouragements qu'ils m'ont apportés jusqu'à aujourd'hui. Enfin, je ne peux finir sans un immense MERCI à Eva pour son soutien dans les moments de doute, pour ses encouragements quotidiens ainsi que pour tous les merveilleux moments partagés et à venir…

Valorisation du Travail de Thèse

1. Publications

M. Nigen, V. Le Tilly, T. Croguennec & S. Bouhallab. *Molecular interaction between apo or holo α-Lactalbumin and Lysozyme: formation of heterodimers as assessed by fluorescence measurements.* En préparation.

M. Nigen, T. Croguennec & S. Bouhallab, *Formation and stability of α-Lactalbumin–Lysozyme spherical particles: involvement of electrostatic forces.***Food Hydrocolloids,** Sous presse.

M. Nigen, T. Croguennec, M.N. Madec & S. Bouhallab, *Apo α-Lactalbumin and Lysozyme are co-localized in their subsequently formed spherical supramolecular assembly.* **FEBS Journal 2007**, 274, *6085–6093*.

M. Nigen, T. Croguennec, D. Renard & S. Bouhallab, *Temperature affects the supramolecular structures resulting from α-Lactalbumin–Lysozyme interaction.* **Biochemistry 2007**, 46, *1248–1255*.

2. Communications Orales

M. Nigen, T. Croguennec and S. Bouhallab, (2008) *Properties and stability of microspheres generated from α-Lactalbumin –Lysozyme interaction*, **Food Colloids**, *7-9 avril,* Le Mans, France.

M. Nigen, T. Croguennec, M.N. Madec and S. Bouhallab, (2007) *α-Lactalbumin and Lysozyme self-assemble into spherical particles*, **Biology and Physic Meeting**, *27 & 28 juin,* Batz-sur-Mer, France.

M. Nigen, T. Croguennec, M.N. Madec and S. Bouhallab, (2007) *An unfolded state of α-Lactalbumin interacts with Lysozyme to form different supramolecular structures in temperature-dependent manner*, **EMBO-IUP Meeting**, *20-24 mai,* Budapest, Hongrie.

M. Nigen, T. Croguennec, D. Renard, & S. Bouhallab, (2006) *La température affecte les suprastructures résultantes de l'interaction entre l'α-lactalbumine et le lysozyme***. Colloque annuel GDR ABV,** *11-13 Décembre,* Villeneuve d'Ascq, France.

3. Communications Ecrites (Posters)

M. Nigen, T. Croguennec, S. Ameziane and S. Bouhallab, (2007) *Physico-chemical conditions for the formation and the stability of α-Lactalbumin–Lysozyme spherical particles*, **Biology and Physic Meeting**, *27 & 28 juin,* Batz-sur-Mer, France.

M. Nigen, T. Croguennec, P. Schuck and S. Bouhallab, (2006) *Investigation of milk protein-protein interactions by isothermal titration calorimetry*, **IDF World Dairy Congress**, *20-23 octobre,* Chine.

Abréviations

A	anisotropie de fluorescence
A_0	anisotropie limite du fluorophore
Apo α-LA	α-lactalbumine dépourvue en calcium
CSLM	microscopie confocale à balayage laser
DNS-Cl	chlorure de dansyl
FITC	fluorescéine isociothianate
FRET	transfert d'énergie de type Förster
FRAP	retour de fluorescence après un photo-blanchiment
Holo α-LA	α-lactalbumine chargée en calcium
ITC	calorimétrie de titration isotherme (microcalorimétrie)
K_D	constante de dissociation ($mol.L^{-1}$)
$\lambda_{max\ ém}$	longueur d'onde maximale d'émission (nm)
λ_{exc}	longueur d'onde d'excitation (nm)
LYS	lysozyme
M_w	masse molaire ($g.mol^{-1}$)
PG	acide poly-L-glutamique
RBITC	rhodamine B isociothianate
RP-HPLC	chromatographie liquide haute performance en phase inverse
SEM	microscopie électronique à balayage
TEM	microscopie électronique à transmission
T	température (K)
TEM	microscopie électronique à transmission
τ	turbidité (cm^{-1})
τ_F	temps de vie de fluorescence (s)
τ_c	temps de corrélation (s)
ΔG_m	variation d'énergie libre du système (énergie de Gibbs) ($kJ.mol^{-1}$)
ΔH_m	variation d'enthalpie ($kJ.mol^{-1}$)
ΔS_m	variation d'entropie ($J.mol^{-1}.K^{-1}$)
$\Delta S_{m\ SOL}$	variation d'entropie de solvatation ($J.mol^{-1}.K^{-1}$)

$\Delta S_{m\ CONF}$	variation d'entropie conformationnelle ($J.mol^{-1}.K^{-1}$)
$\Delta S_{m\ R,TR}$	variation d'entropie rotationnelle et translationnelle ($J.mol^{-1}.K^{-1}$)
$\Delta S_{m\ PROT}$	variation d'entropie de la protéine ($J.mol^{-1}.K^{-1}$)

Sommaire

REMERCIEMENTS 3

VALORISATION DU TRAVAIL DE THESE 5

1. Publications 5

2. Communications Orales 5

3. Communications Ecrites (Posters) 5

ABREVIATIONS 7

SOMMAIRE 9

AVANT PROPOS 13

INTRODUCTION GENERALE 15

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE 21

1. Les interactions moléculaires : généralités 23

1.1. Les liaisons covalentes 23

1.2. Les interactions électrostatiques 23

1.3. Les liaisons hydrogènes 24

1.4. Les liaisons de Van der Waals 24

1.5. Les associations hydrophobes 25

2. Les principaux paramètres thermodynamiques régissant les interactions et les assemblages protéiques 26

3. Les assemblages protéiques 29

3.1. Modulation de la formation des assemblages protéiques et de leur nature 30

3.2. Assemblages dans les systèmes mono-protéiques 35

3.3. Assemblages impliquant au moins deux protéines 42

4. L'α-Lactalbumine et le Lysozyme 44

4.1. Origine du lysozyme et de l'α-lactalbumine 44

4.2. Les fonctionnalités du lysozyme et de l'α-lactalbumine 46

4.3. La séquence primaire du lysozyme et de l'α-lactalbumine 47

4.4. Les structures secondaire et tertiaire du lysozyme et de l'α-lactalbumine 48

4.5. L'interaction du lysozyme et de l'α-lactalbumine avec les minéraux 50

4.6. Les potentiels électrostatiques de surface du lysozyme et de l'α-lactalbumine 51

MATERIELS ET METHODES 53

1. Matériels d'étude 55

1.1. Protéines 55

1.2. Préparation des solutions protéiques 55

1.3. Polymères de synthèse 56

2. Méthodes 56

2.1. Calorimétrie de titration isotherme (ITC) 56

2.2. Anisotropie de fluorescence 60

2.3. Temps de vie de fluorescence 63

2.4. Fluorescence intrinsèque 63

2.5. Dichroïsme circulaire 64

2.6. Microscopie optique à contraste de phase 64

2.7. Microscopie confocale à balayage laser (CSLM) 65

2.8. Microscopie électronique à balayage (SEM) 67

2.9. Microscopie électronique à transmission (TEM) 67

2.10. Chromatographie liquide haute performance en phase inverse 68

2.11. Mesure de taille des structures supramoléculaires LYS/apo α-LA 68

2.12. Turbidité des mélanges LYS/apo α-LA 69

RESULTATS ET DISCUSSION 71

1. Chapitre 1 Mise en évidence de l'interaction et de l'assemblage entre l'α-lactalbumine et le lysozyme 73

1.1. Introduction 75

1.2. Article 1 77

1.3. Structure secondaire et tertiaire de l'apo α-LA et du LYS en fonction de la température 86

1.4. Structures supramoléculaires résultant de l'assemblage entre l'apo α-LA et le LYS en fonction de la température 89

1.5. Article 2 : projet de publication 91

1.6. Principaux résultats du chapitre 1 113

1.7. Discussion des résultats du chapitre 1 113

2. Chapitre 2 Formation et stabilité des microsphères apo α-LA/LYS : implication des interactions électrostatiques et de la flexibilité de l'apo α-LA 117

2.1. Introduction 119

2.2. Article 3 121

2.3. Modulation du signal thermodynamique de formation des microsphères par la force ionique 131

2.4. Modulation de la formation des microsphères par la concentration protéique 133

2.5. Stabilité des microsphères en fonction du pH 136

2.6. Rôle de la flexibilité de l'apo α-LA dans la formation des microsphères 138

2.7. Stabilité des microsphères apo α-LA/LYS en fonction de la température 141

2.8. Principaux résultats de ce chapitre 143

2.9. Discussion des résultats du chapitre 2 143

3. Chapitre 3 Caractérisation structurale des microsphères apo α-LA/LYS par microscopies 151

3.1. Introduction 153

3.2. Article 4 155

3.3. Caractérisation des microsphères résultant de l'assemblage entre le LYS et l'apo α-LA par microscopie électronique à transmission (TEM) 165

3.4. Principaux résultats du chapitre 3 169

3.5. Discussion des résultats du chapitre 3 169

CONCLUSION ET PERSPECTIVES 173

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 183

Avant Propos

Les recherches sur les interactions et les assemblages protéiques concernent des secteurs très variés comme ceux de la biologie – médecine, de l'agroalimentaire et plus récemment des nanobiotechnologies. La littérature scientifique dans ce domaine est par conséquent considérable. Nous limiterons notre introduction bibliographique aux travaux en lien direct avec notre problématique centrée sur les protéines alimentaires. En particulier, nous n'aborderons pas les travaux mettant en œuvre des techniques de haut débit couplées ou non à la bioinformatique pour rechercher et élucider les interactions entre partenaires protéiques, par exemple *in vivo* au sein du compartiment cellulaire. Par ailleurs, la littérature concernant les assemblages entre macromolécules de nature différente (polysaccharides/protéines, polyélectrolytes/protéines) est abondante et ne sera donc pas mentionnée dans l'introduction bibliographique. Cependant, nous discuterons nos résultats sur la base des notions physico-chimiques décrites pour expliquer les interactions entre polyélectrolytes chargés.

Nous avons donc limité notre revue bibliographique aux protéines alimentaires en abordant d'une part la nature des interactions et assemblages après traitements technologiques divers, impliquant principalement des liaisons covalentes (la majorité des travaux), et d'autre part les interactions et assemblages impliquant des interactions de faible energie ; cette dernière catégorie d'interactions étant à la base des interactions et assemblages protéiques étudiés dans cette thèse.

Introduction Générale

Les interactions et les assemblages protéiques sont des processus biologiques complexes impliquant des protéines dotées de propriétés physico-chimiques variables. Ces assemblages sont à l'origine de différentes fonctionnalités souhaitées ou indésirables. A titre d'exemple, ne serait-ce que dans le compartiment cellulaire, les assemblages protéiques (ribosomes, fibres d'actine, cytosquelette, etc) sont des éléments indispensables à de nombreuses fonctionnalités cellulaires (transcription, traduction, transport de molécules, etc) et donc à l'intégrité de la cellule ; au contraire, la mise en œuvre d'autres types d'assemblages cellulaires, tels que les fibres amyloïdes consécutives au défaut de repliement des protéines et à leur association, sont responsables du disfonctionnement, de la dégénérescence cellulaire et donc de pathologies. Par conséquent, de part leur diversité morphologique et fonctionnelle, la compréhension des mécanismes d'assemblages protéiques suscite un intérêt croissant dans différents domaines scientifiques (médical, pharmaceutique, alimentaire, etc). Ils sont devenus des objets d'étude pluridisciplinaire impliquant des chimistes, des physiciens, des biologistes, etc. Le nombre de publications relatant les assemblages protéiques a été multiplié par 9 au cours de ces dernières années comme cela est illustré par le diagramme de la figure 1, ce qui montre l'intérêt croissant des scientifiques pour l'étude des assemblages protéiques.

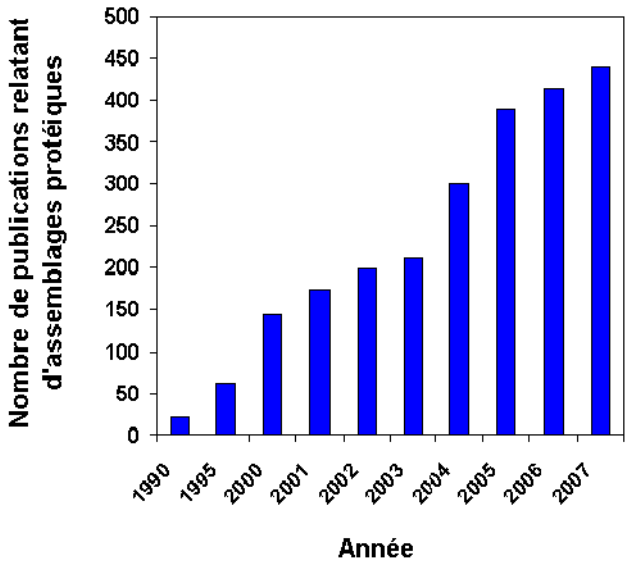

Figure 1. Evolution du nombre de publications concernant les assemblages protéiques durant ces dernières années. Recherche réalisée sur la base des mots clés « proteins » et « self-assembly » dans les banques de données de « Web of Science ».

Dans le domaine alimentaire, les assemblages protéiques sont à l'origine de propriétés recherchées, telles que des propriétés texturantes et interfaciales (moussante, émulsifiante), qu'ils confèrent aux ingrédients et produits alimentaires (Hagolle, Relkin, Popineau, & Bertrand, 2000; Galazka, Dickinson, & Ledward, 2000). Ces assemblages protéiques sont le plus souvent générés suite à des traitements technologiques imposant des conditions physico-chimiques relativement drastiques (température élevée, agitation, séchage, etc) lors de l'élaboration des ingrédients et aliments. Sous ces conditions physico-chimiques, les protéines sont soumises à des modifications structurales irréversibles propices à leur assemblage et à la formation de structures supramoléculaires. A titre d'exemple, le traitement thermique imposé au lait est prépondérant pour l'obtention de gels acides aux caractéristiques rhéologiques souhaitées. Au cours du traitement thermique, les protéines du lactosérum sont soumises à des modifications structurales et s'associent avec les caséines κ pour former des assemblages protéiques covalents qui contribuent à l'amélioration des propriétés rhéologiques des gels acides (Donato, Guyomarc'h, Amiot, & Dalgleish, 2007; Donato, Alexander, & Dalgleish, 2007).

Dans le contexte actuel de raréfaction des matières premières agricoles et d'augmentation des prix de ces dernières couplée à ceux de l'énergie, la compétitivité des industries alimentaires réside plus que jamais dans l'optimisation de la formulation et des procédés appliqués pour la maîtrise de la qualité des produits issus des transformations technologiques. Par ailleurs, la recherche de nouvelles valorisations des produits naturels à travers l'exploitation des potentialités fonctionnelles et biologiques des différents constituants moléculaires représente un moyen de développer des savoir faire techniques et technologiques, source de valeurs ajoutées pour les industries.

Parmi les constituants alimentaires, les protéines sont devenues des objets d'étude de nombreuses équipes scientifiques pour l'élaboration contrôlée de nouveaux objets et matériaux (assemblages protéiques) dotés de propriétés et de fonctionnalités spécifiques dans des conditions physico-chimiques n'impliquant pas de modifications structurales irréversibles. Les applications de ces nouveaux assemblages protéiques trouvent des voies de valorisation dans des domaines scientifiques aussi diversifiés que les domaines alimentaire, médical, pharmaceutique ou encore des télécommunications. Pour une application alimentaire, les nouveaux assemblages protéiques peuvent être à la fois la source de nouvelles propriétés texturante et interfaciale, mais également la source de vecteurs de molécules bioactives (Forster & Konrad, 2003; Sanguansri & Augustin, 2006).

L'élaboration de ces nouveaux assemblages protéiques s'effectue par l'approche dite du « bottom up » (Zhang, Marini, Hwang, & Santoso, 2002; Zhang, 2003; Sanguansri et al., 2006). Cette approche consiste à former des assemblages protéiques bien définis à partir de protéines « individuelles » en contrôlant thermodynamiquement les différentes étapes de leur assemblage (Zhang et al., 2002; Zhang, 2003; Sanguansri et al., 2006). L'élaboration d'assemblages protéiques via cette approche implique la mise en œuvre et la maîtrise d'interactions moléculaires non covalentes et de faible énergie entre les protéines. Par conséquent, dans le but de contrôler et de moduler la formation de tels assemblages protéiques, la compréhension des mécanismes d'assemblages protéiques est devenue une problématique fondamentale. Il est donc devenu indispensable d'apporter de nouvelles connaissances concernant les mécanismes d'interaction et d'assemblages protéiques à différentes échelles d'étude, s'échelonnant du moléculaire au macroscopique pour l'élaboration de nouveaux objets et bio-matériaux aux fonctionnalités définies.

Les travaux développés dans cette thèse s'inscrivent dans une problématique générale de recherche visant à comprendre l'interaction entre protéines globulaires présentes dans le lait et le blanc d'œuf, les deux matières premières étudiées au sein de mon laboratoire d'accueil.

L'objectif de ma thèse était de mettre en évidence les conditions d'interactions et de caractériser les assemblages moléculaires résultant dans le cas d'un mélange protéique binaire incluant deux protéines globulaires : le lysozyme issu du blanc d'œuf de poule et l'α-lactalbumine issue du lactosérum bovin. La stratégie mise en place dans ce travail était de limiter le nombre de partenaires protéiques, comparativement aux milieux complexes que sont le lactosérum et le blanc d'œuf, pour maîtriser la formation des structures supramoléculaires afin de proposer un mécanisme d'assemblage. Les protéines du lactosérum et du blanc d'œuf sont de bonnes candidates pour l'élaboration de nouveaux assemblages car elles présentent les avantages d'être bien caractérisées à l'échelle moléculaire et d'être abondantes sous différentes formes et différents degrés de pureté à l'échelle industrielle. De plus, le lactosérum et le blanc d'œuf sont des co-produits issus de la transformation du lait et de l'œuf. Par conséquent, l'utilisation de ces protéines pour l'élaboration de nouveaux assemblages protéiques fonctionnels constitue une nouvelle voie d'applications.

De plus en plus de travaux mettent en évidence la formation d'assemblages protéiques via des interactions de faible énergie en soulignant l'importance des conditions

physico-chimiques du milieu dans la formation et l'orientation de la nature des structures supramoléculaires formées. La synthèse bibliographique, présentée dans une première partie, fait donc l'état d'une part des interactions moléculaires protéiques et des paramètres thermodynamiques induisant l'assemblage des protéines et d'autre part de la formation de structures supramoléculaires protéiques de différentes natures dans des conditions physico-chimiques données.

Après la description des principaux matériels et méthodes mis en œuvre dans ce travail, les principaux résultats se présentent sous la forme de trois chapitres. Le premier est consacré à la mise en évidence de conditions physico-chimiques particulières dans lesquelles le lysozyme et l'α-lactalbumine (i) interagissent pour former des complexes moléculaires et (ii) s'assemblent en différentes structures supramoléculaires. Le deuxième chapitre est dédié à l'identification des éléments biochimiques et structuraux du lysozyme et de l'α-lactalbumine conduisant à leur interaction et à leur assemblage en structures supramoléculaires. Enfin, le troisième chapitre rapporte la caractérisation structurale d'un type d'assemblage entre les deux protéines déduite de la combinaison de diverses techniques microscopiques - microscopie confocale à balayage laser, microscopie électronique à balayage et microscopie électronique à transmission. La structure de chaque chapitre est la suivante : 1- Questions abordées, 2- Résultats publiés ; 3- Résultats complémentaires non publiés ; 4- Synthèse des réponses apportées et leur discussion. Le manuscrit se termine par une conclusion générale sur notre apport et les perspectives ouvertes par ce travail, suivie par la liste des références bibliographiques.

Etude Bibliographique

1. Les interactions moléculaires : généralités

Les interactions rencontrées dans les assemblages protéiques peuvent être différentes de part leur nature, leur énergie (force) et leur spécificité selon la nature de l'assemblage protéique et les conditions physico-chimiques du milieu. De plus, plusieurs types d'interaction sont susceptibles d'être impliqués entre les protéines à la fois dans la formation de l'assemblage protéique et dans sa stabilité. Il apparaît donc nécessaire de rappeler brièvement les principales caractéristiques des interactions moléculaires rencontrées lors des assemblages protéiques.

1.1. Les liaisons covalentes

Les liaisons covalentes sont spécifiques et résultent de la mise en commun d'électrons entre deux atomes. Elles peuvent aussi bien se former au sein d'une même protéine qu'entre plusieurs protéines. Ces liaisons sont très énergétiques (200 à 800 $kJ.mol^{-1}$).

Elles peuvent s'établir entre les groupements carboxyliques et les groupements amines des acides aminés des protéines pour former des liaisons de type peptidique. La formation de ce type de liaison nécessite fréquemment un catalyseur qui peut être physique (température, pression), biologique (certaines enzymes comme la transglutaminase) ou encore chimique (glutaraldéhyde).

Des liaisons covalentes peuvent également s'établir par l'intermédiaire des groupements thiols des résidus cystéine pour former des ponts disulfures intra- et/ou inter-moléculaires (Croguennec, Molle, Mehra, & Bouhallab, 2004; Visschers & de Jongh, 2005). La formation de ces liaisons est également favorisée par des températures élevées et la présence de catalyseurs, tel le cuivre, qui favorise les réactions d'oxydation (Bouhallab et al., 2004).

Les liaisons covalentes jouent un rôle primordial dans la conformation des protéines et leur stabilité. A titre d'exemple, les ponts disulfures intramoléculaires confèrent une stabilité aux protéines, elles sont contraintes dans une certaine conformation.

1.2. Les interactions électrostatiques

Les interactions électrostatiques s'établissent entre des protéines portant des charges électriques opposées. L'énergie de ces interactions est fortement dépendante (i) des charges

portées par les protéines (q_1 et q_2), (ii) de la distance entre les protéines (r) et (iii) de la constante diélectrique (ε) du milieu dans lequel ces protéines interagissent. La force des interactions électrostatiques est décrite par la loi de Coulomb et s'exprime selon l'équation suivante :

$$F = \frac{q_1 q_2}{4\pi\varepsilon_0\varepsilon_r r^2}$$

ε_0 correspond à la constante diélectrique du vide et ε_r correspond à la constante diélectrique du milieu.

La mise en œuvre et la force des interactions électrostatiques sont influencées par les charges des protéines, notamment leur intensité et leur distribution au niveau de la protéine, et les conditions physico-chimiques du milieu dans lesquelles les complexes protéiques sont formés (pH, force ionique, nature des ions et température). Leur énergie est de l'ordre de 25 à 50 $kJ.mol^{-1}$.

1.3. Les liaisons hydrogènes

Les liaisons hydrogènes sont de type dipôle-dipôle. Elles s'établissent entre un atome d'hydrogène (accepteur d'électrons) lié à un atome électronégatif (N, O) et un autre atome électronégatif (donneur d'électrons).

L'établissement des liaisons hydrogènes est favorisé à basse température. L'énergie de ces liaisons est dépendante de l'électronégativité des atomes et de leur orientation dans la liaison : l'énergie est la plus élevée lors de l'alignement des deux atomes électronégatifs et de l'atome d'hydrogène impliqués dans la liaison. L'énergie d'une liaison hydrogène s'échelonne entre 10 et 30 $kJ.mol^{-1}$.

1.4. Les liaisons de Van der Waals

Les liaisons de Van der Waals sont des liaisons non-spécifiques de type dipôle permanent - dipôle permanent, dipôle permanent - dipôle induit et dipôle induit - dipôle induit. Ces liaisons s'établissent à courte distance entre les domaines d'une même protéine ou entre plusieurs protéines. Elles résultent de la distribution asymétrique des charges

électroniques d'un atome qui induit un moment dipolaire sur ce même atome. Ce moment dipolaire altère la distribution électronique des atomes voisins ce qui entraîne la mise en place de liaisons de Van der Waals entre ces atomes.

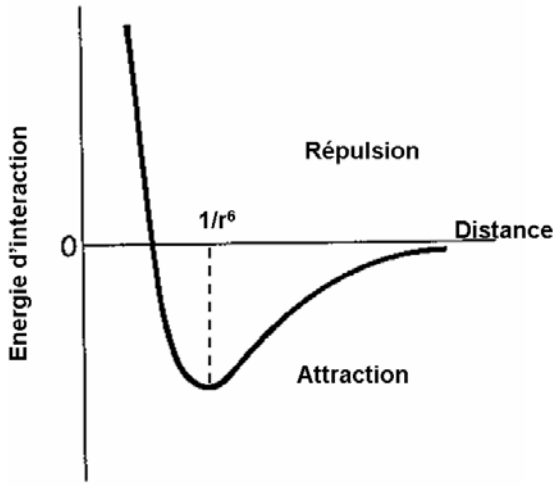

Figure 2. Energie potentiel en fonction de la distance interatomique (Potentiel de Lennard-Jones).

Les liaisons de Van der Waals sont attractives ou répulsives selon la distance entre les partenaires de l'interaction. Elles sont attractives ce qui provoque le rapprochement des atomes et deviennent répulsives lors du rapprochement trop important des atomes dues à la répulsion des nuages électroniques et à l'impénétrabilité des atomes (Figure 2).

L'énergie des liaisons de Van der Waals est proportionnelle à $1/r^6$ (r étant la distance entre deux atomes). Elle est de l'ordre de 1 à 20 $kJ.mol^{-1}$ et est globalement inférieure à celle des interactions électrostatiques et des liaisons hydrogènes.

1.5. Les associations hydrophobes

Les protéines peuvent également interagir et s'assembler pour former des complexes via des associations hydrophobes. Elles s'établissent entre des molécules apolaires ou présentant des domaines apolaires dans des solvants aqueux. Ces associations hydrophobes sont de nature entropique et sont fortement dépendantes de la température, elles sont favorisées pour des températures élevées. L'énergie de ces associations hydrophobes est de l'ordre de 2 à 10 $kJ.mol^{-1}$.

Les protéines globulaires contiennent des acides aminés apolaires. Des associations hydrophobes s'établissent entre ces acides aminés ce qui contribuent au repliement des protéines globulaires et à leur stabilité. L'organisation et le repliement des protéines sont tels que la majeure partie de ces acides aminés se retrouvent enfouis au cœur des protéines, là où l'accessibilité au solvant est restreinte (excepté pour les protéines membranaires dont les acides aminés apolaires sont exposés à la surface des protéines). Par conséquent, l'établissement d'associations hydrophobes entre protéines nécessite fréquemment une modification conformationnelle et structurale de ces dernières afin d'exposer les acides aminés apolaires à leur surface. Dans le cas des protéines globulaires, l'exposition de domaines hydrophobes au solvant peut induire l'agrégation de ces protéines via des associations hydrophobes.

2. Les principaux paramètres thermodynamiques régissant les interactions et les assemblages protéiques

Les interactions entre les protéines et leur assemblage en structures supramoléculaires sont régit par le second principe de la thermodynamique de l'énergie libre, ou énergie de Gibbs (ΔG_m), du système. L'énergie libre est une équation d'état dépendant de deux grandeurs thermodynamiques, l'enthalpie (ΔH_m) et l'entropie (ΔS_m) du système, et de la température (T) :

$$\Delta G_m = \Delta H_m - T\Delta S_m$$

L'enthalpie (ΔH_m) du système est attribuée à la somme des contributions énergétiques apportées par la mise en œuvre d'interactions entre les protéines (interaction électrostatique, liaison hydrogène, interaction de Van der Waals) (Brady & Sharp, 1997; Campoy & Freire, 2005). L'enthalpie du système est favorable à la formation de complexe protéique si les interactions établies entre les protéines compensent totalement les interactions de chacune des protéines avec le solvant avant leur complexation (Campoy et al., 2005).

L'entropie (ΔS_m) du système résulte de la somme de plusieurs contributions entropiques dont l'entropie de solvatation des protéines ($\Delta S_{m\ SOL}$) et l'entropie liée aux protéines elles-mêmes ($\Delta S_{m\ PROT}$) (Brady et al., 1997; Campoy et al., 2005). L'entropie peut être décomposée en plusieurs contributions entropiques et l'énergie libre s'écrire alors de la façon suivante :

$$\Delta G_m = \Delta H_m - T\Delta S_{m\,SOL} - T\Delta S_{m\,PROT}$$

La mise en œuvre d'interactions et la formation de complexes protéiques modifient l'énergie des différentes contributions entropiques du système dont la résultante peut être favorable ou défavorable au processus d'interaction.

L'entropie de solvatation ($\Delta S_{m\ SOL}$) représente le degré de liberté des molécules de solvant. Au voisinage des protéines et notamment à leur surface, le degré de liberté des molécules de solvant est restreint. Lors de l'interaction entre protéines, les molécules de solvant localisées au niveau des groupements impliqués dans l'interaction protéique sont libérées dans le milieu. La libération de ces molécules de solvant est accompagnée de l'augmentation de leur degré de liberté et, par conséquent, de l'augmentation de l'énergie de la contribution entropique de solvatation (Campoy et al., 2005). Dans une solution aqueuse contenant des molécules apolaires, ces molécules interagissent via des associations hydrophobes. Les molécules d'eau n'ont alors pas ou peu de possibilité d'établir des liaisons hydrogènes avec les molécules apolaires pour stabiliser le système ce qui entraîne l'augmentation de l'énergie libre de surface des protéines. Par ailleurs, les molécules d'eau localisées au voisinage des molécules apolaires s'organisent et établissent des liaisons hydrogènes entre elles. Elles forment alors un réseau ordonné au voisinage des molécules apolaires. Par conséquent, les molécules apolaires cherchent à s'isoler et se regrouper en établissant entre elles des associations hydrophobes pour minimiser leur contact avec les molécules d'eau (Meyer, Rosenberg, & Israelachvili, 2006). Cet arrangement moléculaire est accompagné d'une diminution de l'énergie de surface des protéines et d'un gain entropique lié à la libération des molécules d'eau organisées en réseau ordonné préalablement à l'association des protéines (Gabler, 1978; Tanford, 1997).

L'entropie apportée par les protéines ($\Delta S_{m\ PROT}$) est notamment due à des contributions entropiques conformationnelles ($\Delta S_{m\ CONF}$) des protéines et des contributions entropiques liées

à leurs mouvements rotationnel et translationnel ($\Delta S_{m\ R,TR}$). Les protéines sont des molécules dotées d'une conformation, dite « moyenne », qui fluctue autour de celle-ci par des modifications subtiles de la chaine principale et surtout des chaines latérales des acides aminés. L'ensemble de ces conformations confère aux protéines un certain degré de liberté conformationnelle. Lors de la mise en place d'interactions et de la formation de complexes protéiques, la chaine principale et les chaines latérales des protéines incluses dans le complexe se retrouvent d'ordinaire plus contraintes ce qui diminue leur degré de liberté conformationnelle (Brady et al., 1997). Par conséquent, la contribution entropique conformationnelle des protéines diminue lors de la formation de complexe protéique (Brady et al., 1997; Campoy et al., 2005). De plus, l'interaction entre protéines et la formation de complexe protéique engendrent une contrainte supplémentaire aux protéines impliquées dans le complexe en réduisant leur liberté de mouvements rotationnel et translationnel. La contribution entropique liée à ces mouvements s'en trouve donc aussi diminuée.

Par conséquent, la formation de complexes protéiques conduit à la diminution des contributions entropiques conformationnelles ($\Delta S_{m\ CONF}$) et de mouvements ($\Delta S_{m\ R,TR}$) des protéines et à l'augmentation de la contribution entropique de solvatation ($\Delta S_{m\ SOL}$) respectivement défavorable et favorable au processus de formation de complexes protéiques (Brady et al., 1997; Campoy et al., 2005).

D'après l'équation de l'énergie de Gibbs, la formation de complexes protéiques est spontanée lorsque leur mise en œuvre contribue à la diminution de l'énergie libre du système, celle-ci devenant négative ($\Delta G_m < 0$). Comme nous l'avons vu précédemment, la formation de complexes protéiques est gouvernée par la balance subtile des contributions enthalpiques (ΔH_m) et entropiques ($-T\Delta S_m$) du système. La diminution de l'enthalpie et/ou l'augmentation de l'entropie du système associées à la mise en œuvre d'interaction entre les protéines sont favorables à la diminution de l'énergie libre du système et donc à la formation de complexes protéiques. A titre d'exemple, la formation de complexes protéiques via des interactions électrostatiques s'accompagne d'une perte entropique du système due à la diminution de l'énergie libre électrostatique des molécules. Néanmoins, cette perte entropique est compensée par un gain entropique du système engendré à la fois par la libération de contre-ions et des molécules d'eau associés aux protéines (Weinbreck, de Vries, Schrooyen, & de Kruif, 2003; de Vries & Cohen Stuart, 2006; Turgeon, Schmitt, & Sanchez, 2007). Dans

cet exemple, la balance favorable des contributions entropiques de solvatation ($\Delta S_{m\ SOL}$) due à l'interaction constitue la force motrice pour la formation de complexes protéiques.

3. Les assemblages protéiques

L'assemblage entre les protéines est un phénomène ubiquitaire qui peut résulter en la formation d'une variété de structures supramoléculaires. Ces structures supramoléculaires peuvent se différencier de part leur taille (de quelques nanomètres à plusieurs micromètres), leur composition protéique, leur morphologie (agrégats, fibres, nanotubes, etc) ou encore leur propriété fonctionnelle (pouvoirs gélifiant, moussant et émulsifiant ; vecteur de molécules bioactives, etc). Plusieurs facteurs sont susceptibles d'influencer la nature de ces structures supramoléculaires. Ils peuvent être de nature « extrinsèque » aux protéines comme les paramètres physico-chimiques du milieu ou encore de nature « intrinsèque » aux protéines. En effet, la formation des structures supramoléculaires dépend également des propriétés physico-chimiques et conformationnelles des protéines, ces facteurs intrinsèques étant eux-mêmes fréquemment modulés par les paramètres physico-chimiques du milieu. Les protéines sont des polyélectrolytes caractérisés par une diversité conformationnelle, une distribution hétérogène de charges et de « patchs » hydrophobes à leur surface. Elles apparaissent donc comme des polyélectrolytes hétérogènes et complexes. Ces différents facteurs « intrinsèques » aux protéines expliquent par conséquent la diversité et la complexité des comportements rencontrés lors de leur assemblage, ce qui les distingue de l'assemblage de colloïdes de synthèse aux structures monomériques et aux propriétés physico-chimiques plus homogènes et théoriquement facilement contrôlables.

Nous présenterons dans un premier temps l'influence des paramètres physico-chimiques du milieu et des facteurs « intrinsèques » aux protéines sur la formation des structures supramoléculaires, avant de s'attarder, dans un second temps, sur la formation de différentes structures supramoléculaires résultant de l'assemblage protéique dans les cas de mélanges mono-protéique et de mélanges protéiques complexes (mélanges contenant plus d'une protéine).

3.1. Modulation de la formation des assemblages protéiques et de leur nature

Les conditions physico-chimiques (pH, température, force ionique, concentration protéique, nature chimique des sels, nature du solvant, etc) du milieu (van der Linden & Venema, 2007) comme la nature et la conformation des protéines sont des paramètres fondamentaux dans l'orientation des assemblages protéiques en une structure supramoléculaire définie. Ces différents paramètres permettent la formation et l'orientation des structures supramoléculaires en modulant, le plus souvent de manière subtile, la nature et la force des interactions moléculaires impliquées entre les protéines lors de leur assemblage et les propriétés thermodynamiques telles que les contributions enthalpiques (ΔH) et entropiques ($-T\Delta S$) du système. Le mécanisme de formation des structures supramoléculaires protéiques ainsi que leur morphologie sont fortement dépendantes de la nature et de la balance des interactions entre les protéines impliquées dans l'assemblage (Mossa, Sciortino, Tartaglia, & Zaccarelli, 2004). Dans le cas d'un mélange mono-protéique, Mossa et al. ont montré en utilisant une approche de modélisation que des assemblages protéiques stables et de morphologies différentes peuvent être générés en modulant la contribution des interactions attractives à courte distance (interaction de Van der Waals) et répulsives à longue distance (interaction électrostatique) au sein de ces assemblages (Mossa et al., 2004).

3.1.1. Importance de la conformation protéique

Aujourd'hui, le rôle joué par la conformation des protéines dans la formation et l'orientation des assemblages protéiques est clairement démontré. La formation d'assemblages protéiques à partir de protéines globulaires nécessite fréquemment une modification, au moins partielle, de leur structure tridimensionnelle (Chiti & Dobson, 2006) : en effet, les propriétés d'assemblage des protéines globulaires sont accrues dans des conditions physico-chimiques où les protéines globulaires présentent un certain degré de dépliement conduisant généralement à l'exposition au solvant de régions hydrophobes. La modification de la conformation des protéines est le plus souvent réalisée en jouant sur les conditions physico-chimiques du milieu. Cependant, bien que la formation d'assemblage entre protéines globulaire soit facilitée par leur déstabilisation, la formation d'un oligomère, dénommé « native-like », entre protéines globulaires peut également résulter en la formation d'assemblages protéiques (Chiti et al., 2006). Des résultats expérimentaux ont montré que pour certaines protéines, une étape d'oligomérisation précède le processus d'assemblage sans

modification notable de la conformation native. Cet oligomère joue ainsi le rôle d'un précurseur (« nucléi ») favorisant l'assemblage en structures supramoléculaires. Au moins deux « voies » distinctes peuvent donc être suivies par les protéines globulaires pour s'assembler et former des structures supramoléculaires.

3.1.2. Rôle des paramètres physico-chimiques dans les assemblages protéiques

Parmi les différents paramètres physico-chimiques, le pH, la force ionique et la température sont ceux les plus fréquemment étudiés et modulés lors de la formation et de l'orientation des assemblages protéiques.

Le pH est un facteur agissant sur le degré d'ionisation des groupements portés par les chaînes latérales des acides aminés constituant les protéines. Par conséquent, le pH influe directement sur la charge des protéines ce qui peut moduler et orienter la morphologie des assemblages protéiques. En extrapolant les connaissances fondamentales acquises lors des assemblages de polymères, Van der Linden et al. ont proposé une explication quant à la morphologie des assemblages protéiques en se basant sur la densité de charge globale des protéines et sur l'équilibre des interactions moléculaires impliquées dans ces assemblages. Des structures supramoléculaires sphériques sont attendues pour une charge globale faible des protéines complexées, alors que des structures supramoléculaires linéaires sont favorisées lors de la présence d'une forte densité de charge après l'association des protéines, cette morphologie étant favorisée par des répulsions électrostatiques (van der Linden et al., 2007).

La force ionique est un paramètre physico-chimique par lequel la formation des assemblages protéiques peut être modulée en écrantant les charges de surface des protéines. Dans une solution aqueuse, la distribution des ions à la surface des protéines est régit par le potentiel électrostatique de surface des protéines : les contre-ions s'accumulent à l'interface des protéines pour compenser les charges de surface ; alors que les co-ions sont refoulés de la surface des protéines, leur distance à l'interface dépendant de l'intensité du potentiel de surface des protéines (Figure 3). A une distance de l'interface supérieure à la longueur de Bjerrum, lorsque l'énergie thermique de libre diffusion des contre-ions compense l'énergie électrostatique de la protéine, les contre-ions et co-ions ne sont plus condensés ; ils diffusent « librement » (Figure 3). Cependant, la répartition inhomogène de ces derniers génère une

double couche électrique à la surface des protéines caractérisée par un potentiel électrostatique (ψ).

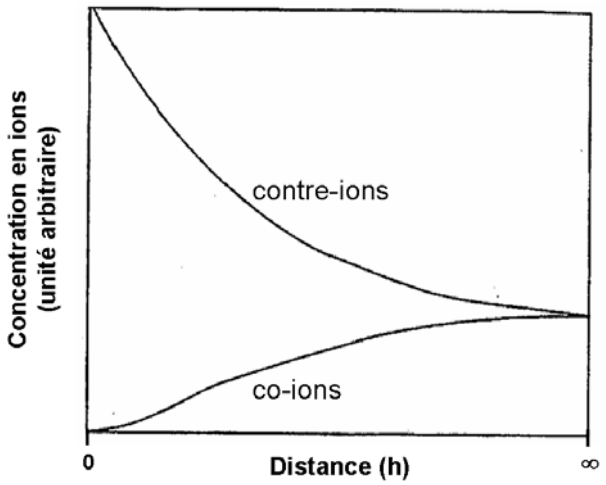

Figure 3. Répartition des ions selon leur distance avec l'interface de la protéine (Walstra, 2003).

Le potentiel électrostatique (ψ) d'une protéine diminue selon la distance à sa surface en suivant la théorie de Debye-Hückel. Le potentiel électrostatique (ψ) à une distance (h) de l'interface de la protéine s'exprime selon l'équation suivante :

$$\psi = \psi_0 \exp\left(-\kappa^{-1} \times h\right)$$

avec ψ_0 le potentiel électrostatique de surface de la protéine et κ^{-1} la longueur de Debye-Hückel qui caractérise la largeur de la double couche électrique à la surface des protéines. A la longueur de Debye-Hückel, $\psi = 0{,}37 \times \psi_0$.

La longueur de Debye-Hückel $\left(\kappa^{-1}\right)$ est modulée par la force ionique (I) de la solution et s'écrit selon l'équation suivante :

$$\kappa^{-1} = \sqrt{\frac{\varepsilon_0 \varepsilon k_B T}{2 I N_A e^2}}$$

avec e la charge des électrons, ε_0 la constante diélectrique du vide, ε la constante diélectrique du milieu, k_B la constante de Boltzmann, T la température et N_A le nombre d'Avogadro.

Dans une solution aqueuse à température ambiante, la longueur de Debye-Hückel peut se réduire à l'équation suivante :

$$\kappa^{-1} \approx \frac{0{,}30}{\sqrt{I}}$$

Par conséquent, cette équation reflète la modulation de la longueur de Debye-Hückel par la force ionique de la solution dont l'augmentation induit une diminution de la longueur de Debye-Hückel comme montré dans la figure 4.

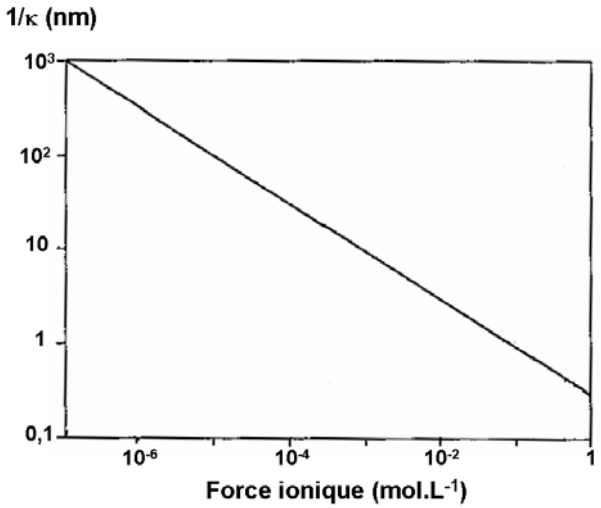

Figure 4. Influence de la force ionique sur la longueur de Debye-Hückel $\left(\kappa^{-1}\right)$.

Lors des assemblages protéiques, l'influence de la force ionique est différente selon les interactions mises en œuvre au cours de l'assemblage. Dans le cas d'un assemblage mono-protéique, l'augmentation de la force ionique permet un écrantage des charges de surface des protéines et donc une diminution des forces répulsives électrostatiques à longue distance entre ces protéines. Par conséquent, la longueur de Debye-Hückel est réduite à force ionique élevée ce qui permet aux protéines de se rapprocher et d'établir d'autres types d'interactions à courte distance, telles que des liaisons de Van der Waals ou des associations hydrophobes, susceptibles de moduler et d'orienter les assemblages protéiques. Cet effet force ionique est généralement exploité dans les études de précipitation ou de cristallisation des protéines.

Lors de la formation d'assemblages protéiques complexes, incluant des protéines de charge globale opposée, via des interactions électrostatiques à longue distance, l'augmentation de la force ionique du milieu va aussi masquer les charges de surface des protéines ce qui va réduire les forces électrostatiques à longue distance qui sont attractives dans cette configuration là. Par conséquent, l'assemblage protéique entre les protéines de charge opposée est réduit voire même inhibé selon la force ionique de la solution et les forces électrostatiques attractives entre les protéines.

La formation des assemblages protéiques peut aussi être influencée par la température du milieu. Ce facteur module tout d'abord la balance des interactions établies entre les protéines impliquées dans l'assemblage. A faible température, la mise en œuvre d'interactions de nature électrostatique entre les protéines est favorisée, alors que l'augmentation de la température permet la formation d'assemblages protéiques via des interactions de nature hydrophobe. De plus, au-delà de la modulation des interactions impliquées dans l'assemblage, la température influe également sur la conformation des protéines : selon leur stabilité thermodynamique, l'augmentation de la température peut induire des modifications conformationnelles des protéines qui peuvent être à l'origine de la formation d'assemblages protéiques.

3.2. Assemblages dans les systèmes mono-protéiques

Dans un système mono-protéique, on cherche à faire interagir et à générer des assemblages à partir d'une seule protéine, donc entre des molécules dotées de propriétés physico-chimiques identiques. Des assemblages protéiques variés de part leur morphologie, leur taille ou encore leurs propriétés fonctionnelles peuvent être formés selon les conditions physico-chimiques et la conformation protéique. Nous présenterons ici quelques exemples de structures supramoléculaires résultant de l'assemblage dans des systèmes mono-protéiques.

3.2.1. Structures agrégées

La formation d'agrégats protéiques est un phénomène ubiquitaire : ces structures supramoléculaires sont fréquemment observées lors d'assemblages protéiques. Ce type de structures se forme par une association aléatoire des protéines, sans aucune hiérarchisation. Les agrégats sont le plus souvent générés après modification conformationnelle des protéines par un facteur physico-chimique (température, pH, pression, force ionique etc). A titre d'exemple, la dénaturation thermique de la β-lactoglobuline (De La Fuente, Singh, & Hemar, 2002), de l'ovalbumine (Weijers, Barneveld, Cohen Stuart, & Visschers, 2003) ou encore de l'α-lactalbumine (Wijesinha-Bettoni et al., 2007) conduit à la formation d'agrégats. A faible force ionique, la β-lactoglobuline s'associe aussi pour former des agrégats à son point isoélectrique alors que son agrégation est prévenue en augmentant la force ionique de la solution (Majhi et al., 2006).

Pedersen et al. ont également montré l'agrégation de l'α-lactalbumine à pH acide (pH 3) lors de son incubation à 30°C durant plusieurs jours. A ce pH, la conformation de l'α-lactalbumine est modifiée, elle adopte une structure de type « molten globule ». De plus, la morphologie des agrégats formés était modulée par l'absence ou la présence de sels ainsi que la nature de ces sels (Figure 5) (Pedersen, Fojan, Sorensen, & Petersen, 2006). Dans ces conditions physico-chimiques, l'α-lactalbumine dépourvue de son calcium présente une stabilité moindre ce qui lui confère des propriétés d'agrégation (Figure 5A). Ces propriétés d'agrégation sont accrues par les ions présents dans le milieu qui déstabilisent l'α-lactalbumine. Le pouvoir déstabilisant des anions suit la série d'Hofmeister : $Cl^- < H_2PO_4^- < SO_4^{2-}$ (Figure 5 B, C, D). De plus, le pouvoir déstabilisant des anions est amplifié par la

présence de Cu^{2+} qui interagit avec l'α-lactalbumine en induisant des modifications structurales.

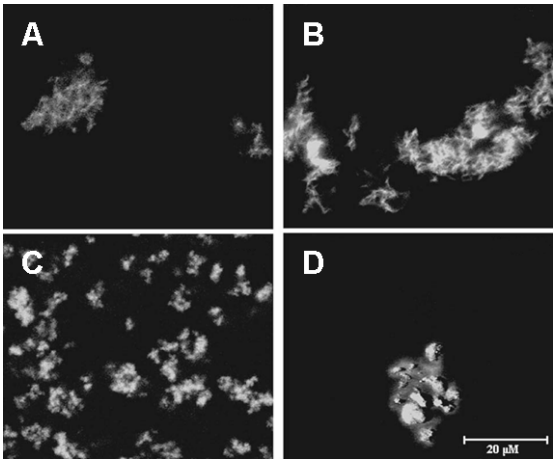

Figure 5. Observation par microscopie confocale d'agrégats d'α-lactalbumine formés à pH 3 selon l'absence de sels (A) et la nature des sels présents : $CuCl_2$ (B), $CuSO_4$ (C) et $Cu_3(PO_4)_2$ (D) (Pedersen et al., 2006). La barre d'échelle représente 20 µm.

Tous ces exemples montrent bien les nombreuses possibilités de former des agrégats en modifiant les conditions physico-chimiques du milieu.

Cependant, la formation de ce type de structures supramoléculaires peut également être modulée et inhibée par d'autres molécules qui jouent le rôle de molécule chaperonne. Takase a montré que l'assemblage et l'agrégation de l'α-lactalbumine dénaturée peuvent être inhibés par la présence d'une autre protéine, la lactoferrine (Takase, 1998). Ceci souligne et constitue un exemple académique quand à la complexité des phénomènes d'auto-assemblages protéiques.

3.2.2. Structures fibrillaires

L'assemblage protéique en fibres de type amyloïde est un phénomène ubiquitaire qui se différencie d'une protéine à une autre selon les conditions physico-chimiques dans lesquelles l'assemblage est effectué. La formation de ces fibres suit un mécanisme de type nucléation/croissance (Lomakin, Chung, Benedek, Kirschner, & Teplow, 1996; Lomakin, Teplow, Kirschner, & Benedek, 1997; Chiti et al., 2006; Pellarin, Guarnera, & Caflisch, 2007). Au cours de l'étape de nucléation, les protéines s'assemblent pour former un « nucléi » stable ; puis d'autres protéines s'associent ce qui permet l'élongation et la formation d'une « proto-fibre », puis d'une fibre, cette deuxième étape constitue la phase de croissance

(Walsh, Lomakin, Benedek, Condron, & Teplow, 1997). La croissance de ces structures fibrillaires est hiérarchisée et unidirectionnelle. Lors de la croissance de la fibre, l'association des protéines s'effectue par des interactions intermoléculaires impliquant des brins β des protéines pour former des feuillets β. La présence de feuillets β est une des caractéristiques des fibres de type amyloïde. Elles sont également caractérisées par un diamètre d'environ 10 nm et une longueur de fibre pouvant atteindre plusieurs micromètres.

Les conditions physico-chimiques d'assemblage des protéines en fibres amyloïdes sont fortement dépendantes de la conformation des protéines. La formation de fibres amyloïdes dans le cas de protéines globulaires nécessite leur déstabilisation de manière à exposer au solvant des brins β ou des régions susceptibles de s'organiser en brin β.

A titre d'exemple, plusieurs travaux montrent que le lysozyme ou l'α-lactalbumine peuvent s'auto-assembler en fibres amyloïdes à des pH acides (pH 2) et dans des conditions de températures de 57°C et 37°C, respectivement (Krebs et al., 2000; Goers, Permyakov, Permyakov, Uversky, & Fink, 2002; Arnaudov & de Vries R., 2005). La morphologie des fibres obtenues pour les deux protéines est illustrée dans la figure 6.

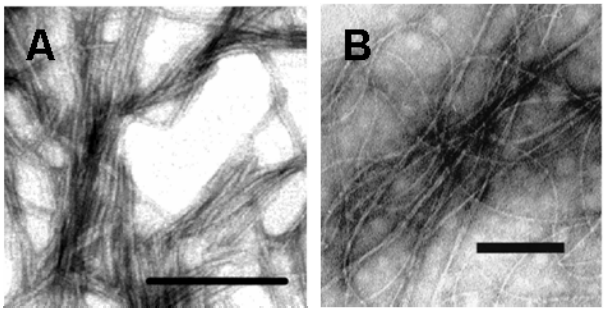

Figure 6. Observation de fibres amyloïdes résultant de l'assemblage de l'α-lactalbumine (A) (Goers et al., 2002) et du lysozyme (B) (Krebs et al., 2000) par microscopie électronique. Les barres d'échelle sont de 100 nm (A) et 200 nm (B).

La formation de fibres de type amyloïde, moins fréquente dans le cas de l'assemblage des protéines globulaires, est bien décrite dans le cas de peptides ou de protéines dites peu structurées, telle que la caséine κ. La formation des fibres amyloïdes à partir de la caséine κ est obtenue à pH neutre et une température de 37°C après réduction des ponts disulfures (Farrell, Cooke, Wickham, Piotrowski, & Hoagland, 2003; Thorn et al., 2005). Par ailleurs, comme dans le cas des structures agrégées, la présence d'une autre protéine complique le

processus. En effet, l'auto-assemblage de la caséine κ en fibres amyloïdes peut être inhibé par son interaction avec les caséine β et caséine α_s (Thorn et al., 2005).

Les fibres amyloïdes sont également susceptibles de s'organiser en de larges structures sphéroïdes dénommées sphérulites. Les sphérulites sont des structures supramoléculaires semi-cristallines caractérisées par l'apparition d'une croix de Malte lors de leur observation sous une lumière polarisée (Figure 7). Le cœur des sphérulites se compose d'un agrégat protéique (« nucléi ») de nature différente des précurseurs des fibres amyloïdes, alors que la couronne des sphérulites est constituée de fibres amyloïdes (Krebs, Bromley, Rogers, & Donald, 2005). La formation de ces structures supramoléculaires s'effectue par un processus de nucléation et d'élongation radiale des fibres amyloïdes autour du « nucléi » (Rogers, Krebs, Bromley, van der Linden, & Donald, 2006).

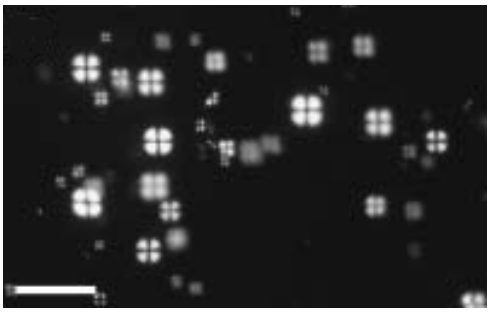

Figure 7. Observation sous lumière polarisée de sphérulites d'insuline bovine. La barre d'échelle est de 100 μm.

3.2.3. Structures sphériques

Les protéines sont susceptibles de s'assembler en particules sphériques. La formation de ce type de structure peut s'effectuer dans des conditions physico-chimiques multiples et variées. Les facteurs physico-chimiques évoqués ci-dessus interviennent dans la modulation et la formation de ces structures supramoléculaires.

Lors du traitement thermique à un pH voisin de leur point isoélectrique ou en présence d'une force ionique élevée, les protéines globulaires (la sérum albumine bovine, la β-lactoglobuline bovine, le lysozyme de blanc d'œuf de poule, l'insuline bovine, etc) s'assemblent pour former des particules sphériques irréversibles constituant des gels particulaires (Figure 8) (Bromley, Krebs, & Donald, 2005; Bromley, Krebs, & Donald, 2006; Krebs, Devlin, & Donald, 2007). Ces structures supramoléculaires se forment lors de la

dénaturation partielle des protéines et de l'exposition de groupements hydrophobes au solvant qui représentent l'élément moteur de leur assemblage en particules sphériques. La morphologie sphérique de ces structures supramoléculaires est due à l'absence de répulsion électrostatique au point isoélectrique des protéines ou en présence d'une force ionique élevée permettant de masquer les charges des protéines.

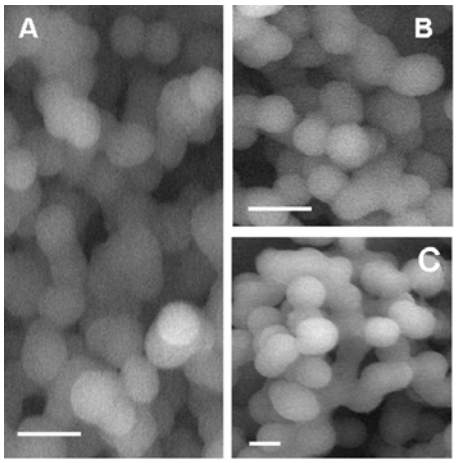

Figure 8. Observation par microscopie à balayage environnementale de particules sphériques résultant de l'assemblage de différentes protéines à leur point isoélectrique lors de traitement thermique (90°C) en présence de NaCl (0,1 M) : β-lactoglobuline (A), sérum albumine bovine (B) et lysozyme de blanc d'œuf de poule (C) (Krebs et al., 2007). Les barres d'échelle sont de 1 µm.

Dans le cas de protéines constituées majoritairement de domaines hydrophobes comme la tropoélastine, la température permet également de moduler son assemblage en particules sphériques. Clarke et al. ont montré que pour des températures inférieures à 35°C la tropoélastine reste à l'état monomérique en solution, alors qu'elle s'assemble en particules sphériques de diamètre d'environ 2 à 6 µm via des interactions hydrophobes pour des températures supérieures à 35°C (Figure 9) (Clarke et al., 2006). Ces particules sphériques sont supposées être un élément précurseur de la formation des fibres d'élastine. De plus, la formation de ces particules sphériques est réversible, l'abaissement de la température permet la dissociation des particules sphériques en monomères de tropoélastine.

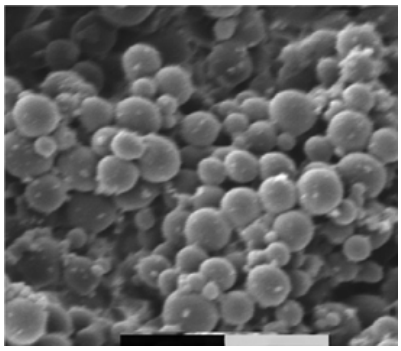

Figure 9. Observation par microscopie électronique à balayage à haute résolution des microsphères de tropoélastine (Clarke et al., 2006). La barre d'échelle est de 10 μm.

La formation de particules sphériques dans le cas d'un mélange mono-protéique est favorisée par des protéines faiblement chargées ou par des conditions physico-chimiques permettant de diminuer la charge des protéines.

3.2.4. Structures de type nanotubes

Les nanotubes sont des assemblages linéaires présentant une cavité centrale au sein de leur structure. Ces assemblages sont notamment utilisés comme vecteur de molécules bioactives d'intérêt. Ce type de structure est fréquemment rencontré lors des assemblages de carbone ou de molécules inorganiques, mais très peu lors des assemblages protéiques. Graveland-Bikker et al. ont montré que l'α-lactalbumine partiellement hydrolysée par une protéase s'assemble pour former des nanotubes (Figure 10) (Graveland-Bikker, Ipsen, Otte, & de Kruif, 2004; Graveland-Bikker & de Kruif, 2006; Ipsen & Otte, 2007). La présence de calcium est indispensable à la formation de ces nanotubes qui s'effectue par la mise en place de ponts salins entre le calcium et des groupements carboxyliques de la protéine (Graveland-Bikker et al., 2004). De plus, la formation et l'orientation de l'assemblage de l'α-lactalbumine en nanotubes sont également modulées par le calcium : un rapport molaire calcium/α-lactalbumine compris entre 1,5 et 4 est nécessaire pour la formation de ces 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.

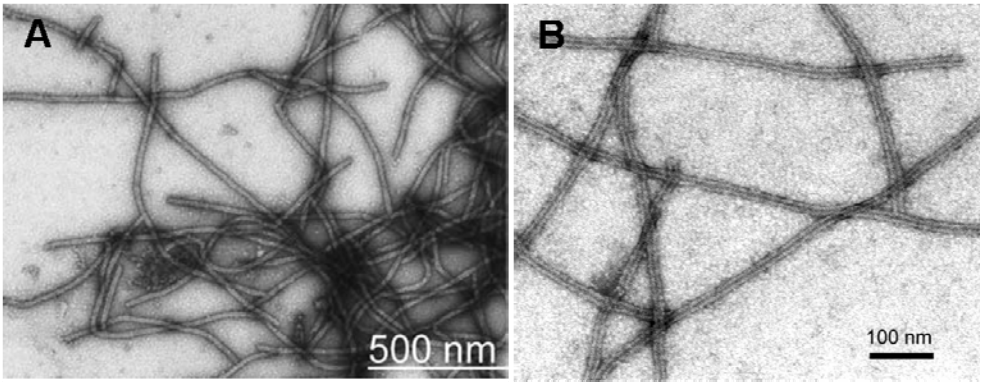

Figure 10. Observation de nanotubes résultant de l'assemblage de l'α-lactalbumine partiellement hydrolysée par microscopie électronique à transmission (Graveland-Bikker et al., 2004; Graveland-Bikker et al., 2006).

Dans un système mono-protéique, différentes structures supramoléculaires (agrégats, fibres, particules sphériques ou encore nanotubes) peuvent être générées. La formation et l'orientation de ces différentes structures supramoléculaires sont modulées par les conditions physico-chimiques du milieu, et même inhibées, dans certains cas, par la présence d'un second partenaire aux propriétés physico-chimiques différentes. La figure 11 illustre les différentes structures supramoléculaires qui peuvent être obtenues à partir d'une même protéine, telle l'α-lactalbumine, selon les conditions physico-chimiques du milieu.

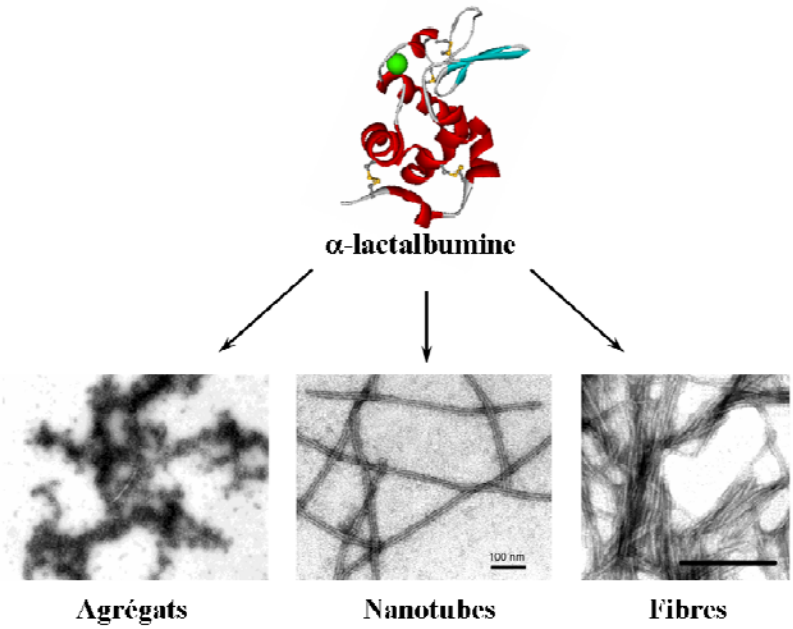

Figure 11. Structures supramoléculaires résultant de l'assemblage de l'α-lactalbumine dans différentes conditions physico-chimiques.

3.3. Assemblages impliquant au moins deux protéines

Les mécanismes d'assemblage protéique et l'effet des différents paramètres phyisco-chimiques sont généralement étudiés dans le cas de mélange mono-protéique. Pour des mélanges protéiques constitués d'au moins deux protéines, la formation de structures supramoléculaires et la caractérisation de mécanismes d'assemblage se complexifient du fait des propriétés physico-chimiques différentes de chacun des partenaires inclus dans l'assemblage. Cependant, les études d'assemblages protéiques dans le cas d'un mélange binaire tendent à se multiplier durant ces dernières années.

Parmi les études relatant la formation de structures supramoléculaires dans le cas de mélanges protéiques binaires, plusieurs d'entre-elles font état de l'assemblage entre deux protéines conduisant à la formation de particules sphériques. La formation de ces particules sphériques a été mise en évidence pour plusieurs couples de protéines : ovalbumine/ovotransferrine (Hu, Yu, & Yao, 2007), β-caséine/lysozyme (Pan, Yu, Yao, & Shao, 2007) et ovalbumine/lysozyme (Yu, Yao, Jiang, & Zhang, 2006). Dans ces trois mélanges protéiques binaires, les particules sphériques sont formées selon le protocole suivant. Les protéines sont tout d'abord mélangées dans des conditions physico-chimiques de pH et de force ionique autorisant leur interaction et la formation de complexes via des interactions électrostatiques. Puis, les solutions contenant les complexes protéiques sont traitées thermiquement (T = 80°C) induisant des modifications conformationnelles des protéines, notamment des protéines globulaires. Les modifications conformationnelles engendrées au niveau des protéines conduisent à la formation et la stabilisation de particules sphériques de quelques centaines de nanomètre (Figure 12) via d'autre type d'interactions (associations hydrophobes, ponts disulfures et liaisons hydrogènes). La distribution des protéines au sein des particules sphériques est modulée par le pH de la solution.

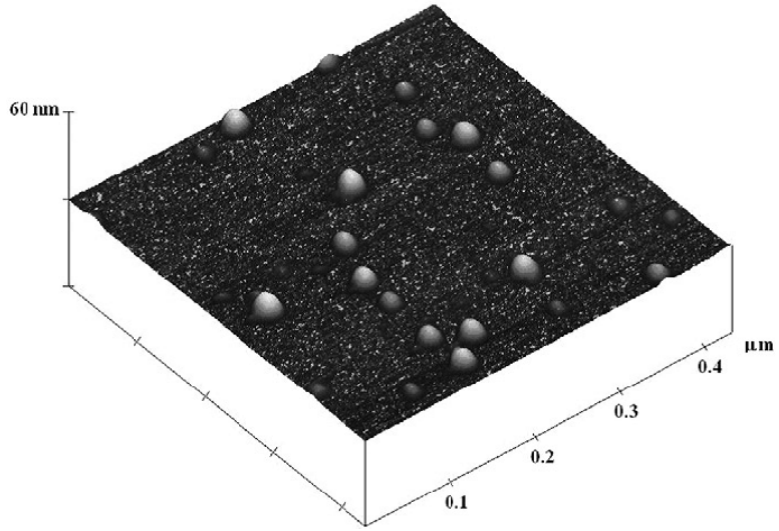

Figure 12. Observation de particules sphériques résultant de l'assemblage entre la β-caséine et le lysozyme par microscopie de force atomique (Pan et al., 2007).

Biesheuvel et al. ont montré dans leurs études l'importance des propriétés de surface des protéines pour leur interaction et assemblage en structures supramoléculaires dans le cas d'un mélange protéique binaire. Pour cela, ils ont étudiés l'assemblage entre le lysozyme et le lysozyme succinylé, deux protéines de charge globale opposée, dans des conditions physico-chimiques selon lesquelles les conformations des protéines ne sont pas affectées. En menant des études expérimentales et de modélisation, ils ont montré que l'assemblage entre ces deux protéines était modulé par différents facteurs physico-chimiques comme le pH, la force ionique, le rapport molaire de ces deux protéines ou encore la température (Biesheuvel, Lindhoud, de Vries, & Cohen Stuart, 2006; Biesheuvel, Lindhoud, Cohen Stuart, & de Vries, 2006). A titre d'exemple, l'assemblage entre ces deux protéines diminue avec l'augmentation de la force ionique et est même inhibé pour des pH où les deux protéines ont des charges globales de même signe. Dans ce système protéique, les interactions électrostatiques servent de moteur à l'interaction et l'assemblage protéique.

Dans une étude similaire, Howell et al. ont aussi montré la modulation de l'interaction et de l'assemblage protéique lors du mélange entre deux protéines globulaires de charge opposée (Howell, Yeboah, & Lewis, 1995). Les assemblages entre le lysozyme et la β-lactoglobuline, mais également entre le lysozyme et l'α-lactalbumine, sont modulés par plusieurs paramètres physico-chimiques tels que le rapport molaire protéique, le pH et la force ionique de la solution ce qui laisse suggérer la prédominance d'interactions électrostatiques dans le processus d'assemblage.

4. L'α-Lactalbumine et le Lysozyme

Dans ce projet, nous avons choisi d'étudier l'interaction et l'assemblage supramoléculaire entre deux protéines globulaires issues du blanc d'œuf de poule et du lactosérum bovin : le lysozyme (LYS) et l'α-lactalbumine (α-LA). Les protéines issues de ces deux liquides biologiques alimentaires sont majoritairement des protéines globulaires acides et de concentrations variables allant de quelques microgrammes à plusieurs grammes par litre.

Le lysozyme et l'α-lactalbumine ont été très largement caractérisés et font toujours l'objet de nombreuses études. Elles sont notamment utilisées par les biologistes – biochimistes comme « protéine modèle » pour étudier les mécanismes de repliement des protéines *in vitro*. Le lysozyme et l'α-lactalbumine présentent une certaine identité de séquence et une forte homologie de structure qui mettent en avant l'évolution de ces protéines à partir d'un même gène ancestral (McKenzie & White, 1991; Acharya, Stuart, Phillips, McKenzie, & Teahan, 1994; Qasba & Kumar, 1997).

4.1. Origine du lysozyme et de l'α-lactalbumine

Le lysozyme est une protéine ubiquitaire rencontrée dans de nombreux liquides physiologiques (lait, sang, urine, etc.), alors que l'α-lactalbumine, localisée au niveau des glandes mammaires, est une protéine soluble du lait.

Le lysozyme utilisé dans cette étude est issu du blanc d'œuf de poule. Outre l'eau (88 % du poids total), les protéines constituent le principal composant du blanc d'œuf. Elles représentent la majorité de la matière sèche du blanc d'œuf avec un rapport « matière azotée/extrait sec » supérieur à 90 % (Lechevalier, Nau, & Anton, 2007). En termes de quantité, le lysozyme représente un des principaux constituants protéiques du blanc d'œuf avec une concentration de 3,6 $g.L^{-1}$ (Tableau 1).

Protéines	Concentration massique ($g.L^{-1}$)	Masse moléculaire ($kg.mol^{-1}$)	pI
Ovalbumine	57	45	4,5
Ovotransferrine	13	76	6,0
Ovomucoïde	11,5	28	4,1
Lysozyme	3,6	14,3	10,7
Ovomucine	3,7	230 – 8300	4,5 – 5

Tableau 1. Principales protéines globulaires constituant le blanc d'œuf de poule d'après Stevens (Stevens, 1991).

L'α-lactalbumine utilisée dans cette étude est issue du lait bovin. Le lait est composé de deux fractions protéiques distinctes qui peuvent être séparées selon leurs propriétés de précipitation à pH 4,6. La fraction protéique qui précipite à ce pH contient les caséines ; alors que la fraction protéique soluble à ce pH, dont fait partie l'α-LA, constitue les protéines du lactosérum.

Les protéines du lactosérum constituent environ 20 % des protéines totales du lait de ruminants ce qui représente une concentration protéique d'environ 6 $g.L^{-1}$. Ces protéines peuvent être divisées en deux fractions protéiques de part leur quantité respective. La fraction protéique « majeure » est composée de la β-lactoglobuline et de l'α-lactalbumine qui représentent 60 à 90% des protéines du lactosérum. Alors que la deuxième fraction protéique dite « mineure » est constituée notamment par les immunoglobulines, la sérum albumine bovine, la lactoferrine ou encore la lactopéroxydase (Tableau 2).

Protéines	Concentration massique ($g.L^{-1}$)	Masse moléculaire ($kg.mol^{-1}$)	pI
β-lactoglobuline	2 – 4	18,3	5,2
α-lactalbumine	1,5	14,2	4,8
Immunoglobulines	0,4 – 1,0	160	5,5 – 8,3
Sérum albumine bovine	0,1 – 0,4	66	4.8
Lactoferrine	0,2	75	8,5

Tableau 2. Principales protéines globulaires constituant le lactosérum bovin.

4.2. Les fonctionnalités du lysozyme et de l'α-lactalbumine

Le lysozyme et l'α-lactalbumine présentent des fonctionnalités opposées : le LYS intervient dans la lyse de sucres alors que l'α-LA est impliquée dans leur synthèse.

Le lysozyme est un enzyme doté d'une activité antibactérienne : il provoque la lyse des bactéries à coloration $Gram^+$ par hydrolyse de la liaison β(1→4) entre l'acide *N*-acétyl-muramique et la *N*-acétyl-glucosamine des polysaccharides de la paroi bactérienne (McKenzie et al., 1991).

L'α-lactalbumine est impliquée dans la régulation de la synthèse du lactose en interagissant et en formant un complexe avec la galactosyltransférase (McKenzie et al., 1991). La galactosyltransférase catalyse la synthèse du lactose à partir du galactose et du glucose libre. Cependant, l'affinité de la galactosyltransférase pour le glucose libre est faible. Cette affinité est accrue lors de l'interaction de la galactosyltransférase avec l'α-LA (Brew, 2003). Par conséquent, la formation du complexe entre l'α-LA et la galactosyltransférase permet la synthèse de lactose dans des conditions physiologiques de concentration en glucose.

En plus de sa fonctionnalité majeure dans la synthèse du lactose, il a également été montré et étudié durant ces dix dernières années l'implication de l'α-LA dans la mort des cellules tumorales par la voie apoptotique. L'α-LA exerce cette fonction quand elle est dépourvue de son calcium et qu'elle adopte une structure de type « molten globule ». Dans ces conditions, elle interagit et forme un complexe avec l'acide oléique dénommé BAMLET (Bovine α-lactalbumin Made Lethal to Tumor Cells) si l'α-LA est issue du lait bovin ou encore HAMLET (Human α-lactalbumin Made Lethal to Tumor Cells) si l'α-LA est issue du lait humain (Svensson et al., 1999; Mok, Pettersson, Orrenius, & Svanborg, 2007).

Au-delà de leur propre fonctionnalité, l'α-lactalbumine et le lysozyme présentent la caractéristique d'être des sources d'acides aminés essentiels tels que les résidus soufrés (cystéine et méthionine) et les résidus aromatiques (tryptophane, tyrosine et phénylalanine). Ces deux protéines sont donc pourvues d'une excellente valeur nutritionnelle.

4.3. La séquence primaire du lysozyme et de l'α-lactalbumine

L'α-lactalbumine et le lysozyme sont des protéines globulaires de faible poids moléculaire constituées respectivement de 123 et 129 acides aminés (Figure 13 et Tableau 3). Elles contiennent toutes les deux un nombre conséquent d'acides aminés ionisables : environ 27 % pour l'α-LA et 20 % pour le LYS (Figure 13 et Tableau 3). Ces deux protéines ont des points isoélectriques (pI) opposés : le LYS et l'α-LA sont respectivement des protéines basique et acide avec des points isoélectriques de 10,7 et 4,8. Le LYS et l'α-LA possèdent toutes les deux 8 résidus cystéines qui forment 4 ponts disulfures intramoléculaires (Figure 13 et Tableau 3).

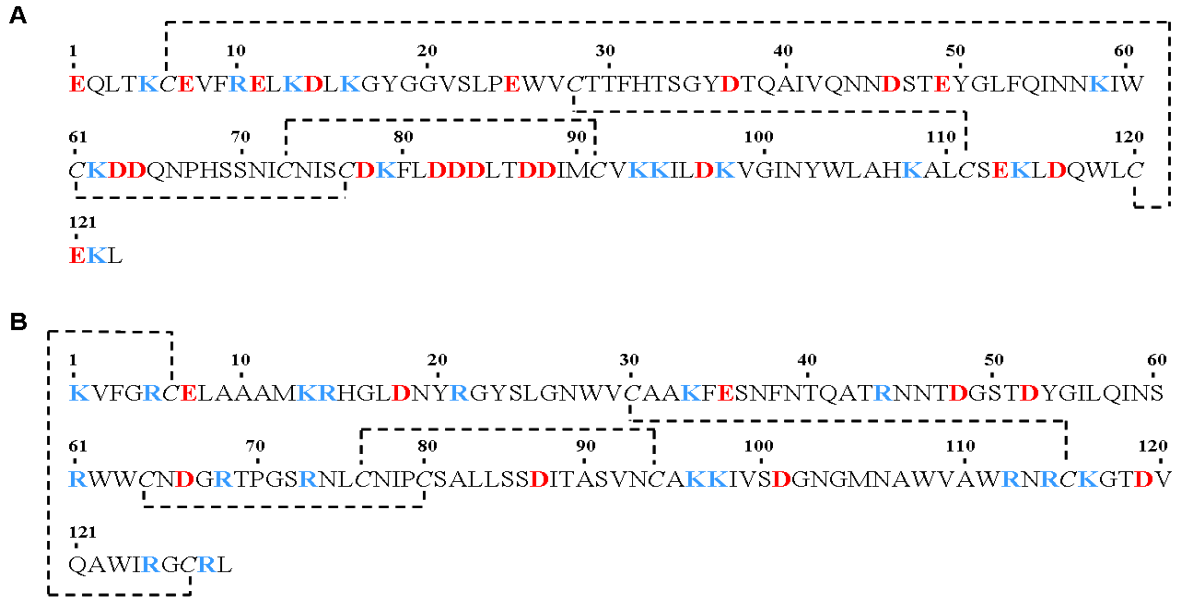

Figure 13. Structures primaires de l'α-lactalbumine (A) et du lysozyme (B). Les acides aminés colorés en rouge et en bleu correspondent respectivement aux acides aminés acides et basiques. Les pointillés représentent les ponts disulfures.

Caractéristiques	α-lactalbumine	lysozyme
Nombre d'acides aminés	123	129
Poids moléculaire (Da)	14186	14300
Rayon hydrodynamique (Å)	19	19
Point isoélectrique	4,8	10,7
Nombre de résidus cystéine	8	8
Nombre de ponts disulfures	4	4
Nombre d'acides aminés acides	20	9
Nombre d'acides aminés basiques	12	16

Tableau 3. Principales caractéristiques de l'α-lactalbumine et du lysozyme.

4.4. Les structures secondaire et tertiaire du lysozyme et de l'α-lactalbumine

Le lysozyme et l'α-lactalbumine présentent des homologies structurales. Au niveau de leur structure secondaire, ces deux protéines sont constituées majoritairement d'hélices α. Elles représentent respectivement 39 et 44 % des structures secondaires du LYS et de l'α-LA (Tableau 4).

Structures secondaires	α-lactalbumine	lysozyme
Hélices α	44 % (54 acides aminés)	39 % (51 acides aminés)
Feuillets β	11 % (14 acides aminés)	11 % (14 acides aminés)

Tableau 4. Structures secondaires de l'α-lactalbumine, à partir de la structure cristallographique 1F6S (Chrysina, Brew, & Acharya, 2000) et du lysozyme, à partir de la structure cristallographique 6LYZ (Diamond, 1974).

Les structures tridimensionnelles du LYS et de l'α-LA s'organisent en deux domaines séparés par un « sillon » : un de ces deux domaines, dénommé domaine α, est constitué majoritairement d'hélice α (Figure 14), alors que le second domaine, dénommé domaine β, se

compose d'une hélice 3_{10} et d'un feuillets β antiparallèle constitué de trois brins (Figure 14) (McKenzie et al., 1991; Pike, Brew, & Acharya, 1996; Greene et al., 1999).

La structure tertiaire de ces deux protéines est stabilisée par quatre ponts disulfures. Trois de ces ponts disulfures impliquant les résidus Cys_6-Cys_{120}, Cys_{28}-Cys_{111}, Cys_{61}-Cys_{77} pour l'α-LA et les résidus Cys_6-Cys_{127}, Cys_{30}-Cys_{115}, Cys_{64}-Cys_{80} pour le LYS sont des ponts disulfures intradomaines : les deux premiers se situent au niveau du domaine α et le troisième au niveau du domaine β. Le quatrième pont disulfure impliquant les résidus Cys_{73}-Cys_{91} pour l'α-LA et Cys_{76}-Cys_{94} pour le LYS est un pont disulfure entre les domaines α et β (McKenzie et al., 1991; Permyakov & Berliner, 2000).

La température de dénaturation du LYS est de l'ordre de 74°C (Shih, Holland, & Kirsch, 1995a; Shih & Kirsch, 1995b; Ueda, Masumoto, Ishibashi, So, & Imoto, 2000), alors que celle de l'α-LA est de l'ordre de 64°C dans des conditions de pH et de force ionique physiologiques (Griko & Remeta, 1999; Hendrix, Griko, & Privalov, 2000).

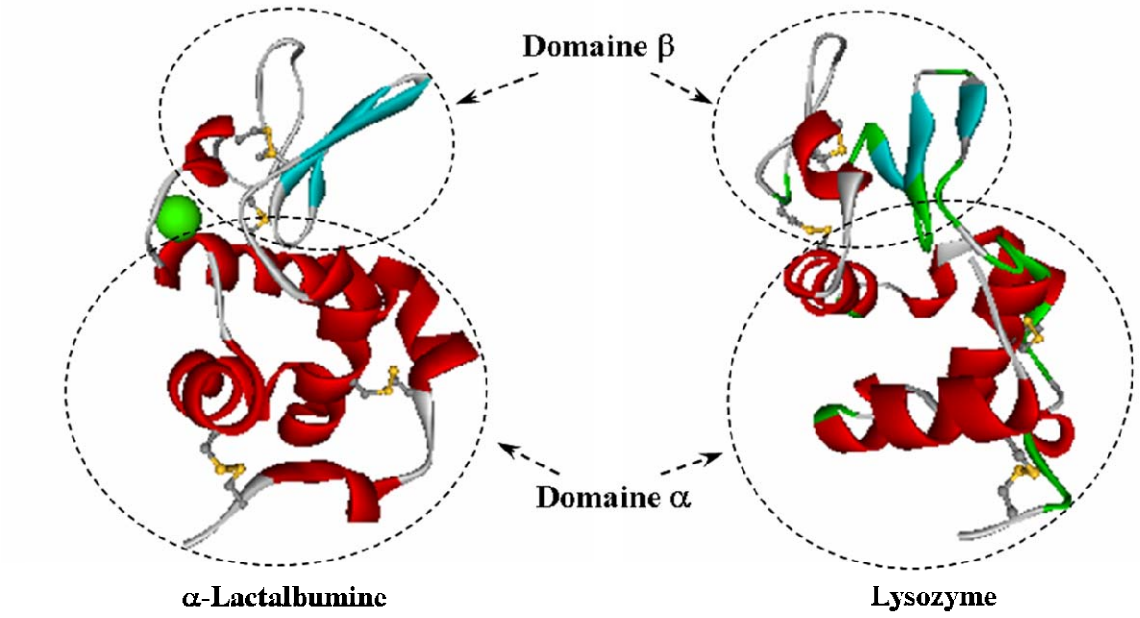

Figure 14. Structures secondaire et tertiaire de l'α-lactalbumine (pdb : 1F6S) et du lysozyme (pdb : 6 LYZ). Le calcium de l'α-lactalbumine est représenté par une « sphère » verte au sein de la structure.

4.5. L'interaction du lysozyme et de l'α-lactalbumine avec les minéraux

L'α-LA est une métalloprotéine, elle possède un site spécifique de fixation pour un atome de calcium entre ces deux domaines. La forme de l'α-LA chargée en calcium est appelée holo α-LA. Au niveau de son site de fixation, le calcium est coordiné par les groupements carboxyles des chaînes latérales des résidus Asp82, Asp87 et Asp88, les groupements carbonyles des résidus Lys79 et Asp84 et par deux atomes d'oxygène de molécule d'eau (Pike et al., 1996; Mizuguchi, Nara, Kawano, & Nitta, 1997; Anderson, Brooks, & Berliner, 1997; Permyakov et al., 2000). La présence de calcium sur son site de fixation contribue aussi à la stabilité de la structure tridimensionnelle de l'holo α-LA (France & Grossman, 2000).

L'α-LA déplétée en calcium est appelée apo α-LA. Le calcium peut-être éliminé de la protéine en ajustant la solution à pH acide, en utilisant des agents dénaturants (urée, chlorure de guanidium) à des concentrations modérées ou encore en utilisant des agents chélatants (EDTA, EGTA…). L'élimination du calcium s'accompagne de modifications de la conformation de la protéine. Ces modifications structurales sont notamment engendrées par les répulsions électrostatiques entre les acides aminés localisés au niveau du site de fixation du calcium (Griko et al., 1999; Forge et al., 1999). Selon les conditions physico-chimiques du milieu, l'apo α-LA peut adopter différents états conformationnels appelés « molten globule », états intermédiaires entre les états natif et dénaturé de la protéine. Le « molten globule » est caractérisé par (i) une structure secondaire proche de celle de la protéine native et (ii) l'absence de structure tertiaire (Kuwajima, 1996). En l'absence de calcium, la stabilité de l'α-LA est réduite (Kuwajima, Harushima, & Sugai, 1986; Veprintsev et al., 1997) ; rappelons que la stabilité de l'apo α-LA et sa température de dénaturation dépendent fortement des conditions physico-chimiques du milieu (force ionique, pH, etc) (Pfeil & Sadowski, 1985). L'augmentation de la force ionique améliore la stabilité thermique de l'apo α-LA : les ions ajoutés masquent les charges portées par les acides aminés localisés au niveau du site de fixation du calcium et donc réduisent les répulsions électrostatiques (Hiraoka & Sugai, 1985; Griko et al., 1999).

En outre, l'α-LA est capable de fixer d'autres cations tels que le zinc, le manganèse mais avec une plus faible affinité comparativement au calcium (Veprintsev, Permyakov, Kalinichenko, & Berliner, 1996).

Le lysozyme du blanc d'œuf de poule ne possède pas de site spécifique pour la fixation de cations au sein de sa structure tridimensionnelle. Cependant, le lysozyme issu d'autres origines telles que le lait de jument ou encore le blanc d'œuf de pigeon possède un site spécifique pour la fixation d'un atome de calcium similaire à celui de l'α-LA (McKenzie et al., 1991; Acharya et al., 1994).

4.6. Les potentiels électrostatiques de surface du lysozyme et de l'α-lactalbumine

Comme nous l'avons observé précédemment, le lysozyme et l'α-lactalbumine sont des protéines constituées de nombreux acides aminés présentant des groupements ionisables (20 et 27 % pour le LYS et l'α-LA, respectivement) dont certains sont localisés en surface de la protéine. Les charges portées par les résidus exposés en surface des protéines varient selon les conditions physico-chimiques du milieu et induisent un potentiel électrostatique de surface à la protéine. La figure 15 présente les potentiels électrostatiques de surface de l'α-LA (les formes holo et apo) et du LYS à pH 7,5 et pour une force ionique de 39 mM, calculé par le programme Delphi inclut dans le logiciel Accelrys Molecular Graphics System. Quelle que soit la protéine étudiée, l'α-LA (les formes holo et apo) et le LYS, les charges sont distribuées sur l'ensemble de la surface protéique et séparées par des zones de faible (voir nulle) densité de charge. Au niveau de certaines zones, les charges sont disposées et regroupées en « patchs ». L'α-LA (les formes holo et apo) présente une prédominance de charge négative (de couleur rouge sur la figure 15) à sa surface, alors que les charges du LYS sont majoritairement positives (de couleur bleu sur la figure 15).

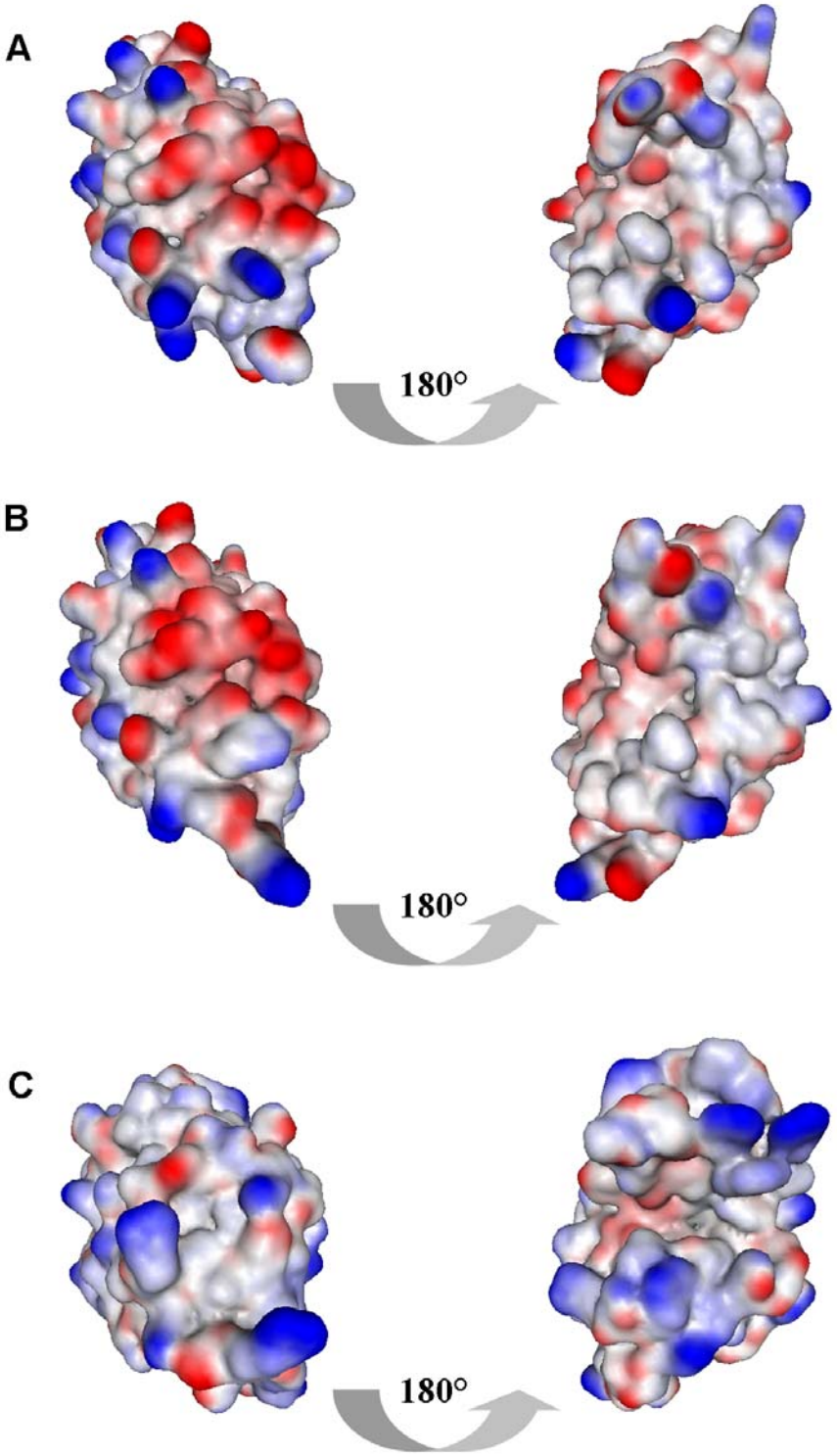

Figure 15. Potentiel électrostatique de surface de l'holo α-lactalbumine (A), de l'apo α-lactalbumine (B) et du lysozyme (C) calculé à pH 7,5 pour une force ionique de 39 mM par le programme Delphi inclut dans le logiciel Accelrys Molecular Graphics System.

Matériels et Méthodes

1. Matériels d'étude

1.1. Protéines

Le LYS utilisé dans ces études provenait de la société Ovonor (Annezin les Betune, France). Après séparation par chromatographie d'échange de cations, il était purifié à partir du blanc d'œuf par cycles de cristallisation à pH basique, et solubilisation à pH acide. La poudre contenait 95 % de LYS et 3 % d'ions chlorures. Elle était utilisée sans traitement supplémentaire.

L'holo α-LA était purifiée à partir de lactosérum bovin selon la méthode développée par Caussin et al. (Caussin, Famelart, Maubois, & Bouhallab, 2003). L'apo α-LA était préparée en éliminant le calcium de l'holo α-LA par dialyse contre de l'eau distillée à pH acide (pH 3,0) pendant 48 h à 4°C en utilisant des membranes de dialyse de seuil de coupure 6-8000 Da (Spectrum Laboratories, Gardena, CA, USA). Après dialyse, la solution d'apo α-LA était ajustée à pH 7,0 avec une solution de NaOH à 1M, puis lyophilisée. La poudre d'apo α-LA contenait moins de 2 % de calcium.

1.2. Préparation des solutions protéiques

Les solutions de LYS et d'α-LA (les formes holo et apo) étaient préparées en solubilisant les poudres dans le tampon d'étude. La majorité des études était réalisée dans un tampon 30 mM Tris/HCl (pH 7,5), 15 mM NaCl doté d'une force ionique de 39 mM. Des études supplémentaires étaient effectuées dans des tampons 5-30 mM Tris/HCl préparés avec ou sans chlorure de sodium dont la force ionique s'échelonnait de 4 à 224 mM. Les protéines étaient également préparées dans deux autres tampons de nature différente dont la force ionique était fixée à 39 mM : (i) un tampon 11 mM phosphate (pH 7,5) contenant 15 mM NaCl et (ii) un tampon 100 mM imidazole (pH 7,5) contenant 15 mM NaCl.

Les solutions protéiques étaient ensuite filtrées sur des membranes de 0,2 µm. Les concentrations protéiques étaient déterminées par mesure de l'absorbance à 280 nm en utilisant respectivement un coefficient d'extinction molaire de 28514 et 37752 $M^{-1}.cm^{-1}$ pour l'α-LA et le LYS.

1.3. Polymères de synthèse

L'acide poly-L-glutamique provenait de chez Sigma Aldrich (Schnelldorf, Allemagne). Nous avons utilisé des polymères de synthèse présentant deux degrés de polymérisation dans ce travail (Tableau 5).

Polymères	Degré de polymérisation*	Masse molaire*
Acide poly-L-glutamique (PG28)	28	4300
Acide poly-L-glutamique (PG60)	60	8900

Tableau 5. Degré de polymérisation et masse molaire des différents polymères de synthèse.
* déterminé par diffusion de la lumière multi-angle (MALLS).

Les polymères de synthèse sont constitués d'entités moléculaires de taille variable du fait de la difficulté à les séparer. Ainsi, le degré de polymérisation indiqué correspond à un degré de polymérisation moyen.

Des solutions stock à une concentration de 12,5 $g.l^{-1}$ de chacun des polymères étaient préparées dans du tampon 30 mM Tris/HCl (pH 7,5), 15 mM NaCl et aliquotées.

2. Méthodes

2.1. Calorimétrie de titration isotherme (ITC)

L'ITC permet de déterminer les paramètres thermodynamiques régissant l'interaction entre deux molécules. Elle est utilisée pour étudier l'interaction entre différents types de molécules comme par exemple : protéine – protéine, protéine – ligand, protéine – acide nucléique, acide nucléique – acide nucléique, acide nucléique – ligand. L'ITC permet d'étudier les interactions moléculaires ayant une contribution enthalpique et présentant des constantes d'affinités s'échelonnant du micromolaire au nanomolaire ($10^3 < K_A < 10^9$) dans une large gamme de température (2-80°C).

2.1.1. Principe

Son principe réside dans la mesure de chaleur échangée lors de la formation d'un complexe entre deux molécules à température constante. En une seule mesure, la constante d'association (K_A), la stœchiométrie (n) ainsi que les variations d'enthalpie (ΔH) et d'entropie (ΔS) de l'interaction sont déterminées. En réalisant des mesures à différentes températures, la chaleur spécifique (ΔCp) de l'interaction peut être calculée.

L'appareil se compose d'une seringue d'injection motorisée dans laquelle est chargé le ligand (L) et de deux cellules disposées dans une enceinte adiabatique permettant d'abolir tout échange thermique avec l'environnement extérieur (Figure 16). Une de ces cellules correspondant à la cellule référence est remplie avec du tampon, tandis que la seconde correspondant à la cellule échantillon est remplie avec la macromolécule (M) en solution dans le même tampon.

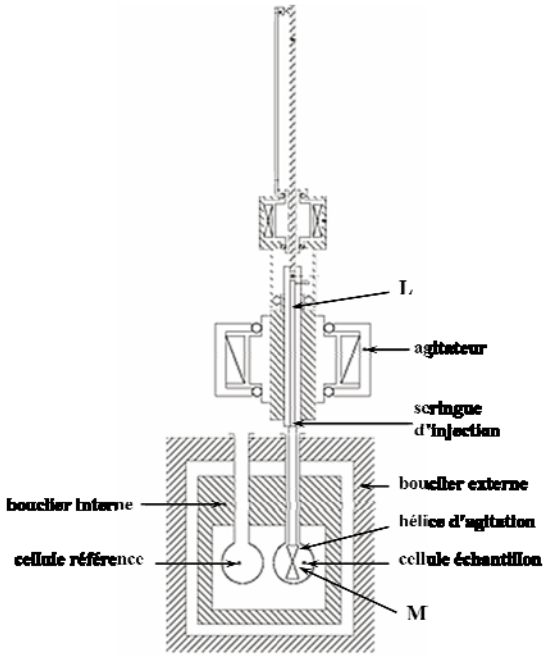

Figure 16. Schéma du microcalorimètre et de la seringue d'injection.

L'appareil est constitué de deux dispositifs thermoélectriques mesurant respectivement la différence de chaleur (ΔT1) entre la cellule référence et la cellule échantillon, et la différence de chaleur (ΔT2) entre la chambre adiabatique régulée à la température expérimentale et les cellules contenues dans cette chambre (Figure 17). Ces deux dispositifs thermoélectriques permettent de maintenir les différences de chaleur (ΔT1 et ΔT2) constantes au cours de la mesure.

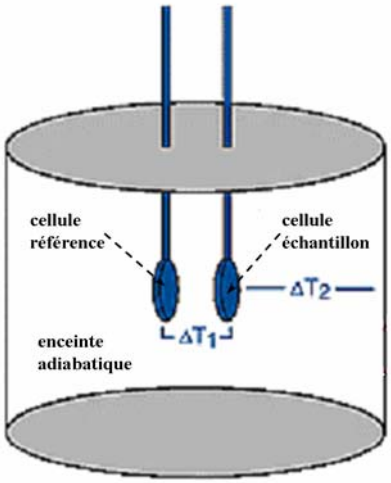

Figure 17. Schéma des deux dispositifs thermoélectriques présents au sein de la chambre adiabatique du microcalorimètre.

Lors de l'injection d'un petit volume (µl) de ligand dans la cellule échantillon, le ligand (L) et la macromolécule (M) interagissent pour former un complexe (ML_n).

$$M + nL \xleftrightarrow{K_A} ML_n$$

avec K_A la constante d'association du complexe et n le nombre de site de fixation pour le ligand (L) sur la macromolécule (M).

La formation de ce complexe conduit à un échange thermique (libération ou consommation de chaleur) qui est mesuré par rapport à la cellule référence. La chaleur libérée ou consommée est spécifique de l'interaction et directement proportionnelle à la quantité de complexe formé. Cette chaleur échangée au cours de l'interaction est déterminée à partir de la puissance électrique à fournir pour maintenir strictement constante la différence de chaleur ($\Delta T1$) entre la cellule référence et la cellule échantillon. Pour chaque injection de ligand, la chaleur échangée au cours de l'interaction est calculée et se traduit par un pic sur le thermogramme (Figure 18A). Les différents pics présents sur le thermogramme sont ensuite intégrés en fonction du temps pour donner accès à la chaleur apparente échangée, $\Delta q_{i,app}$, entre l'addition i et i - 1 (Figure 18B) :

$$\Delta q_{i,app} = q_i - q_{i-1}$$

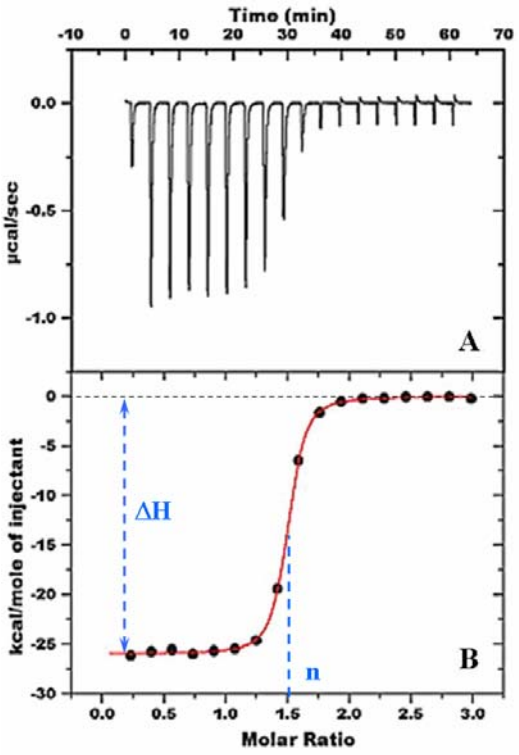

Figure 18. Exemple de profil ITC. Les données brutes sont représentées dans la figure 18A, chaque pic correspond à l'injection de ligand dans la cellule échantillon contenant la macromolécule. La figure 18B représente l'intégration de l'aire contenue sous chaque pic en fonction du rapport molaire (Ligand/Macromolécule).

L'intégration des pics est représentée en fonction du rapport molaire ligand/macromolécule (Figure 18B). Cette représentation permet de générer l'isotherme de liaison et ainsi de déterminer directement la constante d'association (K_A), la stœchiométrie (n) et la variation d'enthalpie (ΔH) de l'interaction. La variation d'énergie libre (ΔG) du système est calculée directement en utilisant la constante d'association (K_A) et la relation suivante :

$$\Delta G = -RT \ln K_A$$

avec R, la constante des gaz parfaits ($J.mol^{-1}.K^{-1}$) et T la température (K).

Connaissant la variation d'enthalpie (ΔH) et la variation d'énergie libre (ΔG) du système, la variation d'entropie (ΔS) est calculée en utilisant la relation ci-dessous :

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

2.1.2. Mode opératoire

Les études étaient effectuées avec un microcalorimètre VP-ITC (Microcal, Northampton, MA). Les échantillons étaient préalablement dégazés sous vide et pré-équilibrés aux températures d'étude avant leur chargement dans la seringue et les cellules échantillon et référence. Les mesures étaient réalisées pour des températures s'échelonnant de 5 à 45°C avec l'homogénéisation de la solution contenue dans la cellule échantillon par la seringue d'injection à une vitesse de 300 rpm. Dans toutes les expériences, l'α-lactalbumine était chargée dans la cellule référence et était titrée par l'injection d'une solution concentrée de lysozyme. Les données étaient analysées en utilisant le logiciel Microcal Origin (version 7.0).

2.2. Anisotropie de fluorescence

Les mesures d'anisotropie de fluorescence permettent d'étudier des réactions d'association entre deux molécules afin d'obtenir des informations sur la constante d'association, l'état d'oligomérisation, la stoechiométrie et la morphologie du complexe formé.

2.2.1. Principe

L'anisotropie de fluorescence mesure le degré de liberté (mouvement rotationnel) d'une molécule liée à un fluorophore. Elle est reliée au temps de corrélation de rotation du fluorophore (τ_c) fixé à la molécule. Le fluorophore, excité avec une lumière polarisée linéairement selon l'axe z, émet une lumière polarisée dans différentes directions. L'anisotropie mesurée est définie comme le rapport entre la différence d'intensité de fluorescence émise parallèlement $(I_{//})$ au vecteur électrique du faisceau laser d'excitation et celle émise perpendiculairement $(I_{\perp})$ et l'intensité totale de fluorescence (I_{tot}) (Figure 19). L'anisotropie (A) s'exprime selon la relation ci-dessous :

$$A = \frac{I_{//} - I_{\perp}}{I_{tot}}$$

avec $I_{tot} = I_{//} + 2 \times I_{\perp}$

A peut également être exprimée en fonction du temps de corrélation de rotation du fluorophore (τ_c), de l'anisotropie de fluorescence limite du fluorophore (A_0) et du temps de vie de fluorescence du fluorophore (τ_F) selon la relation suivante :

$$A = \frac{A_0}{1 + \tau_F / \tau_c}$$

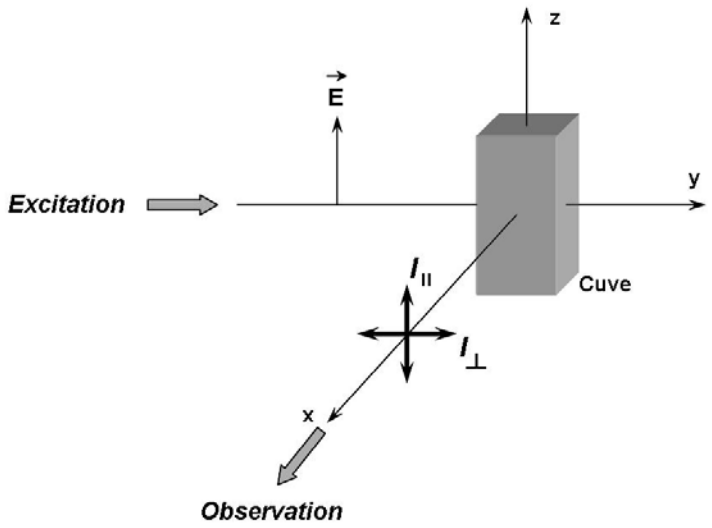

Figure 19. Schéma du principe de mesure de l'anisotropie de fluorescence.

2.2.2. Mode opératoire

Le LYS, l'holo et l'apo α-LA étaient marqués covalemment par le chlorure de dansyl (DNSCl). Le LYS, l'holo et l'apo α-LA étaient solubilisés dans du tampon 30 mM Tris/HCl (pH 9,0), 15 mM NaCl à une concentration de $1,3\times10^{-4}$ mol.L^{-1} et centrifugés à 18000 g pendant 15 minutes à 20°C. Le chlorure de dansyl était dissout dans du diméthylformamide à une concentration de $2,4\times10^{-2}$ mol.L^{-1} avant ajout (25 µl) aux solutions protéiques (800 µl). Le pontage covalent était effectué pendant 10 minutes à température ambiante (Figure 20).

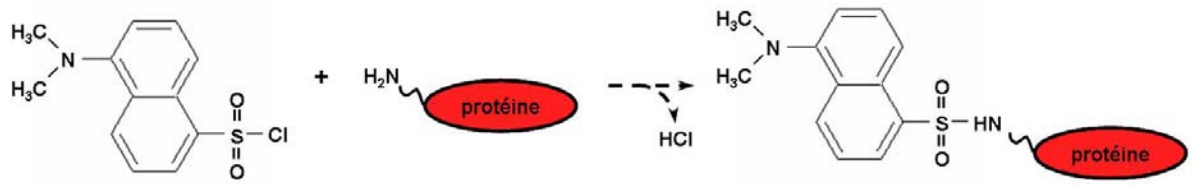

Figure 20. Schéma de la réaction de marquage du LYS, de l'holo et apo α-LA par le chlorure de dansyl.

Le chlorure de dansyl non lié aux protéines était éliminé par gel filtration sur colonne séphadex G25 (hauteur : 30 cm, diamètre : 1 cm). L'élution était effectuée avec du tampon 30 mM Tris/HCl (pH 7,5), 15 mM NaCl. L'élution sélective des protéines « dansylées » et du chlorure de dansyl libre était suivie en illuminant la colonne à l'aide d'une lampe UV : le dansyl lié à la protéine apparaissait jaune alors que le dansyl libre apparaissait vert après excitation à 365 nm. Les solutions protéiques « dansylées » étaient dialysées contre du tampon 30 mM Tris/HCl (pH 7,5), 15 mM NaCl. Le taux de marquage des protéines était déterminé par mesure de l'absorbance à 280 nm pour les protéines et à 340 nm pour le dansyl en utilisant un coefficient d'extinction molaire de 28514 L.mol^{-1}.cm^{-1} pour l'α-LA, de 37752 L.mol^{-1}.cm^{-1} pour le LYS et de 4500 L.mol^{-1}.cm^{-1} pour le chlorure de dansyl.

L'anisotropie du chlorure de dansyl lié à la protéine était mesurée à l'aide d'un spectrofluorimètre SLM8100 monté en T. Les échantillons étaient excités à 340 nm et les intensités de fluorescence parallèles $(I_{//})$ et perpendiculaires $(I_{\perp})$ émises par le chlorure de dansyl étaient collectées à travers un filtre GG455 (Oriel). La contribution du solvant était soustraite de chaque mesure.

Au cours de ces études, la concentration en protéine marquée par le chlorure de dansyl était maintenue constante à 1×10^{-6} mol.L^{-1}. Cette dernière était titrée par l'ajout de petits

aliquots de protéines non marquées préparées à une concentration de 2×10^{-3} mol.L^{-1} ; les concentrations en protéines non marquées après ajout s'échelonnaient de 2×10^{-8} à 2×10^{-4} mol.L^{-1}.

2.3. Temps de vie de fluorescence

Les mesures de temps de vie de fluorescence sont indispensables à l'analyse et l'interprétation des mesures d'anisotropie de fluorescence. En effet, les mesures d'anisotropie de fluorescence sont directement liées au temps de vie de fluorescence de la sonde qui peut être influencé par les phénomènes d'association et de dissociation des molécules.

Les mesures de temps de vie de fluorescence étaient réalisées sur un spectrofluorimètre FLS 920 (Edinburgh Instruments). Les échantillons étaient disposés dans une cuve en quartz elle-même placée dans une cellule thermostatée à 10°C et 45°C par un bain circulant. Les mesures de temps de vie de fluorescence étaient acquises sur le dansyl lié à l'α-LA (les formes apo et holo) à une concentration de 1×10^{-6} mol.L^{-1}, et sur une solution protéique contenant le dansyl lié à l'α-LA (les formes apo et holo) à une concentration de 1×10^{-6} mol.L^{-1} et le LYS non marqué à une concentration de 1×10^{-4} mol.L^{-1}. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission étaient respectivement de 340 et 470 nm. Les valeurs de temps de vie de fluorescence étaient obtenues par modélisation du profil de déclin de fluorescence du dansyl avec une fonction double exponentielle en utilisant le logiciel d'analyse F900. La qualité de l'ajustement était évaluée par la valeur du χ^2.

2.4. Fluorescence intrinsèque

Les spectres d'émission de fluorescence intrinsèque du LYS, de l'holo et apo α-LA étaient acquis sur un fluorimètre LS 50B (Perkin Elmer). Les mesures étaient réalisées dans une cuve en quartz disposée dans une cellule régulée en température par un bain circulant. Les températures d'étude s'échelonnaient de 10°C à 50°C (par incrément de 5°C) pour le LYS et l'α-LA (formes apo et holo). La longueur d'onde d'excitation des protéines était de 295 nm, celle-ci correspondant à la longueur d'excitation des groupements tryptophane. L'émission de fluorescence des protéines était enregistrée de 305 à 460 nm. Les fentes d'excitation et d'émission étaient fixées à 5 nm et la vitesse de scan était de 50 nm.min^{-1}. Les spectres étaient

acquis pour une concentration protéique de 0,03 g.l^{-1} afin d'obtenir une absorbance à 295 nm inférieure à 0,1.

2.5. Dichroïsme circulaire

Les spectres de dichroïsme circulaire de l'α-LA (formes apo et holo) étaient acquis dans une cuve en quartz de 2 mm d'épaisseur sur un dichrographe Jasco 810 (Jasco France) pour des températures de 10°C et 45°C. Pour ces études, les protéines étaient solubilisées dans un tampon phosphate 10 mM (pH 7,5) contenant 15 mM NaCl. Les spectres en UV proche étaient acquis entre 260 et 320 nm pour une concentration en apo α-LA de 1,48 g.L^{-1}, alors que les spectres en UV lointain étaient acquis entre 190 et 260 nm pour une concentration en apo α-LA de 0,148 g.L^{-1}. La vitesse de scan était de 50 nm.min^{-1}. Le spectre d'un échantillon était une moyenne de deux enregistrements. L'ellipticité molaire $[\theta_\lambda]$ était exprimée par mole d'acides aminés en UV lointain et en UV proche :

$$[\theta]_{mrw,\lambda} = MRW \times \theta_\lambda / 10 \times d \times c$$

avec $MRW = \frac{M_w}{N-1}$

$[\theta]_{mrw,\lambda}$: ellipticité molaire à la longueur d'onde λ (degré.cm^2.dmol^{-1}).

MRW : masse molaire moyenne par acide aminé de la protéine.

M_w : masse molaire de la protéine (Da).

N : nombre d'acides aminés constituant la protéine.

θ_λ : ellipticité mesurée à la longueur d'onde λ (degré).

d : trajet optique (cm).

c : concentration protéique (g.ml^{-1}).

2.6. Microscopie optique à contraste de phase

Un microscope à contraste de phase (Olympus BX51TF) équipé d'un appareil photographique (Olympus DP11) était utilisé pour observer les structures supramoléculaires résultant de l'assemblage entre le LYS et l'apo α-LA. Les échantillons, déposés entre lame et lamelle, étaient immédiatement observés au grossissement ×100 à température ambiante.

2.7. Microscopie confocale à balayage laser (CSLM)

La microscopie confocale à balayage laser permet d'augmenter la résolution des images observées en microscopie optique à contraste de phase en éliminant les photons ne provenant pas du plan focal.

2.7.1. Principe

Un faisceau lumineux monochromatique et cohérent, produit par un laser, est concentré en un point lumineux par un pinhole d'excitation (Figure 21). Il est ensuite réfléchi par un miroir dichroïque sur l'objectif qui le focalise en un petit volume au sein de l'échantillon. Le faisceau laser excite les sondes fluorescentes qui réémettent des photons. La lumière émise par les sondes fluorescentes est collectée par l'objectif et transmise vers le photomultiplicateur qui transforme le signal lumineux en signal électrique. Avant d'atteindre le photomultiplicateur, la lumière émise traverse un pinhole d'émission qui retient les photons émis par les sondes fluorescentes localisées en dehors du plan focal. Seuls les photons émis par les sondes fluorescentes localisées dans le plan focal traversent le pinhole d'émission et contribuent au signal. La lumière issue du plan focal forme un pixel qui contribue à l'image.

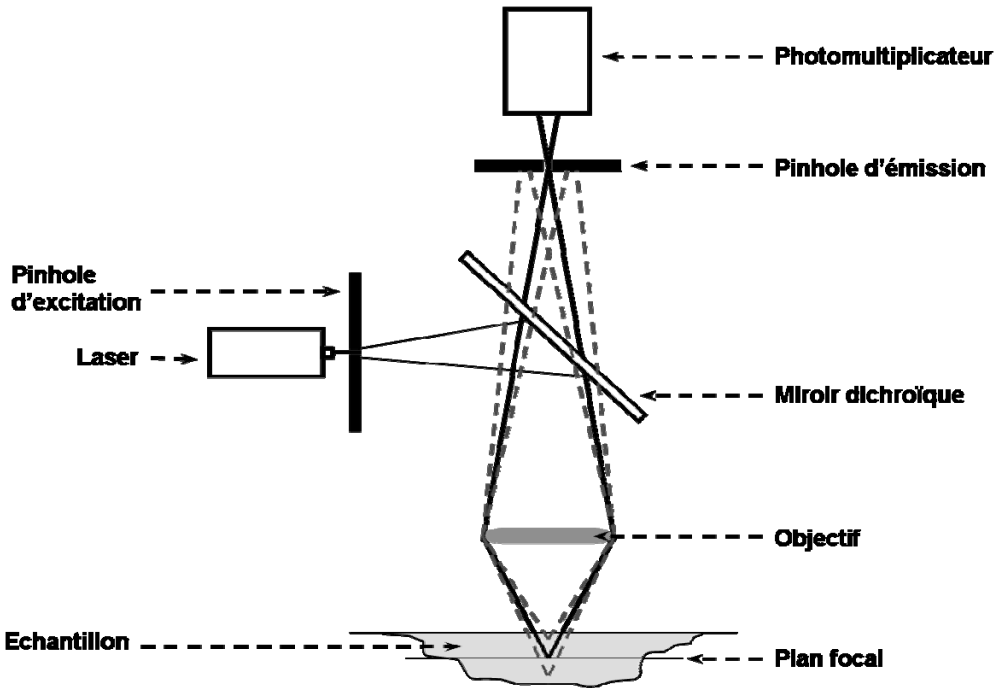

Figure 21. Principe de fonctionnement du microscope confocal à balayage laser.

L'image est construite pixel par pixel par un balayage latéral (X, Y) de l'échantillon à l'aide du faisceau laser en utilisant des miroirs galvanométriques. Des images issues de différents plans focaux peuvent être acquises en déplaçant l'échantillon selon l'axe Z à l'aide de la platine motorisée. La structure tridimensionnelle de l'objet est reconstruite en superposant les images issues des différents plans focaux.

2.7.2. Mode opératoire

Le LYS et l'apo α-LA étaient marqués respectivement par la rhodamine B isothiocyanate (RBITC) et la fluorescéine isothiocyanate (FITC) (Figure 22). Chaque protéine était marquée isolément de la manière suivante : des solutions aqueuses (pH 8,5) de LYS et d'apo α-LA étaient préparées et filtrées sur des membranes de 0,2 µm. Les sondes, dissoutes dans du diméthylsulfoxide à une concentration de 1 $g.l^{-1}$, étaient ajoutées (100 µl) aux solutions protéiques. Le pontage covalent était effectué à température ambiante pendant 3 h.

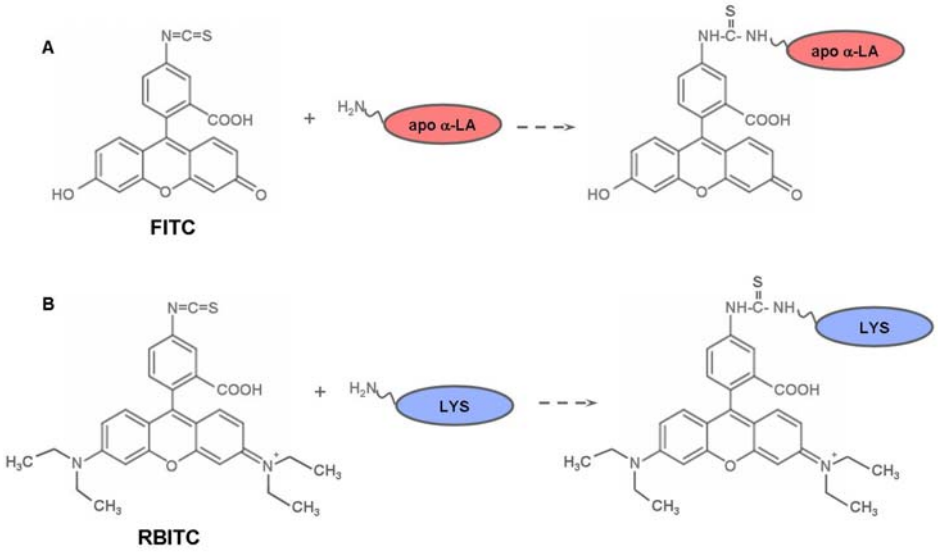

Figure 22. Schéma de la réaction de marquage de l'apo α-LA par la fluorescéine isothiocyanate (A) et du LYS par la rhodamine B isothiocyanate (B).

Les solutions protéiques marquées étaient ensuite dialysées contre du tampon 10 mM Tris/HCl (pH 7,0), 0,6 mM NaCl, puis contre de l'eau distillée (pH 7,0) à l'aide de membranes de dialyse présentant un seuil de coupure de 6-8000 Da (Spectrum Laboratories,

Gardena, CA, USA). Après dialyse, les solutions étaient centrifugées à 12000 g pendant 30 min ; les surnageants contenant les protéines marquées étaient prélevés et lyophilisés.

Un microscope inversé TE2000-E (Nikon, Champigny-sur-Marne, France) équipé d'un système d'imagerie confocale Nikon C1Si et de lasers argon et hélium/néon émettant aux longueurs d'onde de 488 et 543 nm était utilisé pour l'observation des échantillons. Les images étaient acquises avec l'objectif ×100 (immersion à huile) pour une ouverture numérique de 1,40. Le microscope était utilisé en mode standard pour l'acquisition des images, alors que les spectres d'émission des sondes étaient enregistrés en mode spectral. L'émission de fluorescence des sondes était recueillie à des longueurs d'onde de 515/30 et 590/50 lors de l'utilisation du microscope en mode standard. En mode spectral, le signal d'émission des sondes était enregistré par un photomultiplicateur (multianode) constitué de 32 canaux avec une résolution de 5 nm. La version 3.40 du logiciel EZ-C1 (Nikon) était utilisée pour la visualisation et le traitement des spectres et des images acquis.

2.8. Microscopie électronique à balayage (SEM)

Les structures supramoléculaires LYS/apo α-LA étaient déposées sur des membranes d'ester de cellulose présentant un diamètre de pores de 0,22 µm (Millipore SAS, Molsheim, France). Les membranes étaient plongées dans du tampon 30 mM Tris/HCl (pH 7,5), 15 mM NaCl contenant 2,5 % (v/v) de glutaraldéhyde (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) pendant 1 h pour y fixer les structures supramoléculaires. Les échantillons étaient ensuite déshydratés par des bains successifs d'éthanol à 50 %, 75 %, 85 %, 95 % et 100 %, puis séchés en utilisant la méthode du point critique du CO_2 et métallisés à l'or-palladium par pulvérisation cathodique avec un appareil JEOL JFC 1100 (JEOL, Tokyo, Japon). Les structures supramoléculaires LYS/apo α-LA étaient observées à l'aide d'un microscope électronique à balayage à effet de champ JEOL JSM 6301 F opérant à 9 kV (JEOL, Tokyo, Japon).

2.9. Microscopie électronique à transmission (TEM)

Des mélanges contenant du LYS et de l'apo α-LA dans des proportions équimolaires étaient préparés à 45°C dans une gamme de concentration protéique totale s'échelonnant de 0,02 à 0,2 mM. Les solutions contenant les structures supramoléculaires LYS/apo α-LA fraîchement préparées étaient déposées (50 µl) sur la surface d'une grille de cuivre recouverte par un film continu de carbone. L'excédant de liquide était éliminé par bref contact avec un

papier Wattman. Un volume équivalent d'une solution aqueuse à 1% d'acétate d'uranyle était ensuite placé sur le film de carbone contenant l'échantillon. La grille était alors séchée à l'air libre avant son introduction dans la chambre du microscope.

Les échantillons étaient observés en utilisant un microscope électronique à transmission JEM-1230 (JEOL SA, Japon) opérant avec une tension d'accélération de 80 kV et équipé d'un filament thermoionique d'hexaborure de lanthane. Les images étaient acquises sur une caméra CCD Gatan ES500W de résolution 1,35 K x 1,04 K. Les analyses d'images étaient réalisées à l'aide du logiciel ImageJ.

2.10. Chromatographie liquide haute performance en phase inverse

La composition des structures supramoléculaires LYS/apo α-LA en chacune des protéines était déterminée par chromatographie liquide haute performance en phase inverse. Préalablement à l'analyse chromatographique, les mélanges LYS/apo α-LA étaient centrifugés à 12000 g pendant 30 min à la température d'étude. Les culots contenant les structures supramoléculaires étaient lavés avec du tampon 30 mM Tris/HCl (pH 7,5), 15 mM NaCl puis dispersés avec un volume d'éluant A équivalent au volume initial du mélange LYS/apo α-LA.

La chaîne chromatographique (Waters, Milford, USA) était constituée d'un module de séparation Waters 2695 et d'un détecteur Waters 2487. La séparation des protéines était effectuée sur une colonne Vydac C4 214TP5215. L'éluant A était une solution aqueuse contenant 1,06 ‰ d'acide trifluoroacétique (TFA) (v/v) et l'éluant B une solution d'acétonitrile/eau (80/20, v/v) contenant 1,00 ‰ de TFA (v/v). Le LYS et l'apo α-LA étaient séparés en utilisant un gradient linéaire d'éluant B allant de 20 % à 84 % en 22 min. Durant l'élution, la température de la colonne était régulée à 40°C, le débit était de 0,2 $ml.min^{-1}$ et les protéines étaient détectées simultanément à 214 et 280 nm en sortie de colonne.

2.11. Mesure de taille des structures supramoléculaires LYS/apo α-LA

Le diamètre hydrodynamique moyen des structures supramoléculaires résultant de l'assemblage entre le LYS et l'apo α-LA à 45°C était mesuré par diffusion dynamique de la lumière (DLS) à 633 nm (Malvern, HPPS, zetasizer Nano ZS). Les mesures étaient effectuées

15 minutes après la formation des structures supramoléculaires dans une cuve en plastique de trajet optique 1 cm à 45°C. La viscosité du tampon 30 mM Tris/HCl (pH 7,5), 15 mM NaCl à 45°C était de 0.60×10^{-3} Pa.s et son indice de réfraction de 1,33. Pour éviter la saturation du détecteur, les solutions les plus concentrées en structures supramoléculaires étaient diluées dans le même tampon. Nous avons vérifié que cette dilution n'affectait pas significativement la taille des structures supramoléculaires. Les fonctions de corrélation étaient analysées par la méthode Contin aboutissant à la détermination d'un diamètre hydrodynamique moyen.

2.12. Turbidité des mélanges LYS/apo α-LA

La turbidité (τ) des mélanges LYS/apo α-LA était mesurée sur un spectrophotomètre 6505 UV-visible (Jenway, Chelles, France) équipé d'une cellule régulée à 45°C par un bain circulant. L'absorbance (A) des échantillons était mesurée à 600 nm. La turbidité des échantillons était déterminée à partir de l'absorbance ($A = \log (I_0/I)$) de l'échantillon en utilisant la relation suivante :

$$\tau = l^{-1} \times \ln (I_0/I)$$

avec I_0, l'intensité du faisceau lumineux incident ; I, l'intensité du faisceau lumineux transmit ; l, la longueur du trajet optique (1 cm dans nos études).

$$\text{soit} \quad \tau = 2.303 \times A \times l^{-1}$$

Résultats et Discussion

1. Chapitre 1

Mise en évidence de l'interaction et de l'assemblage entre l'α-lactalbumine et le lysozyme

1.1. Introduction

Différentes structures supramoléculaires peuvent être formées lors de l'assemblage de protéines. La morphologie et les propriétés de ces structures sont fortement dépendantes (i) de l'état conformationnel des protéines impliquées dans l'assemblage et (ii) des conditions physico-chimiques dans lesquelles l'assemblage protéique est effectué. Ma thèse s'est focalisée sur l'étude de l'interaction entre deux protéines globulaires et ceci aux échelles moléculaire et macroscopique.

Dans ce chapitre, nous avons cherché à répondre aux questions suivantes :

- Comment et dans quelles conditions physico-chimiques le LYS, une protéine basique, interagit-il avec les formes holo et apo de l'α-LA, une protéine acide ?
- Quelles sont la nature et l'organisation des structures supramoléculaires générées ?
- Quelle est la nature des entités moléculaires impliquées dans les étapes initiales de l'assemblage protéique ?

Les structures supramoléculaires formées entre le LYS et les formes holo ou apo α-LA dans des conditions physico-chimiques « douces » ont, dans un premier temps, été identifiées. La morphologie, la taille et la composition protéique de ces structures ont été caractérisées à faible force ionique (39 mM) dans une gamme de température s'échelonnant de 5°C à 45°C. Ce travail a été réalisé en collaboration avec Denis Renard, de l'INRA de Nantes (unité APR), et a fait l'objet d'une publication dans *Biochemistry* (Article 1).

Une fois les assemblages mis en évidence, nous avons cherché à identifier à l'échelle moléculaire les évènements pouvant expliquer la formation de deux structures supramoléculaires différentes. Pour cela, nous avons analysé l'interaction à l'échelle moléculaire entre le LYS et les formes holo et apo de l'α-LA par anisotropie de fluorescence. Les conditions physico-chimiques employées dans cette étude étaient identiques à celles utilisées dans l'article 1. Ce travail a été mené en collaboration avec Véronique Le Tilly, de l'Université de Bretagne Sud à Vannes (L2PIC). Il est présenté sous la forme d'un projet de publication (Article 2).

1.2. Article 1

Temperature affects the supramolecular structures resulting from α-Lactalbumin–Lysozyme interaction

Biochemistry **2007**, *46*, 1248-1255

Michaël Nigen[1], Thomas Croguennec[1], Denis Renard[2], and Saïd Bouhallab[1]

[1]*INRA, Agrocampus Rennes, UMR 1253, Science & Technologie du Lait et de l'Oeuf, 65 rue de Saint Brieuc, F-35000 Rennes, France.*

[2]*INRA, Unité Biopolymères, Interactions, Assemblages, Rue de la Géraudière, BP 71627, F-44000 Nantes, France.*

1248 *Biochemistry* **2007,** *46,* 1248−1255

Temperature Affects the Supramolecular Structures Resulting from α-Lactalbumin−Lysozyme Interaction

Michaël Nigen,[‡] Thomas Croguennec,[‡] Denis Renard,[§] and Saïd Bouhallab*[,‡]

INRA, Agrocampus Rennes, UMR 1253, Science & Technologie du Lait et de l'Œuf, 65 rue de Saint Brieuc, F-35000 Rennes, France, and INRA, Unité Biopolymères, Interactions, Assemblages, Rue de la Géraudière, BP 71627, F-44000 Nantes, France

Received October 12, 2006; Revised Manuscript Received November 30, 2006

ABSTRACT: The interaction between α-lactalbumin and lysozyme, two globular proteins with highly homologous tertiary structures but opposite electric charges, was investigated. As assessed by isothermal titration calorimetry, lysozyme did not bind to the native form of α-lactalbumin but did interact with calcium-depleted α-lactalbumin (apo α-LA). This interaction leads to the formation of different supramolecular structures depending on the temperature. Heterogeneous, amorphous aggregates are formed at 5 °C, while droplets, coacervate-like structures, exist at 45 °C. The coacervates are formed by equimolar quantities of the two proteins, but their size and number depend on the initial protein molar ratio. These supramolecular structures are found to be stable when the temperature is decreased to 5 °C, while prolonged heating at 45 °C induces the formation of larger coacervates through a coalescence phenomenon. Surprisingly, interplay occurs between aggregates and coacervates when the temperature is increased from 5 to 45 °C. We discuss the results in terms of subtle heat-induced conformational changes in apo α-LA. In conclusion, our results show an association between globular proteins that leads to the formation of a variety of supramolecular structures in a temperature-dependent manner and confirm the primordial role of certain α-lactalbumin unfolding intermediates in protein-driven assembly.

Protein−protein interaction is relevant and important in both medical and food science. These interactions modify the protein structure and unfolding process and may lead to a variety of supramolecular structures. Understanding protein−protein interaction in multiprotein systems is a key factor in controlling the formation of protein aggregates and opening the field of nanostructured protein assemblies. For this purpose, two globular proteins, bovine α-lactalbumin (α-LA) and hen egg white lysozyme (LYS),[1] for which a wealth of information is now available at the molecular level were used. α-LA and LYS are two related proteins of 123 and 129 amino acid residues, respectively, which have amino acid sequences that are ∼40% similar and share a similar three-dimensional structure, including four disulfide bonds (*1*−*3*). These proteins differ particularly in their biological function and their opposite isoelectric points. α-LA is an acidic protein with a pI value near 4−5, while LYS is a basic protein with a pI value of 10.7. Indeed, notable differences among these two proteins reside in their calcium binding properties and their ability to adopt partly folded states or molten globules in acid solutions (*3*).

α-LA, a small monomeric milk protein, consists of two lobes: a large basic α-helical lobe and a small acidic β-sheet domain, which are connected by a calcium binding loop (*4*−*8*). The calcium located between the two lobes plays a key role in the structure, functionality, and stability of α-LA; its denaturation temperature is ∼64 °C (*9*). Calcium is particularly coordinated by the β-carboxylate group side chains of three aspartic acid residues (*3*, *6*, *10*). Removal of calcium from holo α-LA to generate the apo form destabilizes the protein and decreases its thermal stability due to negative charge−charge repulsions at the calcium binding site (*7*).

LYS is a relatively small secretory protein that catalyzes the hydrolysis of specific kinds of polysaccharides comprising the cell walls of bacteria. It is a basic protein exceptionally abundant in egg white. It is also one of the best characterized and most studied proteins. Its folding−unfolding mechanism has been studied in detail (*11*). The three-dimensional structure of lysozyme is formed by two domains with a first predominantly α-helical domain and a second β-sheet domain. By contrast to bovine α-LA, LYS from hen egg white does not contain a specific metal binding site in its structure. LYS is relatively stable, its denaturation temperature being 74 °C (*12*−*14*).

This study constitutes a part of a research program aimed at investigating how food proteins interact and aggregate together under various physicochemical conditions. The potential interaction of LYS with either native α-LA (holo α-LA) or its calcium-depleted form (apo α-LA) was first examined by isothermal titration calorimetry. The detected interaction between LYS and apo α-LA was further explored at different temperatures via characterization of supramolecular structures formed by means of turbidity, optical microscopy, and reverse phase high-performance liquid chromatography. The results revealed that different structures,

* To whom correspondence should be addressed. Telephone: 00 33 (0)223485742. Fax: 0033(0)223485350. E-mail: said.bouhallab@rennes.inra.fr.
‡ INRA, Agrocampus Rennes, UMR 1253.
§ INRA, Unité Biopolymères, Interactions, Assemblages.

[1] Abbreviations: apo α-LA, calcium-depleted α-lactalbumin; LYS, hen egg white lysozyme; rp-HPLC, reverse phase high-performance liquid chromatography; ITC, isothermal titration calorimetry.

10.1021/bi062129c CCC: $37.00 © 2007 American Chemical Society
Published on Web 01/09/2007

amorphous aggregates versus droplets, coacervates-like structures, were generated depending on working temperature.

MATERIALS AND METHODS

Reagents. Hen egg white lysozyme (LYS) was purchased from Ovonor and contained 95% LYS and 3% chloride ions. Holo α-LA was purified from bovine whey as reported by Caussin et al. (*15*). The resulting powder contained 95% holo α-LA. Apo α-LA was prepared by dialysis of a solution of holo α-LA against deionized water at pH 3 for 48 h at 4 °C using a dialysis membrane (Spectrum Laboratories) with a nominal cutoff of 6000−8000 Da to remove calcium ions. The pH of the apo α-LA solution was adjusted to pH 7 with 1 M NaOH and then freeze-dried. The calcium content of the apo α-LA powder was analyzed by atomic absorption spectrometry on a SpectrAA 220FS instrument (Varian, Les Ulis, France); the Ca/apo α-LA molar ratio was less than 2%.

Stock solutions of LYS, holo α-LA, and apo α-LA were prepared by solubilization of protein powders in 30 mM Tris-HCl, 15 mM NaCl buffer (pH 7.5). They were filtered through a 0.2 μm membrane before preincubation at the working temperature. The protein concentration was determined by measuring the absorbance at 280 nm using extinction coefficients of 2.01 and 2.64 L g^{-1} cm^{-1} for apo α-LA and LYS, respectively.

Isothermal Titration Calorimetry (ITC). ITC experiments were performed on a VP-ITC microcalorimeter (Microcal, Northampton, MA). Stock solutions of α-LA, apo α-LA, and LYS were diluted in 30 mM Tris-HCl, 15 mM NaCl buffer (pH 7.5) at final concentrations of 0.32, 0.32, and 2.3 mM, respectively. Samples were degassed under vacuum before titration experiments. Measurements were carried out at 5, 25, and 45 °C. The reference cell was filled with deionized water, and the sample cell (1.425 mL) was filled with either an α-LA or an apo α-LA solution. After an equilibration time at the working temperature, apo α-LA was titrated with 29 successive 10 μL injections of LYS. The injection time was 10 s, and the lag time between injections was fixed at 130 or 200 s to allow complete thermodynamic equilibrium. During titrations, the solution in the sample cell was stirred at 300 rpm in the injection syringe to ensure complete mixing of the solution. References were obtained by injecting LYS into a cell containing the buffer solution. Data resulting from the subtraction of reference values (dilution heat) from the sample values were analyzed using MicroCal ORIGIN version 7.0 provided by the manufacturer. For each experiment, the area under each peak was plotted versus the LYS/apo α-LA molar ratio. All experiments were repeated at least three times.

Preparation of the Protein Mixtures. Solutions with different LYS/apo α-LA molar ratios ranging from 0.05 to 2 were prepared from stock solutions of LYS and apo α-LA and kept at a temperature of 5 or 45 °C. Further analyses were performed after equilibration for 30 min at these two temperatures. All prepared protein mixtures contained a constant final apo α-LA concentration of 0.266 mM, except when specified in Results. All the analytical experiments performed below were repeated at least three times.

Optical Microscopy. Structures resulting from the mixing of apo α-LA and LYS at 5 and 45 °C were observed using a phase contrast optical microscope (Olympus BX51TF) equipped with an Olympus DP11 camera. Samples were put between glass slides, and structures were immediately observed at a magnification of 100× at room temperature. The irreversibility of structures formed at 45 °C limits any important change between sampling and microscopic examination.

Particle Size Determination. The size of the structures formed in the mixtures at 45 °C was investigated by laser dynamic light scattering (DLS) using a Malvern HPPS instrument (Malvern zetasizer Nano ZS). Measurements were performed 15 min after the preparation of the samples in a 1 cm path length spectroscopic plastic cell at 45 °C. Before each measurement, solutions were gently stirred. Experimental data were analyzed using the Contin algorithm provided by the manufacturer. Samples with a LYS/apo α-LA molar ratio of >0.2 were diluted 21 times before measurements to avoid detector saturation. Each measurement was performed in duplicate.

Reverse Phase HPLC Analysis. We performed reverse phase separation on a Vydac C_4 column (214TP5215) connected to a HPLC system, consisting of a Waters 2695 separations module, a Waters 2487 dual λ absorbance detector, and Empower (Waters) to acquire, process, and report chromatographic profiles. Milli-Q water containing 1.06‰ (v/v) trifluoroacetic acid as buffer A and an 80:20 (v/v) acetonitrile/Milli-Q water mixture containing 1‰ (v/v) trifluoroacetic acid as buffer B were used for protein elution. The gradient started with 20% buffer B to reach 84% in 22 min. Protein separation was carried out at a flow rate of 0.2 mL/min at 40 °C. Proteins were detected simultaneously at 214 and 280 nm.

Before analysis, samples were centrifuged at 12000*g* for 30 min at 5 or 45 °C. Supernatants were recovered, and pellets were washed with 30 mM Tris-HCl, 15 mM NaCl buffer (pH 7.5) and then dissolved in a buffer A volume equivalent to the initial volume. Samples were diluted 100 times in buffer A before injection.

Turbidity Measurement. Turbidity was measured on a 6505 UV−vis spectrophotometer (Jenway, Chelles, France) equipped with a temperature-controlled cell connected to a circulating water bath. Optical density (OD) was measured 30, 90, and 150 min after the preparation of the samples at 600 nm and 45 °C. Before each measurement, solutions were gently stirred. Sample turbidity (τ) was determined using the relationship $\tau = (2.303\mathrm{OD})/l$, where OD is the optical density of the sample and l is the light path length in the cell (1 cm).

Solutions with a LYS/apo α-LA molar ratio higher than 0.2 were diluted five times before turbidity measurements. For samples with a lower protein molar ratio, measurements were performed on undiluted samples.

RESULTS

Isothermal Titration Calorimetry (ITC). When native holo α-LA was titrated with LYS, no signal was detected from ITC (results not shown). On the other hand, when calcium-depleted α-LA, i.e., apo α-LA, was used, raw data displayed large amplitude responses at all the temperatures that were studied. The heat flow versus time profiles resulting from the titration of apo α-LA with LYS at various temperatures

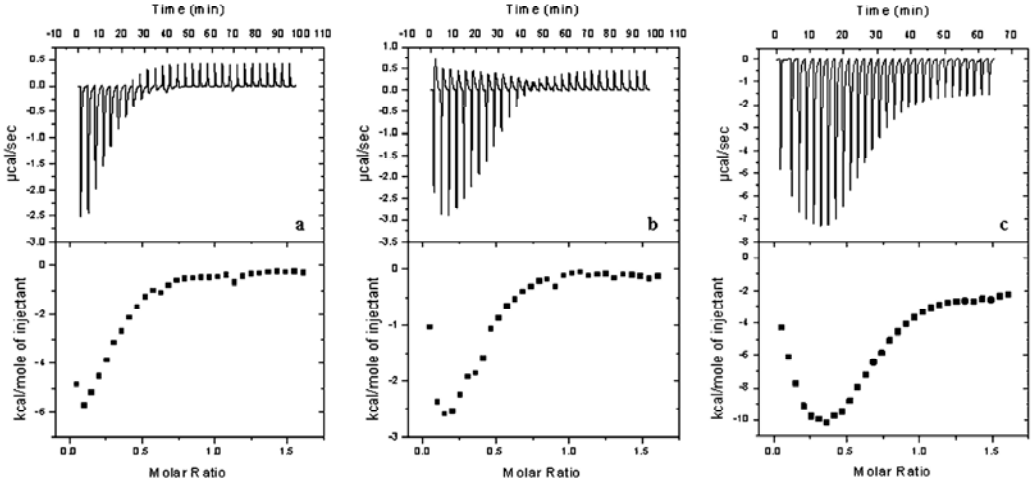

FIGURE 1: Microcalorimetric titration of apo α-LA with LYS in 30 mM Tris-HCl, 15 mM NaCl buffer (pH 7.5) at 5 (a), 25 (b), and 45 °C (c). Top panels represent the raw heat signal for the titration of apo α-lactalbumin (0.32 mM) with 10 μL increments of 2.3 mM lysozyme. Bottom panels represent the area under each peak integrated and plotted against the LYS/apo α-LA molar ratio.

are shown in Figure 1 (top panels). The area under each peak represented the heat exchange within the system after each injection. At 5 °C (Figure 1a), the injection profiles of LYS in the sample cell containing apo α-LA were exothermic and decreased regularly to become endothermic and constant after the 10th injection (corresponding to a LYS/apo α-LA molar ratio of 0.5). At 25 °C (Figure 1b), the first 13 injection peaks exhibited both an exothermic and endothermic contribution while an endothermic signal was obtained for subsequent injections. During the first injections, the interaction between LYS and apo α-LA exhibited a complex behavior. The endothermic signal after the 10th and 14th injections at 5 and 25 °C, respectively, corresponded to the dilution signal of LYS in the sample cell as assessed in a reference experiment. At 45 °C (Figure 1c), an exothermic signal was obtained for all injections. The signal corresponding to the dilution of LYS, also endothermic at 45 °C, was masked by other phenomena.

Titration curves of LYS−apo α-LA interaction, shown in Figure 1 (bottom panels), are obtained by integration of the isotherm peaks and subtraction of the heats of dilution of LYS into buffer solution. The resulting curves at 5, 25, and 45 °C showed that the complexation between LYS and apo α-LA was exothermic at all tested temperatures. The first injection was not taken into account for analysis. At 5 °C (Figure 1a), the energy released in the sample cell decreased as the molar ratio increased. The saturation of apo α-LA with LYS was reached at a molar ratio of ∼1. At 45 °C (Figure 1c), the shape of the titration curve showed two distinct thermodynamic events during the interaction between apo α-LA and LYS. (i) the heat released increased first from 6.15 to 10.17 kcal/mol of LYS injected for molar ratios ranging from 0.10 to 0.36, respectively. (ii) The heat released following LYS injection decreased then from 10.17 to 2.8 kcal/mol to reach a plateau value for a molar ratio of >1.25. At 25 °C (Figure 1b), the heat released increased slightly from 2.4 (second injection) to 2.6 kcal/mol of LYS injected (third injection) and then decreased to reach saturation at a molar ratio of ∼1. The shape of the titration curves obtained at 25 °C was similar to that obtained at 45 °C with two successive events, the first event being, however, shorter at 25 °C.

Whatever the temperature, the shapes of titration curves were rather complex. As a consequence, fitting experimental data to an integrated binding isotherm could not be performed and no interaction parameters were determined. However, the temperature dependence of the interaction between apo α-LA and LYS was evidenced from ITC experiments.

Characterization of the Supramolecular Structures. During ITC experiments, we noted the formation of a whitish precipitate at the end of titration, the visual aspect of which depended on the working temperature. The precipitate obtained at 5 °C looked more compact, fluffy, and dense than that obtained at 45 °C. The aim of the following sections was to better characterize the formed precipitates following formation of the LYS−apo α-LA complex at 5 and 45 °C.

Optical Microscopy. Phase contrast micrographs obtained at 5 and 45 °C for different LYS/apo α-LA molar ratios, ranging from 0.05 to 1.5, are shown in Figure 2. At 5 °C (Figure 2a−d), aggregates with irregular shape were observed for all the protein molar ratios that were studied. From theses micrographs, aggregate sizes were estimated to range from 1−2 to 20−50 μm. Small aggregates were observed whatever molar ratios were studied, whereas numerous larger aggregates were observed for higher molar ratios (Figure 2b−d). Consequently, aggregates in solution were polydisperse in size for each molar ratio. Moreover, the number and average size of aggregates seemed to increase with increasing LYS/apo α-LA molar ratios. According to the polydispersity in the aggregates size observed by optical microscopy, the aggregates were not further analyzed by dynamic light scattering.

At 45 °C, the particles looked completely different (Figure 2e−h). Coacervate-like structures, with spherical and regular

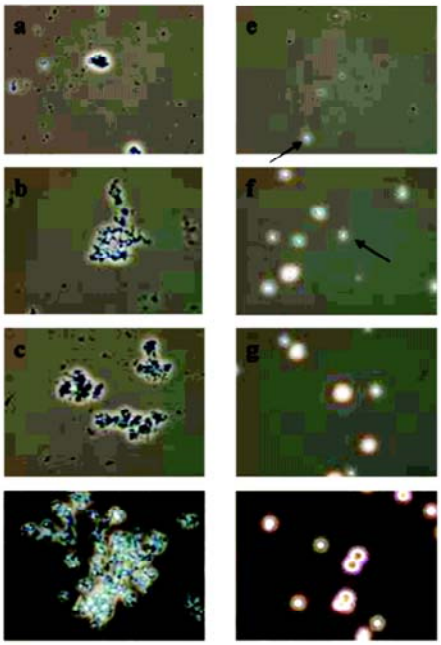

FIGURE 2: Phase contrast micrographs taken at 5 (left) and 45 °C (right) for various LYS/apo α-LA molar ratios: 0.05 (a and e), 0.1 (b and f), 0.2 (c and g), and 1.5 (d and h). Arrows show small coacervates. The scale bar is 10 μm.

Table 1: Size Distribution Parameters of Coacervates Resulting from the Interaction of Apo α-LA with LYS at 45 °C in 30 mM Tris-HCl, 15 mM NaCl Buffer (pH 7.5) and for Different LYS/Apo α-LA Molar Ratios

LYS/apo α-LA molar ratio	*Z* average (nm)	distribution width (nm)
0.05	488 ± 2.8	270
0.1	1123 ± 19	410
0.2	3018 ± 115	810
0.5	3269 ± 148	770
1	5357 ± 32	800
1.5	4820	730

shape, were observed. The size (diameter) of the coacervates depended on the LYS/apo α-LA molar ratio, however, to a lesser extent than that of aggregates observed at 5 °C for the same molar ratio range. The smallest particles were obtained for a molar ratio of 0.05 with diameters of <1 μm (Figure 2e), while the largest particles with diameters of $\sim 3-6$ μm were observed for molar ratios ranging from 0.2 to 2 (Figure 2g,h). For the intermediate molar ratio, the size of coacervates was also intermediate with a diameter of ~ 1 μm (Figure 2f). The coacervates were relatively homogeneous in size for each molar ratio. Coalescence occurring between coacervates to form bigger particles with various morphologies was also visible in Figure 2h. The increase in coacervate size with an increasing LYS/apo α-LA molar ratio was confirmed by dynamic light scattering measurements (Table 1). Moreover, as shown by the increase in the distribution width, the polydispersity of the coacervates slightly increased with an increasing molar ratio. The average sizes deduced from optical microscopy and dynamic light

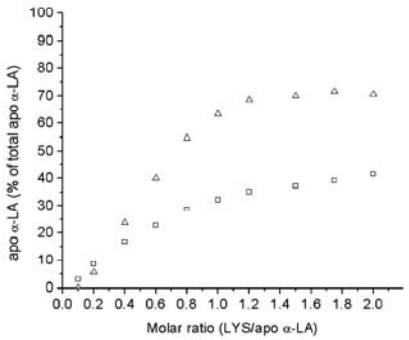

FIGURE 3: Proportion of apo α-LA in the centrifuged material for different LYS/apo α-LA molar ratios at 5 (□) and 45 °C (△). Mixtures of apo α-LA and LYS were centrifuged at 12000*g* for 30 min at 5 or 45 °C. The pellets were washed with 30 mM Tris-HCl, 15 mM NaCl buffer (pH 7.5) and analyzed by rp-HPLC.

scattering were not affected by dilution of the samples, indicating that coacervates were rather stable to dilution.

The effect of protein concentration on the formation of coacervates was then studied at a LYS/apo α-LA molar ratio of 0.05. It was found that coacervates were formed at a total protein concentration of 1.05 mM. However, their number and size decreased with a decrease in protein concentration until coacervates completely disappeared at a total protein concentration of 0.26 mM (data not shown). The formation and size of coacervates formed at 45 °C were thus dependent on the total concentration of proteins.

Composition of Supramolecular Structures (aggregates versus coacervates). The protein compositions (LYS and apo α-LA) of aggregates and coacervates formed at 5 and 45 °C, respectively, were analyzed by reverse phase HPLC after samples were centrifuged. For all mixtures, analysis of proteins in pellets and supernatants indicated that the initial protein contents were fully recovered. Figure 3 shows the evolution of the apo α-LA fraction in pellets as a function of LYS/apo α-LA molar ratios at 5 and 45 °C. For both temperatures, the apo α-LA fraction in the pelleted material linearly increased at protein molar ratios ranging from 0.1 to 1. For the higher molar ratios, the amount of apo α-LA slightly increased and then tended to reach a plateau value. At plateau values, the apo α-LA fraction in the coacervates (pelleted material collected at 45 °C) was ~2-fold higher than those in the aggregates (pelleted material collected at 5 °C). At a LYS/apo α-LA molar ratio of 2, the proportion of precipitated apo α-LA was 40 ± 4.2% at 5 °C versus 67.8 ± 4.7% at 45 °C. At 45 °C and the lowest protein molar ratio (0.1 LYS/apo α-LA), all apo α-LA was recovered in the supernatant. Consequently, the coacervate-like structures observed for this molar ratio by optical microscopy (Figure 2f) and dynamic light scattering (Table 1) experiments were probably too small to be pelleted under experimental conditions that were used. In other words, the LYS concentration in the mixture is probably too limited to produce structures with a critical size for centrifugation. The amount of apo α-LA in the pellet then increased at higher molar ratios and reached a plateau for a LYS/apo α-LA molar ratio of >1.2. The apo α-LA concentration in solution seemed to be the limiting factor for the formation of coacervates. Figure

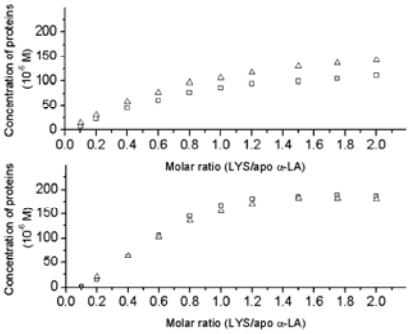

FIGURE 4: Quantity of LYS (Δ) and apo α-LA (□) in the centrifuged material for different (LYS/apo α-LA) molar ratios at 5 (top panel) and 45 °C (bottom panel). Mixtures of apo α-LA and LYS were centrifuged at 12000*g* for 30 min at 5 or 45 °C. The pellets were washed with 30 mM Tris-HCl, 15 mM NaCl buffer (pH 7.5) and analyzed by rp-HPLC.

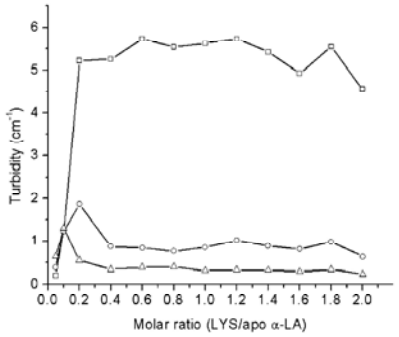

FIGURE 5: Turbidity (cm^{-1}) as a function of LYS/apo α-LA molar ratio in 30 mM Tris-HCl, 15 mM NaCl buffer (pH 7.5) after incubation at 45 °C for (□) 30, (○) 90, and (△) 150 min.

4 reports the recovered insoluble quantity of LYS and apo α-LA at 5 and 45 °C for different protein molar ratios. At 5 °C, the quantity of precipitated LYS was 1.31 ± 0.11-fold higher than that of apo α-LA. At 45 °C, equimolar quantities of both proteins (i.e., molar ratio of 0.97 ± 0.20) were pelleted whatever the initial molar ratio. These results suggest that aggregates and coacervates were different in their relative composition, i.e., protein stoichiometry.

Turbidity of LYS/Apo α-LA Mixtures at 45 °C. Turbidity is a light scattering method that is dependent on the concentration, size, refractive index of scattering particles, and incident wavelength. Turbidity measurements were performed to gain more insight into the supramolecular structures formed at 45 °C. As optical microscopy and dynamic light scattering studies revealed that dilution did not affect the structure of coacervates, samples with a high protein content were diluted before turbidity measurements. The evolution of turbidity as a function of protein molar ratio at three incubation times is shown in Figure 5. After incubation for 30 min, an abrupt increase in turbidity (25-fold) was observed when the LYS/apo α-LA molar ratio increased from 0.05 to 0.2. No further change in turbidity was observed at higher protein molar ratios. Figure 5 also shows that turbidity evolved during storage of samples at

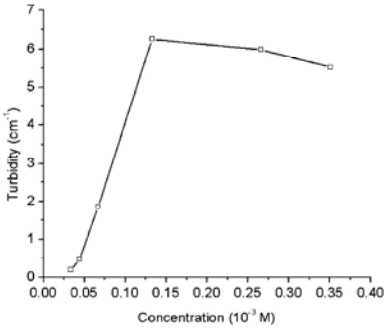

FIGURE 6: Turbidity (cm^{-1}) of LYS/apo α-LA mixtures at 45 °C in 30 mM Tris-HCl, 15 mM NaCl buffer (pH 7.5) as a function of apo α-LA concentration and at a constant LYS/apo α-LA molar ratio of 1.

45 °C. Turbidity of protein mixtures with molar ratios ranging from 0.2 to 2 decreased strongly with an increasing incubation time at 45 °C. Furthermore, a thin layer appeared on the tube walls for longer incubation times. The decrease in turbidity was thus attributed to the formation of this layer throughout a coalescence phenomenon between individual coacervates. The low turbidity values obtained at the lowest protein molar ratio whatever the incubation time at 45 °C would be in agreement with an absence of a coalescence phenomenon.

Turbidity of LYS/apo α-LA mixtures was also measured after incubation for 30 min at 45 °C at various apo α-LA concentrations from 0.033 to 0.351 mM and at a constant protein molar ratio of 1. As shown in Figure 6, an unexpected protein concentration dependence of turbidity is obtained. The turbidity first increased for apo α-LA concentrations ranging from 0.033 to 0.133 mM and then slightly decreased for higher apo α-LA concentrations. The formation and size of coacervates were thus dependent on the total protein concentration in the mixtures.

DISCUSSION

The interaction between LYS and the two structural forms of α-LA was first investigated at 25 °C using isothermal titration calorimetry. ITC is a powerful tool widely used to obtain thermodynamic parameters regarding biological binding processes (*16*−*18*). From our results, it was apparent that LYS did not interact with a native calcium-loaded α-LA form but did interact with calcium-depleted α-LA (apo α-LA). A difference in protein surface charge density associated with Ca^{2+} removal (*19*) may be relevant, initiating an interaction between LYS and α-LA. In fact, three negatively charged residues, Asp82, Asp87, and Asp88, are directly involved in calcium coordination. Hence, removal of calcium leads to a more negatively charged α-LA form that might probably promote the interaction with positively charged LYS. In addition, structural and conformational differences have been reported between holo (folded state) and apo (semifolded states) α-LA (*8*). It was demonstrated, for instance, that, in the absence of calcium at neutral pH and a low ionic strength, α-LA adopts a molten globule-like state (*20*). Consequently, the interaction of apo α-LA with LYS could be promoted throughout the overall con-

formational changes such as higher protein flexibility and surface hydrophobicity induced by Ca^{2+} removal.

The interaction of apo α-LA with LYS characterized by an exothermic signal (Figure 1) was found to be rather complicated, and known models for fitting the ITC signal, to determine the interaction parameters, always failed. Formation of aggregated structures following interaction may explain such an enthalpy change as supported by the presence of precipitated material recovered at the end of titration experiments as well as by turbidity measurements. Indeed, the formation of precipitate was effective at all tested temperatures from 5 to 45 °C. This result is rather surprising and seems to be specific to apo α-LA−LYS interaction. In other protein systems, such as neocarzinostatin−LYS interaction or a mix of two cuticular proteins, protein aggregation was prevented by lowering temperature below 20 °C (*21*, *22*).

Despite the formation of precipitates at low and high temperatures, the shape of calorimetric isotherms differed. Further analysis of the precipitates formed at 5 and 45 °C by optical microscopy showed that supramolecular structures resulting from the interaction between LYS and apo α-LA were different. At 5 °C, aggregates having irregular shapes and disordered structures were formed, while coacervate-like structures with a spherical shape and well-ordered structure were observed at 45 °C (Figure 2). Consequently, the temperature was found to be a key parameter in the formation of the supramolecular structures with respect to the interaction between LYS and apo α-LA. Coacervation is a phenomenon widely spread in the formation of protein−polysaccharide complexes (*23*). Attractive electrostatic interactions between the two (bio)polymers prevail during complex coacervation, a process which is favored by a low temperature and random coil configurations of both biopolymers (*23*). In the case of complex coacervation occurring between weakly charged polyelectrolytes, Ou and Muthukumar (*24*) recently highlighted the fact that complexation was driven by a negative enthalpy due to electrostatic attraction between two oppositely charged chains, with counterion release entropy playing only a minor role. However, the formation of coacervate-type structures is to our knowledge less prevalent in the formation of protein−protein complexes. Coacervation was mainly reported in the case of high-molecular weight proteins such as tropoelastin, legumin, and Tenebrio larval/pupal cuticular proteins (*21*, *25*, *26*). Contrary to what happens in the case of protein−polysaccharide interactions, coacervation is favored with an increasing temperature in the case of protein systems, and the process is said to be entropically driven (*27*, *28*). Accordingly, in our study dealing with protein−protein complexation and coacervation, the formation of coacervate-like structures was favored by an increase in temperature. How do the same binary protein systems lead to completely different structures, i.e., aggregates versus coacervates at 5 and 45 °C, respectively? It is well-known that an increase in temperature may induce an increase in the level of of protein unfolding and gives rise to drastic entropic changes. The denaturation temperature of apo α-LA is around 27 °C, versus 64 °C for holo α-LA (*29*−*31*). This means that, at neutral pH and a low ionic strength, the native structure of apo α-LA is stable at temperature below 27 °C. At 5 °C, global conformational characteristics of apo α-LA were shown to be very similar to those of the native holo form (*32*). At >27 °C, apo α-LA undergoes a conformational change and adopts a molten globule state with a high content of nativelike secondary structure and a lack of specific tertiary structure (*30*, *33*, *34*). Hence, at 5 and 45 °C, apo α-LA exists in two different conformational forms that differ in stability and flexibility. At 45 °C, apo α-LA adopts a more unfolded flexible state with potential hydrophobic domains exposed to the solvent. Hydrophobic interactions certainly play a key role in the coacervation process between LYS and apo α-LA. Moreover, ITC experiments conducted at 45 °C showed a progressive decrease in the magnitude of the interaction signal with an increase in salt concentration until its total disappearance in the presence of 200 mM added NaCl (results not shown). Therefore, if the electrostatic interactions might contribute to the initial recognizance between apo α-LA and LYS, further association and formation of coacervates seem to be mainly driven by protein flexibility and hydrophobic interactions. At 5 °C, apo α-LA adopts a nativelike structure having its hydrophobic domains buried in the core of the molecule and its negatively charged groups no longer involved in the coordination of calcium, more exposed to the solvent. In addition, even if the interaction between the two proteins at 5 °C was suppressed by an increasing ionic strength (results not shown), the observed LYS−apo α-LA aggregation could not be solely attributed to the unique electrostatic interactions resulting from the negatively charged apo α-LA neutralizing the positively charged LYS to reduce the overall entropy of the system. The main driving force in the aggregation could be found in the numerous hydrogen bonds between LYS and apo α-LA preferentially occurring at low temperatures. The decrease in interaction forces through hydrogen bonds would proceed with an increase in temperature, thus favoring the formation of coacervates at 45 °C.

The temperature dependence of the interaction between apo α-LA and LYS, the resulting supramolecular structures, and their evolution are summarized in Figure 7. At 5 °C, the mixture of LYS with apo α-LA gave rise to the formation of polydisperse heterogeneous aggregates. The increase in temperature from 5 to 45 °C affected the stability of the aggregates and led to the formation of coacervates. This temperature dependence assembly is probably linked, in addition to attractive electrostatic interactions, to the conformational change in apo α-LA occurring above 27 °C (a conformational change of LYS in this temperature range being neglected, its denaturation temperature being 74 °C). The observed ability of aggregates formed at 5 °C to be converted to coacervate-like structures at 45 °C underlines a reversible property of these aggregates probably throughout a new balance between involved driven forces (hydrogen, electrostatic, and hydrophobic interactions). The mechanism behind this structural transition is still obscure. Direct mixing of LYS and apo α-LA at 45 °C produced coacervates with equimolar quantities of the two proteins. These coacervates were homogeneous in size in solution with a well-defined structure. Furthermore, the formation and size of coacervates depended on the LYS/apo α-LA molar ratio in the mixtures. The protein molar ratio seems to be a critical factor for the induction and growth of coacervates. At low LYS/apo α-LA molar ratios (<0.2), LYS being the limiting protein as an increase in its concentration seeds the formation of more and

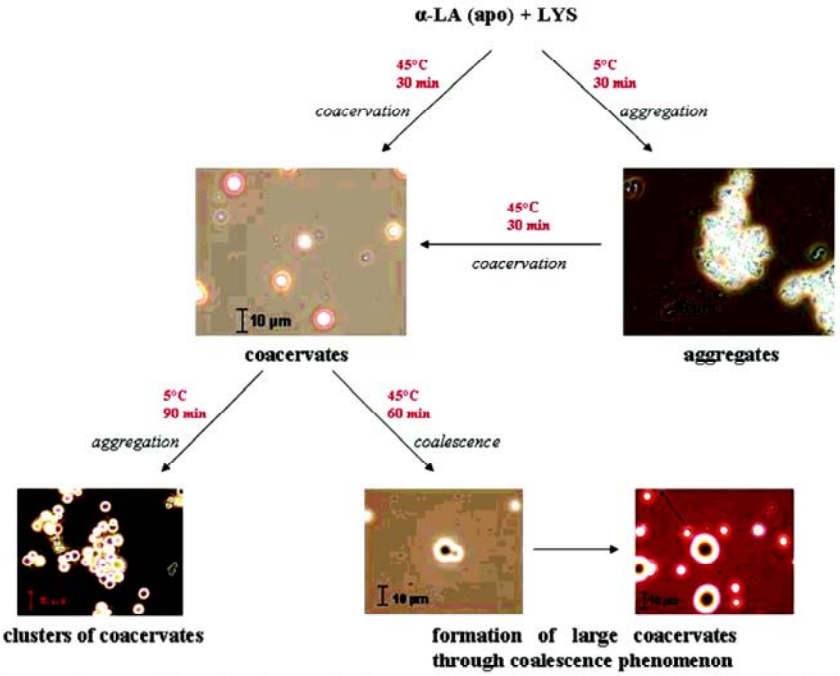

FIGURE 7: Summary of events and formation of supramolecular structures occurring after interaction of apo α-lactalbumin with lysozyme at 5 and 45 °C.

larger cocarvates. In contrast, for protein molar ratios higher than 1, apo α-LA became the limiting component, leading to plateau values for the amount of pelleted proteins and the size of formed structures. In addition, for LYS/apo α-LA molar ratios of <0.2, the coacervates seemed to be stable with aging, while above this ratio, the mixtures exhibited a low stability for prolonged incubation at 45 °C where coalescence phenomena resulting in the formation of larger coacervates occurred. The macroscopic consequence was the formation of a thin layer on the tube walls. On the other hand, the structure of coacervates was stabilized by lowering the temperature from 45 to 5 °C. The decrease in temperature did not involve the structural reorganization of LYS and apo α-LA within coacervates to form aggregates. Furthermore, the decrease in temperature favored the formation of dense networks of coacervate clusters without a detectable coalescence phenomenon. Coacervation has been often reported to be a reversible phenomenon (*28*). The stability and partial irreversibility observed for our system could be explained by the rather specific conditions at a particularly low ionic strength, in which these supramolecular structures are formed.

In this study, the interaction between bovine α-lactalbumin and hen egg white lysozyme was investigated at low ionic strengths and neutral pH. In separate solutions, self-assembly to form fibrils under physicochemical stress conditions, e.g., heat or acidic pH, has been reported for both proteins (*35*, *36*). However, no studies were undertaken to determine the behavior of a mix of these homologous proteins under unstressed conditions with the exception of the work published by Ibrahim et al. (*37*). These authors evidenced the formation of dimeric structures between these two proteins at 25 °C. Our study provides the first detailed demonstration of the association between α-LA and LYS with the following main conclusions. (i) LYS interacts specifically with calcium-depleted α-LA. (ii) LYS−apo α-LA interaction occurs at high (45 °C) and low (5 °C) temperatures and leads to the formation of white precipitates. (iii) Reversible aggregates are formed if apo α-LA is in its native form (5 °C), while coacervate-like structures are obtained with the denatured form of apo α-LA (45 °C). These coacervates can be stabilized toward coalescence at low temperatures. Interaction mechanisms of a variety of structural forms of α-LA with various proteins, including chaperone proteins, start to be well-documented (*20*, *38*). An illustration that subtle heat-induced conformational changes in apo α-lactalbumin affect its type of association with lysozyme and lead to drastic changes in the subsequently formed supramolecular structures is given here.

REFERENCES

1. Qasba, P. K., and Kumar, S. (1997) Molecular divergence of lysozymes and α-lactalbumin, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 32*, 255−306.
2. Greene, L. H., Grobler, J. A., Malinovskii, V. A., Tian, J., Acharya, K. R., and Brew, K. (1999) Stability, activity and flexibility in α-lactalbumin, *Protein Eng. 12*, 581−587.
3. Iyer, L. K., and Qasba, P. K. (1999) Molecular dynamics simulation of α-lactalbumin and calcium binding c-type lysozyme, *Protein Eng. 12*, 129−139.
4. McGuffey, M. K., Epting, K. L., Kelly, R. M., and Foegeding, E. A. (2005) Denaturation and aggregation of three α-lactalbumin preparations at neutral pH, *J. Agric. Food Chem. 53*, 3182−3190.

5. Pike, A. C., Brew, K., and Acharya, K. R. (1996) Crystal structures of guinea-pig, goat and bovine α-lactalbumin highlight the enhanced conformational flexibility of regions that are significant for its action in lactose synthase, *Structure 4*, 691−703.
6. Permyakov, E. A., and Berliner, L. J. (2000) α-Lactalbumin: Structure and function, *FEBS Lett. 473*, 269−274.
7. Chrysina, E. D., Brew, K., and Acharya, K. R. (2000) Crystal structures of apo- and holo-bovine α-lactalbumin at 2.2-Å resolution reveal an effect of calcium on inter-lobe interactions, *J. Biol. Chem. 275*, 37021−37029.
8. Kuwajima, K. (1996) The molten globule state of α-lactalbumin, *FASEB J. 10*, 102−109.
9. Griko, Y. V. (2000) Energetic basis of structural stability in the molten globule state: α-Lactalbumin, *J. Mol. Biol. 297*, 1259−1268.
10. Mizuguchi, M., Nara, M., Kawano, K., and Nitta, K. (1997) FT-IR study of the Ca^{2+}-binding to bovine α-lactalbumin: Relationships between the type of coordination and characteristics of the bands due to the Asp COO- groups in the Ca^{2+}-binding site, *FEBS Lett. 417*, 153−156.
11. Redfield, C., and Dobson, C. M. (1988) Sequential ^{1}H NMR assignments and secondary structure of hen egg white lysozyme in solution, *Biochemistry 27*, 122−136.
12. Shih, P., and Kirsch, J. F. (1995) Design and structural analysis of an engineered thermostable chicken lysozyme, *Protein Sci. 4*, 2063−2072.
13. Shih, P., Holland, D. R., and Kirsch, J. F. (1995) Thermal stability determinants of chicken egg-white lysozyme core mutants: Hydrophobicity, packing volume, and conserved buried water molecules, *Protein Sci. 4*, 2050−2062.
14. Ueda, T., Masumoto, K., Ishibashi, R., So, T., and Imoto, T. (2000) Remarkable thermal stability of doubly intramolecularly cross-linked hen lysozyme, *Protein Eng. 13*, 193−196.
15. Caussin, F., Famelart, M. H., Maubois, J. L., and Bouhallab, S. (2003) Mineral modulation of thermal aggregation and gelation of whey proteins: From β-lactoglobulin model system to whey protein isolate, *Lait 83*, 353−364.
16. Campoy, A. V., and Freire, E. (2005) ITC in the post-genomic era...? Priceless, *Biophys. Chem. 115*, 115−124.
17. Schueler-Furman, O., Wang, C., Bradley, P., Misura, K., and Baker, D. (2005) Progress in Modeling of Protein Structures and Interactions, *Science 310*, 638−642.
18. Ladbury, J. E., and Chowdhry, B. Z. (1996) Sensing the heat: The application of isothermal titration calorimetry to thermodynamic studies of biomolecular interactions, *Chem. Biol. 3*, 791−801.
19. Permyakov, S. E., Makhatadze, G. I., Owenius, R., Uversky, V. N., Brooks, C. L., Permyakov, E. A., and Berliner, L. J. (2005) How to improve nature: Study of the electrostatic properties of the surface of α-lactalbumin, *Protein Eng., Des. Sel. 18*, 425−433.
20. Lindner, R. A., Kapur, A., and Carver, J. A. (1997) The interaction of the molecular chaperone, α-crystallin, with molten globule states of bovine α-lactalbumin, *J. Biol. Chem. 272*, 27722−27729.
21. Andersen, S. O. (2002) Characteristic properties of proteins from pre-ecdysial cuticle of larvae and pupae of the mealworm *Tenebrio molitor*, *Insect Biochem. Mol. Biol. 32*, 1077−1087.
22. Nicaise, M., Valerio-Lepiniec, M., Minard, P., and Desmadril, M. (2004) Affinity transfer by CDR grafting on a nonimmunoglobulin scaffold, *Protein Sci. 13*, 1882−1891.
23. Schmitt, C., Sanchez, C., Sobry-Banon, S., and Hardy, J. (1998) Structure and Technofunctional Properties of Protein-Polysaccharide Complexes: A Review, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 38*, 689−753.
24. Ou, Z., and Muthukumar, M. (2006) Entropy and enthalpy of polyelectrolyte complexation: Langevin dynamics simulations, *J. Chem. Phys. 124*, 154902−154911.
25. Irache, J. M., Bergougnoux, L., Ezpeleta, I., Gueguen, J., and Orecchioni, A. M. (1995) Optimization and in vitro stability of legumin nanoparticles obtained by a coacervation method, *Int. J. Pharm. 126*, 103−109.
26. Muiznieks, L. D., Jensen, S. A., and Weiss, A. S. (2003) Structural changes and facilitated association of tropoelastin, *Arch. Biochem. Biophys. 410*, 317−323.
27. Tamburro, A. M., Bochicchio, B., and Pepe, A. (2005) The dissection of human tropoelastin: From the molecular structure to the self-assembly to the elasticity mechanism, *Pathol. Biol. 53*, 383−389.
28. Clarke, A. W., Arnspang, E. C., Mithieux, S. M., Korkmaz, E., Braet, F., and Weiss, A. S. (2006) Tropoelastin massively associates during coacervation to form quantized protein spheres, *Biochemistry 45*, 9989−9996.
29. Hendrix, T., Griko, Y. V., and Privalov, P. L. (2000) A calorimetric study of the influence of calcium on the stability of bovine α-lactalbumin, *Biophys. Chem. 84*, 27−34.
30. Griko, Y. V., and Remeta, D. P. (1999) Energetics of solvent and ligand-induced conformational changes in α-lactalbumin, *Protein Sci. 8*, 554−561.
31. Veprintsev, D. B., Permyakov, S. E., Permyakov, E. A., Rogov, V. V., Cawthern, K. M., and Berliner, L. J. (1997) Cooperative thermal transitions of bovine and human apo-α-lactalbumins: Evidence for a new intermediate state, *FEBS Lett. 412*, 625−628.
32. Wijesinha-Bettoni, R., Dobson, C. M., and Redfield, C. (2001) Comparison of the structural and dynamical properties of holo and apo bovine α-lactalbumin by NMR spectroscopy, *J. Mol. Biol. 307*, 885−898.
33. Dolgikh, D. A., Gilmanshin, R. I., Brazhnikov, E. V., Bychkova, V. E., Semisotnov, G. V., Venyaminov, S. Y., and Ptitsyn, O. B. (1981) α-Lactalbumin: Compact state with fluctuating tertiary structure? *FEBS Lett. 136*, 311−315.
34. Dolgikh, D. A., Abaturov, L. V., Bolotina, I. A., Brazhnikov, E. V., Bychkova, V. E., Gilmanshin, R. I., Lebedev, Y., Semisotnov, G. V., Tiktopulo, E. I., and Ptitsyn, O. B. (1985) Compact state of a protein molecule with pronounced small-scale mobility: Bovine α-lactalbumin, *Eur. Biophys. J. 13*, 109−121.
35. Goers, J., Permyakov, S. E., Permyakov, E. A., Uversky, V. N., and Fink, A. L. (2002) Conformational prerequisites for α-lactalbumin fibrillation, *Biochemistry 41*, 12546−12551.
36. Arnaudov, L. N., and de Vries, R. (2005) Thermally induced fibrillar aggregation of hen egg white lysozyme, *Biophys. J. 88*, 515−526.
37. Ibrahim, H. R., Taniyama, N., and Aoki, T. (2004) Distinct dimerization between α-lactalbumin and lysozyme exhibiting novel antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, *Lett. Drug Des. Discovery 1*, 101−109.
38. Poon, S., Treweek, T. M., Wilson, M. R., Easterbrook-Smith, S. B., and Carver, J. A. (2002) Clusterin is an extracellular chaperone that specifically interacts with slowly aggregating proteins on their off-folding pathway, *FEBS Lett. 513*, 259−266.

BI062129C

1.3. Structure secondaire et tertiaire de l'apo α-LA et du LYS en fonction de la température

1.3.1. Objectif

Le LYS et l'apo α-LA s'assemblent en deux structures supramoléculaires distinctes selon la température. La formation de ces deux différentes structures supramoléculaires a été corrélée avec les modifications de la structure tridimensionnelle de l'apo α-LA. Par conséquent, dans le but de confirmer cette hypothèse, nous avons caractérisé (i) les structures secondaire et tertiaire de l'apo α-LA et du LYS par spectroscopie de fluorescence intrinsèque et dichroïsme circulaire dans une gamme de température s'échelonnant de 5°C à 45°C. En effet, les données bibliographiques montrent que la température de dénaturation de l'apo α-LA est fortement dépendante des conditions physico-chimiques du milieu et notamment de la force ionique (Pfeil et al., 1985).

1.3.2. Résultats

Les structures tridimensionnelles du LYS et de l'apo α-LA ont été étudiées par spectroscopie de fluorescence en suivant l'émission de fluorescence des résidus tryptophane dans une gamme de température s'échelonnant de 10°C à 45°C après excitation à une longueur d'onde de 295 nm. Comme le montre les résultats de la figure 23, la longueur d'onde maximale d'émission ($\lambda_{max\ ém}$) du LYS est de 343 ± 1 nm dans toute la gamme de température étudiée. Par conséquent, l'environnement des résidus tryptophane du LYS n'est pas modifié par l'augmentation de la température, le LYS conservant une structure native.

La $\lambda_{max\ ém}$ de l'apo α-LA à 10°C est de 334 nm, elle est supérieure de 3 nm à celle de l'holo α-LA ($\lambda_{max\ ém}$ = 331 nm) (Figure 23). Cette différence fait état de modifications conformationnelles induites par la déplétion du calcium de l'α-LA. A cette température, la flexibilité de l'apo α-LA est accrue comparativement à celle de l'holo α-LA. L'augmentation de la température entraîne un décalage de la $\lambda_{max\ ém}$ de l'apo α-LA vers les plus grandes longueurs d'onde. Par conséquent, l'augmentation de la température entraîne l'exposition des résidus tryptophane de l'apo α-LA au solvant. Cependant, ce processus peut être divisé en deux phases selon la température : dans la première phase (10°C-30°C), la $\lambda_{max\ ém}$ est légèrement décalée vers les grandes longueurs d'onde pour atteindre une valeur de 336 nm à

30°C, soit un décalage faible mais significatif de 2 nm. Dans la seconde phase (35°C-45°C), l'effet de la température sur la valeur de la $\lambda_{max\ ém}$ est plus important avec un décalage de 7 nm pour atteindre une valeur de 343 nm à 45°C (Figure 23). Par conséquent, l'augmentation de la température modifie fortement la structure tridimensionnelle de l'apo α-LA en provoquant son dépliement. A 45°C, la $\lambda_{max\ ém}$ de l'holo α-LA est décalée de 3 nm comparativement à 10°C pour atteindre une valeur de 334 nm, la conformation de l'holo α-LA subit de légères modifications à 45°C.

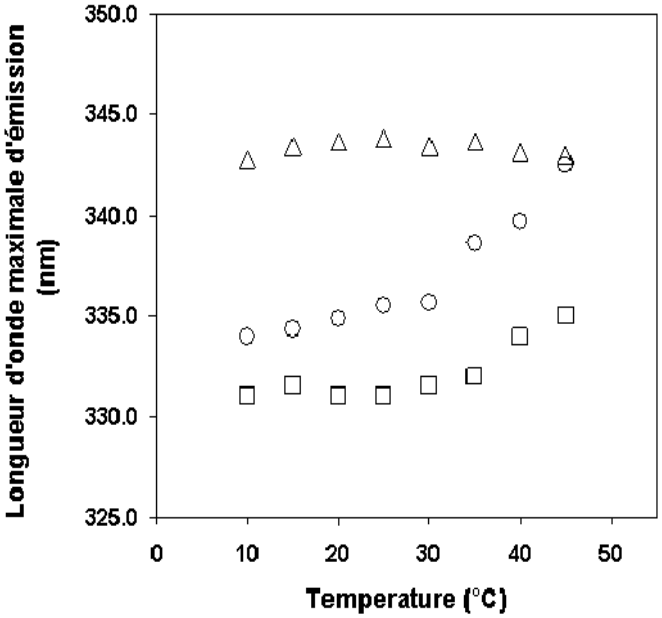

Figure 23. Longueur d'onde maximale d'émission des résidus tryptophanes du LYS (Δ), de l'holo α-LA (□) et de l'apo α-LA (○) en fonction de la température après excitation à 295 nm. Les spectres étaient acquis pour une concentration protéique de 0.03 $g.l^{-1}$ dans un tampon 30 mM Tris/HCl (pH 7,5), 15 mM NaCl.

Afin de mieux spécifier les modifications structurales de l'apo α-LA par la température, la protéine a été étudiée à 10°C et 45°C par dichroïsme circulaire dans l'UV lointain et l'UV proche pour caractériser respectivement ses structures secondaire et tertiaire. Les résultats sont présentés dans la figure 24. Les spectres d'UV lointain de l'apo α-LA à 10°C et 45°C sont caractérisés par un minimum d'ellipticité molaire à une longueur d'onde de 208 nm représentatif d'une protéine structurée en hélices (Figure 24A). De plus, l'augmentation de la température de 10°C à 45°C s'accompagne d'une diminution de

l'éllipticité molaire à une longueur d'onde de 220 nm. Par conséquent, la structure secondaire de l'apo α-LA est légèrement affectée par l'augmentation de la température.

Le spectre dans l'UV proche de l'apo α-LA à 10°C est caractérisé par un signal négatif intense caractéristique à une longueur d'onde de 270 nm, proche de celui de la forme native de la protéine (holo α-LA). L'augmentation de la température de 10°C à 45°C induit une diminution d'un facteur 4 de l'ellipticité molaire de l'apo α-LA à une longueur d'onde de 270 nm (Figure 24B). Ce résultat est en adéquation avec ceux précédemment obtenus (Veprintsev et al., 1997; Griko et al., 1999; Polverino de Laureto, Frare, Gottardo, van Dael, & Fontana, 2002; Bushmarina, Blanchet, Vernier, & Forge, 2006).

Par conséquent, l'augmentation de la température de 10°C à 45°C induit des modifications importantes de la structure tertiaire de l'apo α-LA. A 45°C, l'apo α-LA adopte une structure de type « molten globule » caractérisée par une flexibilité accrue de la protéine (Griko et al., 1999; Greene et al., 1999; Bai, Song, Luo, & Peng, 2001).

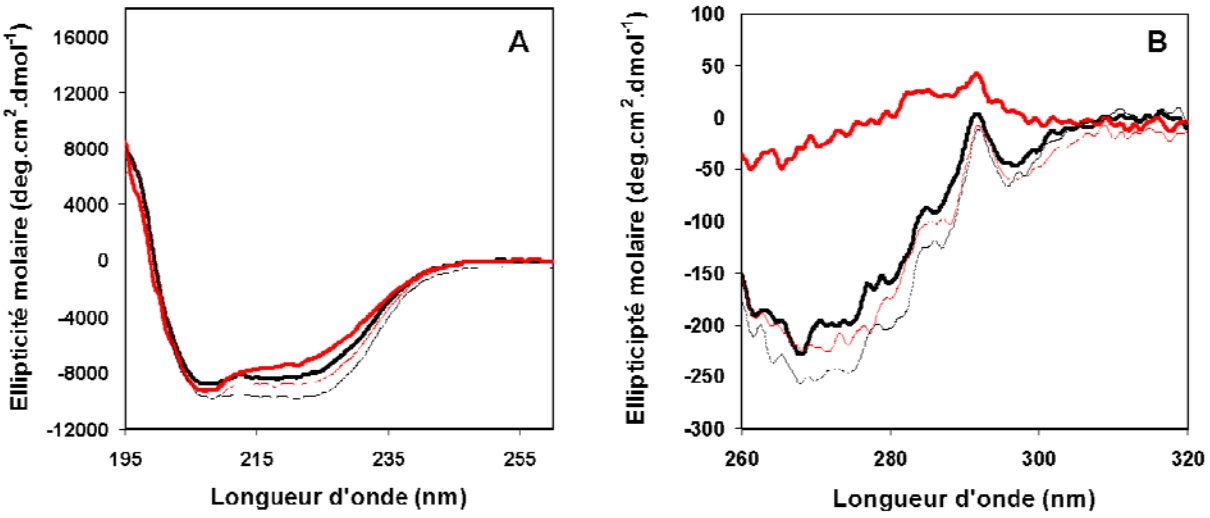

Figure 24. Spectres de dichroïsme circulaire de l'apo α-LA (gras) et de l'holo α-LA (fin) à 10°C (–) et 45°C (–) dans l'UV lointain (A) et le proche UV (B). Les spectres étaient acquis pour une concentration protéique de 0,148 et 1,48 $g.L^{-1}$ respectivement dans l'UV lointain et l'UV proche et dans un tampon 30 mM Tris/HCl (pH 7,5), 15 mM NaCl.

1.4. Structures supramoléculaires résultant de l'assemblage entre l'apo α-LA et le LYS en fonction de la température

1.4.1. Objectif, stratégie et matériels et méthodes

L'assemblage supramoléculaire entre l'apo α-LA et le LYS résulte en la formation d'agrégats amorphes et hétérogènes à 5°C, et de particules sphériques à 45°C (article 1). Dans le but de déterminer la température de transition pour la formation de ces deux structures supramoléculaires, nous avons étudié par microscopie la morphologie des structures supramoléculaires formées entre l'apo α-LA et le LYS dans une gamme de température s'échelonnant de 5°C à 45°C. Les structures supramoléculaires étaient formées à concentration protéique totale de 0,15 mM et un rapport équimolaire en LYS et apo α-LA.

1.4.2. Résultats

Les structures supramoléculaires résultant de l'assemblage entre le LYS et l'apo α-LA en fonction de la température sont présentées dans la figure 25. Des agrégats sont formés lors du mélange de ces deux protéines pour des températures comprises entre 5°C et 25°C, alors que pour des températures supérieures à 30°C, ces protéines s'assemblent pour former des structures sphériques (Figure 25). A 30°C, les protéines s'assemblent également pour former des agrégats ; cependant, ces agrégats diffèrent de ceux formés à plus basse température de part leur morphologie, la densité du réseau protéique et une « luminosité » plus proche de celle des microsphères. Par conséquent, ces agrégats semblent correspondre à une structure intermédiaire entre les agrégats formés à plus basse température et les structures sphériques formées à des températures plus élevées.

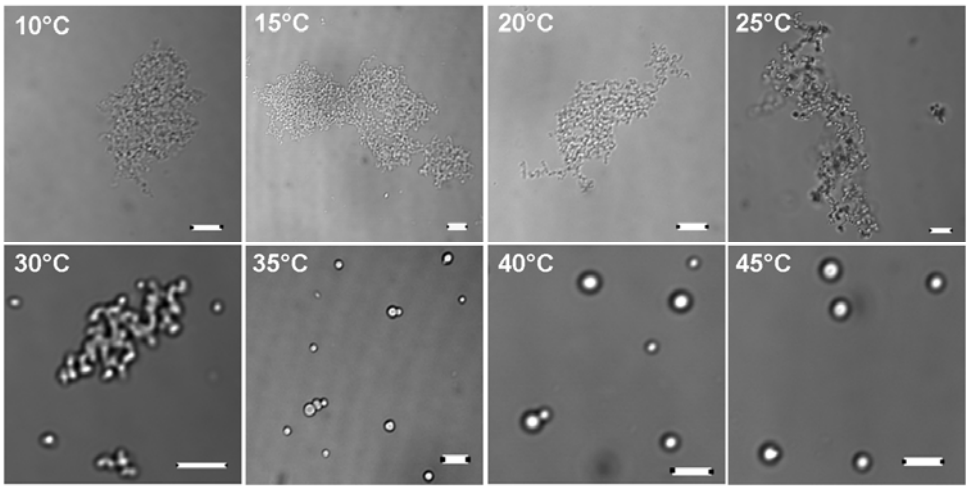

Figure 25. Observation par microscopie optique des structures supramoléculaires résultant de l'assemblage entre le LYS et l'apo α-LA en fonction de la température. Les barres d'échelle sont de 5 µm (10°C, 15°C, 20°C et 25°C) et 3 µm (30°C, 35°C, 40°C et 45°C).

1.5. Article 2 : projet de publication

Molecular interaction between apo or holo α-Lactalbumin and Lysozyme: formation of heterodimers as assessed by fluorescence measurements

Michaël Nigen, Thomas Croguennec, Saïd Bouhallab*

INRA-agrocampus Rennes, UMR 1253, STLO, 65 rue de Saint-Brieuc, F-35042, Rennes, France

Véronique Le Tilly

Laboratoire des Polymères, Propriétés aux Interfaces et Composites, Université de Bretagne-Sud, Campus de Tohannic, F-56017 Vannes, France

* To whom correspondence should be addressed: Tel: 00 33 (0)2 23 48 57 42. Fax: 00 33 (0)2 23 48 53 50. E-mail: said.bouhallab@rennes.inra.fr

ABSTRACT

In a previous work, we reported that contrary to native calcium-loaded α-lactalbumin (holo α-LA), calcium-depleted form (apo α-LA) has the ability to self-assemble with lysozyme (LYS) to form different supramolecular structures in temperature-dependent manner. In this study, we examine what happens at molecular scale using fluorescence techniques. Fluorescence anisotropy coupled with fluorescence lifetime measurements provides a means to measure intermolecular interactions. It was shown that LYS interacts with both apo α-LA and holo α-LA to form oligomers, assumed to be heterodimers, at 10°C and 45°C. The dissociation constants for dimerization were found to be in the μM range and increased significantly with increasing ionic strength from 39 to 124 mM. Although the binding constants of holo α-LA – LYS and apo α-LA – LYS complexes were of the same order of magnitude, the shape or conformation of formed heterodimers differed as assessed by fluorescence parameters in particular correlation time calculations. Such conformation differences could explain why holo α-LA – LYS complexes are trapped as heterodimers while the apo α-LA – LYS complexes have the ability to further self-assemble into various supramolecular structures.

Keywords: α-lactalbumin; lysozyme; interactions; heterodimers, fluorescence

INTRODUCTION

The spontaneous and hierarchical protein self-assembly into supramolecular structures apart those related to neurodegenerative diseases is considered as a powerful and endless way for the development of nano- to micro-meters tools designed to deliver new functionalities (Ipsen, Otte, & Qvist, 2001; Zhang, 2003; Viney, 2004; Sanguansri & Augustin, 2006). Self-assembly results from complex and various intermolecular interactions of weak energy (hydrogen bonding, electrostatic interactions, Van der Waals interactions, etc.) shared between proteins into the overall structure. Depending on the balance of the interactions, different supramolecular structures are formed as shown for α-lactalbumin that arrange into fibrils, spherical particles or aggregates according to the physico-chemical conditions of the medium (Takase, 1998; Ipsen et al., 2001; Goers, Permyakov, Permyakov, Uversky, & Fink, 2002; Nigen, Croguennec, Renard, & Bouhallab, 2007). Hence, understanding the driving forces that trigger protein self-assembly and the successive steps leading to the building of supramolecular structures is of paramount importance for controlling their shape, size and properties.

Recently, we evidenced the self-assembly of two oppositely charged proteins, apo α-lactalbumin (apo α-LA) and lysozyme (LYS), into different supramolecular structures according temperature: spherical particles and amorphous aggregates were formed at 45°C and 10°C, respectively (Nigen et al., 2007). In contrast, calcium loaded α-lactalbumin (holo α-LA) and LYS did not lead to supramolecular structures when they were mixed together under the same physico-chemical conditions. Protein self-assembly into supramolecular structures usually requires a protein destabilisation or the formation of specific protein oligomers (nuclei) (Chiti & Dobson, 2006). Hence, from our previous work, α-LA destabilisation through the release of bound Ca^{2+} seems to be an important parameter for the formation of structures at macroscopic level. However, the formation of LYS/apo α-LA specific oligomer at the initial step of the interaction as a building block cannot be excluded yet as an equimolar ratio between the two proteins was found within the supramolecular structures whatever the initial proteins concentrations (Nigen et al., 2007). Furthermore, Ibrahim et al. evidenced a specific α-LA – LYS heterodimer by cross-linking reaction (Ibrahim, Taniyama, & Aoki, 2004). In this paper, using fluorescence anisotropy, we confirmed that LYS and apo α-LA but also LYS and holo α-LA self-assemble as heterodimers whatever the temperature studied. For each conditions studied, the dissociation constant of the interaction was determined. Combined with fluorescence lifetime

measurements, interesting new features for the overall mechanism leading to LYS/apo α-LA supramolecular structures emerged. Specific conformational properties of LYS – apo α-LA heterodimers that drive their subsequent self-assembly toward different and specific supramolecular structures are suggested.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Commercial LYS was purchased from Ovonor and contained 95 % of LYS and 3 % of chloride ions. Holo α-LA was purified from bovine whey as reported by Caussin et al (Caussin, Famelart, Maubois, & Bouhallab, 2003). Apo α-LA was prepared by dialysis of a solution of holo α-LA against deionised water at pH 3 during 48h at 4°C using a 6-8000 Da nominal cut off membrane (Spectrum Laboratories, US & Canada) in order to remove calcium ions. Then, pH of the apo α-LA solution was adjusted to pH 7 with 1 M NaOH and freeze-dried; the apo α-LA powder contained less than 2 % of calcium ($mol.mol^{-1}$). 5-Dimethylamino-1-naphthalenesulfonyl chloride (Dansyl chloride, DNS-Cl) was purchased from molecular probes, Invitrogen, France.

Preparation of protein solutions

Stock solutions of LYS, holo α-LA and apo α-LA were prepared by solubilisation of protein powders in 30 mM Tris/HCl buffer (pH 7.5) containing 15 mM or 100 mM NaCl to obtain a final ionic strength of 39 or 124 mM, respectively. They were filtered through a 0.2 µm membrane. The protein concentration was determined by measuring the absorbance at 280 nm using extinction coefficients of 28514 $L.mol^{-1}.cm^{-1}$ for holo α-LA and apo α-LA, and 37752 $L.mol^{-1}.cm^{-1}$ for LYS. Experiments were conducted at 10°C or 45°C after the stock solutions were equilibrated at the desired temperature.

Protein labelling

LYS, holo α-LA and apo α-LA were labelled separately using dansyl chloride. The labelling was achieved as follows. Proteins were solubilised at a concentration of 0.13 mM in 30 mM Tris/HCl (pH 9) buffer containing 15 mM NaCl. Subsequently, 25 µl of DNS-Cl dissolved in dimethylformamide at a concentration of 23.9 mM was added to the protein

solution (800 µl), giving a DNS:protein molar ratio of 6. The labelling reaction occurred at room temperature during 10 minutes. Free DNS-Cl was separated from labelled proteins (DNS-proteins) on a Sephadex G-25 column pre-equilibrated with 30 mM Tris/HCl (pH 7.5) buffer containing 15 mM NaCl. Then, labelled protein solutions were dialysed against 30 mM Tris/HCl (pH 7.5) buffer containing 15 mM or 100 mM NaCl using a dialysis membrane with a nominal cut-off of 6-8000 Da. Stoechiometries of labelling for apo α-LA-DNS, holo α-LA-DNS and LYS-DNS were determined by measuring the absorbance of the solutions at 280 and 340 nm and using the same extinction coefficients as above for proteins and 4500 $L.mol^{-1}.cm^{-1}$ for dansyl chloride. Apo α-LA-DNS, holo α-LA-DNS and LYS-DNS stoechiometries were found to be about 0.85.

Lifetime measurements (τ_F)

Fluorescence lifetime measurements were carried out on an Edinburgh Instruments (FLS 920) spectrofluorimeter in photon-counting mode equipped with a temperature-controlled cell connected to a circulating water bath. The excitation and emission wavelengths were 340 and 470 nm, respectively. Measurements were done with dansyl-labelled α-LA (apo or holo form) at a concentration of 1×10^{-6} $mol.L^{-1}$, and with a protein mixture solution containing dansyl-labelled α-LA (apo or holo form) at a concentration of 1×10^{-6} $mol.L^{-1}$ and unlabelled LYS at a concentration of 1×10^{-4} $mol.L^{-1}$. The lifetime values were obtained from the reconvolution fit analysis using a double-exponential decay function of the decay profiles with F900 analysis software. The goodness of fit was evaluated by the reduced χ^2 value (close to 1 in all case). As the dansyl labelled to α-LA exhibited two different lifetime values, the average fluorescence lifetime (τ_F) was calculated by taking into account the amplitude α_i of the *i*th component lifetime τ_{F_i} according to the following equation (Lipari & Szabo, 1980):

$$\tau_F = \frac{\Sigma_i \alpha_i \tau_{F_i}^{\ 2}}{\Sigma_i \alpha_i \tau_{F_i}} \qquad [1]$$

Fluorescence anisotropy measurements (*A*)

Dansyl fluorescence anisotropy measurements were monitored at an excitation wavelength of 340 nm using a SLM8100 spectrofluorimeter equipped with a temperature-controlled cell connected to a circulating water bath. The fluorescence emission (λ = 470 nm) was recovered through a GG455 filter (Oriel) to remove the excitation light

scattering. For these experiments, the labelled protein (1×10^{-6} mol.L^{-1}) was titrated with unlabelled protein at a concentration varying from 1×10^{-7} to 1×10^{-3} mol.L^{-1}.

The steady-state anisotropy (A) is given by:

$$A = \frac{I_{VV} - G \times I_{VH}}{I_{VV} + G \times 2I_{VH}} \qquad [2]$$

where I_{VV} and I_{VH} are the intensities measured with vertically polarized excitation, as indicated by the first subscript, and detected through vertically or horizontally oriented emission polarisers, respectively, as indicated by the second subscript. G corresponds to a geometry factor that corrects for instrument. The G factor is measured using horizontally polarized excitation and is given by the following expression: $G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}}$.

Experimentally, the steady-state anisotropy depends on the correlation time (τ_c) of the probes bound to proteins free or involved in a complex, the fluorescence lifetime of the fluorescent probe (τ_F) and the limiting anisotropy (A_0 = 0.31 for dansyl probe, (Weber, 1952), corresponding to the angle between the probe's excitation and emission transition dipoles) as indicated in the equation below:

$$A = \frac{A_0}{1 + \tau_F / \tau_c} \qquad [3]$$

Analysis of fluorescence data

For fluorescence data analysis, an equilibrium between two globular proteins (α-LA-DNS and LYS) leading to a heterodimer (α-LA-DNS – LYS) was used.

The dissociation constant, K_D of the equilibrium, as labelled α-LA and labelled α-LA – LYS heterodimer anisotropy values, is reached by fitting the data of the steady-state anisotropy titration curve using the equation [4] below:

$$A = \left[1 - \frac{([P]_t + [L]_t + K_D) - \sqrt{([P]_t + [L]_t + K_D)^2 - 4[L]_t[P]_t}}{2[P]_t} \right] \times A_P + \left[\frac{([P]_t + [L]_t + K_D) - \sqrt{([P]_t + [L]_t + K_D)^2 - 4[L]_t[P]_t}}{2[P]_t} \right] \times A_{PL}$$

with A_P and A_{PL}, the anisotropy values of α-LA-DNS and α-LA-DNS – LYS heterodimer, respectively, and $[P]_t$ and $[L]_t$, the total concentrations of α-LA and LYS, respectively.

From experimental fluorescence anisotropy and fluorescence lifetime measurements, the value of the correlation time (τ_c) was reached for each labelled proteins and labelled complexes using equation [3]. τ_c (s) was used to estimate the molecular mass (M_w, g.mol^{-1}) of the labelled proteins and complexes (α-LA-DNS – LYS) in order to check the consistency with the assumption of the above equilibrium:

$$M_w = \frac{\tau_c \times k_B \times T \times N}{\eta \times (\nabla + h)} \times f \qquad [5]$$

with k_B (J.K^{-1}) boltzmann constant; T (Kelvin), the temperature; N (mol^{-1}), Avogadro number; η (Pa.s), the viscosity (1.3215×10^{-3} Pa.s at 10°C and 0.60256×10^{-3} Pa.s at 45°C); ∇ (m^3.kg^{-1}), the specific partial volume of the protein; h, the hydration shell of the protein and f, a form factor (Egelhaaf et al., 2000). The values of 0.72× 10^{-3} m^3.kg^{-1} and 0.38 × 10^{-3} m^3.kg^{-1} were used for specific partial volume and hydration shell, respectively (Cantor & Schimmel, 1980; Kharakoz & Bychkova, 1997)).

RESULTS

Fluorescence lifetime measurements

The fluorescence lifetime of the dansyl probe bound to α-LA (τ_F) depends on its interactions with the local environment. The N-terminal residue of α-LA being exposed on the protein surface, the fluorescence lifetime of the probe bound to the protein is expected to be close to the intrinsic fluorescence lifetime of the free probe in solution ($\tau_F = 13.3$ ns at 10°C and 13 ns at 45°C, data not shown).

Proteins	$A_{mesurée}$		τ_F (ns)		K_D ($\times 10^{-6}$ mol.L^{-1})		τ_c (ns)		M_w (g.mol^{-1})	
	T = 10°C	T = 45°C	T = 10°C	T = 45°C	T = 10°C	T = 45°C	T = 10°C	T = 45°C	T = 10°C	T = 45°C
apo α-LA*	0.1031±0.0003	0.0717±0.0003	14.04	12.63			6.98	3.82	11189	15103
holo α-LA*	0.1032±0.0003	0.0721±0.0004	13.82	14.18			6.99	4.14	11207	16348
apo α-LA* – LYS	0.1394±0.0008	0.1333±0.0011	11.13	10.21	5.6±1	26.4±6.4	8.99	7.63	14417	30167
holo α-LA* – LYS	0.1468±0.0005	0.1294±0.0181	11.23	11.31	5.0±0.4	16.3±3.4	9.80	8.17	15727	32288

Table 1. Fluorescence Parameters of dansyl-labelled α-LA (apo and holo form) alone and after their interaction with lysozyme. A concentration of 1×10^{-6} mol.L^{-1} of Dansyl-labelled α-LA (apo or holo form) was titrated with increasing concentration of unlabelled LYS until 10^{-4} mol.L^{-1} in the reaction mixture. Fluorescence experiments were performed in 30 mM Tris/HCl (pH 7.5) buffer containing 15 mM NaCl at 10°C and 45°C.

The asterisk (*) indicates dansyl-labelled protein. Molecular weight and dissociation constant of dansyl-labelled α-LA and dansyl-labelled α-LA – LYS complexes were derived from fluorescence lifetimes and fluorescence anisotropy values.

In the absence of LYS, the fluorescence lifetime of the probe bound to apo α-LA decreases as the temperature is increased from 10°C to 45°C (τ_F = 14.04 ns and τ_F = 12.63 ns, respectively) (Table 1), indicating a modification in the local environment at or near the probe binding site. In contrast, such temperature dependent transition does not lead to the same modification in the local environment of the probe bound to the calcium loaded α-LA protein (τ_F = 13.82 ns at 10°C and τ_F = 14.18 ns at 45°C) (Table 1). In addition, at 10°C, whatever the α-LA state, apo α-LA or calcium loaded α-LA, the local environments of the probe bound to α-LA are nearly similar (13.82 ns and 14.04 ns, respectively) (Table 1). These results are not surprising since the flexibility of the apo α-LA form is strongly affected by the temperature. At 10°C, apo α-LA adopts a conformation close to that of holo α-LA, while increasing the temperature to 45°C shifts the protein conformation to a "molten globule", more flexible state (Veprintsev et al., 1997; Griko & Remeta, 1999; Bushmarina, Blanchet, Vernier, & Forge, 2006). This transition was confirmed by circular dichroism (data not shown). In this temperature range, the conformation of holo α-LA was not affected to the same extent.

In the presence of LYS, the local environment of the probe bound to α-LA was changed in every case, suggesting an interaction between LYS and α-LA (holo and apo forms) at both studied temperatures. These results confirm the previous cross-link experiments where the existence of a specific heterodimer resulting from the interaction between LYS and holo α-LA or apo α-LA was demonstrated (Ibrahim et al., 2004). Fluorescence lifetime measurements indicates that the local environment of the dansyl involved in the labelled holo α-LA – LYS complex was similar whatever the temperature studied (10°C or 45°C) (Table 1). In addition, at 10°C, the local environment of the probe involved in the apo α-LA – LYS complex was identical to that of holo α-LA – LYS complex. In contrast, at 45°C, the measured fluorescence lifetime for labelled apo α-LA – LYS complex is lower than that of labelled holo α-LA – LYS complex; this result indicates a distinct local environment of the probe in these two complexed α-LA – LYS forms at 45°C.

Fluorescence anisotropy of dansyl-labelled α-LA titration with LYS.

Fluorescence anisotropy was used to probe the interaction between LYS and dansyl-labelled α-LA in order to determine the dissociation constant (K_D) and get clues about the nature of the complexes formed between these two proteins. From Ibrahim (Ibrahim et al., 2004) results and our fluorescence anisotropy profiles, we assumed the simplest equilibrium

in which α-LA interacts with LYS for giving a α-LA – LYS heterodimer complex. The fluorescence anisotropy profiles were analyzed by using equation [4] (see Materials and Methods section) and the extracted parameters are displayed in Table 1.

Temperature effect on the apo α-LA – LYS interaction

Apo α-LA – LYS equilibrium binding curves obtained at low ionic strength (I = 39 mM) and temperatures of 10°C and 45°C are shown in Figure 1. The fluorescence anisotropy values of dansyl-labelled apo α-LA were 0.103 and 0.072 at 10°C and 45°C, respectively. This difference may be due to a distinct conformation of apo α-LA and/or only due to higher dynamical Brownian diffusion at 45°C. At 10°C and 45°C, the anisotropy value of dansyl-labelled apo α-LA increased to 0.18 with increasing LYS concentrations from $2x10^{-7}$ to 10^{-3} $mol.L^{-1}$. The same results were obtained when dansyl-labelled LYS was titrated by apo α-LA in the same protein concentration range and temperature conditions (data not shown). Whatever the temperature, the apo α-LA – LYS binding curves exhibit a bi-phasic pattern: a first phase was observed for LYS concentrations ranging from 10^{-7} to 10^{-4} $mol.L^{-1}$, and a second one for LYS concentrations above 10^{-4} $mol.L^{-1}$. To understand what is occurring in this range of protein concentrations, dansyl-labelled apo α-LA was titrated with unlabelled apo α-LA (Figure 1) and dansyl-labelled LYS with unlabelled LYS at 10°C and 45°C (data not shown). At these temperatures, the obtained titration curves were rigorously identical.

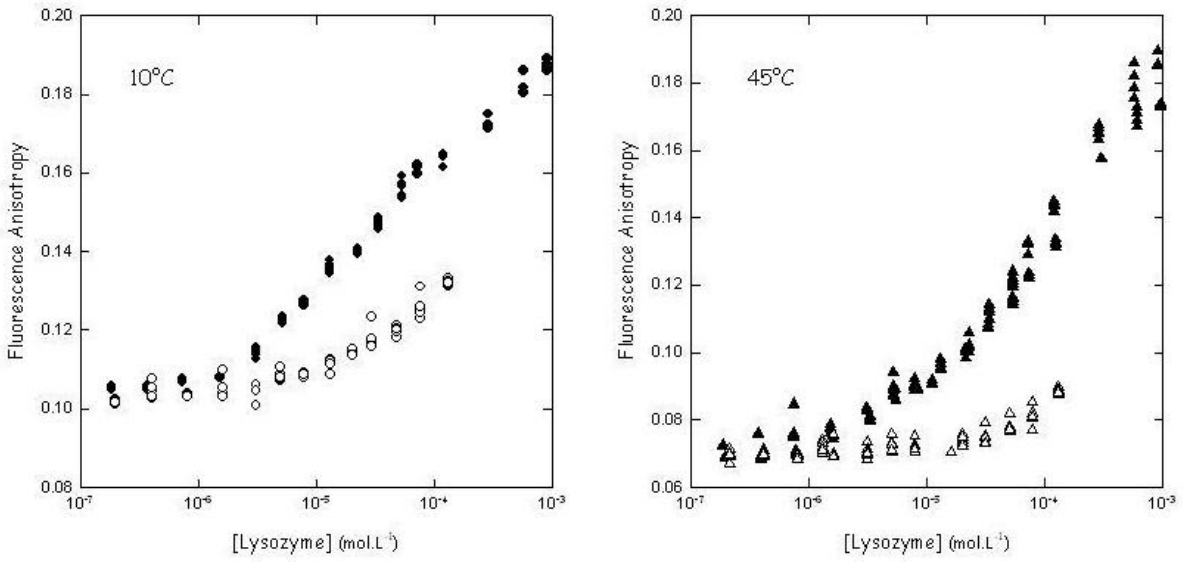

Figure 1. Apo α-LA – LYS (closed symbols) and LYS – LYS (opened symbols) binding curves at 10°C and 45°C. [DNS labelled-protein]=$1x10^{-6}$ $mol.L^{-1}$. The ionic strength of the solution was 39 mM.

Interestingly, they did not display a final plateau with the increase of LYS concentration and the fluorescence anisotropy values took off only when unlabelled-protein concentration of 10^{-5} mol.L^{-1} was reached. Hence, these results gave evidence that the first phase of the dansyl-labelled apo α-LA – LYS binding curves corresponds to a specific interaction between apo α-LA and LYS, while the second phase is due to a non-specific interaction or a non-specific signal. In a previous fluorescence study of the R2R3-DNA interaction, it was shown that both a specific complex (1:1 R2R3-DNA stoechiometry) and a nonspecific complex are formed depending on the ranges of the protein and DNA concentrations (Jamin et al., 1996). The occurrence of such a second phase could also be due to diffusion phenomena induced by high concentration of added unlabelled protein. Hence, the equilibrium binding curves for the sole apo α-LA – LYS interaction at 10°C and 45°C were generated after subtracting the non-specific contributions to the experimental apo α-LA – LYS equilibrium binding curves (Figure 2).

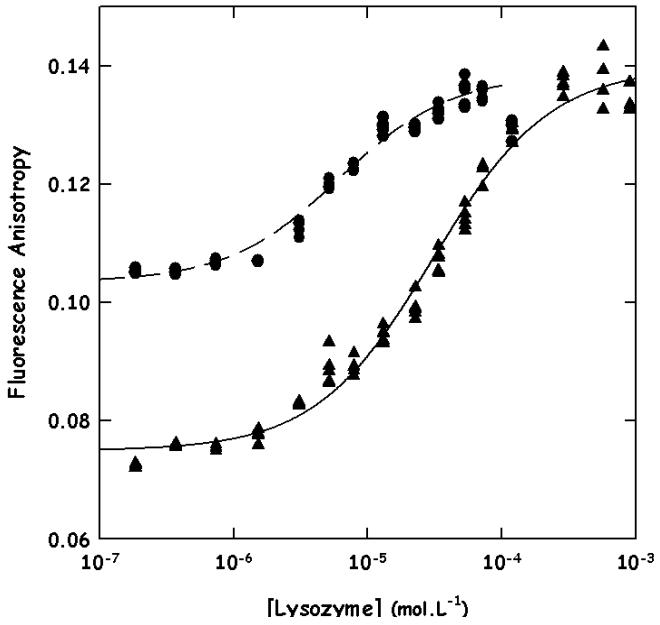

Figure 2. Apo α-LA – LYS specific binding curves at 10°C (●) and 45°C (▲). [DNS-apo α-LA] = 1x10^{-6} mol.L^{-1}. The ionic strength of the solution was 39 mM.

These curves were characterised by final plateau values for fluorescence anisotropy of 0.139 and 0.133 for a LYS concentration of 10^{-4} and 5×10^{-4} mol.L^{-1} at 10°C and 45°C, respectively. These final values are of the same order of magnitude than those observed for the association of hemoglobin into a dimeric state with a molecular mass of 32 kDa (Pin,

Royer, Gratton, Alpert, & Weber, 1990). Thus, the final fluorescence anisotropy values obtained in this study are consistent with the formation of an apo α-LA – LYS heterodimer. The fitted data, by using equation [4], have allowed us to determine the binding constant between apo α-LA and LYS at both temperatures. The dissociation constant values of $5.6x10^{-6}$ $mol.L^{-1}$ and $26.4x10^{-6}$ $mol.L^{-1}$ were obtained for apo α-LA – LYS interactions at 10°C and 45°C, respectively.

Temperature effect on the holo α-LA – LYS interaction

Whatever the temperature (10°C and 45°C), the experimental fluorescence anisotropy titration profiles of dansyl-labelled holo α-LA with LYS were similar to those obtained for dansyl-labelled apo α-LA titrated with LYS under the same conditions (Figure 3). Furthermore, the titration of dansyl-labelled holo α-LA with unlabeled holo α-LA also displayed the same binding profile than dansyl-labelled apo α-LA with apo α-LA and dansyl-labelled LYS with LYS (Figure 3).

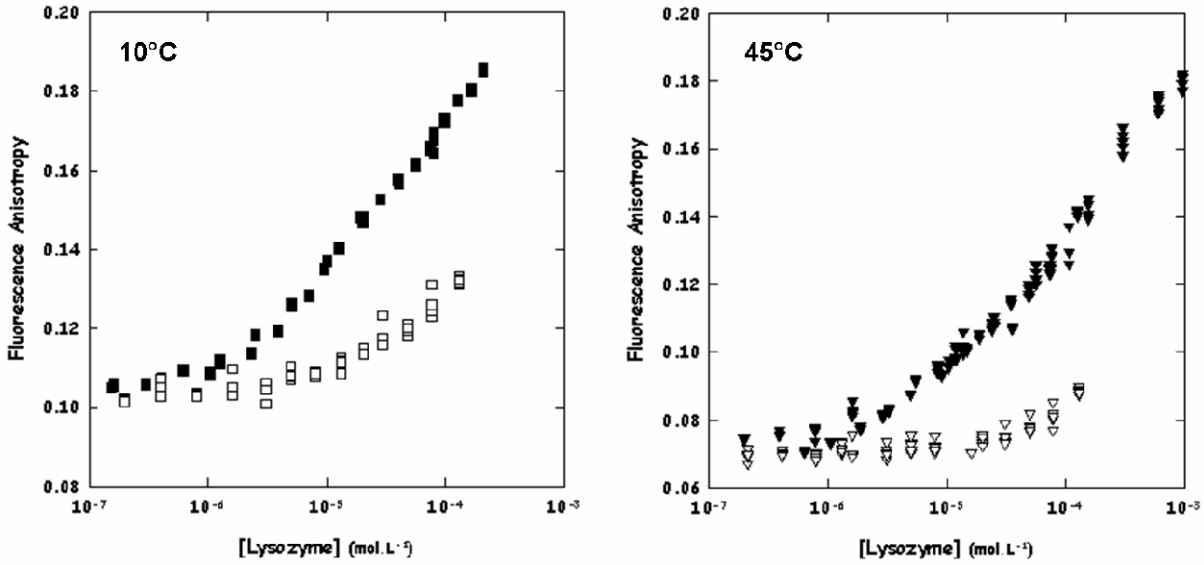

Figure 3. Holo α-LA – LYS (closed symbols) and LYS – LYS (opened symbols) binding curves at 10°C and 45°C. [DNS labelled-protein] = $1x10^{-6}$ $mol.L^{-1}$. The ionic strength of the solution was 39 mM.

Hence, experimental dansyl-labelled holo α-LA – LYS binding curves also exhibited a non-specific contribution. Consequently, specific binding curves of dansyl-labelled holo α-LA with LYS were obtained by subtracting the non-specific contributions from the

experimental holo α-LA – LYS equilibrium binding curves (Figure 4). Using equation [4], the calculated dissociation constants of holo α-LA – LYS complexes at 10°C and 45°C were $5.0x10^{-6}$ mol.L^{-1} and $16.3x10^{-6}$ mol.L^{-1}, respectively (Table 1). The Gibbs free energy (ΔG°) of the apo α-LA and holo α-LA with LYS was calculated from binding constants using the relation: $\Delta G° = - R.T.LnK_{eq}$. As shown in Table 2, the formation of both apo α-LA – LYS and holo α-LA – LYS complexes were spontaneous as underlined by the negative values of ΔG°.

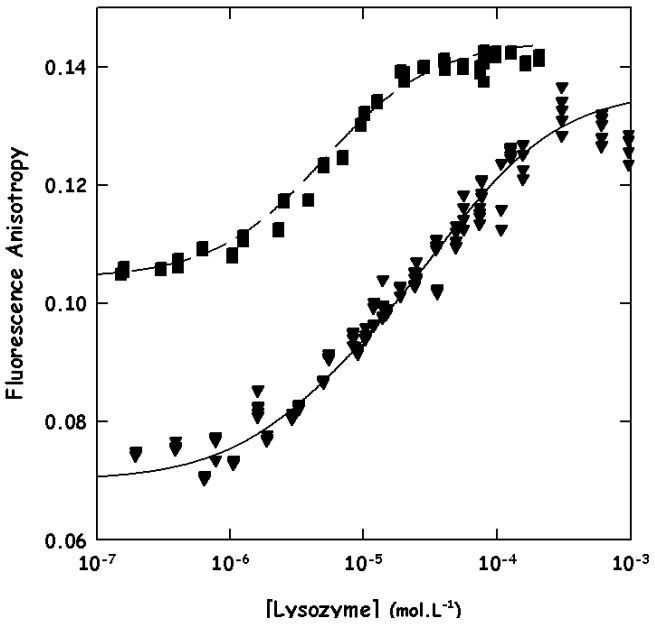

Figure 4. specific holo α-LA – LYS binding curves at 10°C (■) and 45°C (▼). [DNS-apo α-LA] = $1x10^{-6}$ mol.L^{-1}. The ionic strength was 39 mM.

Salt effect on the apo and holo α-LA/LYS interaction

A previous study evidenced the influence of the ionic strength on the supra-molecular structure formation resulting from apo α-LA and LYS assembly (Nigen et al., 2007). Hence, to investigate the contribution of electrostatic interactions between α-LA (apo and holo forms) and LYS at molecular level (heterodimer formation), fluorescence anisotropy

experiments were performed at ionic strength of 124 mM and 45°C. The equilibrium binding curves for apo α-LA – LYS and holo α-LA – LYS titrations obtained after subtraction of the non-specific contributions are shown in Figure 5. For both protein interaction systems, the binding curves were shifted towards the higher LYS concentrations as compared to those obtained for apo α-LA – LYS and holo α-LA – LYS interactions at lower ionic strength (39 mM). Moreover, the binding curves obtained at ionic strength of 124 mM were characterised by the absence of a saturation phase after the addition of LYS to apo α-LA or holo α-LA in this range of LYS concentration (from 10^{-7} to 10^{-3} mol.L^{-1}). Hence, a fraction of apo α-LA or holo α-LA was left uncomplexed at the end of the titration performed at an ionic strength of 124 mM. Even if the binding curves of apo α-LA – LYS and holo α-LA – LYS complexes were characterised by the absence of a saturation phase, they were fitted using the same equation [4]. The recovered dissociation constants from apo α-LA – LYS and holo α-LA – LYS titration curves yielded values of 1.6×10^{-4} mol.L^{-1} and 3.9×10^{-4} mol.L^{-1}, respectively. The comparison of K_D values obtained at the two ionic strengths indicates that increasing ionic strength from 39 to 124 mM results in a significantly decrease of interaction and affinity between apo α-LA or holo α-LA and LYS at 45°C. The lower affinity between LYS and the two forms of α-LA at high ionic strength is accompanied by less negative values for ΔG° which express unfavourable interaction (Table 2).

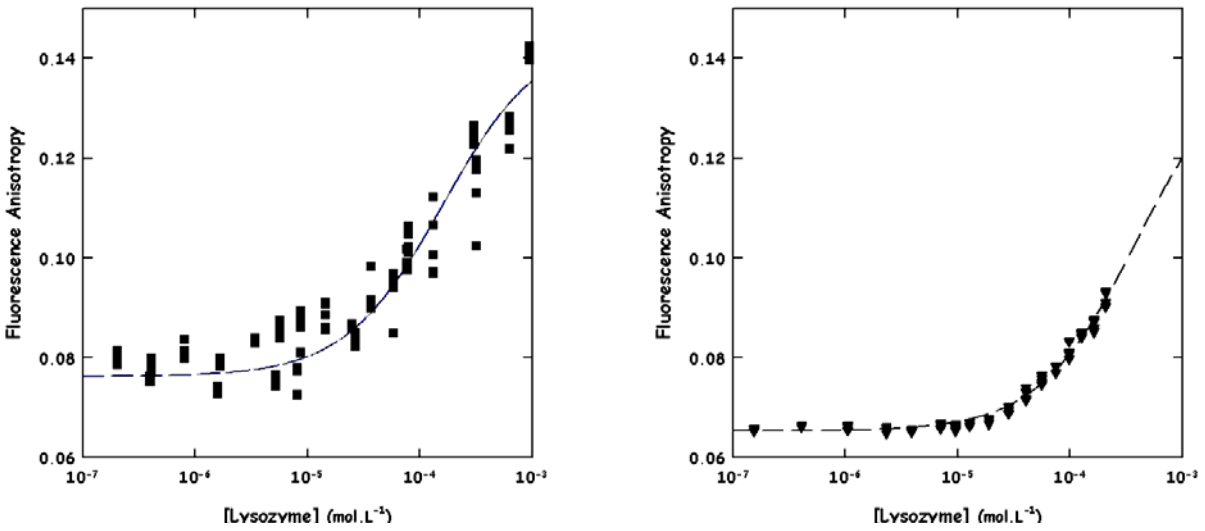

Figure 5. Specific binding curves of apo α-LA – LYS (■) and holo α-LA – LYS (▼) for an ionic strength of 124 mM at 45°C.

Protein	Temperature (K)	Ionic strength (M)	K_D (µM)	ΔG° (kJ.mol^{-1})	ΔS° (J.mol^{-1}.K^{-1})*	ΔH° (kJ.mol^{-1})*
Apo α-LA	283	39	5.6	- 28.4	- 16	- 33
	318	39	26.1	- 27.9		
	318	124	160	- 23.1		
Holo α-LA	283	39	5.0	- 28.7	+ 12.1	- 25.3
	318	39	16.3	- 29.1		
	318	124	390	- 20.7		

Table 2. Binding and thermodynamic parameters of the interaction of holo and apo α-LA with LYS at pH 7.5. Binding constants were calculated from fluorescence anisotropy measurements. Thermodynamic parameters were deduced from the relation: $\Delta G° = \Delta H° - T\Delta S°$ and Van't Hoff equation: $\text{Ln } K_{eq} = -\Delta H°/RT + \Delta S°/R$ with the assumption that the enthalpy changes (ΔH°) do not vary significantly over the temperature range studied.

Correlation time and Molecular masses estimation

The correlation time results from a calculation including lifetime measurements and fluorescence anisotropy values (equation [3]). The calculated rotational motion (τ_c) of the dansyl bound to a macromolecule is a mean between the own rotational motion of the probe and the rotational motion of the molecule in the solution. τ_c of the bound dansyl depends on the size and the shape of the macromolecule. As expected, the correlation time of labelled α-LA and labelled α-LA – LYS heterodimers are lower at 45°C. At 10°C, the same correlation time for apo α-LA and holo α-LA was calculated. Interestingly the correlation time of the heterodimers (apo α-LA – LYS and holo α-LA – LYS) was different though the local environment of the probe (same lifetime measurement) was unaffected by the interaction. This suggests differences in the conformation of the heterodimers. At 45°C, the correlation time of labelled apo α-LA was lower than the correlation time of labelled holo α-LA in accordance with a change in the conformation of α-LA due to Ca^{2+} release. The correlation time of the heterodimer (apo α-LA – LYS and holo α-LA – LYS) was also different suggesting differences in their conformation.

An estimation of the M_w of labelled α-LA and complexes inside which labelled α-LA was included was done from the correlation time τ_c (equation [5]). For M_w calculations, we assumed that both free labelled proteins and labelled complexes are spherical particles (i.e. f=1). Also, for all M_w calculations, we assumed constant values for specific partial volume and hydration shell. Although these parameters are known to vary with temperature (Chalikian, Totrov, Abagyan, & Breslauer, 1996), we neglected such variations in the temperature range studied. The calculated M_w of dansyl-labelled apo α-LA are 11.4 $kg.mol^{-1}$ and 14.7 $kg.mol^{-1}$ at 10°C and 45°C, respectively close to the values obtained for holo α-LA in the same temperature conditions (11.4 $kg.mol^{-1}$ and 16.0 $kg.mol^{-1}$ at 10°C and 45°C, respectively Table 2). Although these values are different at 10°C and 45°C, they are consistent with a α-LA molecule in a monomeric state (M_w=14.2 $kg.mol^{-1}$).

In order to estimate the M_w of the complexes formed between α-LA and LYS, a correlation time for the complexes was calculated from the experimental fluorescence anisotropy values at the end of the titration curve, corresponding to heterodimer anisotropy. In the presence of LYS, the correlation time of labelled α-LA increased in all cases. Using the above assumption, this increase is proportional to the increase of the apparent M_w of the

complexes inside which labelled α-LA is included ($\frac{\tau_c^{Complex}}{\tau_c^{Monomer}} = \frac{M_W^{Complex}}{M_W^{Monomer}}$). The M_w of the complexes involving labelled apo α-LA increased 1.3 and 2 times compared to the M_w of monomeric apo α-LA at 10°C and 45°C respectively. This increase was in the same order of magnitude for holo α-LA: the apparent M_w of labelled holo α-LA increased 1.4 and 2 times in the presence of LYS. As the M_w of LYS equal the one of α-LA, the expected increase of the above ratio for a heterodimer should not be higher than 2. At 45°C, the calculated M_w for the complexes are close to that expected for heterodimers. However, for all M_w calculation performed at 10°C, the obtained values were lower and far from expected for monomeric proteins as well as for formed complexes.

DISCUSSION

The assembly between proteins leads to the formation of various supramolecular structures (aggregates, fibres, nanotubes, spherical particles, etc) which can exhibit new properties and functionalities. These assemblies are driven by weak, noncovalent, interactions and by the chemical and structural compatibility between these proteins (Zhang, 2003). Previously, we displayed the formation of two different supramolecular structures resulting from the assembly between LYS and apo α-LA according to temperature: amorphous aggregates were formed at 10°C, while well spherical particles called microspheres were generated at 45°C (Nigen et al., 2007). The present work was focused on the involved mechanism at the molecular level scale. Using fluorescence anisotropy technique, we evidenced the interaction and complexation between LYS and apo α-LA, but also between LYS and holo α-LA, at 10°C and 45°C. LYS interacted with α-LA (apo and holo form) into heterodimers. These results were in accordance with those obtained by Ibrahim et al. that provided formation of heterodimers between LYS and α-LA at room temperature using chemical cross-linking reactions (Ibrahim et al., 2004).

The characterisation of holo α-LA – LYS and apo α-LA – LYS heterodimers showed that their formation was controlled by similar dissociation constants at a given temperature and an ionic strength of 39 mM. This indicates that LYS exhibits similar affinity towards the two conformational forms of α-LA. Furthermore, the binding parameters of LYS – α-LA (holo and apo form) molecular interaction was influenced by the temperature: the increase of temperature from 10°C to 45°C induced an increase of the dissociation constants of holo α-LA – LYS and apo α-LA – LYS heterodimers. They were of about 5×10^{-6} and

20×10^{-6} mol.L^{-1} at 10°C and 45°C, respectively. The same behaviour was also observed by modifying the ionic strength of the medium. The dissociation constants of holo α-LA – LYS and apo α-LA – LYS complexes were increased by about 10 fold when the ionic strength was increased from 39 to 124 mM. These trends are reflected in the thermodynamic parameters (Table 2). For both apo and holo forms of α-LA, the less negative values of Gibbs free energy (ΔG°) at higher ionic strength indicate less favourable interactions with LYS. So, the binding affinity between LYS and α-LA (holo and apo form) was reduced slightly by the increase of temperature and significantly by the increase of ionic strength. Hence, these features emphasized the involvement of electrostatic forces in the molecular interaction between LYS and α-LA (holo and apo form). This result was in well agreement with the modulation of LYS/apo α-LA microspheres formation at 45°C by the ionic strength (Nigen, Croguennec, & Bouhallab, 2008). In this previous study, microspheres formation was reduced by the increase of the ionic strength until no microsphere was observed at 124 mM. According to apo α-LA – LYS dissociation constant at ionic strength of 124 mM ($K_D = 1.6\times10^{-4}$ mol.L^{-1}) and the protein concentration used in the previous study (0.075 mM of LYS and apo α-LA), a fraction (26%) of LYS and apo α-LA was in interaction. So even if a fraction of LYS and apo α-LA interacted, the concentration of formed complex was certainly not sufficient to lead to supramolecular structures at the micrometer scale.

Interestingly, although the binding parameters of holo α-LA – LYS and apo α-LA – LYS complexes were similar at a given temperature, these heterodimers differed probably by their conformational properties as shown by fluorescence parameters in particular correlation time calculations. These observed differences between holo α-LA – LYS and apo α-LA – LYS are to be correlated with the conformational changes of α-LA (holo and apo form) between 10°C and 45°C. Holo α-LA has a native conformation in this range of temperature, while apo α-LA adopts a "native like" and "molten globule" conformation at 10°C and 45°C, respectively (Veprintsev et al., 1997; Griko et al., 1999; Bushmarina et al., 2006). Hence, the conformational state of α-LA (holo or apo form) did not influence its binding properties with LYS, but the α-LA – LYS heterodimers resulting from the interaction exhibit different conformational and assembling properties into supramolecular structures.

Reasonable values were determined for M_w of monomers and heterodimers from experimental fluorescence parameters at 45°C (Table 1). However, the obtained values are slightly higher than the theoretical ones. Such overestimation of M_w could be attributed to the

fact that shapes of protein monomers as well as formed heterodimers are probably different from hard spheres as assumed for form factor f (see equation [5]) used for M_w calculations. In contrast, the M_w estimated at 10°C are too low to be corrected and approximated throughout shape factors. The fact that the calculated rotational motion of a fluorescent probe bound to a macromolecule is a mean between the own rotational motion of the probe and the rotational motion of the molecule in solution could explain the high divergence between theoretical and estimated M_w values at 10°C.

The molecular interaction between LYS and apo α-LA give rise to the formation of different supramolecular structures at 10°C and 45°C; while, LYS and holo α-LA did not self-assemble into supramolecular structures (Nigen et al., 2007), even if they interact at molecular scale to form heterodimers as shown here. Hence, holo α-LA – LYS and apo α-LA – LYS heterodimers differed by their self-assembly properties. These assembly properties observed between holo α-LA – LYS and apo α-LA – LYS heterodimers could be attributed to their specific conformation and certainly to the kind of amino acids exposed to the solvent. This is supported by comparison of estimated thermodynamic parameters given in table 2. It can be seen that holo α-LA – LYS complex is accompanied by negative enthalpy (ΔH°) and positive entropy (ΔS°), which indicate that the binding is entropically driven. For apo α-LA – LYS complex, the negative signs for both ΔH° and ΔS° are rather in favour of the involvement of hydrogen bonding and van der Walls forces as already suggested in the case of the association of other protein systems (Yue, Zhang, Qin, & Chen, 2008). Consequently, the conformation and the nature of interactions forces involved in subsequent heterodimers between LYS and α-LA constitute key factors in the ability of such heterodimers to form supramolecular structures.

It is now widely established that the formation of supramolecular structures between globular proteins requires conformational modification of native protein and/or formation of specific oligomers between native protein (Chiti et al., 2006). In our protein binary system, the contribution of both protein destabilisation (α-LA) and its interaction with a second partner (LYS) were needed for the formation of supramolecular structures.

REFERENCES

Bushmarina, N. A., Blanchet, C. E., Vernier, G., & Forge, V. (2006). Cofactor effects on the protein folding reaction: Acceleration of α-lactalbumin refolding by metal ions. *Protein Science,* 15, 659-671.

Cantor, C. R., &Schimmel, P. R. (1980). Techniques for thestudy of biophysical structure and function. In W.H.Freeman and Company (Eds.), *Biophysical Chemistry* (pp. 550-555). New York:

Caussin, F., Famelart, M. H., Maubois, J. L., & Bouhallab, S. (2003). Mineral modulation of thermal aggregation and gelation of whey proteins: from β-lactoglobulin model system to whey protein isolate. *Le Lait,* 83, 353-364.

Chalikian, T. V., Totrov, M., Abagyan, R., & Breslauer, K. J. (1996). The hydration of globular proteins as derived from volume and compressibility measurements: cross correlating thermodynamic and structural data. *Journal of Molecular Biology,* 260, 588-603.

Chiti, F., & Dobson, C. M. (2006). Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annual Review of Biochemistry,* 75, 333-366.

Egelhaaf, H. J., Luer, L., Tompert, A., Bauerle, P., Mullen, K., & Oelkrug, D. (2000). Fluorescence anisotropy and rotational diffusion of polyene-like molecules in solution. *Synthetic Metals,* 115, 63-68.

Goers, J., Permyakov, S. E., Permyakov, E. A., Uversky, V. N., & Fink, A. L. (2002). Conformational prerequisites for α-lactalbumin fibrillation. *Biochemistry,* 41, 12546-12551.

Griko, Y. V., & Remeta, D. P. (1999). Energetics of solvent and ligand-induced conformational changes in α-lactalbumin. *Protein Science,* 8, 554-561.

Ibrahim, H. R., Taniyama, N., & Aoki, T. (2004). Distinct dimerization between α–lactalbumin and lysozyme exhibiting novel antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Letters in Drug Design & Discovery,* 1, 101-109.

Ipsen, R., Otte, J., & Qvist, K. B. (2001). Molecular self-assembly of partially hydrolysed α-lactalbumin resulting in strong gels with a novel microstructure. *Journal of Dairy Research,* 68, 277-286.

Jamin, N., LeTilly, V., Zargarian, L., Bostad, A., BesanconYoshpe, I., Lirsac, P. N., Gabrielsen, O. S., & Toma, F. (1996). Preliminary investigation of the interaction between the R2R3 DNA binding domain of the oncoprotein c-Myb and DNA fragments. *International Journal of Quantum Chemistry,* 59, 333-341.

Kharakoz, D. P., & Bychkova, V. E. (1997). Molten globule of human α-lactalbumin: Hydration, density, and compressibility of the interior. *Biochemistry,* 36, 1882-1890.

Lipari, G., & Szabo, A. (1980). Effect of librational motion on fluorescence depolarization and nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules and membranes. *Biophysical Journal,* 30, 489-506.

Nigen, M., Croguennec, T., Renard, D., & Bouhallab, S. (2007). Temperature affects the supramolecular structures resulting from α-lactalbumin-lysozyme interaction. *Biochemistry,* 46, 1248-1255.

Nigen, M., Croguennec, T., & Bouhallab, S. (2008). Formation and stability of α-lactalbumin-lysozyme spherical particles: Involvement of electrostatic forces. *Food Hydrocolloids,* http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.02.005,

Pin, S., Royer, C. A., Gratton, E., Alpert, B., & Weber, G. (1990). Subunit interactions in hemoglobin probed by fluorescence and high-pressure techniques. *Biochemistry,* 29,

Sanguansri, P., & Augustin, M. A. (2006). Nanoscale materials development - a food industry perspective. *Trends in Food Science and Technology,* 17, 547-556.

Takase, K. (1998). Reactions of denatured proteins with other cellular components to form insoluble aggregates and protection by lactoferrin. *FEBS Letters,* 441, 271-274.

Veprintsev, D. B., Permyakov, S. E., Permyakov, E. A., Rogov, V. V., Cawthern, K. M., & Berliner, L. J. (1997). Cooperative thermal transitions of bovine and human apo α-lactalbumins: evidence for a new intermediate state. *FEBS Letters,* 412, 625-628.

Viney, C. (2004). Self-assembly as a route to fibrous materials: concepts, opportunities and challenges. *Current Opinion in Solid State & Materials Science,* 8, 95-101.

Weber, G. (1952). Polarization of the fluorescence of macromolecules. II. Fluorescent conjugates of ovalbumin and bovine serum albumin. *Biochemical Journal,* 51, 155-167.

Yue, Y., Zhang, Y., Qin, J., & Chen, X. (2008). Study of the interaction between esculetin and human serum albumin by multi-spectroscopic method and molecular modeling. *Journal of Molecular Structure,* In Press, Corrected Proof,

Zhang, S. (2003). Fabrication of novel biomaterials through molecular self-assembly. *Nature Biotechnology,* 21, 1171-1178.

1.6. Principaux résultats du chapitre 1

Nous avons mis en évidence :

- L'interaction entre le LYS et l'α-LA (formes holo et apo) à l'échelle moléculaire résulte en la formation d'hétérodimères qui présentent des propriétés conformationnelles dépendantes à la fois de la présence ou de l'absence de calcium et de la température.
- La nature des structures supramoléculaires résultant de l'assemblage entre l'apo α-LA et le LYS est dépendante de la température. Des agrégats sont formés pour des températures inférieures à 25°C, alors que des structures originales de nature sphérique sont générées pour des températures supérieures à 30°C. Ainsi, la structure tridimensionnelle de l'apo α-LA oriente la nature des structures supramoléculaires résultant de l'assemblage entre l'apo α-LA et le LYS.
- L'interaction entre l'holo α-LA et le LYS ne conduit pas à un assemblage supramoléculaire.
- Ces résultats constituent un exemple démontrant le rôle primordial de la conformation des protéines dans la formation et l'orientation des assemblages protéiques.

1.7. Discussion des résultats du chapitre 1

Dans cette première partie de travail de thèse, notre étude a été focalisée sur les propriétés d'interaction et d'assemblage de deux protéines globulaires caractérisées par une charge opposée, le LYS et l'α-LA, et sur l'identification et la caractérisation des complexes moléculaires et/ou supramoléculaires formés entre ces deux protéines.

L'interaction à l'échelle moléculaire entre le LYS et l'α-LA (les formes holo et apo) a été approchée par la mise en œuvre de deux techniques expérimentales complémentaires : la microcalorimétrie (ITC) et l'anisotropie de fluorescence. Les études menées par anisotropie de fluorescence ont montré que le LYS et l'α-LA interagissent pour former un hétérodimère. Cette interaction a été mise en évidence aussi bien pour l'α-LA chargée (holo α-LA) que dépourvue (apo α-LA) en calcium et pour des températures de 10°C et 45°C. Au contraire, l'étude de l'interaction entre le LYS et l'holo α-LA par microcalorimétrie est caractérisée par l'absence de signal thermodynamique d'interaction, alors qu'un signal thermodynamique

d'interaction a été lui enregistré entre le LYS et l'apo α-LA pour des températures comprises entre 10°C et 45°C. Ce signal thermodynamique entre le LYS et l'apo α-LA, enregistré pour des concentrations protéiques supérieures à celles utilisées lors des études effectuées par anisotropie de fluorescence, est accompagné de la formation de structures supramoléculaires (agrégats et microsphères) entre ces deux protéines. Dans le cas du mélange entre le LYS et l'holo α-LA, aucun assemblage supramoléculaire n'a été observé à ces différentes concentrations protéiques. Par conséquent, le signal thermodynamique mesuré lors du mélange du LYS et de l'apo α-LA correspond certainement au signal d'assemblage supramoléculaire de ces deux protéines et non à leur interaction à l'échelle moléculaire. Cela explique donc l'absence de signal thermodynamique entre le LYS et l'holo α-LA malgré leur interaction à l'échelle moléculaire identifiée par anisotropie de fluorescence.

L'absence de signal thermodynamique d'interaction moléculaire entre le LYS et l'α-LA soulève une question concernant la nature enthalpique ou entropique de l'interaction moléculaire entre ces deux protéines. La microcalorimétrie est une technique permettant uniquement de détecter et de quantifier les interactions de nature enthalpique ; les interactions de nature entropique ne sont pas mesurées par cette technique (Cooper, Johnson, Lakey, & Nollmann, 2001; Campoy et al., 2005). Par conséquent, l'absence de signal calorimétrique tend à indiquer que l'étape initiale de l'interaction moléculaire entre le LYS et l'α-LA est de nature entropique. Cependant, l'étude par anisotropie de fluorescence a également montré l'implication des interactions électrostatiques, lors de l'interaction moléculaire entre ces deux protéines. En effet, l'affinité entre ces deux molécules était diminuée lors de l'augmentation de la force ionique de la solution. Ces résultats suggèrent une contribution enthalpique au cours de l'interaction. Ainsi, l'absence de signal thermodynamique d'interaction entre ces deux protéines peut être due à une contribution enthalpique faiblement énergétique. D'une manière générale, l'établissement d'interactions moléculaires ou supramoléculaires entre les protéines est le résultat d'une balance énergétique impliquant des contributions énergétiques de nature enthalpique et entropique (Campoy et al., 2005; Turgeon et al., 2007).

Ces études ont également mis en avant un lien prépondérant entre la conformation des protéines à l'échelle moléculaire et celle des complexes et assemblages protéiques formés à différentes échelles (du moléculaire au macroscopique). Dans la gamme de température étudiée (10°C à 45°C), l'holo α-LA adopte une conformation native alors que celle de l'apo α-LA est soumise à des modifications. Pour des températures supérieures à 30°C, l'apo

α-LA adopte une structure en « molten globule » caractérisée par une perte de sa structure tertiaire ; alors que pour des températures inférieures à 30°C, la conformation de l'apo α-LA est voisine de celle de l'holo α-LA avec une stabilité moindre. A l'échelle moléculaire, le LYS interagit avec l'holo et l'apo α-LA pour former des hétérodimères aussi bien à 10°C qu'à 45°C. Cependant ces hétérodimères LYS – holo α-LA et LYS – apo α-LA diffèrent d'un point de vue conformationnel malgré des constantes d'association similaires à une température donnée. Par conséquent, la conformation de l'α-LA conditionne l'organisation tridimensionnelle des hétérodimères LYS – α-LA.

A l'échelle macroscopique, aucune structure supramoléculaire n'a été observée lors du mélange du LYS et l'holo α-LA. Par conséquent, les hétérodimères formés entre le LYS et l'holo α-LA sont stables et solubles. La conformation des hétérodimères LYS – holo α-LA ne semble pas propice à leur assemblage en structure supramoléculaire à 10°C et 45°C. Au contraire, le mélange du LYS et de l'apo α-LA résulte en la formation de structures supramoléculaires dont les morphologies sont dépendantes de la température. Des agrégats sont formés pour des températures inférieures à 20°C, températures pour lesquelles l'apo α-LA conserve une structure tertiaire légèrement modifiée comparée à celle de l'holo α-LA ; alors que pour des températures supérieures à 30°C, températures pour lesquelles l'apo α-LA est dépourvue de structure tertiaire, l'assemblage entre le LYS et l'apo α-LA résulte en la formation de microsphères. Par conséquent, la conformation des hétérodimères LYS – apo α-LA est favorable à leur assemblage en différentes structures supramoléculaires à 10°C et 45°C.

Dans notre système protéique, la conformation de l'α-LA est primordiale dans la formation et l'orientation de structures supramoléculaires différentes de part leur nature et leur morphologie.

D'après Chiti et Dobson, les potentialités des molécules à s'auto-assembler dépendent soit de la conformation des protéines, soit de la formation d'un oligomère précurseur à l'association (Chiti et al., 2006). Dans notre système protéique binaire incluant le LYS et l'α-LA, le mécanisme d'assemblage entre ces deux protéines est contrôlé à la fois par (i) la conformation de l'α-LA et (ii) son interaction moléculaire avec le LYS (formation d'hétérodimères spécifiques).

A partir des résultats obtenus, un mécanisme d'interaction et d'assemblage entre l'α-LA et le LYS impliquant différentes voies selon la conformation de l'α-LA est proposé (Figure 26).

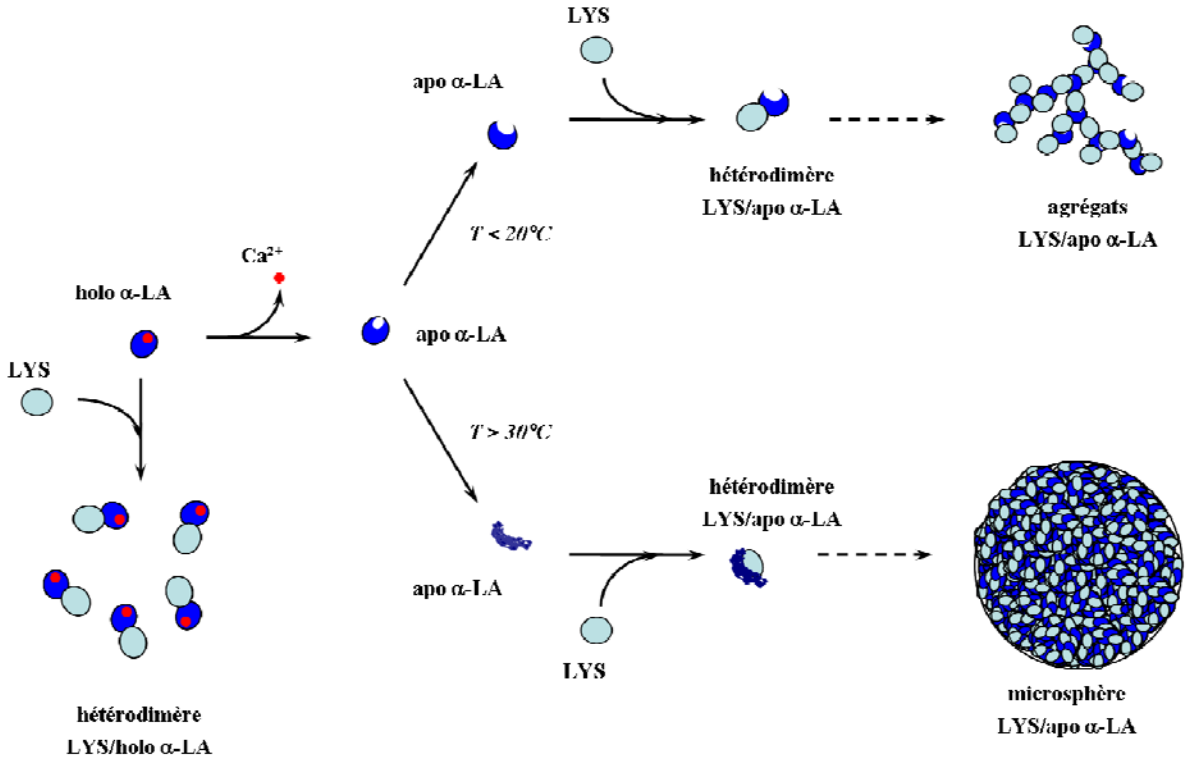

Figure 26. Mécanisme d'interaction et d'assemblage entre le LYS et l'α-LA (les formes holo et apo) conduisant à la formation de structures moléculaires et supramoléculaires.

Les formations d'agrégats et de microsphères lors de l'assemblage du LYS et de l'apo α-LA respectivement à 10°C et 45°C sont clairement montrées dans ce travail. A notre connaissance, les structures supramoléculaires sphériques sont relativement nouvelles et originales dans le cas d'assemblage protéique binaire et de conditions physico-chimiques utilisées relativement douces. Par conséquent, nous avons décidé de focaliser la suite de notre travail sur la caractérisation de ces microsphères. Dans le chapitre suivant, nous chercherons à déterminer le rôle des interactions électrostatiques aussi bien dans la formation que dans la stabilité des microsphères et l'importance de la flexibilité de l'apo α-LA dans la formation et l'orientation de cette structure supramoléculaire.

2. Chapitre 2

Formation et stabilité des microsphères apo α-LA/LYS : implication des interactions électrostatiques et de la flexibilité de l'apo α-LA

2.1. Introduction

Le LYS et l'apo α-LA s'assemblent en microsphères pour des températures supérieures à 30°C et une force ionique de 39 mM (chapitre 1). Par conséquent, on peut supposer que la formation des microsphères est régie et contrôlée par des interactions de faible énergie.

Dans ce deuxième chapitre, nous avons cherché à répondre aux questions suivantes :

- Quel est le rôle des interactions électrostatiques dans la formation et la stabilité des microsphères formées entre l'apo α-LA et le LYS ?
- Quel est l'impact de la flexibilité moléculaire de l'apo α-LA dans cet assemblage ?
- Comment les microsphères formées à 45°C évoluent-elles en fonction du temps et de la température ?

Ces protéines possèdent des potentiels électrostatiques de surface opposés à pH 7,5 et à faible force ionique (39 mM) : celui du LYS est positif, alors que celui de l'α-LA est négatif (Etude bibliographique). Les charges théoriques du LYS et de l'α-LA, calculées avec le logiciel « Protein Calculator v3.3 », sont opposées sur une gamme de pH s'échelonnant entre 4,8 et 9 (Figure 27). Expérimentalement, le point isoélectrique mesuré du LYS est de l'ordre de 10,7 (Stevens, 1991). Comme c'est généralement le cas, une différence existe entre le point isoélectrique calculé et expérimental du fait de la non prise en compte des effets conformationnels par les logiciels de calcul, dont les valeurs sont basées sur les séquences en acides aminés. A pH 7,5, les charges théoriques de nos deux protéines sont quasiment identiques en valeur absolue : + 7,1 et – 7,7 respectivement pour le LYS et l'α-LA (Figure 27).

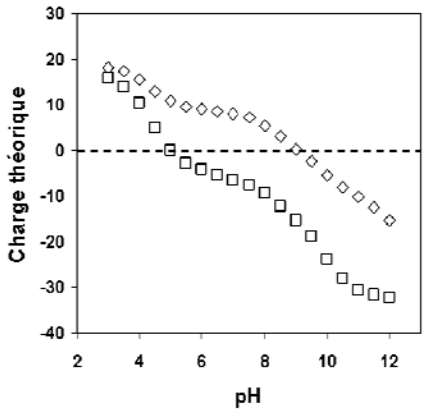

Figure 27. Charges théoriques du LYS (◊) et de l'α-LA (□) calculées à l'aide logiciel « protein calculator v3.3 ».

Nous avons choisi dans un premier temps de faire varier la force ionique du milieu en modifiant la concentration saline et la nature des sels (sels monovalents ou divalents). Cette étude a été effectuée dans des conditions de pH (7,5) et de température (45°C) identiques à celles décrites dans le chapitre 1. Les résultats obtenus sont présentés dans l'article 3 publié dans *Food Hydrocolloids*. Dans le prolongement de ce travail, des résultats portant sur (i) l'influence de la concentration protéique sur la formation des microsphères et (ii) l'effet du pH sur leur stabilité sont présentés en complément de cet article.

En plus de la stabilité structurale des microsphères décrite dans l'article 3, la stabilité temporelle des microsphères formées à 45°C a été ensuite approfondie à pH 7,5 et en présence d'une force ionique de 39 mM (conditions chapitre 1).

En plus de l'implication des interactions électrostatiques dans l'assemblage du LYS et de l'apo α-LA en microsphères, la conformation de l'apo α-LA est également primordiale pour la formation des structures supramoléculaires. La formation des microsphères est favorisée lorsque l'apo α-LA adopte une structure de type « molten globule » caractérisée par une flexibilité accrue de la chaîne protéique (Résultats et discussion du chapitre 1). L'importance de la flexibilité moléculaire pour la formation de microsphères a été montrée avec d'autres biopolymères (tels que les polysaccharides et les protéines). A titre d'exemple, la chaîne polysaccharidique doit présenter un certain degré de flexibilité pour s'assembler avec des protéines et former des structures sphériques (Schmitt, Sanchez, Desobry-Banon, & Hardy, 1998; Doublier, Garnier, Renard, & Sanchez, 2000). Pour approfondir le rôle de la flexibilité, nous avons utilisé un polymère de synthèse flexible (l'acide poly-L-glutamique) chargé négativement au pH d'étude pour mimer la flexibilité de l'apo α-LA.

2.2. Article 3

Formation and stability of α-Lactalbumin - Lysozyme spherical particles: involvement of electrostatic forces

Food Hydrocolloids **2008**

Michaël Nigen, Thomas Croguennec, and Saïd Bouhallab

INRA, Agrocampus Rennes, UMR 1253, Science & Technologie du Lait et de l'Oeuf, 65 rue de Saint Brieuc, F-35000 Rennes, France.

Available online at www.sciencedirect.com
ScienceDirect
Food Hydrocolloids 23 (2009) 510–518
FOOD HYDROCOLLOIDS
www.elsevier.com/locate/foodhyd

Formation and stability of α-lactalbumin–lysozyme spherical particles: Involvement of electrostatic forces

Michaël Nigen, Thomas Croguennec, Saïd Bouhallab*

INRA, Agrocampus Rennes, UMR 1253, Science and Technologie du Lait et de l'Œuf, 65 rue de Saint Brieuc, F-35000 Rennes, France

Received 21 December 2007; accepted 7 February 2008

Abstract

The formation and the subsequent stability of spherical microparticles resulting from the self-assembly between two oppositely charged proteins, lysozyme (LYS) and apo α-lactalbumin (apo α-LA), at pH 7.5 and 45 °C were studied under different physico-chemical conditions—ionic strength, type of salts, type of buffer. Increasing the ionic strength reduced the ability of the two proteins to interact together and to form microspheres. The formation of such microparticles was completely abolished at an ionic strength of 100 mM. Increasing salt concentration also allowed destabilisation and dissociation of formed microspheres in salt-dependent manner as assessed by turbidity experiments and microscopic observations. Microparticles were destabilised with either NaCl, $MgCl_2$ or $CaCl_2$, but the latter showed the greatest destabilising effect. The higher efficiency of calcium ions in the destabilisation experiment could be attributed to the presence of specific calcium binding site on α-LA. Interestingly, complete disappearance of formed particles was not reached even after adding salt concentrations as high as 250 mM of NaCl or 7.5 mM of divalent cations. Our results suggest that electrostatic interactions are clearly involved in the first events of the two-protein assembly and spherical particles building. Moreover, non-electrostatic forces are also involved in maintaining the integrity and stability of formed microparticles.
© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: α-Lactalbumin; Lysozyme; Self-assembly; Microsphere; Electrostatic interactions; Ionic strength

1. Introduction

Understanding protein–protein interactions and assembly in order to control the hierarchical building of well-ordered supramolecular structure is highly relevant to tailor-made new biomaterials ("bottom-up" approach) (Sanguansri & Augustin, 2006; Zhang, 2003). The "bottom-up" approach relies on the protein self-assembling properties under thermodynamic control to build supramolecular structures and microstructures having specific functional properties (Forster & Konrad, 2003; Turgeon, Schmitt, & Sanchez, 2007). The importance of such research field was summarised four years ago by Zhang in conclusion of his review: "Though the field is still in its infancy, the self-assembly of biological molecules ultimately promises materials, devices and technologies beyond our current imagination" (Zhang, 2003).

In food, lots of researches were often performed on the irreversible assembly of proteins triggered by protein denaturation during heating and/or acidification (van der Linden & Venema, 2007). In contrast, much less is known about food protein–protein interactions and assembly without processing or under mild stressing conditions. Natural food products (milk, whey, egg white, etc.) are complex systems with various proteins that could associate to generate supramolecular structures where weak non-covalent attractive interactions constitute the main driving force (Semenova, 2007). Protein assembly depends on the balance between attractive and repulsive forces, and hence is greatly dependent on the physico-chemical conditions of the medium (pH, temperature, ionic strength, protein concentration, etc.).

Although many proteins are able to self-assemble into well-defined supramolecular structures the propensity to do so under given circumstances and the properties of final structures can vary markedly from a protein to another with strong dependence on the physico-chemical

*Corresponding author. Tel.: +33 2 23 48 57 42; fax: +33 2 23 48 53 50.
E-mail address: said.bouhallab@rennes.inra.fr (S. Bouhallab).

0268-005X/$ - see front matter © 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.foodhyd.2008.02.005

conditions. Among others, mildly denaturing conditions (intermediate state resulting from protein destabilisation) seem to favour latter well-ordered organisations of globular proteins that have no intrinsic ability to self-assemble into supramolecular structures. For instance, a recent work showed that α-lactalbumin (α-LA) is able to self-assemble into amyloïd fibrils upon incubation at 37 °C and acidic pH where α-LA adopt a molten globule-like conformation, while amorphous aggregates are formed in the presence of ligands such as minerals (Goers, Permyakov, Permyakov, Uversky, & Fink, 2002). The formation of such amorphous aggregates of α-LA is in turn inhibited by lactoferrin which forms soluble complex with α-LA (Takase, 1998). In addition, self-assembly is not only restricted to the building of homoprotein supramolecular structures. Howell, Yeboah, and Lewis (1995) have already reported the predominant formation of an insoluble precipitate after mixing whey proteins and lysozyme (LYS). Biesheuvel, Lindhoud, de Vries, and Cohen Stuart (2006) formed supramolecular structures throughout interaction of native LYS and its chemically modified oppositely charged form (succinylated LYS). In the same time, we evidenced that calcium-depleted α-lactalbumin (apo α-LA) and hen egg white LYS interact together and form different supramolecular structures in temperature-dependent manner: amorphous aggregates at 5 °C versus well-defined spherical particles (2 to 4 μm in diameter) at 45 °C (Nigen, Croguennec, Renard, & Bouhallab, 2007). Indeed, such assembly and formation of supramolecular structures were not observed between LYS and calcium-loaded α-LA. These results are interpretable on the basis of structural data available for α-LA. Firstly, more negatively charged protein surface combined with structural and conformational changes from holo (folded state) to apo (semi-folded states) α-LA are reported to be the main events associated to calcium removal (Kuwajima, 1996; Permyakov & Berliner, 2000). Consequently, apo α-LA/LYS self-assembly seems to be promoted throughout higher protein flexibility and surface hydrophobicity induced by calcium removal. Secondly, the temperature-dependence assembly between the two proteins is probably linked to the conformational change of apo α-LA occurring near its denaturation temperature, i.e. 27 °C. Above 27 °C, native apo α-LA undergoes a conformational change and adopts a molten globule state with a high content of native-like secondary structure and a lack of specific tertiary structure (Griko & Remeta, 1999). Hence, the interaction between these two globular proteins and the nature of subsequently formed supramolecular structure require a specific conformational state of α-LA. To our knowledge, the formation of such spherical structures between two oppositely charged globular proteins has never been described before, and may hence constitute a new biomaterial, which could exhibit new functionalities.

The aim of the present study was to assess the role of electrostatic interactions in the formation and the stability of the microparticles formed between apo α-LA and LYS. The effect of buffer and increasing concentrations of NaCl or divalent cations on the formation and stability of preformed particles at 45 °C was monitored using turbidity and microscopic observations. Proteins stoechiometry in the spherical particles was determined using reverse-phase HPLC.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Hen egg white LYS was purchased from Ovonor as LYS hydrochloride (Ovonor SA, Annezin les Bethunes, France) and contained 95% of LYS and 3% chloride ions. Holo α-LA was purified from bovine whey as described by Caussin, Famelart, Maubois, and Bouhallab (2003). The resulting powder contained 95% holo α-LA. Calcium depleted α-LA (apo α-LA) was prepared by dialysis of a solution of holo α-LA against deionised water at pH 3 during 48 h at 4 °C using dialysis membrane (Spectrum Laboratories, US and Canada) with a nominal cut-off of 6000–8000 Da. Then, the pH of the apo α-LA solution was adjusted to pH 7 with 1 M NaOH then freeze-dried. The calcium content of the apo α-LA powder was analysed by atomic absorption spectrometry on a SpectrAA 220FS (Varian, Les Ulis, France); the Ca/apo α-LA molar ratio was less than 2%.

2.2. Spherical particle formation

For studies at different ionic strengths, LYS and apo α-LA powders were solubilised in several Tris/HCl (from 5 to 30 mM) buffers prepared with 15–100 mM or without added sodium chloride in order to obtain final ionic strengths ranging from 4 to 124 mM at a constant pH of 7.5.

For studies under different buffer conditions, LYS and apo α-LA powders were solubilised in 30 mM Tris/HCl buffer (pH 7.5) containing 15 mM NaCl or 10 mM phosphate buffer (pH 7.5) containing 15 mM NaCl or 100 mM Imidazole buffer (pH 7.5) containing 15 mM NaCl. The different buffer solutions had an equivalent ionic strength of 39 mM.

Stock solutions of LYS and apo α-LA were filtered through a 0.2 μm membrane. The protein concentration was determined by measuring the absorbance at 280 nm using extinction coefficients of 2.01 and 2.64 $L\,g^{-1}\,cm^{-1}$ for apo α-LA and LYS, respectively. To prepare the spherical particles, equal volume of LYS (0.075 mM) and apo α-LA (0.075 mM) solutions previously equilibrated at 45 °C were gently mixed with the help of the pipette. The results are presented as mean of at least two independent experiments.

2.3. Spherical particle stability

The stability was determined 30 min after spherical particle formation throughout mixing LYS (0.075 mM)

and apo α-LA (0.075 mM) at 45 °C and an ionic strength of 39 mM. The effect of ionic strength on the stability of formed spherical particles were performed by adding small aliquots (20 µl) of 30 mM Tris/HCl buffer (pH 7.5) containing increasing concentration of NaCl to reach final ionic strengths varying from 39 to 250 mM in a total blend volume of 720 µL.

For studies of the nature of salts on spherical particles stability, $CaCl_2$ or $MgCl_2$ solubilised in 30 mM Tris/HCl buffer (pH 7.5) containing 15 mM NaCl were added to the LYS/apo α-LA mixtures. Final concentrations of $CaCl_2$ or $MgCl_2$ in the LYS/apo α-LA solutions were 0, 0.0075, 0.075, 0.75 and 7.5 mM that corresponded to divalent cation/apo α-LA molar ratios of 0, 0.1, 1, 10 and 100, respectively. The results are presented as mean of at least two independent experiments.

2.4. Spherical particle analysis

2.4.1. Turbidity

Turbidity measurements were performed using a 6505 UV–Vis spectrophotometer (Jenway, Chelles, France) equipped with a temperature-controlled cell connected to a circulating water bath regulated at 45 °C. Optical density (OD) was measured at 600 nm. Sample turbidity (τ) was determined using the following relationship: $\tau = (2.303.OD)/l$, where OD is the optical density of the sample and l is the light path length in the cell (1 cm).

2.4.2. Reverse phase HPLC

Reverse phase separation was performed on a Vydac C_4 column (214TP5215) connected to an HPLC system, consisting of a Waters 2695 Separations Module, a Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector and an Empower software (Waters) to acquire, process and report chromatographic profiles. Milli-Q water containing 1.06‰ (v/v) trifluoroacetic acid as buffer A and 80:20 (v/v) acetonitrile-Milli-Q water mixture containing 1‰ (v/v) trifluoroacetic acid as buffer B were used for protein elution. The gradient started with 20% buffer B to reach 84% in 22 min. Protein separation was carried out at a flow rate of 0.2 mL/min at 40 °C. Proteins were detected simultaneously at 214 and 280 nm.

Before analysis, samples were centrifuged at 12,000g during 30 min at 45 °C. Supernatants were recovered and pellets were washed with 30 mM Tris/HCl buffer (pH 7.5) containing 15 mM NaCl and then dissolved in a buffer A volume equivalent to the initial volume.

2.4.3. Optical microscopy

The spherical particles resulting from the interactions between apo α-LA and LYS at 45 °C were observed using a phase contrast optical microscope (Olympus BX51TF) equipped with an Olympus DP11 camera. Samples were put between glass slides, and the spherical particles were immediately observed at a magnification of 100 × at room temperature. The irreversibility of the spherical particles formed at 45 °C limits any important changes between sampling and microscopic examination.

2.4.4. Dynamic light scattering

The size of the spherical particles was investigated by laser dynamic light scattering (DLS) using a Malvern HPPS Instrument (Malvern zetasizer Nano ZS, UK). Measurements were performed 30 min after $CaCl_2$ was added to the solution containing spherical particles at 45 °C. Before each measurement, solutions were gently stirred. Experimental data were analysed using the Contin algorithm provided by the manufacturer. When necessary, samples were diluted 10 times before measurements in order to avoid detector saturation.

3. Results

3.1. Formation of LYS/apo α-LA spherical particles

3.1.1. Influence of ionic strength

The kinetic of LYS/apo α-LA spherical particles formation at ionic strengths ranging from 4 to 124 mM are presented in Fig. 1A. At low ionic strengths (4–24 mM), the turbidity increased strongly after LYS and apo α-LA were mixed together to reach a value of ~4.5–5 cm^{-1}. This abrupt increase in turbidity was immediately followed by a continuous decrease suggesting at least a two-step process. At ionic strength of 124 mM, the LYS/apo α-LA mixture was characterised by an absence of turbidity suggesting that the formation of LYS/apo α-LA spherical particles did not occur at this ionic strength. This hypothesis was strengthened by the lack of signal when apo α-LA was titrated by LYS using isothermal titration calorimetry at this ionic strength (data not shown). For intermediate ionic strength ranging from 30 to 54 mM, the turbidity increased progressively after LYS and apo α-LA solutions were mixed to reach a plateau value after 30 min incubation. The turbidity at the plateau value decreased with increasing the ionic strength to reach a value of ~3.0 and ~0.6 cm^{-1} for 30 and 54 mM, respectively.

As the turbidity depends on the number and the size of spherical particles, these latter were observed using optical microscopy and the proteins (LYS and apo α-LA) involved in the spherical particles were quantified using reverse phase HPLC after they were pelleted by centrifugation. Optical microscopic observations of LYS/apo α-LA spherical particles are shown in Fig. 1B. Whatever the ionic strength of the solution, the spherical particles showed rather a monodisperse distribution profile. The size of the particles depended on the ionic strength of the solution: the largest ones with diameters of ~4–6 µm were obtained for the ionic strength ranging from 4 to 24 mM, while the smallest ones with diameters < 1 µm were obtained for ionic strengths higher than 44 mM. Microscopic observation confirmed that the formation of protein spheres was inhibited at very high ionic strength, i.e. 124 mM (Fig. 1B, f). Fig. 2 shows the evolution of LYS and

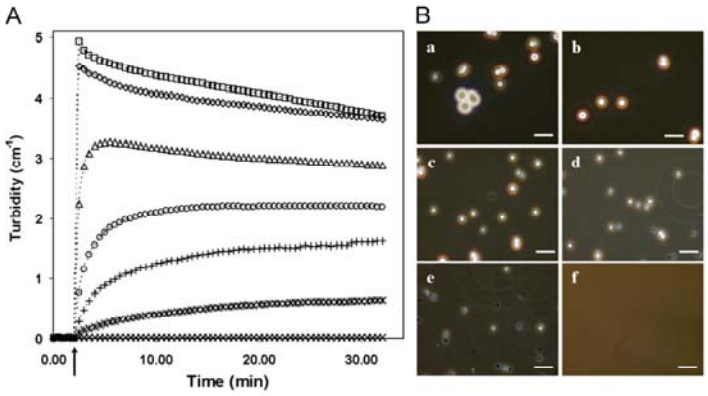

Fig. 1. (A) Kinetic formation of microparticles throughout mixing LYS (0.075 mM) and apo α-LA (0.075 mM) in Tris/HCl buffers (5–30 mM), pH 7.5, with and without added NaCl (15–100 mM) at 45 °C. Final ionic strengths were: 4 mM (□), 24 mM (◇), 30 mM (△), 39 mM (○), 44 mM (+), 54 mM (*) and 124 mM (×). The arrow shows the addition time of LYS to apo α-LA. (B) Phase contrast micrographs of spherical particles taken 30 min after the mixture of LYS and apo α-LA at different ionic strength (*I*): 4 mM (a), 24 mM (b), 39 mM (c), 44 mM (d), 54 mM (e) and 124 mM (f). The scale bar: 10 μm.

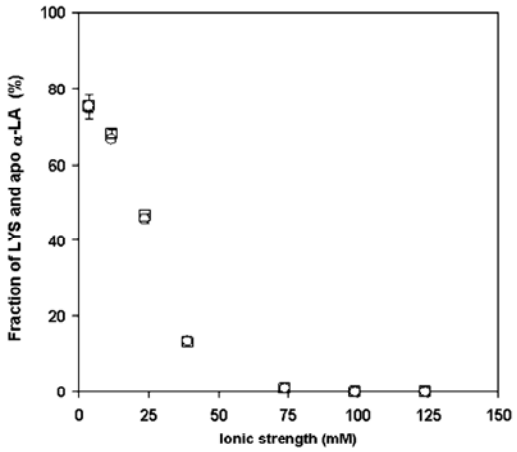

Fig. 2. Proportion of LYS (○) and apo α-LA (□) involved into the spherical particles as a function of the ionic strength at 45 °C. Spherical particles were prepared by mixing LYS (0.075 mM) and apo α-LA (0.075 mM) at 45 °C during 30 min. Samples were then centrifuged at 12,000*g* for 30 min to separate microspheres from free proteins in solution.

apo α-LA fraction included in the spherical particles (pelleted fraction) as function of the ionic strength. Firstly, equimolar proportion of both proteins was found into the spherical particles whatever the ionic strength studied, and secondly, protein fraction in these particles decreased with increasing the ionic strength. For the lower ionic strength (4 mM), 75% of the initial proteins were pelleted, while at an ionic strength of 124 mM, all the proteins were recovered in the supernatant, confirming the results from turbidity and microscopic observations above (Fig. 1).

3.1.2. Influence of buffer

To investigate a putative contribution of Tris buffer to the observed protein assembly, the formation of spherical particles was monitored in the presence or absence of Tris, but at identical ionic strength and at pH 7.5. In the absence of Tris buffer, the ionic strength of the solutions was adjusted by simple addition of sodium chloride. Comparative studies were performed for three different ionic strengths: 4, 39 and 54 mM. The kinetics of LYS/apo α-LA spherical particles formation prepared in the presence and the absence of Tris buffer were identical whatever the ionic strength studied (data not shown). Hence, the physico-chemical properties of Tris molecules did not interfere with the formation of LYS/apo α-LA spherical particles, which depended only on the ionic strength of the solution.

The influence of other buffers on the formation of LYS/apo α-LA spherical particles was also investigated. Phosphate and imidazole buffers that showed some chemical differences comparing to Tris buffer was used. At pH 7.5, the net charge of phosphate buffer is negative, while that of Tris and imidazole buffers are positive. These experiments were performed at an ionic strength of 39 mM that showed an intermediate increase of turbidity (microparticle formation) over time (Fig. 1A). In phosphate buffer, the kinetic of particles formation (profile of the curve and turbidity values) was similar to that obtained in Tris buffer with an increase of turbidity until it reaches a plateau value at ~2 cm^{-1} after 30 min (Fig. 3). Furthermore, the size of spherical particles formed in these both buffers was similar with a diameter of ~1–2 μm (data not shown). Hence, phosphate buffer did not affect the formation of LYS/apo α-LA spherical particles. In imidazole buffer, the rate of spherical particles formation and the final turbidity of the solution were lower than for

experiments performed in Tris and phosphate buffers (Fig. 3).

3.2. Stability of LYS/apo α-LA spherical particles

Destabilisation of the spherical particles resulting from LYS and apo α-LA assembly was analysed by adding different salts, 30 min after the spherical particles were formed at an ionic strength of 39 mM. The influence of ionic strength increase on spherical particle stability was investigated by adding various amounts of sodium chloride to solution containing LYS/apo α-LA spherical particles (Fig. 4). Addition of sodium chloride reduced the overall turbidity of all samples. A rapid decay in turbidity occurred immediately after the addition of sodium chloride and tended to a plateau value after 30 min. A loss of ~32%, 54% and 81% of the initial turbidity value was induced by increasing the ionic strength to 61, 150 and 250 mM, respectively (Fig. 4A). Furthermore, turbidity decrease was correlated with the reduction of both (i) the size of spherical particles as illustrated in Fig. 4B and (ii) the fraction of LYS and apo α-LA involved into spherical particles (Table 1). At ionic strength of 39 mM, ~12% of both proteins were included into spherical particles exhibiting an average diameter of ~2 μm, while after an ionic strength increase up to 250 mM, about only 1% of both proteins were involved into particles.

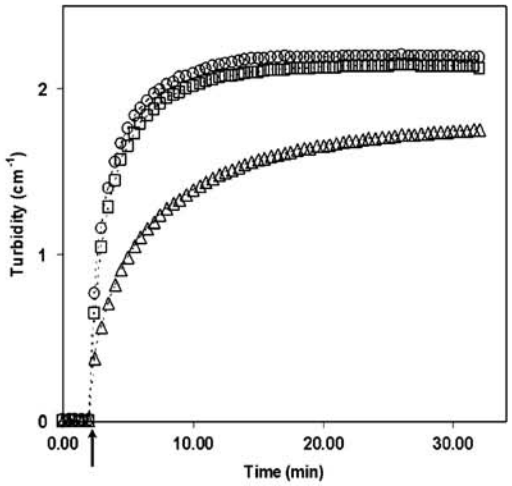

Fig. 3. Formation of LYS/apo α-LA spherical particles in different buffers (pH 7.5) at 45 °C for a total ionic strength of 39 mM: (○) 30 mM Tris/HCl, 15 mM NaCl; (□) 10 mM phosphate, 15 mM NaCl; (△) 100 mM imidazole, 15 mM NaCl. Spherical particles were prepared by mixing LYS (0.075 mM) and apo α-LA (0.075 mM) at 45 °C. The arrow shows the addition time of LYS to apo α-LA solution.

Table 1
Effect of increasing ionic strength (NaCl in 30 mM Tris/HCl buffer, pH 7.5) on the proportion of LYS and apo α-LA involved into the spherical particles

Final ionic strength (mM)	% apo α-LA	% LYS
39	12.0±0.2	12.0±0.7
41	9.5±0.5	10.0±0.2
61	4.5±0.5	4.5±0.6
75	3.5±0.2	4.0±0.2
150	2.0±0.2	2.5±0.2
250	1.0±0.2	1.0±0.1

Spherical particles were pre-formed by mixing LYS (0.075 mM) and apo α-LA (0.075 mM) in 30 mM Tris/HCl buffer (pH 7.5) containing 15 mM NaCl at 45 °C. Samples were centrifuged at 12,000*g* for 30 min and proteins in the pellets and supernatants were quantified by rp-HPLC.

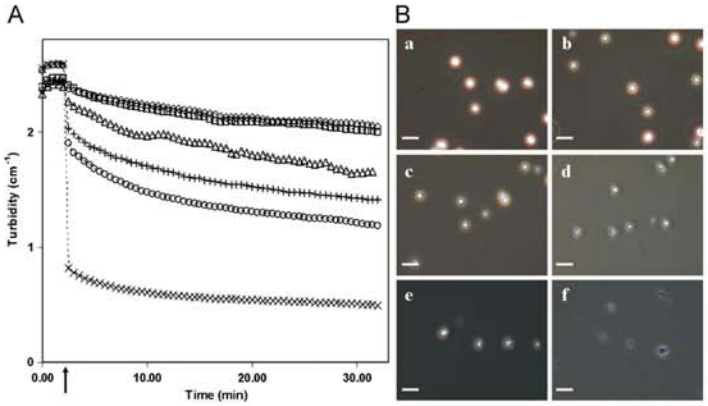

Fig. 4. (A) Destabilisation kinetic of LYS/apo α-LA spherical particles by increasing the ionic strength (*I*) at 45 °C. The arrow shows the addition time of NaCl to the LYS/apo α-LA mixtures. (B) Phase contrast micrographs of spherical particles taken 30 min after the addition of salt (scale bar: 5 μm). The final ionic strengths were: 39 mM (◇, a), 41 mM (□, b), 61 mM (△, c), 75 mM (+, d), 150 mM (○, e) and 250 mM (×, f). Spherical particles were pre-formed by mixing LYS (0.075 mM) and apo α-LA (0.075 mM) in 30 mM Tris/HCl buffer (pH 7.5) containing 15 mM NaCl at 45 °C.

The smallest size of these latter correlated well with low turbidity value of the solution (~0.5 cm^{-1} after 30 min).

LYS/apo α-LA spherical particles was also shown to be sensitive to divalent cations such as calcium (Ca^{2+}) and magnesium (Mg^{2+}) (Fig. 5A and B). Turbidity decrease was more pronounced with $CaCl_2$ than $MgCl_2$. A turbidity decay of ~35% and 72% was obtained by addition of 0.075 and 7.5 mM of $CaCl_2$, respectively, while only 46% reduction of turbidity was observed after addition of 7.5 mM $MgCl_2$. No significant decrease in turbidity was detected after addition of 0.075 mM $MgCl_2$. This feature was also confirmed by the quantification of both proteins involved in LYS/apo α-LA spherical particles (Table 2), the observation of spherical particles using optical microscopy (Fig. 5C) as well as particle size measurements performed for calcium added samples (Table 3).

To dissociate the effect of ionic strength from the effect caused by the nature of salt, the comparative decrease in turbidity by the three studied cations at the same final ionic strength in the solution is shown in Fig. 6. From these results, calcium was shown to be more potent destabilising cation than magnesium and sodium ions. For a total ionic strength of 61 mM, addition of $CaCl_2$ allowed ~72% reduction of turbidity against ~31% and ~46% with NaCl and $MgCl_2$, respectively. So sodium, magnesium and calcium can be ranged according to their efficiency to destabilise LYS/apo α-LA spherical particles: $Ca^{2+} > Mg^{2+} > Na^{+}$.

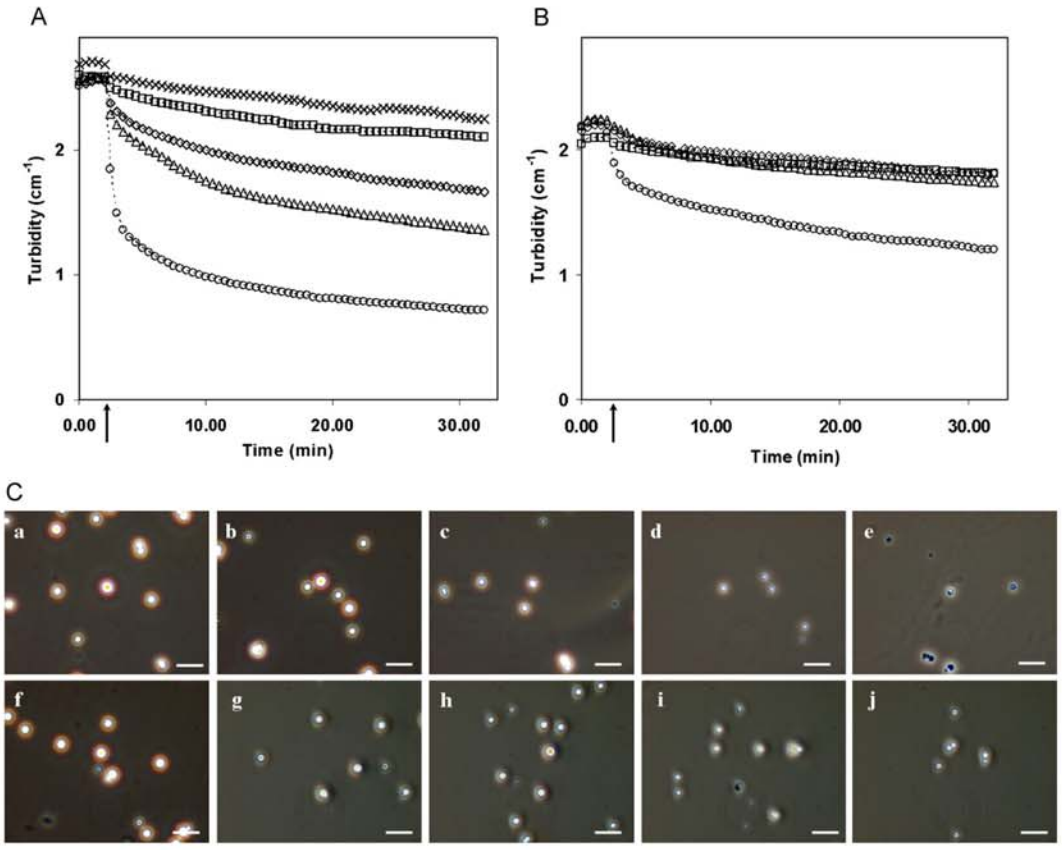

Fig. 5. Destabilisation kinetic of LYS/apo α-LA microparticles by addition of divalent cations $CaCl_2$ (A) and $MgCl_2$ (B). Final concentrations of $CaCl_2$ or $MgCl_2$ were 0 mM (×), 0.0075 mM (□), 0.075 mM (◇), 0.75 mM (△), 7.5 mM (○). The arrow shows the addition time of $CaCl_2$ or $MgCl_2$. (C) Phase contrast micrographs of spherical particles taken 30 min after addition of $CaCl_2$ (top) or $MgCl_2$ (below) at different concentrations: 0 mM (a and f), 0.0075 mM (b and g), 0.075 mM (c and h), 0.75 mM (d and i), 7.5 mM (e and j). Spherical particles were pre-formed by mixing LYS (0.075 mM) and apo α-LA (0.075 mM) in 30 mM Tris/HCl buffer (pH 7.5) containing 15 mM NaCl at 45 °C. The scale bar: 5 μm.

Table 2
Effect of $CaCl_2$ or $MgCl_2$ on the proportion of LYS and apo α-LA involved into the spherical particles

[$CaCl_2$] or [$MgCl_2$] (mM)	Final ionic strength (mM)	+ $CaCl_2$		+ $MgCl_2$	
		% Average of apo α-LA	% Average of LYS	% of apo α-LA	% of LYS
0	39	13.0±1.3	13.0±0.8	11.0±2.3	11.0±2.2
0.0075	39	11.5±0.1	12.0±0.4	11.0±2.5	11.0±2.1
0.075	39	4.5±0.9	5.5±0.4	10.5±2.4	10.5±2.0
0.75	41	3.0±0.7	3.5±0.2	8.0±1.5	8.5±1.9
7.5	61	1.5±0.9	1.5±0.4	4.0±1.6	3.5±1.4

Spherical particles were pre-formed by mixing LYS (0.075 mM) and apo α-LA (0.075 mM) in 30 mM Tris/HCl buffer (pH 7.5) containing 15 mM NaCl at 45 °C. Samples were centrifuged at 12,000*g* for 30 min and proteins in the pellets and supernatants were determined by rp-HPLC.

Table 3
Size distribution of the spherical particles 30 min after their destabilisation by the addition of $CaCl_2$ at 45 °C in 30 mM Tris/HCl buffer (pH 7.5) containing 15 mM NaCl

[$CaCl_2$] (mM)	*Z*-average (nm)	Distribution width (nm)
0	2201	863
0.0075	2714	845
0.075	1046	181
0.75	664	104
7.5	544	93

Z-average reflects average property of a mixture with different size particles determined by light scattering; distribution width reflects size polydispersity. Spherical particles were pre-formed by mixing LYS (0.075 mM) and apo α-LA (0.075 mM) in 30 mM Tris/HCl buffer (pH 7.5) containing 15 mM NaCl at 45 °C.

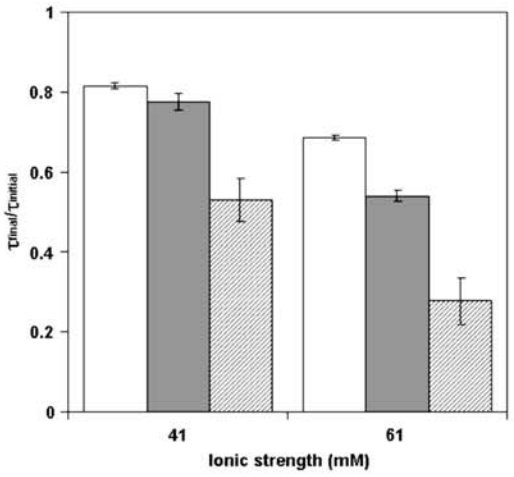

Fig. 6. Residual turbidity of LYS/apo α-LA mixtures 30 min after their destabilisation by the addition of salts: NaCl (white), $MgCl_2$ (grey) and $CaCl_2$ (hatched). Spherical particles were pre-formed by mixing LYS (0.075 mM) and apo α-LA (0.075 mM) in 30 mM Tris/HCl buffer (pH 7.5) containing 15 mM NaCl at 45 °C.

4. Discussion

Under specific physico-chemical conditions, proteins are able to interact and self-assemble into supramolecular structures (aggregates, fibres, spherical particles, etc.) which exhibit a wide spectrum of properties and functionalities. The mechanism of supramolecular structures formation and the shape of supramolecular structures formed are strongly mediated and controlled by the type and balance of interactions shared between proteins during the self-assembly process (Mossa, Sciortino, Tartaglia, & Zaccarelli, 2004). We reported recently on the formation of monodispersed spherical particles throughout self-assembly of two globular proteins, LYS and apo α-LA (Nigen et al., 2007). These spherical particles, with an equimolar proportion of both proteins, were generated at pH 7.5 and 45 °C. The theoretical charges of LYS and apo α-LA at this pH value, calculated using "Protein Calculator v3.3" software, are nearly equal in magnitude but opposite in sign, i.e. +7.1 for LYS and −7.7 for α-LA. Such charge magnitude is generally considered as weak for charged polyelectrolytes (Biesheuvel & Cohen Stuart, 2004; Turgeon et al., 2007). In such system of weakly charged polyelectrolytes, the complexation between oppositely charged proteins is mainly driven by electrostatic attractive interactions combined with an increase of the entropy due to the release of counterions from proteins surface (Biesheuvel & Cohen Stuart, 2004; de Vries & Cohen Stuart, 2006; Turgeon et al., 2007). Hence, in order to go deeper into the understanding of the formation mechanism of the spherical particles and their subsequent stabilisation, we evaluated the contribution of electrostatic interactions involved during the self-assembling process of LYS and apo α-LA and inside the formed supramolecular structures. We show here that the ability of both proteins to form particles, the rate of their formation as well as their final size were strongly dependent on the ionic strength of the solution: increasing the ionic strength reduced the ability of the proteins to self-assemble in accordance with the work reported by Biesheuvel et al. (2006). This effect is attributed to the ionic screening of the charges on the protein surfaces that reduces the electrostatic attractive energy needed for

protein self-assembly (Ou & Muthukumar, 2006). High ionic strength ($I > 124$ mM) abolished the self-assembly between LYS and apo α-LA confirming that electrostatic interactions are of primary importance for the formation of LYS/apo α-LA spherical particles.

Interestingly, the formed monodisperse spherical particles, exhibited a finite size that decreased with increasing ionic strength. Whatever the size, the spherical particles contained an equimolar quantity of LYS and apo α-LA although apo α-LA exhibits a slightly higher theoretical charge magnitude. The observed stoechiometry over the difference in charge between the two proteins occurs probably because the global charge of a protein can change when it approaches close to another charged protein (Lund & Jonsson, 2005). Consequently, charge compensation could be reached in the supramolecular structure generated from proteins having different charge magnitude. Such assumption is supported by the globally neutral net charge of the spherical particles (results not shown). The absence of residual charge on the spherical particles surface reinforces the importance of electrostatic interactions for LYS and apo α-LA assembly. The global charge of the spherical particles could also explain the coalescence phenomenon observed previously that leads to bigger particles on aging (Nigen et al., 2007).

As stated in the result section, increasing the ionic strength by the addition of NaCl reduced the proteins fraction involved into the spherical particles. The interaction between the two proteins is then favoured at low ionic strength. However, even for the lower ionic strength studied (4 mM) and for a total protein concentration of 0.15 mM, only 75% of proteins were involved into the spherical particles. The presence of residual non-associated polymers at very low ionic strength seems to be an universal phenomenon during the interaction between oppositely charged polymers (Burgess, 1990) and could be explained by the intrinsic ionic strength of polymers and associated counterions. The release of counterions reduces the electrostatic attractive energy for protein–protein interaction and therefore for the formation of supramolecular structures as suggested for other hydrocolloid systems (Gummel, Boue, Deme, & Cousin, 2006). An alternative explanation come from Biesheuvel et al. (2006) who suggested an ionic strength dependence on the solubility limit of the proteins in the soluble phase rather than a pure equilibrium between proteins in the supernatant and those in dense phase to explain phase separation in oppositely charged protein system.

Although the spherical particles were formed whatever the buffer studied (Tris, phosphate and Imidazole buffers adjusted at the same ionic strength), a particular behaviour was observed when experiments were performed in imidazole buffer. In this latter, the rate of spherical particle formation and the final turbidity of the mixtures were lower than those measured when the spherical particles are formed in Tris and phosphate buffers. The simplest explanation could be linked to the higher concentration of imadazole (i.e. 100 mM) needed to reach an ionic strength equivalent to that of the two other buffers. Alternatively, Shinitzky, Katchalski, Grisaro, and Sharon (1966) showed that protonated imidazole ring inhibited the enzymatic activity of LYS by the formation of a charge transfer complex between protonated imidazole ring and the tryptophan residues of LYS. In our experimental conditions, a fraction of imidazole ring was protonated and the interaction of this latter with tryptophan residues of LYS could explain the differences observed in the spherical particle formation. This interaction could result in (i) a modification of the global LYS charges and/or (ii) a steric hindrance on LYS surface reducing the ability of LYS to interact and self-assemble with apo α-LA.

After the LYS/apo α-LA spherical particles being formed, the addition of salts leads to a significant decrease of the protein fraction involved into the spherical particles. Hence, electrostatic interactions are also involved at least partly in maintaining the stability of formed supramolecular structure. Furthermore, the particles remain spherical and monodispersed and their average size were reduced as the ionic strength increased. This result suggests that the destabilisation of the spherical particles occurred following a zipper mechanism with a preferential removal of the proteins localised at the surface of each existing particles rather than complete disruption of a given number of particles. Such destabilisation mechanism seemed to be true for all tested salts even if the extent of the destabilisation depended on the chemical nature of the added cation. For the same final ionic strength, the spherical particles were more sensitive to Ca^{2+} than Mg^{2+} and Na^{+}. This could be related to the affinity of these cations to apo α-LA. Apo α-LA has an affinity constant of $2 \times 10^7\ M^{-1}$ for Ca^{2+}, whereas the affinity constant for Mg^{2+} and Na^{+} is only 211 and $36\ M^{-1}$, respectively, at 37 °C (Permyakov & Berliner, 2000). Such interaction could induce a cation-specific competition with the positive charges of the LYS hence resulting in a reduction of the interaction energy between the two proteins inside the spherical particles. As the spherical particles are not generated when LYS and calcium-loaded α-LA were mixed together (Nigen et al., 2007), it is suggested that, behind its classical effect on the ionic strength, the Ca^{2+} reached its binding site on apo α-LA molecules inducing modifications of the three-dimensional structure and/or the charge distribution on apo α-LA leading to the more extent destabilisation of LYS/apo α-LA microparticles.

Clearly, while an ionic strength around 100 mM or the use of holo α-LA are sufficient to inhibit the complexation between LYS and α-LA, higher ionic strength (i.e. >250 mM) or large excess of calcium (Ca^{2+}/apo α-LA molar ratio of 100) are not enough for complete destabilisation of LYS/apo α-LA microparticles. The solutions remain slightly turbid and some proteins are still included into supramolecular structures. Hence, LYS/apo α-LA spherical particles present a relative stability towards electrostatic destabilisation after their formation that

suggests the contribution of non-electrostatic interactions such as hydrogen bonding and hydrophobic interactions. As previously suggested to explain the interaction inside a polyelectrolyte-protein system (Cousin, Gummel, Ung, & Boue, 2005), it is likely that firstly electrostatic interactions drive the self-assembly of LYS and apo α-LA into supramolecular structure and then when proteins are in close contact, short-range interactions take place and stabilise the core of spherical particles. This second step, favoured by polyelectrolyte chain flexibility (Turgeon et al., 2007) is indeed plausible in our protein system since α-LA adopts a flexible molten globule state under the temperature condition used in the present study. It is also possible that LYS/apo α-LA microparticles are build-up from the association of smaller primary complexes inside which the non-electrostatic interactions constitute the predominant stabilising forces. Better knowledge on the kinetics of the association and formation of the microspheres under dilute regime as well as on the fine internal will help in understanding the involved association mechanism between the two globular proteins.

This study highlighted the essential involvement of electrostatic interactions in the self-assembly mechanism of LYS and apo α-LA as well as their contribution to the stabilisation of formed microparticles. Controlling the ionic strength of the solution could be an easy way to control of both the formation rate of LYS/apo α-LA spherical particles and their final size.

References

Biesheuvel, P. M., & Cohen Stuart, M. A. (2004). Cylindrical cell model for the electrostatic free energy of polyelectrolyte complexes. *Langmuir*, *20*, 4764–4770.

Biesheuvel, P. M., Lindhoud, S., de Vries, R., & Cohen Stuart, M. A. (2006). Phase behavior of mixtures of oppositely charged nanoparticles: Heterogeneous Poisson–Boltzmann cell model applied to lysozyme and succinylated lysozyme. *Langmuir*, *22*, 1291–1300.

Burgess, D. J. (1990). Practical analysis of complex coacervate systems. *Journal of Colloid and Interface Science*, *140*, 227–238.

Caussin, F., Famelart, M. H., Maubois, J. L., & Bouhallab, S. (2003). Mineral modulation of thermal aggregation and gelation of whey proteins: From β-lactoglobulin model system to whey protein isolate. *Le Lait*, *83*, 353–364.

Cousin, F., Gummel, J., Ung, D., & Boue, F. (2005). Polyelectrolyte–protein complexes: Structure and conformation of each specie revealed by SANS. *Langmuir*, *21*, 9675–9688.

de Vries, R., & Cohen Stuart, M. (2006). Theory and simulations of macroion complexation. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, *11*, 295–301.

Forster, S., & Konrad, M. (2003). From self-organizing polymers to nano- and biomaterials. *Journal of Materials Chemistry*, *13*, 2671–2688.

Goers, J., Permyakov, S. E., Permyakov, E. A., Uversky, V. N., & Fink, A. L. (2002). Conformational prerequisites for α-lactalbumin fibrillation. *Biochemistry*, *41*, 12546–12551.

Griko, Y. V., & Remeta, D. P. (1999). Energetics of solvent and ligand-induced conformational changes in α-lactalbumin. *Protein Science*, *8*, 554–561.

Gummel, J., Boue, F., Deme, B., & Cousin, F. (2006). Charge stoichiometry inside polyelectrolyte–protein complexes: A direct SANS measurement for the PSSNa-Lysozyme system. *Journal of Physical Chemistry B*, *110*, 24837–24846.

Howell, N., Yeboah, N., & Lewis, D. (1995). Studies on the electrostatic interactions of lysozyme with α-lactalbumin and β-lactoglobulin. *International Journal of Food Science and Technology*, *30*, 813–824.

Kuwajima, K. (1996). The molten globule state of alpha-lactalbumin. *FASEB Journal*, *10*, 102–109.

Lund, M., & Jonsson, B. (2005). On the charge regulation of proteins. *Biochemistry*, *44*, 5722–5727.

Mossa, S., Sciortino, F., Tartaglia, P., & Zaccarelli, E. (2004). Ground-state clusters for short-range attractive and long-range repulsive potentials. *Langmuir*, *20*, 10756–10763.

Nigen, M., Croguennec, T., Renard, D., & Bouhallab, S. (2007). Temperature affects the supramolecular structures resulting from α-lactalbumin–lysozyme interaction. *Biochemistry*, *46*, 1248–1255.

Ou, Z., & Muthukumar, M. (2006). Entropy and enthalpy of polyelectrolyte complexation: Langevin dynamics simulations. *Journal of Chemical Physics*, *124*, 154902–154911.

Permyakov, E. A., & Berliner, L. J. (2000). α-Lactalbumin: Structure and function. *FEBS Letters*, *473*, 269–274.

Sanguansri, P., & Augustin, M. A. (2006). Nanoscale materials development—a food industry perspective. *Trends in Food Science and Technology*, *17*, 547–556.

Semenova, M. G. (2007). Thermodynamic analysis of the impact of molecular interactions on the functionality of food biopolymers in solution and in colloidal systems. *Food Hydrocolloids*, *21*, 23–45.

Shinitzky, M., Katchalski, E., Grisaro, V., & Sharon, N. (1966). Inhibition of lysozyme by imidazole and indole derivatives. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *116*.

Takase, K. (1998). Reactions of denatured proteins with other cellular components to form insoluble aggregates and protection by lactoferrin. *FEBS Letters*, *441*, 271–274.

Turgeon, S. L., Schmitt, C., & Sanchez, C. (2007). Protein–polysaccharide complexes and coacervates. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, *12*, 166–178.

van der Linden, E., & Venema, P. (2007). Self-assembly and aggregation of proteins. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, *12*, 158–165.

Zhang, S. (2003). Fabrication of novel biomaterials through molecular self-assembly. *Nature Biotechnology*, *21*, 1171–1178.

2.3. Modulation du signal thermodynamique de formation des microsphères par la force ionique

2.3.1. Objectif

L'assemblage du LYS et de l'apo α-LA en microsphères engendre un signal thermodynamique spécifique en microcalorimétrie (Article 1). Par conséquent, nous avons exploité cette signature thermodynamique pour approfondir l'étude de l'effet de la force ionique sur la formation de ces structures supramoléculaires.

2.3.2. Résultats

Dans le but de recueillir un signal d'assemblage, nous avons choisi de travailler avec des concentrations protéiques identiques à celles utilisées dans l'article 1 pour trois différentes forces ioniques (39, 74 et 124 mM).

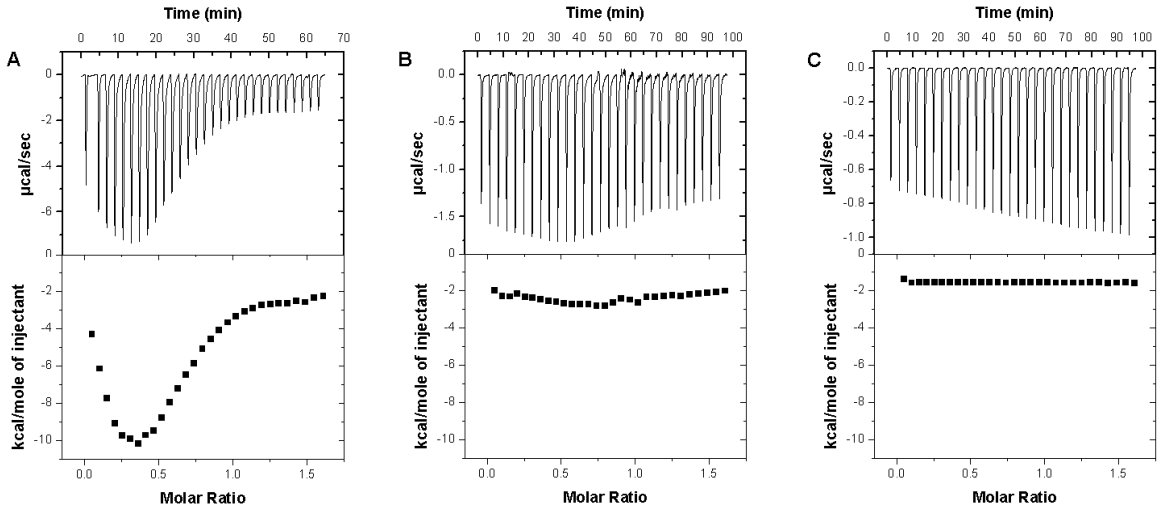

Figure 28. Interaction entre l'apo α-LA et le LYS à 45°C observée par microcalorimétrie dans du tampon 30 mM Tris/HCl (pH 7,5) contenant 15 mM NaCl (I = 39 mM ; A), 50 mM NaCl (I = 74 mM ; B) et 100 mM NaCl (I = 124 mM ; C). La figure du haut représente les signaux bruts résultant de l'ajout de LYS (2,3 mM) par incréments de 10 µl dans la cellule contenant l'apo α-LA (0,32 mM). La figure du bas représente l'intégration de l'aire de chaque pic en fonction du rapport molaire LYS/apo α-LA.

Les énergies d'interaction résultant de l'assemblage entre l'apo α-LA et le LYS à 45°C en fonction de la force ionique sont présentées sur la figure 28 (haut). Le signal d'assemblage entre le LYS et l'apo α-LA est de nature exothermique pour les trois forces ioniques étudiées.

L'aire contenue sous chaque pic, correspondant à l'énergie de l'assemblage entre le LYS et l'apo α-LA, a été intégrée et soustraite de l'énergie apportée par l'injection et la dilution du LYS dans la cellule échantillon pour générer les isothermes de liaison. Les isothermes de liaison sont présentées sur la figure 28 (bas). Le premier point n'est pas pris en compte lors des analyses. A 124 mM, l'isotherme de liaison obtenue est caractéristique de l'absence d'assemblage entre le LYS et l'apo α-LA. Pour des forces ioniques de 39 et 74 mM, les deux isothermes de liaison sont constituées de deux phases thermodynamiquement distinctes. A 39 mM, l'énergie augmente de 6,15 à 10,17 kcal.mol^{-1} de LYS injecté pour des ratios molaires LYS/apo α-LA s'échelonnant de 0,10 à 0,36, puis diminue pour atteindre une valeur de 2,24 kcal.mol^{-1} de LYS injecté pour un ratio molaire LYS/apo α-LA de 1,61. A 74 mM, l'énergie augmente de 2,30 à 2,83 kcal.mol^{-1} de LYS injecté pour des ratios molaires LYS/apo α-LA s'échelonnant de 0,10 à 0,80, puis diminue pour atteindre une valeur de 2,02 kcal.mol^{-1} de LYS injecté à un ratio molaire LYS/apo α-LA de 1,61. Ces isothermes de liaison sont donc similaires de part leur profil thermodynamique, mais diffèrent du point de vue de l'intensité énergétique.

En conclusion, la force ionique de la solution ne modifie pas le profil thermodynamique de l'assemblage entre le LYS et l'apo α-LA, et donc la nature des structures supramoléculaires formées (microsphères) ; par contre, elle module l'énergie associée à l'assemblage entre le LYS et l'apo α-LA, et par conséquent la fraction protéique contenue dans les microsphères.

2.4. Modulation de la formation des microsphères par la concentration protéique

2.4.1. Objectif, stratégie et matériels et méthodes

Nous avons montré que la force ionique de la solution module la fraction protéique incluse dans les microsphères ; cette étude a été réalisée pour une concentration protéique totale de 0,15 mM et un rapport équimolaire en LYS et apo α-LA (article 3). Nous avons également montré que pour une force ionique de 39 mM et un même rapport molaire, la turbidité des mélanges LYS/apo α-LA était fortement dépendante de la concentration protéique totale du mélange (Figure 6 de l'article 1). Bien que dépendant de la taille et du nombre de particules présentes dans la solution, la turbidité constitue un indicateur de la fraction protéique incluse dans les microsphères. Ces résultats semblent donc montrer une corrélation entre la fraction protéique impliquée dans les microsphères, la force ionique de la solution et la concentration protéique totale. Dans le but de vérifier cette corrélation, nous avons quantifié la fraction protéique incluse dans les microsphères formées pour différentes concentrations protéiques totales s'échelonnant de 0,085 mM à 0,53 mM avec un rapport molaire initial LYS/apo α-LA constant de 1 et des forces ioniques allant de 4 à 174 mM. Pour cela, les microsphères formées ont été centrifugées et les culots résultant ont été analysés par rp-HPLC (cf matériels et méthodes de l'Article 3).

2.4.2. Résultats

La fraction protéique incluse dans les microsphères préparées pour différentes concentrations protéiques totales et différentes forces ioniques a été analysée et quantifiée. Pour chacune des concentrations protéiques totales et forces ioniques testées dans cette étude, les microsphères étaient composées de LYS et d'apo α-LA en proportion équimolaire (Tableau 6).

Concentration protéique totale (mM)	0.085		0.15		0.3		0.53	
Force ionique (mM)	apo α-LA (%)	LYS (%)	apo α-LA (%)	LYS (%)	apo α-LA (%)	LYS (%)	apo α-LA (%)	LYS(%)
4	71 ± 0.2	69 ± 4.0	75 ± 1.5	75 ± 3.0	83 ± 0.7	80 ± 2.0	88 ± 1.0	84 ± 4.0
12	51 ± 1.0	48 ± 2.0	68 ± 1.4	67 ± 0.7	77 = 0	72 ± 2.0	85 ± 4.0	81 ± 0.5
24	19 + 0.1	19 + 0.1	46 + 0.7	45 + 0.7	61 − 0	57 + 0.7	74 + 3.0	70 + 0.6
39	2 ± 0.4	3 ± 0.1	13 ± 0	13 ± 0.7	38 ± 1.4	36 ± 1.4	58 ± 2.7	54 ± 1.6
54	0.3 ± 0	0.6 ± 0.1			17 = 0	17 ± 0		
74	0.2 ± 0	0.4 ± 0.1	1 ± 0	1 ± 0	5 ± 0	5 ± 0	21 ± 1.7	21 ± 1.9
99	0	0	0	0	0.2 ± 0.2	0.5 ± 0.7	6 ± 1.1	7 ± 1.5
124					0	0	1 ± 0.5	2 ± 0.7
174							0	0

Tableau 6. Fraction d'apo α-LA et de LYS incluse dans les microsphères selon la force ionique du milieu et la concentration totale en protéine. L'apo α-LA et le LYS ont été mélangés en proportion équimolaire à 45°C.

Quelle que soit la force ionique, la proportion des deux protéines dans les microsphères est stœchiométrique. Les résultats suivants concernant l'apo α-LA sont donc également valables pour le LYS. La fraction d'apo α-LA incluse dans les microsphères en fonction de la force ionique de la solution pour les quatre concentrations protéiques totales étudiées est représentée dans la figure 29. Quelle que soit la concentration protéique totale, la fraction d'apo α-LA incluse dans les microsphères diminue avec l'augmentation de la force ionique de la solution jusqu'à disparition complète signifiant l'absence de microsphère en solution. Ainsi, par un contrôle de la force ionique de la solution, il est possible de moduler la fraction d'apo α-LA et de LYS incluse dans les microsphères.

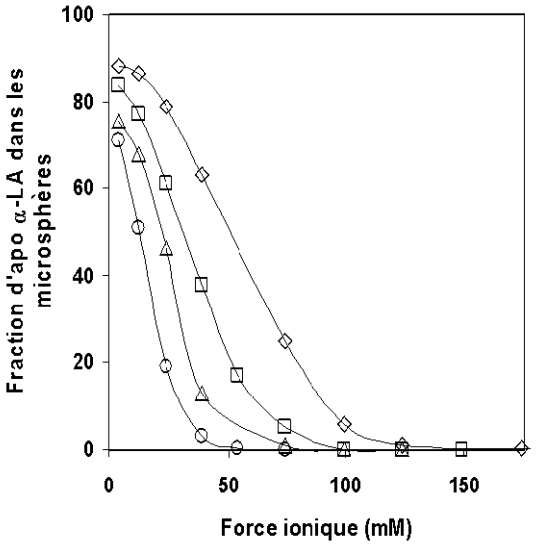

Figure 29. Fraction d'apo α-LA incluse dans les microsphères LYS/apo α-LA en fonction de la force ionique de la solution pour différentes concentrations protéiques totales : 0,085 mM (○), 0,15 mM (Δ), 0,3 mM (□) et 0,53 mM (◊). Le LYS et l'apo α-LA étaient mélangés en proportion équimolaire à 45°C.

Pour une force ionique donnée et inférieure à 150 mM, l'augmentation de la concentration protéique totale entraîne également une augmentation de la fraction d'apo α-LA incluse dans les microsphères. Par exemple, pour une force ionique de 39 mM, la fraction d'apo α-LA incluse dans les microsphères est de 3, 13, 38 et 63 % pour des concentrations protéiques totales respectives de 0,085, 0,15, 0,3 et 0,53 mM. A très faible force ionique, la fraction protéique incluse dans les microsphères augmente aussi avec l'augmentation de la concentration protéique totale. Cependant, on observe un fléchissement des courbes,

l'apo α-LA présente dans la solution n'est jamais totalement incluse dans les microsphères (Figure 29). Ce phénomène peut être expliqué par la libération de contre-ions préalablement associés aux protéines lors de l'assemblage de l'apo α-LA et du LYS en microsphères qui contribuent à l'augmentation de la force ionique de la solution. Cette fraction ionique libérée est d'autant plus importante que la concentration totale en protéines est élevée. Dans les conditions de concentrations protéiques étudiées, les concentrations calculées en contre-ions apportés par les protéines varient de 0,8-1 mM à 5-7 mM pour la faible et forte concentration protéique, respectivement.

Ces résultats confirment donc notre hypothèse selon laquelle la fraction protéique impliquée dans les microsphères est modulée à la fois par la force ionique de la solution et la concentration protéique totale du mélange.

2.5. Stabilité des microsphères en fonction du pH

2.5.1. Objectif

Nous avons montré l'implication des interactions électrostatiques dans la stabilité des microsphères en modifiant la force ionique du milieu. Dans le but de compléter ce résultat, nous avons choisi d'étudier l'implication des interactions électrostatiques dans la stabilité des microsphères en modifiant cette fois-ci le pH de la solution.

2.5.2. Résultats

Pour conforter l'implication des interactions électrostatiques dans la stabilité des microsphères formées à pH 7,5 entre l'apo α-LA et le LYS, nous avons analysé l'évolution de la turbidité et la morphologie des microsphères après la modification du pH de la solution par l'ajout de petite quantité de NaOH ou d'HCl de faible molarité. L'acidification ou l'alcalinisation des solutions contenant les microsphères s'accompagne d'une baisse de la turbidité des mélanges LYS/apo α-LA (Figure 30A) signifiant une diminution du nombre et/ou de la taille des microsphères. L'observation des microsphères après la modification du pH montre que celles-ci ont évolué en structures supramoléculaires de types agrégats contenant, pour certaines valeurs de pH, des microsphères résiduelles (Figure 30B). L'augmentation de la turbidité de la solution observée pour des pH voisin de 4,4 est attribuée

à l'auto agrégation de l'apo α-LA à son point isoélectrique et qui s'ajoute ou se substitue à la turbidité liée à la présence d'agrégats mixtes (LYS/apo α-LA). Au-delà des points isoélectriques des deux protéines (4,8 pour l'apo α-LA et 10,7 pour le LYS), la turbidité des solutions devient nulle et aucune structure supramoléculaire n'est observée en microscopie optique.

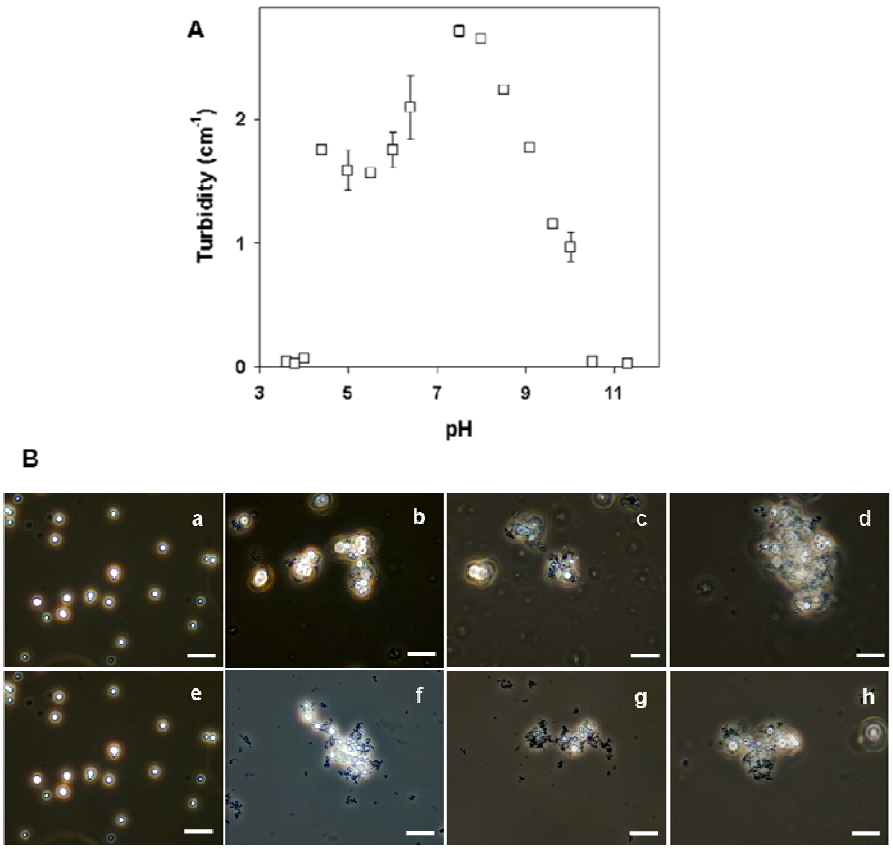

Figure 30. Influence du pH sur la stabilité des microsphères résultant de l'assemblage entre l'apo α-LA et le LYS à 45°C. Turbidité des mélanges LYS/apo α-LA après modification du pH par ajout de NaOH ou de HCL (A). Observation par microscopie optique à contraste de phase des structures supramoléculaires après la modification du pH : pH 7,5 (a et e), pH 6,5 (b), pH 5,5 (c), pH 4,4 (d), pH 8,5 (f), pH 9,5 (g), pH 10,0 (h).

Outre la modification de la force ionique du milieu, la variation du pH par l'ajout de NaOH ou d'HCl modifie également l'état d'ionisation des acides aminés portés par les protéines et donc les charges de celles-ci. Une turbidité résiduelle et des structures supramoléculaires sont observées dans une gamme de pH (5 – 10,5) où l'apo α-LA et le LYS présentent des charges de signe opposé. Alors que pour des pH où les protéines présentent des

charges nettes de signe identique (pH < 4 et pH > 10,5), la turbidité est nulle et aucune structure supramoléculaire n'est observée. L'effet du pH confirme l'implication des interactions électrostatiques dans la stabilité des structures supramoléculaires formées entre l'apo α-LA et le LYS. Par contre, ces résultats révèlent une modification structurale des microsphères en agrégats lors de la modification du pH. La modification structurale des microsphères conduit à nous poser la question de l'effet de la modification du pH par l'ajout de NaOH ou d'HCl et sur la nécessité d'avoir une neutralisation parfaite des charges de l'apo α-LA et du LYS pour former des microsphères. L'étude de l'assemblage de l'apo α-LA et du LYS dans une gamme de pH s'échelonnant de 4 à 11 permettrait d'apporter de nouveaux éléments à ces interrogations.

2.6. Rôle de la flexibilité de l'apo α-LA dans la formation des microsphères

2.6.1. Objectif, stratégie et matériels et méthodes

Dans le premier chapitre de ce travail de thèse, nous avons montré que les microsphères se forment quand l'apo α-LA adopte une structure en « molten globule ». Ces résultats conduisent à nous interroger sur l'importance de la flexibilité de l'apo α-LA dans la formation et l'orientation des structures supramoléculaires en microsphères. Pour répondre à nos interrogations, nous avons choisi de substituer l'apo α-LA par deux polymères de synthèse d'acide L-glutamique constitués respectivement de 28 (PG28) et 60 (PG60) résidus. Ces études étaient réalisées avec une concentration en LYS constante de 1,07 $g.L^{-1}$ (0.075 mM) soit une concentration identique à celle utilisée dans l'article 3. Les mélanges LYS/acide poly-L-glutamique étaient réalisés de manière à obtenir soit un rapport de concentration massique LYS/acide poly-L-glutamique de 1, soit un rapport molaire de charge positive/négative (LYS/acide poly-L-glutamique) de 1. Pour les études présentant un rapport de concentration identique, les charges apportées par les polymères de synthèse étaient en excès par rapport aux charges apportées par le LYS. Les cinétiques d'assemblage entre le LYS et les acides poly-L-glutamiques PG28 et PG60 étaient suivies par mesure de la turbidité à 600 nm et les structures supramoléculaires résultantes étaient identifiées par microscopie optique à contraste de phase. Ces études étaient effectuées pour une force ionique de 39 mM, à pH 7,5 et à 45°C.

2.6.2. Résultats

L'ajout d'acide poly-L-glutamique au LYS entraîne une augmentation immédiate de la turbidité de la solution (Figure 31A). Les cinétiques d'assemblage entre le LYS et les acides poly-L-glutamique sont similaires quelque soit le degré de polymérisation et la concentration en polymère ajouté afin d'obtenir des rapports (LYS/acide poly-L-glutamique) de concentration ou de charge identiques. Les profils cinétiques d'assemblage sont caractérisés par une augmentation brutale de la turbidité pour atteindre une valeur légèrement supérieure à 4 cm^{-1}, puis une diminution lente de la turbidité due à la sédimentation des particules pour atteindre une valeur comprise entre 3 et 3,5 cm^{-1} après 30 minutes de mélange (Figure 31A). L'observation par microscopie à contraste de phase des structures supramoléculaires formées montre que le LYS et l'acide poly-L-glutamique s'assemblent pour former des microsphères semblables à celles formées lors de l'assemblage du LYS et de l'apo α-LA à 45°C (Figure 31B).

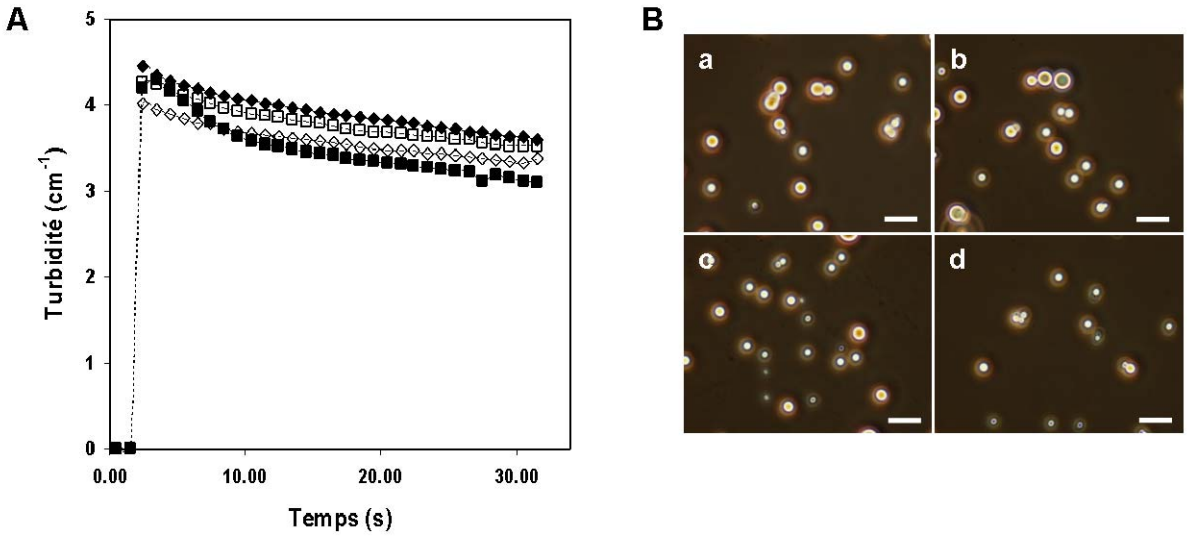

Figure 31. Cinétique d'assemblage entre le LYS et les acides poly-L-glutamiques PG28 (◊, ⍰) et PG60 (□, ■) pour des rapports de concentration LYS/polymère identique (symboles ouverts) et de charge LYS/polymère identique (symboles pleins) (A). Observation par microscopie à contraste de phase des structures supramoléculaires LYS/PG28 (a) et LYS/PG60 (c) formées pour un rapport de concentration LYS/polymère identique, et LYS/PG28 (b) et LYS/PG60 (d) formées pour un rapport de charge identique (B). La barre d'échelle représente 10 µm.

Lors de l'étude effectuée pour des concentrations en LYS et acide poly-L-glutamique identiques, les acides poly-L-glutamiques apportaient un excès de charge négative : le rapport molaire en charges négative/positive était de 13. Malgré cet excès de charges, les valeurs finales de turbidité des mélanges LYS/acides poly-L-glutamique sont similaires à celles obtenues lors des mélanges LYS/acides poly-L-glutamique présentant un rapport équimolaire en charges positive et négative. Ce résultat semble signifier que dans ces conditions le LYS représente l'espèce moléculaire limitant l'assemblage des deux biopolymères en microsphères, en accord avec le résultat obtenu lors de la formation de microsphères pour différents rapports molaires LYS/apo α-LA (Figure 4 de l'article 1).

Les cinétiques d'assemblage entre le LYS et les acides poly-L-glutamiques et les structures supramoléculaires résultantes sont identiques à celles observées lors de l'assemblage entre le LYS et l'apo α-LA. Cependant, les valeurs de turbidité atteintes lors du mélange du LYS avec les acides poly-L-glutamiques sont supérieures à celles obtenues lors du mélange du LYS et de l'apo α-LA pour une même force ionique de 39 mM (Article 3 : *Food Hydrocolloids*). Cette différence est due à la présence soit (i) de microsphères de taille plus importante soit (ii) d'une quantité plus importante de microsphères dans la solution. La taille des microsphères formées entre le LYS et les acides poly-L-glutamiques est globalement identique à celle des microsphères LYS/apo α-LA : le diamètre des microsphères est compris entre 2 et 4 µm (Figure 31B et Figure 1B de l'article 3). Par conséquent, la différence de turbidité observée peut s'expliquer par un nombre plus important de microsphères formées entre le LYS et les polymères de synthèse. Cette hypothèse reste à vérifier en quantifiant la proportion de LYS incluse dans les microsphères LYS/acides poly-L-glutamiques et LYS/apo α-LA. Cette quantification n'a pas été aisée à mettre en œuvre par chromatographie en phase inverse du fait de la forte polydispersité des chaines d'acide poly-L-glutamiques (Wang, Lai, & Li, 2004). Une optimisation technique s'avère nécessaire.

La substitution de l'apo α-LA par un polymère de synthèse, l'acide poly-L-glutamique, confirme l'importance de la flexibilité de l'apo α-LA dans la formation de microsphères lors de son assemblage avec le LYS.

2.7. Stabilité des microsphères apo α-LA/LYS en fonction de la température

2.7.1. Objectif, stratégie et matériels et méthodes

Dans cette étude, nous avons testé la stabilité des microsphères en fonction de la température après leur formation à 45°C. Les structures supramoléculaires dispersées en solution ont été observées par microscopie. Cette étude, de nature préliminaire, a été effectuée à une concentration protéique totale de 0,2 mM et un rapport équimolaire en LYS et apo α-LA.

2.7.2. Résultats

Après la formation de microsphères à 45°C (Figure 32A), leur incubation prolongée à 45°C entraîne leur fusion (Figure 32B), puis la formation d'un film protéique sur le support (Figure 32C). Ce film protéique est dispersé en microsphères lors de son incubation à 5°C (Figure 32D). Cette réversibilité du film en microsphères est plutôt intrigante et mérite d'être confirmée et approfondie. Après la formation de microsphères à 45°C, leur incubation à 5°C provoque l'agrégation des sphères en clusters (Figure 32E). Cependant et contrairement à ce que nous avons observé à 45°C, il n'existe pas de phénomène de fusion entre les microsphères agrégées et maintenues à 5°C.

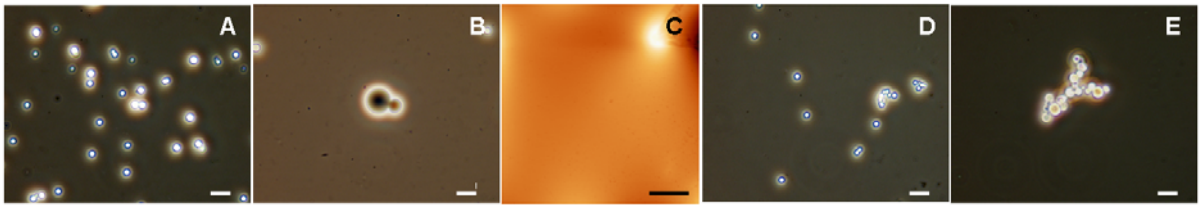

Figure 32. Evolution macroscopique des microsphères formées à 45°C en fonction de la température. Les différentes étapes observées sont : la formation des microsphères à 45°C (A), leur fusion à 45°C (B), la formation d'un film protéique à 45°C (C), la dispersion du film protéique à 5°C (D) et l'agrégation des microsphères à 5°C. La barre d'échelle représente 4 µm.

Le schéma présenté dans la figure 33 résume nos principales observations concernant la stabilité et l'évolution thermique des microsphères protéiques que nous avons générées à 45°C. Ce schéma illustre à la fois la complexité du processus thermique et la nécessité de poursuivre ces travaux pour comprendre les mécanismes thermodynamiques et cinétiques impliqués.

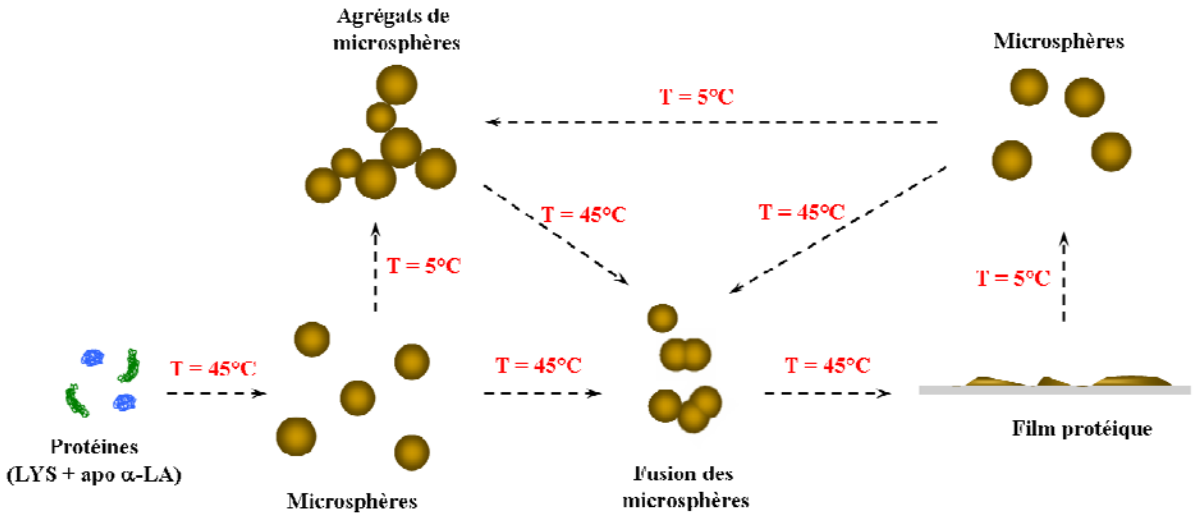

Figure 33. Schéma bilan représentant l'influence de la température sur la stabilité des microsphères résultant de l'assemblage entre l'apo α-LA et le LYS à 45°C.

2.8. Principaux résultats de ce chapitre

Nous avons mis en évidence que:

- Les interactions électrostatiques constituent l'élément moteur de l'assemblage de l'apo α-LA et du LYS en microsphères.
- La flexibilité de l'apo α-LA est primordiale à son assemblage avec le LYS en microsphères. L'apo α-LA doit adopter une structure de type « molten globule » qui lui confère une flexibilité accrue.
- Les interactions électrostatiques sont également impliquées dans la stabilité des microsphères résultant de l'assemblage entre l'apo α-LA et le LYS.
- D'autres types d'interactions telles que les associations hydrophobes et les liaisons de Van der Waals s'établissent entre les protéines au sein des microsphères et contribuent à leur stabilité.

2.9. Discussion des résultats du chapitre 2

Dans ce second chapitre de travail de thèse, nous nous sommes focalisés sur l'identification des éléments moteurs conduisant à l'assemblage de l'apo α-LA et du LYS en microsphères. Cette étude a été réalisée en modulant certains paramètres physico-chimiques de la solution (force ionique, nature des minéraux, pH, température) et en substituant l'apo α-LA par un polymère de synthèse dans le but de mimer la flexibilité de la protéine.

Importance des forces électrostatiques

Les interactions électrostatiques constituent l'élément moteur de l'assemblage de l'apo α-LA et du LYS en microsphères. En effet, nous avons montré que la vitesse de formation des microsphères, leur signal thermodynamique d'assemblage et leur taille étaient régit par la force ionique de la solution : l'augmentation de la force ionique réduisait la capacité de l'apo α-LA et du LYS à s'assembler en microsphères. Ce phénomène, également observé par Biesheuvel et al. (2006) lors de l'étude de l'assemblage entre le LYS et du LYS succinylé, s'explique par un écrantage des charges de surface de l'apo α-LA et du LYS par les ions de la solution induisant une diminution du potentiel électrostatique de surface des protéines (Biesheuvel et al., 2006). L'effet de la force ionique sur l'assemblage de l'apo α-LA et du LYS en microsphères est supporté par les études d'anisotropie de fluorescence

présentées dans le chapitre 1 (Article 2). Au cours de cette étude, nous avons montré que l'augmentation de la force ionique de la solution de 39 à 124 mM diminuait la constante d'affinité entre l'apo α-LA et le LYS d'un facteur 10. Par conséquent, l'absence de formation de microsphères de taille importante entre l'apo α-LA et le LYS lors de l'augmentation de la force ionique est conditionnée par une baisse de l'affinité entre les protéines à l'échelle moléculaire, mais aussi par une moindre aptitude des hétérodimères à s'associer en structures supramoléculaires. En effet, pour une force ionique de 124 mM et une concentration protéique totale de 0,53 mM, 70% des protéines sont complexées d'après la constante de dissociation (K_D = 1.6x10^{-4} mol.L^{-1}) déterminée entre le LYS et l'apo α-LA à cette même force ionique (Article 2). Par conséquent, l'augmentation de la force ionique semble également favoriser la solubilité des hétérodimères LYS/apo α-LA.

Nos résultats montrent également l'existence d'un lien entre la concentration protéique totale du mélange et la fraction (concentration) de protéines impliquées dans la formation des microsphères. Ce résultat est en adéquation avec l'étude de l'assemblage du LYS et du LYS succinylé menée par Biesheuvel et al. (2006) alliant l'expérimentation et la modélisation (Biesheuvel et al., 2006). Nos différents résultats montrent que la fraction d'apo α-LA et de LYS incluse dans les microsphères peut être modulée en jouant sur deux paramètres qui sont la force ionique de la solution et la concentration protéique totale du mélange. Cependant, l'augmentation de la concentration protéique totale ne permet pas d'inclure la totalité des protéines présentes dans la solution dans les microsphères, même à faible force ionique. Une fraction d'apo α-LA et de LYS est constamment quantifiée dans la phase soluble. La persistance résiduelle de protéines dans la phase soluble à faible force ionique est fréquemment rencontrée lors des assemblages entre polymères (Burgess, 1990). La mise en œuvre d'interactions électrostatiques lors d'assemblages entre polymères s'accompagne de la libération dans le milieu de contre-ions initialement associés aux molécules individuelles (de Vries et al., 2006; Turgeon et al., 2007). Ce phénomène provoque une augmentation de la force ionique de la solution s'opposant à l'assemblage des autres protéines. Ce phénomène est d'autant plus marqué que la force ionique initiale de la solution est faible.

Les interactions électrostatiques intervenant dans l'assemblage de l'apo α-LA et du LYS en microsphères sont également impliquées dans le maintien de la stabilité de ces structures supramoléculaires. La variation du pH de part et d'autre des points isoélectriques de l'apo α-LA et du LYS entraîne une déstabilisation totale des microsphères préalablement formées. Pour des pH inférieurs à 4,0 ou supérieurs à 10,5, l'apo α-LA et le LYS présentent

une charge de surface globale de même signe. Dans ces gammes de pH, aucune structure supramoléculaire n'a été observée. Par conséquent, les interactions électrostatiques qui étaient attractives et assuraient la cohésion de la structure supramoléculaire à pH 7,5 deviennent répulsives, ce qui déstabilise et déstructure totalement ou partiellement les microsphères préformées.

Les interactions électrostatiques à longue distance constituent les forces motrices permettant le rapprochement, l'interaction et l'assemblage de l'apo α-LA et du LYS en microsphères. Néanmoins, la distribution des charges à la surface de ces protéines est hétérogène avec la présence de domaines chargés, non chargés et voir même de domaines hydrophobes. Par conséquent, d'autres types d'interactions à courte distance telles que les liaisons hydrogènes, les associations hydrophobes ou encore les liaisons de Van der Waals peuvent s'établir entre les deux protéines après la formation des microsphères et stabiliser ces structures supramoléculaires. Cette hypothèse est en partie vérifiée lors de l'étude de la déstabilisation des microsphères LYS/apo α-LA par l'augmentation de la force ionique de la solution. En effet, pour déstabiliser les microsphères, la force ionique doit atteindre des concentrations bien supérieures à celles nécessaires pour inhiber l'assemblage du LYS et de l'apo α-LA en microsphères (Article 3 : *Food Hydrocolloids*). Ces résultats sont en accord avec ceux de Selzer et al. qui ont montré que l'augmentation de la force ionique abaissait la vitesse d'association (k_{on}) des protéines due à la diminution des interactions électrostatiques attractives longue distance ; alors que la vitesse de dissociation (k_{off}) était moins affectée par l'augmentation de la force ionique du fait des réorganisations structurales au sein des complexes et la mise en place d'autres types d'interactions (liaisons hydrogènes, interactions hydrophobes, liaisons de Van der Waals) à courte distance (Selzer, Albeck, & Schreiber, 2000).

Des études préliminaires effectuées par microscopie électronique à transmission après déstabilisation des microsphères par l'augmentation de la force ionique nous ont apporté des éléments de réponse quant au mécanisme de déstabilisation. La figure 34 montre un cliché obtenu après la déstabilisation des microsphères préformées entre le LYS et l'apo α-LA par l'ajout de calcium pour atteindre un rapport équimolaire en apo α-LA et en Ca^{2+}. Le cœur des microsphères apparait dense aux électrons, alors que la périphérie de ces microsphères est beaucoup plus diffuse. Par conséquent, le processus de déstabilisation est un processus d'érosion des microsphères par la périphérie et non un processus de « dislocation » totale des microsphères (Figure 34). L'érosion des microsphères s'accompagne de la libération de particules (petits agrégats) de plus petite taille.

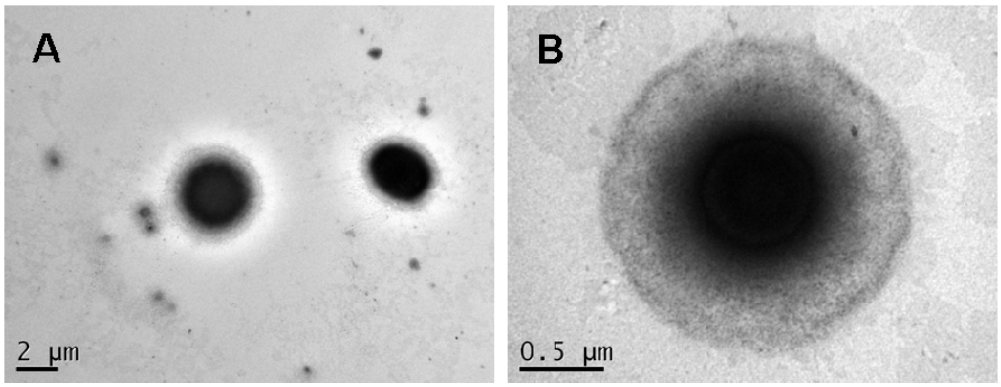

Figure 34. Clichés de microscopie électronique à transmission obtenus après la déstabilisation des microsphères préformées entre le LYS et l'apo α-LA à 45°C par l'ajout d'une solution de calcium. Le rapport molaire final Ca^{2+}/apo α-LA est de 1.

L'implication d'autres types d'interaction entre ces protéines au sein des microsphères soulève une question quant à l'intégrité de la conformation des protéines impliquées dans les structures supramoléculaires. Concernant le LYS, il a été montré que cette protéine est déstabilisée et dénaturée lors de son interaction avec des polyanions (Ivinova, Izumrudov, Muronetz, Galaev, & Mattiasson, 2003) ou des polyélectrolytes (Gummel, 2006). De plus, Ibrahim et al ont également montré une augmentation de l'activité enzymatique du LYS lors de son interaction avec l'α-LA ce qui suggère une modification structurale du LYS (Ibrahim, Taniyama, & Aoki, 2004). Il serait donc intéressant de déterminer les structures des deux protéines au sein des microsphères en utilisant la spectroscopie infrarouge (IR) et la résonance magnétique nucléaire (RMN) couplée au marquage spécifique d'une des deux protéines.

Importance de la flexibilité moléculaire

Les microsphères LYS/apo α-LA se forment à 45°C, température à laquelle l'apo α-LA adopte une structure en « molten globule » (chapitre 1) ce qui lui confère une flexibilité accrue (Griko et al., 1999; Greene et al., 1999; Bai et al., 2001). Pour évaluer l'importance de la flexibilité de l'apo α-LA dans son assemblage avec le LYS en microsphères, celle-ci a été substituée par un polymère de synthèse flexible, l'acide L-glutamique. Nous avons montré que lors du mélange du LYS et de l'acide poly-L-glutamique à 45°C, des microsphères, identiques à celles résultant de l'assemblage entre l'apo α-LA et le LYS, étaient formées. Par conséquent, la flexibilité de l'apo α-LA est primordiale pour son assemblage avec le LYS en microsphères.

Par ailleurs nous avons vu que l'assemblage entre l'apo α-LA et le LYS pour des températures inférieures à 25°C entraîne la formation d'agrégats (chapitre 1). Dans cette gamme de température, l'apo α-LA possède une structure tridimensionnelle légèrement modifiée comparativement à celle de l'holo α-LA du fait de l'absence de calcium ; cependant, la flexibilité de l'apo α-LA reste restreinte (Griko et al., 1999; Bai et al., 2001). L'apo α-LA doit donc atteindre un certain degré de flexibilité, induit dans notre étude par l'augmentation de la température, pour orienter l'assemblage vers des structures supramoléculaires de type microsphères.

La nécessité d'avoir une protéine flexible pour l'assemblage entre l'apo α-LA et le LYS est confortée par des travaux focalisés sur l'assemblage entre des biopolymères tels que les protéines et les polyélectrolytes. Des études entre les polysaccharides et les protéines montrent que le polysaccharide doit adopter une structure flexible pour former des microsphères lors de son assemblage avec la protéine (Burgess, 1990; Schmitt et al., 1998; Doublier et al., 2000). Cousin *et al.* et Gummel *et al.* ont également caractérisé la formation de complexes primaires globulaires entre le LYS et un polyélectrolyte flexible, le polystyrènesulfonate, par diffusion de neutrons aux petits angles (Cousin, Gummel, Ung, & Boue, 2005; Gummel, Boue, Deme, & Cousin, 2006). Une étude menée par Cooper *et al.* alliant l'expérimentation et la modélisation conforte l'importance de la flexibilité des polyélectrolytes dans leur association avec les protéines (Cooper et al., 2006).

Les études présentées dans ce chapitre soulignent l'importance mutuelle des interactions électrostatiques et de la flexibilité de l'apo α-LA pour la formation de microsphères avec le LYS.

Nature et stabilité des structures supramoléculaires : un rôle clé de la température

Cette deuxième partie de travail de thèse a également été consacrée à l'étude de la stabilité des microsphères préalablement formées à 45°C en fonction de la température. La température de la solution a été modifiée dans une gamme s'échelonnant de 45°C à 5°C. L'incubation prolongée, « vieillissement », des microsphères à 45°C conduit à leur fusion en microsphères de plus grande taille, puis à la formation d'un film protéique avec la disparition totale des microsphères de la solution. Cette fusion est à relier à la charge globale nulle portée par les microsphères et donc à l'absence de force répulsive entre les structures supramoléculaires (Article 3 : *Food Hydrocolloids*). Ce phénomène de fusion entre des microsphères faiblement ou pas chargées a déjà été caractérisé dans le cas d'un système protéine/polysaccharide (Schmitt et al., 2001). L'incubation des microsphères LYS/apo α-LA à 5°C entraîne leur agrégation en amas qui s'explique également par l'absence de force répulsive entre ces structures supramoléculaires. Cependant, contrairement à 45°C, aucun phénomène de fusion entre les microsphères n'est observé à 5°C. Cette différence de propriété de fusion entre 45°C et 5°C peut être expliquée par une différence de dynamique interne au sein des microsphères. A 45°C, les microsphères résultant de l'assemblage entre l'apo α-LA et le LYS présenteraient vraisemblablement une dynamique interne élevée qui facilite leur fusion et la réorganisation des protéines au sein de la nouvelle structure formée. A 5°C, la dynamique interne des microsphères serait diminuée empêchant ainsi la réorganisation des protéines et la fusion des microsphères ; les protéines constituant les microsphères doivent être figées en leur état. Pour tester cette hypothèse, il est envisagé d'étudier la dynamique interne des microsphères à 5°C et 45°C en utilisant des protéines marquées par un fluorophore et la technique de FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching).

L'effet de la température sur la stabilité des microsphères LYS/apo α-LA a également mis en évidence une propriété intéressante et surprenante du film protéique formé par ces microsphères. Après formation à 45°C, le film protéique peut être dispersé en microsphères lors de son incubation à 5°C. Ce résultat soulève des questions sur l'organisation du film. Est-il constitué d'une succession de microsphères ou se présente-t-il sous la forme d'un réseau protéique continu constitué d'apo α-LA et de LYS ? La première organisation semble a priori peu probable si on considère la dynamique interne et la fusion des microsphères à 45°C jusqu'à former un film. La deuxième semble la plus conforme à ce système. L'incubation du film à 5°C n'engendre pas la formation d'agrégats, qui sont les structures formées lors du mélange des deux protéines à cette température, mais au contraire la

formation de microsphères formées habituellement à 45°C. Or, l'apo α-LA est une protéine dont la structure est réversible par la température. Par conséquent, l'apo α-LA semble piégée par le LYS au sein du film dans sa conformation « molten globule » permettant la dispersion du film en microsphères. Des études supplémentaires sur la transition du film vers les microsphères à 5°C sont nécessaires pour comprendre le mécanisme permettant cette transition inattendue et intrigante. L'utilisation de LYS et d'apo α-LA marqués sélectivement ainsi que les techniques microscopiques (microscopie confocale, microscopie de force atomique) peuvent constituer une approche appropriée pour étudier et élucider l'organisation et l'agencement de ce film protéique.

3. Chapitre 3

Caractérisation structurale des microsphères apo α-LA/LYS par microscopies

3.1. Introduction

Après la mise en évidence de la formation de microsphères originales par assemblage entre l'apo α-LA et le LYS et l'étude des interactions impliquées, ce troisième chapitre se focalise sur la caractérisation structurale des microsphères en combinant différentes méthodes microscopiques.

Nous avons combiné les techniques microscopiques pour répondre aux questions suivantes :

- Comment les deux protéines, présentes d'une manière équimolaire, sont-elles réparties dans les microsphères ?
- Quelles sont les étapes qui jallonnent l'assemblage de l'hétérodimère LYS – apo α-LA en microsphères ?

Dans une première phase, les microsphères formées entre l'apo α-LA et le LYS ont été étudiées par deux techniques microscopiques complémentaires : la microscopie confocale à balayage laser (CSLM) et la microscopie électronique à balayage (SEM). La microscopie confocale à balayage laser a permis notamment d'étudier la distribution du LYS et de l'apo α-LA au sein des microsphères, alors que la microscopie électronique à balayage nous a apporté des éléments sur la surface de ces microsphères. Les résultats obtenus sont présentés sous la forme d'une publication parue dans *FEBS Journal* (Article 4).

Dans une seconde phase, nous avons utilisé la microscopie électronique à transmission (TEM) pour étudier les assemblages entre le LYS et l'apo α-LA. Cette technique permet une observation multi-échelle, du nanomètre au micromètre, des structures formées. La caractérisation des structures formées à différentes concentrations protéiques (de 0,02 mM à 0,2 mM) pour un rapport équimolaire en LYS et apo α-LA nous a apporté de nouveaux éléments qui nous ont permis de proposer un mécanisme quant au processus d'assemblage de ces deux protéines à 45°C. Ce travail a été mené en collaboration avec Cédric Gaillard (BIA, INRA de Nantes).

3.2. Article 4

Apo α-lactalbumin and lysozyme are colocalized in their subsequently formed spherical supramolecular assembly

FEBS Journal **2007**, *274*, 6085-6093

Michaël Nigen, Thomas Croguennec, Marie-Noëlle Madec, and Saïd Bouhallab

INRA, Agrocampus Rennes, UMR 1253, Science & Technologie du Lait et de l'Oeuf, 65 rue de Saint Brieuc, F-35000 Rennes, France.

the FEBS Journal

Apo α-lactalbumin and lysozyme are colocalized in their subsequently formed spherical supramolecular assembly

Michaël Nigen, Thomas Croguennec, Marie-Noëlle Madec and Saïd Bouhallab

INRA, Agrocampus Rennes, France

Keywords
assembly; α-lactalbumin; lysozyme; microscopy; microsphere

Correspondence
S. Bouhallab, INRA, Agrocampus Rennes, UMR 1253, Science & Technologie du Lait et de l'Œuf, 65 rue de Saint Brieuc, F-35042 Rennes cedex, France
Fax: +33 2 23 48 53 50
Tel: +33 2 23 48 57 42
E-mail: said.bouhallab@rennes.inra.fr

(Received 31 August 2007, revised 4 October 2007, accepted 5 October 2007)

doi:10.1111/j.1742-4658.2007.06130.x

We have reported previously that the calcium-depleted form of bovine α-lactalbumin (apo α-LA) interacts with hen egg-white lysozyme (LYS) to form spherical supramolecular structures. These supramolecular structures contain an equimolar ratio of the two proteins. We further explore here the organization of these structures. The spherical morphology and size of the assembled LYS/apo α-LA supramolecular structures were demonstrated using confocal scanning laser microscopy and scanning electron microscopy. From confocal scanning laser microscopy experiments with labelled proteins, it was found that LYS and apo α-LA were perfectly colocalized and homogeneously distributed throughout the entire three-dimensional structure of the microspheres formed. The spatial colocalization of the two proteins was also confirmed by the occurrence of a fluorescence resonance energy transfer phenomenon between labelled apo α-LA and labelled LYS. Polarized light microscopy analysis revealed that the microspheres formed differ from spherulites, a higher order semicrystalline structure. As the molecular mechanism initiating the formation of these microspheres is still unknown, we discuss the potential involvement of a LYS/apo α-LA heterodimer as a starting block for such a supramolecular assembly.

Protein aggregation into various nano- to micrometre architectural assemblies, including amorphous aggregates, clusters, fibrils, tubes and spherical particles, is a widespread phenomenon in biological science [1–4]. However, the mechanism underlying protein aggregation is not fully understood, and the control of protein aggregation into well-defined supramolecular structures is highly relevant in different scientific fields: biotechnology [5], medical science [6,7] and microbiology [8]. Proteins have also been shown to be an interesting material in nanotechnology for the engineering and development of novel biomaterials through the control of supramolecular structure design [9–11]. Starting from globular proteins, the formation of supramolecular structures depends on the environmental conditions (temperature, pH, ionic strength, use of denaturants) that affect protein stability [12,13]. When placed under favourable conditions, proteins are able to self-assemble into complex structures. For instance, (partially) unfolded proteins can form fibrils, aggregates or spherical particles under mild denaturing conditions when the pH of the solution is varied. At pH values far from the isoelectric point, where the protein is highly charged, the formation of fibres is favoured [14–17]. By contrast, close to the isoelectric point, spherical particles, in addition to classical amorphous aggregates, can be obtained [15,18].

In comparison with the above studies, fewer investigations have been carried out on the formation of well-defined supramolecular structures from a mixture

Abbreviations
apo α-LA, calcium-depleted α-lactalbumin; CSLM, confocal scanning laser microscopy; FITC, fluorescein isothiocyanate; FRET, fluorescence resonance energy transfer; LYS, hen egg-white lysozyme; RBITC, rhodamine B isothiocyanate; SEM, scanning electron microscopy.

of proteins, even though it has been shown to be a promising approach to the design of new architectural assemblies [19]. Recently, Biesheuvel *et al.* [20] have shown that well-organized spherical particles between oppositely charged lysozyme (native and succinylated lysozyme) can be formed. At the same time, we demonstrated the formation of spherical particles between calcium-depleted α-lactalbumin (apo α-LA) and chemically unmodified hen egg-white lysozyme (LYS) [3]. LYS and α-lactalbumin are two related proteins of 129 and 123 amino acid residues, respectively, which share a similar three-dimensional structure, including four disulfide bonds [21–23]. These proteins differ particularly in their opposing isoelectric points (the pI value of lysozyme is 10.7, whereas that of α-lactalbumin is near 4–5) and their calcium-binding properties (α-lactalbumin has a specific calcium-binding site). Interestingly, the formation of spherical particles containing the two proteins in an equimolar ratio was favoured at pH 7.5 under conditions in which apo α-LA adopts a molten globule conformation (temperature above 30 °C) [3].

In the current study, we extend this work to provide more insight into the supramolecular organization of LYS/apo α-LA into spherical particles, called here LYS/apo α-LA microspheres. Using a combination of two microscopic techniques, confocal scanning laser microscopy (CSLM) and scanning electron microscopy (SEM), we demonstrate that these microspheres are totally filled, with perfect spatial colocalization of both proteins, LYS and apo α-LA.

Results

In our previous work, we reported the ability of LYS and apo α-LA to form microspheres at pH 7.5 as long as the protein molar ratio exceeded 0.2 [3]. A molar ratio of unity was selected in the present work to further characterize the microspheres formed.

Visualization of microspheres by CSLM

The use of CSLM to characterize microspheres resulting from the interaction between LYS and apo α-LA required the labelling of both proteins with two different specific dyes. The fluorescent dyes fluorescein isothiocyanate (FITC) and rhodamine B isothiocyanate (RBITC) were covalently linked to apo α-LA and LYS, respectively. About 5% of apo α-LA or LYS contained one mole of FITC or RBITC per mole of protein, respectively, as assessed by mass spectrometry analyses (results not shown). To examine the influence of labelling on protein interaction and the formation of microspheres, LYS and apo α-LA were mixed using only one labelled protein. Figure 1 presents the CSLM images of the mixtures of apo α-LA-FITC with unlabelled LYS (Fig. 1A) and unlabelled apo α-LA with LYS-RBITC (Fig. 1B) at 45 °C. In both cases, regular spheres with a diameter in the range 1–4 μm were observed in accordance with previous observations [3]. The microspheres were either green (FITC) or red (RBITC) according to the fluorescent dye used for the labelling reaction. Consequently, neither the labelling of apo α-LA with FITC, nor the labelling of LYS with RBITC, influenced the interaction or self-association phenomenon between apo α-LA and LYS at 45 °C. Moreover, the labelling level of both proteins (~ 5%) was sufficient to allow the observation and characterization of microspheres by CSLM. From these images, the surface of the microspheres seemed to be rather smooth without any visible protuberances. During these experiments, a coalescence phenomenon was also observed between the microspheres (Fig. 1).

In Fig. 2, the images acquired using optical microscopy and CSLM are compared. This comparison was

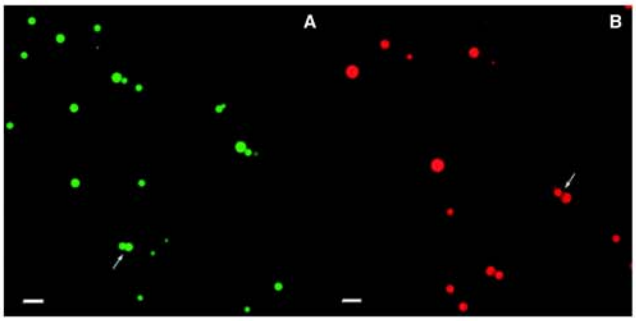

Fig. 1. Confocal scanning laser micrographs of microspheres prepared from apo α-LA-FITC and unlabelled LYS (A) or unlabelled apo α-LA and LYS-RBITC (B). Microspheres were obtained by mixing LYS (0.1 mM) with apo α-LA (0.1 mM) in 30 mM Tris/HCl buffer, pH 7.5, containing 15 mM NaCl, and incubated for 30 min at 45 °C. Scale bars = 5 μm. Arrows indicate microspheres undergoing coalescence.

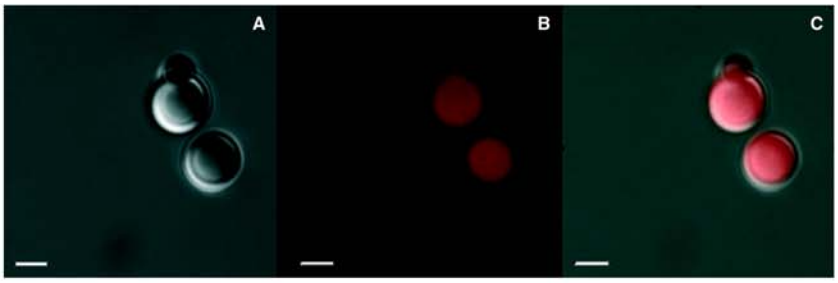

Fig. 2. Visualization of the microspheres generated from labelled proteins (apo α-LA-FITC and LYS-RBITC) using optical microscopy (A), confocal scanning laser microscopy (B) and the superimposition of the two images (C). Scale bars = 2 μm.

a good tool to determine the localization of the labelled and unlabelled areas within the microspheres. In this experiment, microspheres were formed using both labelled proteins. Figure 2A shows an image of the microspheres taken using optical microscopy. Good spherical structures were observed with a slightly bright white ring surrounding the microspheres. The image of the same (x, y) plane taken using CSLM is shown in Fig. 2B. In this image, the spherical particles are orange, resulting from the combination of the fluorescence signals of the two labelled proteins incorporated into the microspheres. After the superimposition of both optical microscopy and CSLM images, the bright white ring surrounding the microspheres was still observed, but without any fluorescence signal (Fig. 2C). Consequently, no proteins were localized in this area. This ring, only observed using optical microscopy, was probably generated from the light scattering of microspheres during optical microscopy observation.

Organization of LYS and apo α-LA within microspheres by CSLM

To investigate the distribution of apo α-LA and LYS, the microspheres were formed with both labelled proteins, and the fluorescence intensity of FITC and RBITC was measured across the spheres (Fig. 3). For this study, the three-dimensional structure of the microspheres was generated using the accumulation of several images along the z axis for a given (x, y) plane. Figure 3A shows the plane corresponding to the middle of the microspheres as an example of slices along the z axis. Figure 3B shows the normalized fluorescence intensity measured along the dotted line depicted in Fig. 3A. The two spectra showed the same behaviour along the entire line, with emission detected only

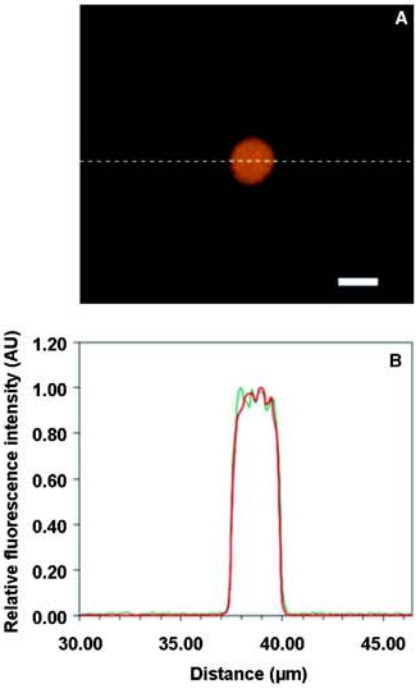

Fig. 3. Confocal scanning laser micrographs of microspheres prepared from apo α-LA-FITC and LYS-RBITC (A), and fluorescence intensity of FITC (green line) and RBITC (red line) along the dotted line (B). Scale bar = 3 μm.

at the microsphere area. The size of the microsphere determined using the two relative fluorescence intensity curves (Fig. 3B), as well as from the image, was about

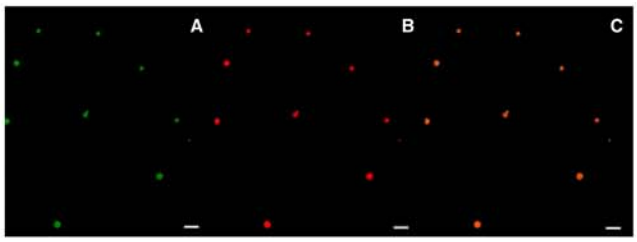

Fig. 4. Confocal scanning laser micrographs of microspheres prepared from apo α-LA-FITC and LYS-RBITC. Excitation of the dyes: 488 nm for FITC (A); 543 nm for RBITC (B); 488 and 543 nm (C). Scale bars = 5 μm.

3 μm. The superimposition of the curves representing the relative fluorescence intensity of FITC and RBITC showed a similar distribution of apo α-LA-FITC and LYS-RBITC in the microspheres. Furthermore, the relative fluorescence intensity was constant for both dyes across the microspheres. Consequently, the labelled apo α-LA and LYS were homogeneously distributed throughout the microspheres. This feature was observed whatever plane of the microsphere was studied along the *z* axis (results not shown). The distribution of the two labelled proteins inside the structures indicated that the microspheres formed were filled with both proteins. No vacuoles containing solvent or air were observed throughout the internal structure of the microspheres.

The localization of both proteins was explored in more detail by simultaneous excitation of the two dyes in the same sample (Fig. 4). The recorded images resulting from the signals of FITC and RBITC are shown in Fig. 4A and 4B, respectively. These two images were very similar, with the visualization of the same spheres in the same area of the image. Furthermore, the size of the spheres observed with FITC (Fig. 4A) was identical to the size of the spheres observed with RBITC (Fig. 4B). The superimposition of the two sets of images is presented in Fig. 4C. In this image, all the spheres were orange; neither green nor red emissions were observed. Consequently, apo α-LA and LYS are colocalized throughout the microspheres.

Further evidence of the colocalization of the two proteins in the microspheres was drawn from fluorescence emission spectra. When microspheres containing both labelled proteins were excited at 543 nm, one spectrum with a maximum emission wavelength at 584 nm was recovered (Fig. 5A). This spectrum was attributed to the emission of RBITC, as the same emission spectrum was obtained after excitation at 543 nm of LYS-RBITC/apo α-LA microspheres (Fig. 5A). By contrast, excitation at 488 nm of the microspheres containing both labelled proteins resulted

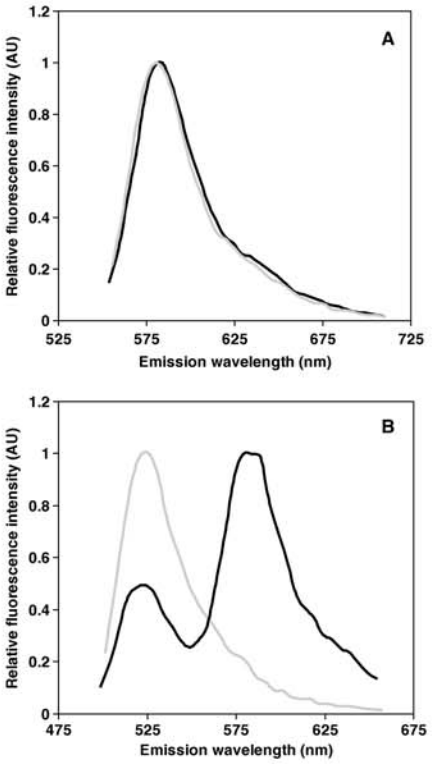

Fig. 5. Emission spectra of LYS-RBITC/apo α-LA (gray) and LYS-RBITC/apo α-LA-FITC (black) excited at 543 nm (A), and LYS/apo α-LA-FITC (gray) and LYS-RBITC/apo α-LA-FITC (black) excited at 488 nm (B).

in an emission spectrum containing two maxima at wavelengths of 524 and 584 nm (Fig. 5B). Only one maximum at a wavelength of 522 nm was recovered from the emission spectrum following excitation at

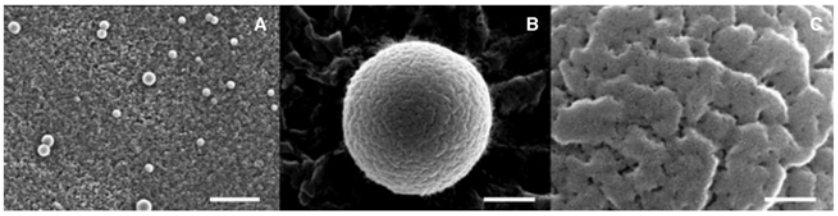

Fig. 6. Scanning electron micrographs of microspheres generated from LYS and apo α-LA at different magnifications: (A) × 2000; scale bar = 10 μm; (B) × 20 000; scale bar = 1 μm; (C) × 100 000; scale bar = 0.2 μm. Microspheres were obtained by mixing LYS (0.1 mM) with apo α-LA (0.1 mM) in 30 mM Tris/HCl buffer, pH 7.5, containing 15 mM NaCl, and incubated for 30 min at 45 °C.

488 nm of the microspheres formed from the mixture of LYS/apo α-LA-FITC (Fig. 5B). In addition, no emission signal from FITC was observed after the excitation at 543 nm of LYS/apo α-LA-FITC microspheres (results not shown). Consequently, the two maxima at wavelengths of 524 and 584 nm in the emission spectrum of the microspheres containing both labelled proteins can be attributed to the emission of FITC and RBITC, respectively. In a control experiment, no emission signal was detected after excitation of LYS-RBITC/apo α-LA microspheres at 488 nm, as reported previously by Lamprecht *et al.* [24]. Consequently, the occurrence of an unexpected emission signal at 584 nm (Fig. 5B) could be attributed to fluorescence resonance energy transfer (FRET) from FITC to RBITC: a quantity of the energy from the emission of FITC was transferred and absorbed by RBITC, acting as excitation energy. The FRET phenomenon occurs only when dyes are close to one another, within the 1–10 nm range [25]. Moreover, it should be noted that the relative fluorescence intensity of the pick corresponding to FITC was lower than that of RBITC, underlying the high-energy transfer yield. The FRET phenomenon between FITC and RBITC confirms the good colocalization of apo α-LA and LYS within the microspheres, the proteins being separated by less than 10 nm.

Characterization of the microsphere surface by SEM

The morphology and external structure of the microspheres were studied using SEM. The scanning electron micrographs in Fig. 6 show that the microspheres have a diameter in the range 1–4 μm (Fig. 6A,B), in good agreement with the microsphere diameter determined by confocal microscopy and optical microscopy. The microspheres seemed to have a compact and densely packed structure with a coarse surface (Fig. 6B,C) without any protuberances. The surface of the microspheres exhibited a somewhat specific organization (Fig. 6C), consisting of a relatively rough network that was shown to be made up of both proteins (CSLM observations). Such a rough appearance of the microspheres could be linked to the evaporation of water during the dehydration step needed for SEM observations.

Coalescence between microspheres was also observed using SEM. The coalescence phenomenon between three microspheres is shown in Fig. 7A. Different stages of the coalescence phenomenon are shown in this image. The two larger microspheres are at an earlier stage of the coalescence phenomenon, whereas the coalescence phenomenon is almost complete in the large microsphere in the middle and the smaller one

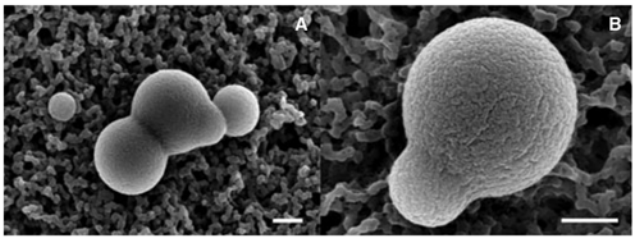

Fig. 7. Scanning electron micrographs showing the coalescence phenomenon between microspheres prepared from LYS and apo α-LA at different magnifications: (A) × 10 000; (B) × 20 000. Scale bars = 1 μm.

on the right, as also shown in Fig. 7B. At the beginning, the two microspheres seem to coalesce with the formation of a groove between them, which appears darker on the image. Then, the microspheres continue to coalesce, with the disappearance of the groove between them at the end of this phenomenon; one of the two microspheres seems to be absorbed by the second, as shown in Fig. 7A,B. The coalescence observed between these microspheres appears as a 'swallowing up' phenomenon.

Discussion

Understanding specific associations between proteins is fundamental to all aspects of life, as well as to the generation of novel biomaterials of interest for the pharmaceutical and food industries. Well-ordered amyloid fibres, characterized by a canonical cross-β structure and the frequent presence of repetitive hydrophobic or polar interactions along the fibrillar axis, and classical irregular amorphous aggregates are the main protein assemblies that have been extensively studied. Spherical particles constitute a recent type of supramolecular structure that is formed during protein self-assembly under slightly stressed conditions. Recently, we have reported the occurrence of spheres following the interaction and assembly of two small globular proteins, LYS and apo α-LA, under specific physicochemical conditions. Optical microscopic observations showed that, at 45 °C and pH 7.5, the LYS/apo α-LA assembly leads to the formation of microspheres, with a size range from 1 to 4 μm. The present study provides the first characterization of the external and internal structures of these original microspheres. Using CSLM, we observed that these microspheres are filled structures, with the two hydrated proteins well distributed throughout the spherical particle and without solvent vesicles in the internal structure. Spherical supramolecular structures exhibiting different properties depending on the nature of the biopolymer and the experimental conditions have been reported for other protein systems. For instance, spherical filled structures similar to those described here have been reported to occur during the fibrillation process of tropoelastin [26]. It has been shown that tropoelastin alone in solution is able to form microspheres containing hydrated proteins when hydrophobic patches are exposed onto the protein surface at temperatures above 29 °C. Otherwise, higher order semicrystalline spheres, called spherulites, have been observed during protein self-assemblies. For instance, these particular supramolecular structures have been reported in the case of heat-treated β-lactoglobulin [15] or bovine insulin [17]. One of the main properties of spherulites is that they exhibit, under a polarized light microscope, a typical Maltese cross pattern of light extinction, which is caused by the difference in refractive index between the plane axis and the perpendicular axis. Polarized light microscopy analysis ruled out the occurrence of such spherulite forms in our protein system (results not shown). As in the case of tropoelastin [26], it is assumed that the LYS/apo α-LA microspheres are likely to grow in an outward manner and to reach a critical size, at which no more protein molecules can be incorporated. However, the precise internal organization is still unknown; in particular, how solvent molecules are sequestered and how both proteins are arranged in the three-dimensional network. Studies are currently in progress to further explore the internal structure of the microspheres formed, as well as the mechanism of their formation, using cryo-high-resolution SEM and time-resolved small-angle X-ray scattering. At a mechanical level, it is widely established that a 'nucleated growth mechanism' prevails during biopolymer self-assembly processes [6]. Such a nucleation and growth process can be described either by the classical theory of heterogeneous nucleation or by an aggregation mechanism involving primary particles [27].

We have demonstrated here that LYS and apo α-LA are perfectly colocalized in the microspheres, as demonstrated by the CSLM image and by the energy transfer from the apo α-LA-FITC fluorescence emission to LYS-RBITC (FRET phenomenon). This result corroborates our recent finding concerning the equimolar quantity of LYS and apo α-LA in the microspheres, whatever the initial LYS/apo α-LA molar ratio in the bulk [3]. Thus, mechanistically speaking, it appears likely that the microspheres formed are composed of an assembly of an elementary dimeric entity containing a molecule of LYS and a molecule of apo α-LA. The occurrence of a heterodimer form between lysozyme and α-lactalbumin at neutral pH has already been observed by Ibrahim *et al.* [28]. Our proposal is that this dimeric form plays a central role in the nucleation and/or growth steps to form the final structures. If confirmed, such a growth mechanism will strongly support the work by Dima and Thirumalai [29] showing the crucial role of dimerization in protein aggregation and self-propagation.

Two main hypotheses are generally proposed as the requirement for the aggregation and assembly process of a globular protein [6]: (a) conformational change, leading to the formation of an unfolded state with decreased stability; (b) the formation of an oligomeric structure between native protein conformations which enhances the association process. As the formation of

LYS/apo α-LA microspheres requires both partial unfolding of apo α-LA, obtained at a temperature above 27 °C [30], and probably the formation of a heterodimer as a starting block, our protein system is a special case in which the two events occur together.

In conclusion, the LYS/apo α-LA system constitutes a good model to highlight the mechanistic keys required for a fundamental understanding of the events involved in protein self-assembly (driving forces, nature and energy of the interactions) leading to different supramolecular structures [3], and for the control and orientation of protein interactions and cluster formation. We are convinced that an understanding of the behaviour of this system will shed new light on the relationships between interactions at the molecular level and the architecture of the generated supramolecular structures. Studies on the mechanism of the formation and association of the heterodimer between the two proteins are underway.

Experimental procedures

Materials

Commercial lysozyme (LYS) was purchased from Ovonor and contained 95% LYS and 3% chloride ions. Holo α-lactalbumin (holo α-LA) was purified from bovine whey as reported by Caussin *et al.* [31]. Apo α-lactalbumin (apo α-LA) was prepared by dialysis of a solution of holo α-LA against deionized water at pH 3 during 48 h at 4 °C using a 6–8000 Da nominal cut-off membrane (Spectrum Laboratories, Gardena, CA, USA) in order to remove calcium ions. Then, the pH of the apo α-LA solution was adjusted to pH 7 with 1 M NaOH and freeze-dried; the apo α-LA powder contained less than 2% calcium. FITC and RBITC were purchased from Sigma-Aldrich (L'Isle d'Abeau Chesnes, France).

Protein labelling

LYS and apo α-LA were labelled separately using two different covalently linking fluorescent dyes: FITC and RBITC were used for apo α-LA and LYS labelling, respectively. The labelling was achieved as follows. Aqueous solutions of 0.2 mM LYS and 0.2 mM apo α-LA were adjusted to pH 8.5 using 1 M NaOH and filtered through a 0.2 μm membrane. Subsequently, 100 μL of the dye solution, dissolved in dimethylsulfoxide at a concentration of 1 mg·mL^{-1}, was added to the protein solution. The cross-linking reaction occurred at room temperature under gentle stirring during 3 h. Then, the solutions were first dialysed against 10 mM Tris/HCl, 0.6 M NaCl buffer, pH 7, to remove free dyes, and second against deionized water at pH 7 using a dialysis membrane (Spectrum Laboratories) with a nominal cut-off of 6–8000 Da. The solutions were then centrifuged at 12 000 ***g*** for 30 min and the supernatants were recovered and freeze-dried.

Preparation of LYS/apo α-LA mixtures

Stock solutions of labelled and unlabelled LYS and apo α-LA were prepared by solubilization of protein powder in 30 mM Tris/HCl, 15 mM NaCl buffer, pH 7.5, and filtered through a 0.2 μm membrane. The protein concentration was determined by measuring the absorbance at 280 nm using extinction coefficients of 2.01 and 2.64 L·g^{-1} cm^{-1} for apo α-LA and LYS, respectively.

Mixtures of LYS/apo α-LA with a molar ratio of unity at 45 °C were prepared using stock solutions of labelled and unlabelled LYS and apo α-LA. The final protein concentration in the mixtures was 0.2 mM. Mixtures containing at least one labelled protein were used for CSLM studies, whereas only unlabelled proteins were used for SEM studies. In this study, all the microscopic analyses were performed after equilibration of the protein mixtures at 45 °C for 30 min.

CSLM and optical microscopy

A Nikon C1Si laser scanning confocal imaging system on an inverted TE2000-E microscope (Nikon, Champigny-sur-Marne, France), equipped with a differential interference contrast unit and argon ion and helium/neon lasers emitting at 488 and 543 nm, respectively, was used to investigate the organization of LYS and apo α-LA within microspheres. All optical and fluorescence confocal data were acquired with a ×100 objective (oil immersion; numeric aperture, 1.40). CSLM studies were performed using the standard mode for the acquisition of images and the spectral mode for the acquisition of the spectra of the dyes. For the acquisition of images using the standard mode, FITC and RBITC were excited at 488 and 543 nm, respectively, and the emitted light from FITC and RBITC was recovered at 515/30 and 590/50 nm, respectively. For the acquisition of spectra, the spectral imaging system C1si was used. FITC and RBITC were excited at 488 and 543 nm, respectively, and the emission spectra of both dyes were recovered using a multianode PMT made up of 32 channels with a resolution of 5 nm. The microspheres were analysed under optical and polarized light using a differential interference contrast unit which enhances the contrast between the object and the background using the 543 nm line of the helium/neon laser. The software used for the CSLM and optical images was EZ-C1 version 3.40 (Nikon).

SEM

Mixtures of apo α-LA and LYS, prepared at 45 °C, were deposited on an ester cellulose membrane. Samples were

fixed in 30 mM Tris/HCl, 15 mM NaCl buffer, pH 7.5, containing 2.5% (v/v) glutaraldehyde for 1 h at room temperature. Then, the samples were dehydrated using successive ethanol solutions at 50%, 75%, 85%, 95% and 100% (elapsed time per solution, 5 min). Following dehydration, the samples were critical point dried using carbon dioxide, and coated with gold. The experiments were performed using a JEOL JSM 6301F field emission scanning electron microscope with an accelerating voltage of 9 kV (JEOL, Tokyo, Japan).

Acknowledgements

The authors would like to thank J. Le Lannic (CMEBA, Rennes, France) for his contribution to the acquisition of SEM images, and D. Mollé (UMR1253 INRA, Rennes, France) for performing mass spectrometry analyses.

References

1 Goers J, Permyakov SE, Permyakov EA, Uversky VN & Fink AL (2002) Conformational prerequisites for α-lactalbumin fibrillation. *Biochemistry* **41**, 12546–12551.
2 Majhi PR, Ganta RR, Vanam RP, Seyrek E, Giger K & Dubin PL (2006) Electrostatically driven protein aggregation: β-lactoglobulin at low ionic strength. *Langmuir* **22**, 9150–9159.
3 Nigen M, Croguennec T, Renard D & Bouhallab S (2007) Temperature affects the supramolecular structures resulting from α-lactalbumin–lysozyme interaction. *Biochemistry* **46**, 1248–1255.
4 Stradner A, Sedgwick H, Cardinaux F, Poon WCK, Egelhaaf SU & Schurtenberger P (2004) Equilibrium cluster formation in concentrated protein solutions and colloids. *Nature* **432**, 492–495.
5 Yon JM (1996) The specificity of protein aggregation. *Nat Biotechnol* **14**, 1231.
6 Chiti F & Dobson CM (2006) Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu Rev Biochem* **75**, 333–366.
7 Gazit E (2002) A possible role for π-stacking in the self-assembly of amyloid fibrils. *FASEB J* **16**, 77–83.
8 Chapman MR, Robinson LS, Pinkner JS, Roth R, Heuser J, Hammar M, Normark S & Hultgren SJ (2002) Role of *Escherichia coli* curli operons in directing amyloid fiber formation. *Science* **295**, 851–855.
9 Sanguansri P & Augustin MA (2006) Nanoscale materials development – a food industry perspective. *Trends Food Sci Technol* **17**, 547–556.
10 Zhang S, Marini DM, Hwang W & Santoso S (2002) Design of nanostructured biological materials through self-assembly of peptides and proteins. *Curr Opin Chem Biol* **6**, 865–871.
11 Zhang S (2003) Fabrication of novel biomaterials through molecular self-assembly. *Nat Biotechnol* **21**, 1171–1178.
12 Jahn TR & Radford SE (2007) Folding versus aggregation: Polypeptide conformations on competing pathways. *Arch Biochem Biophys*, doi:10.1016/j.abb.2007.05.015.
13 Kelly JW (1998) The alternative conformations of amyloidogenic proteins and their multi-step assembly pathways. *Curr Opin Struct Biol* **8**, 101–106.
14 Bolder SG, Hendrickx H, Sagis LMC & van der Linden E (2006) Fibril assemblies in aqueous whey protein mixtures. *J Agric Food Chem* **54**, 4229–4234.
15 Bromley EHC, Krebs MRH & Donald AM (2005) Aggregation across the length-scales in β-lactoglobulin. *Faraday Discuss* **128**, 13–27.
16 Krebs MRH, Wilkins DK, Chung EW, Pitkeathly MC, Chamberlain AK, Zurdo J, Robinson CV & Dobson CM (2000) Formation and seeding of amyloid fibrils from wild-type hen lysozyme and a peptide fragment from the β-domain. *J Mol Biol* **300**, 541–549.
17 Krebs MRH, Bromley EHC, Rogers SS & Donald AM (2005) The mechanism of amyloid spherulite formation by bovine insulin. *Biophys J* **88**, 2013–2021.
18 Krebs MRH, Devlin GL & Donald AM (2007) Protein particulates: another generic form of protein aggregation? *Biophys J* **92**, 1336–1342.
19 Padilla JE, Colovos C & Yeates TO (2001) Nanohedra: using symmetry to design self assembling protein cages, layers, crystals, and filaments. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 2217–2221.
20 Biesheuvel PM, Lindhoud S, de Vries R & Cohen Stuart MA (2006) Phase behavior of mixtures of oppositely charged nanoparticles: heterogeneous Poisson–Boltzmann cell model applied to lysozyme and succinylated lysozyme. *Langmuir* **22**, 1291–1300.
21 Greene LH, Grobler JA, Malinovskii VA, Tian J, Acharya KR & Brew K (1999) Stability, activity and flexibility in α-lactalbumin. *Protein Eng* **12**, 581–587.
22 Iyer LK & Qasba PK (1999) Molecular dynamics simulation of α-lactalbumin and calcium binding c-type lysozyme. *Protein Eng* **12**, 129–139.
23 Qasba PK & Kumar S (1997) Molecular divergence of lysozymes and α-lactalbumin. *Crit Rev Biochem Mol* **32**, 255–306.
24 Lamprecht A, Schafer UF & Lehr C-M (2000) Characterization of microcapsules by confocal laser scanning microscopy: structure, capsule wall composition and encapsulation rate. *Eur J Pharm Biopharm* **49**, 1–9.
25 Hallworth R, Currall B, Nichols MG, Wu X & Zuo J (2006) Studying inner ear protein–protein interactions using FRET and FLIM. *Brain Res* **1091**, 122–131.
26 Clarke AW, Arnspang EC, Mithieux SM, Korkmaz E, Braet F & Weiss AS (2006) Tropoelastin massively

associates during coacervation to form quantized protein spheres. *Biochemistry* **45**, 9989–9996.
27 Burgess DJ (1990) Practical analysis of complex coacervate systems. *J Colloid Interface Sci* **140**, 227–238.
28 Ibrahim HR, Taniyama N & Aoki T (2004) Distinct dimerization between α-lactalbumin and lysozyme exhibiting novel antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Lett Drug Des Discov* **1**, 101–109.
29 Dima RI & Thirumalai D (2002) Exploring protein aggregation and self-propagation using lattice models: phase diagram and kinetics. *Protein Sci* **11**, 1036–1049.
30 Griko YV & Remeta DP (1999) Energetics of solvent and ligand-induced conformational changes in α-lactalbumin. *Protein Sci* **8**, 554–561.
31 Caussin F, Famelart MH, Maubois JL & Bouhallab S (2003) Mineral modulation of thermal aggregation and gelation of whey proteins: from β-lactoglobulin model system to whey protein isolate. *Lait* **83**, 353–364.

3.3. Caractérisation des microsphères résultant de l'assemblage entre le LYS et l'apo α-LA par microscopie électronique à transmission (TEM)

3.3.1. Objectif, stratégie et matériels et méthodes

Dans les études précédentes, les assemblages protéiques formés entre le LYS et l'apo α-LA ont été caractérisés à l'échelle moléculaire (hétérodimère) et macroscopique (microsphère). Dans le but d'élucider les différentes étapes, notamment mésoscopique (échelle intermédiaire entre le moléculaire et le macroscopique), du mécanisme d'assemblage entre le LYS et l'apo α-LA, les structures supramoléculaires formées à 45°C entre ces deux protéines pour différentes concentrations protéiques totales (de 0,02 mM à 0,2 mM) et un rapport équimolaire en LYS et apo α-LA ont été caractérisées par microscopie électronique à transmission (TEM). Cette technique microscopique présente l'avantage de permettre l'observation d'objets s'échelonnant du nanomètre au micromètre.

3.3.2. Résultats

Les structures supramoléculaires formées à des concentrations protéiques de 0,02 mM sont présentées dans la figure 35. A cette concentration protéique, le LYS et l'apo α-LA s'assemblent en structures de type agrégats dont la taille s'échelonne de 10 à 300 nm. Cependant, ces structures agrégées possèdent une organisation particulière : elles sont constituées de petites sous-unités plus ou moins sphériques présentant un diamètre inférieur à 10 nm. Par conséquent, les structures agrégées observées à une concentration protéique de 0,02 mM résultent certainement de l'assemblage de petites particules sphériques.

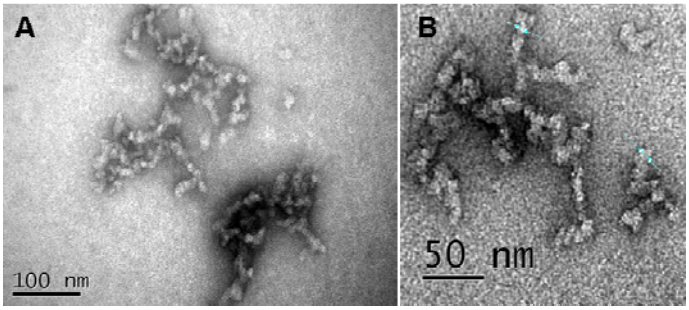

Figure 35. Observation par microscopie électronique à transmission des structures supramoléculaires résultant de l'assemblage entre le LYS et l'apo α-LA pour une concentration protéique totale de 0,02 mM. Le LYS et l'apo α-LA ont été mélangés dans des proportions équimolaires à 45°C. Les barres d'échelle sont de 100 nm (A) et 50 nm (B).

A une concentration protéique de 0,04 mM, le LYS et l'apo α-LA s'assemblent pour former des particules sphériques avec un diamètre de quelques dizaines de nanomètres (« nanosphères ») : le diamètre de ces « nanosphères » est compris entre 20 et 40 nm (Figure 36). Au sein de cet échantillon, aucune structure de taille supérieure à 40 nm et de type agrégat n'a été observée. Par conséquent, l'augmentation de la concentration protéique de 0,02 à 0,04 mM conduit à une réorganisation des structures agrégées constituées de petites particules sphériques (d < 10 nm) en « nanosphères » (particules sphériques) de 40 nm de diamètre.

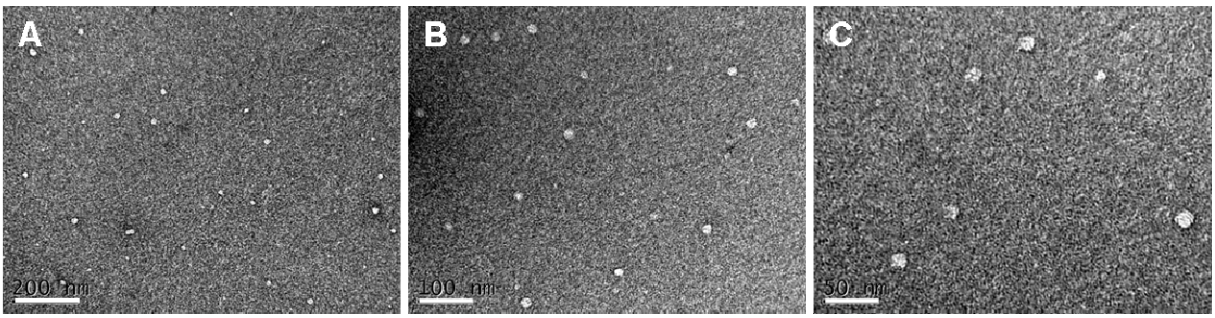

Figure 36. Observation par microscopie électronique à transmission des structures supramoléculaires résultant de l'assemblage entre le LYS et l'apo α-LA pour une concentration protéique totale de 0,04 mM. Le LYS et l'apo α-LA ont été mélangés dans des proportions équimolaires à 45°C. Les barres d'échelle sont de 200 nm (A), 100 nm (B) et 50 nm (C).

Lors du mélange du LYS et de l'apo α-LA à une concentration de 0,1 mM, deux types de structures supramoléculaires sont générées : des particules sphériques (Figure 37 : A et B) et des agrégats fractaux (Figure 37 : C et D). Les particules sphériques observées au sein de l'échantillon sont hétérogènes en taille, deux populations peuvent être distinguées (Figure 37 : A et B). Les petites particules sphériques présentent un diamètre de l'ordre de 20 à 50 nm (Figure 37 A), alors que les particules de taille supérieure ont un diamètre d'environ 300 nm (Figure 37 B). Les particules sphériques d'environ 50 nm de diamètre sont similaires en taille à celles observées à une concentration protéique de 0,04 mM. Les particules sphériques de 300 nm sont caractérisées par une morphologie particulière : elles semblent constituées de petites structures sphériques présentant un diamètre d'environ 50 nm (Figure 37 B). Dans cet échantillon, des structures de type agrégat sont également observées. Elles sont hétérogènes en taille (400 à 700 nm) et semblent être constituées de sous-unités sphériques de diamètre compris entre 20 et 50 nm. Par conséquent, les particules sphériques de 300 nm et les agrégats fractaux semblent résulter de l'assemblage de petites particules sphériques (diamètre 50 nm) qui constituent les sous-unités de ces assemblages.

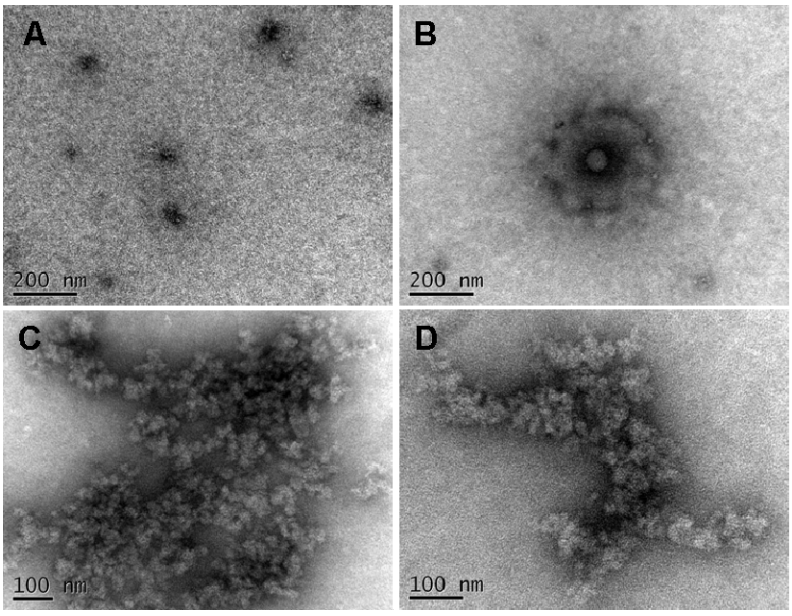

Figure 37. Observation par microscopie électronique à transmission des structures supramoléculaires résultant de l'assemblage entre le LYS et l'apo α-LA pour une concentration protéique totale de 0,1 mM. Le LYS et l'apo α-LA ont été mélangés dans des proportions équimolaires à 45°C. Les barres d'échelle sont de 200 nm (A et B) et 100 nm (C et D).

Dans le mélange préparé à une concentration protéique de 0,2 mM, des particules sphériques présentant un diamètre de 1 à 2 µm (microsphères) sont observées (Figure 38). Ce résultat est en adéquation avec les observations précédentes effectuées via différentes techniques microscopiques (Microscopie à contraste de phase, CSLM, SEM) pour une concentration identique en protéine. Ces microsphères apparaissent très denses, cela ne permet donc pas de distinguer d'éventuelles sous-unités constituant ces structures. Les microsphères observées sur les clichés 38A et 38B semblent être engagées dans un processus de fusion d'une part (Figure 38B) et dans un processus d'agrégation d'autre part (Figures 38A). Cependant, cette technique présente l'inconvénient de compresser l'image, la notion de volume est donc perdue et il est alors difficile de discriminer entre la fusion de ces microsphères et leur superposition dans l'espace sur la figure 38B. La nature des interactions mises en œuvre entre les sphères reste pour le moment méconnue.

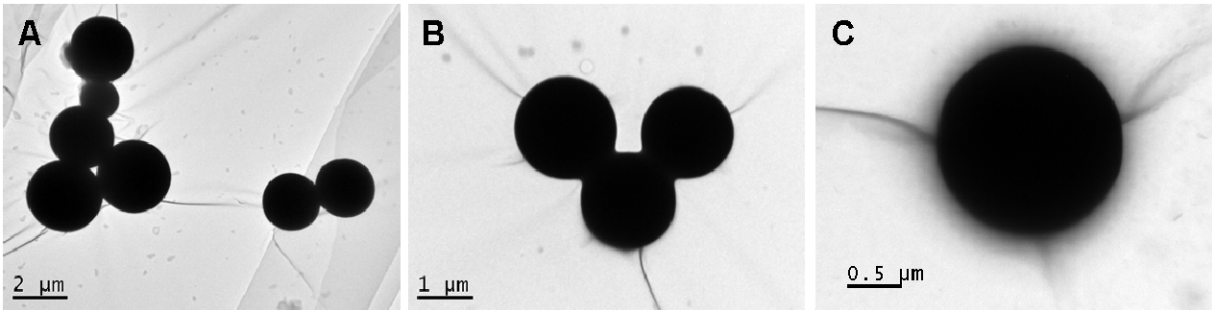

Figure 38. Observation par microscopie électronique à transmission des structures supramoléculaires résultant de l'assemblage entre le LYS et l'apo α-LA pour une concentration protéique totale de 0,2 mM. Le LYS et l'apo α-LA ont été mélangés dans des proportions équimolaires à 45°C. Les barres d'échelle sont de 2 µm (A), 1 µm (B) et 500 nm (C).

Cette étude montre que le LYS et l'apo α-LA s'assemblent en différentes structures supramoléculaires selon la concentration protéique à 45°C : des particules sphériques et des structures agrégées fractales sont formées. Dans la gamme de concentration protéique étudiée, la formation de structures agrégées et de particules sphériques est le plus fréquemment alternée. De plus, les structures agrégées formées sont constituées de particules sphériques de plus petite taille. Après la formation de structures agrégées, l'augmentation de la concentration protéique conduit à la formation de nouvelles particules sphériques de diamètre supérieur. Nous supposons donc que la réorganisation en clusters constitue l'étape initiale

pour la formation d'agrégats observés aux autres concentrations qui se réorganisent ensuite pour former des sphères de taille supérieure. Ces études montrent que l'augmentation du diamètre des particules sphériques suit un processus d'agrégation.

3.4. Principaux résultats du chapitre 3

Les techniques microscopiques nous ont permis d'approcher l'organisation des deux protéines au sein des sphères formées à 45°C ainsi que leur mécanisme d'assemblage :

- Dans une gamme de concentration protéique s'échelonnant de 0,02 à 0,2 mM, le LYS et l'apo α-LA s'assemblent en particules sphériques stabilisées à l'état individuel ou en structures agrégées selon la concentration protéique.
- De petites particules sphériques servent d'éléments de base à la formation de structures agrégées qui se réorganisent pour générer de nouvelles structures sphériques de taille plus importante.
- L'apo α-LA et le LYS sont distribués de manière homogène au sein de la structure tridimensionnelle des microsphères avec une co-localisation parfaite de ces deux protéines.
- Les microsphères formées entre l'apo α-LA et le LYS sont des structures « totalement » remplies par les deux protéines.
- Les observations en microscopie confocale à balayage laser et en microscopie électronique à balayage montrent l'existence de phénomène de fusion entre ces microsphères.

3.5. Discussion des résultats du chapitre 3

Dans ce dernier chapitre, nous avons abordé la caractérisation à la fois (i) des microsphères (échelle macroscopique) formées à concentration protéique élevée et (ii) de leur mécanisme de formation à l'échelle mésoscopique.

Les études menées par microscopie confocale à balayage laser ont mis en évidence une répartition homogène du LYS et de l'apo α-LA au sein de la structure tridimensionnelle des microsphères avec une co-localisation de ces deux protéines. Ce résultat est en adéquation avec le rapport équimolaire en LYS et apo α-LA quantifié au sein des microsphères quelle

que soit leur condition de formation (force ionique, concentration protéique, rapport molaire LYS/apo α-LA) et l'identification d'un hétérodimère entre ces deux protéines à l'échelle moléculaire.

La connaissance du processus allant du moléculaire au macroscopique est la question qui préoccupe souvent la communauté scientifique s'intéressant aux assemblages des (bio)-polymères. Dans le cas de notre système, nous avons cherché à savoir comment les microparticules sont formées à partir de protéines individuelles en passant par l'hétérodimère identifié. Les études effectuées par microscopie électronique à transmission ont permis de disposer de quelques éléments sur les différentes étapes de formation des microsphères et de proposer un mécanisme d'assemblage entre le LYS et l'apo α-LA s'échelonnant du moléculaire au macroscopique (Figure 39). Le mécanisme proposé de formation des microsphères entre le LYS et l'apo α-LA suggère des étapes successives d'agrégation d'entités protéiques (hétérodimères, nanosphères), et donc de concentration de ces entités protéiques, qui se réorganisent ensuite pour former de nouvelles particules sphériques de taille supérieure. A de faible concentration protéique, les hétérodimères formés s'agrègent en clusters d'hétérodimères qui se réorganisent ensuite en petites particules sphériques (« nanosphères »). Ces « nanosphères » formées suivent également le même processus en s'agrégeant avant de se réorganiser en microsphères (Figure 39).

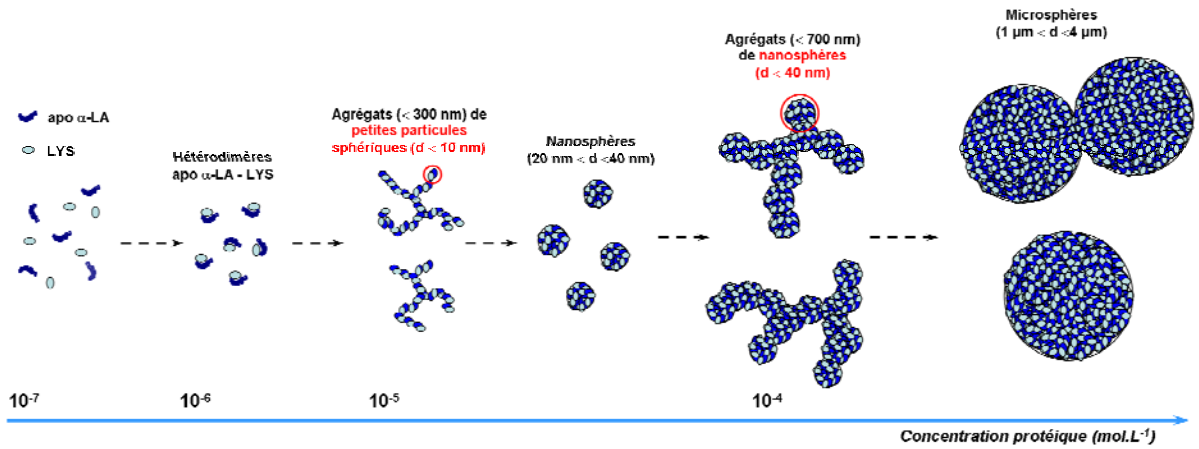

Figure 39. Mécanisme d'assemblage du LYS et de l'apo α-LA de l'échelle moléculaire à l'échelle macroscopique.

Malgré l'apport de la microscopie électronique à transmission sur la caractérisation de différentes étapes du processus d'assemblage entre le LYS et l'apo α-LA, cette technique présente également des inconvénients. En effet, elle impose de figer l'échantillon en son état à un temps donné pour l'observation. Par conséquent, l'aspect cinétique concernant aussi bien la formation, l'agrégation ou encore la réorganisation de ces structures supramoléculaires n'est pas prise en compte dans cette étude. Or, des études préliminaires montrent une évolution des structures supramoléculaires formées entre le LYS et l'apo α-LA durant les premiers instants du mélange de ces deux protéines. L'observation des assemblages entre le LYS et l'apo α-LA immédiatement après leur mélange montre la présence de structures de type agrégats et non de microsphères en solution (Figure 40A). Après 30 minutes de mélange, les structures supramoléculaires observées sont des microsphères (Figure 40B). Ce résultat préliminaire suggère donc une réorganisation à 45°C des structures de type agrégats vers des microsphères présentant certainement une certaine stabilité thermodynamique. La cinétique de réorganisation de ces structures supramoléculaires est un processus certainement contrôlé par la concentration protéique. Des études cinétiques sur la formation et l'évolution des structures supramoléculaires résultant de l'assemblage entre le LYS et l'apo α-LA pourrait compléter le présent travail et apporter de nouveaux éléments au mécanisme de formation de ces microsphères.

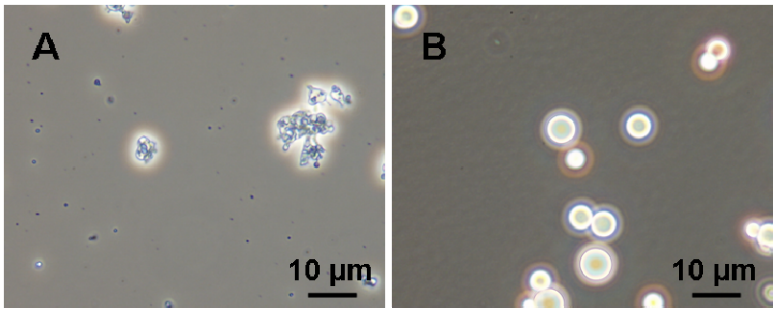

Figure 40. Structures supramoléculaires résultant de l'assemblage entre le LYS et l'apo α-LA à 45°C : observation par microscopie à contraste de phase immédiatement (A) et 30 min (B) après mélange des protéines. La concentration protéique totale était de 0,53 mM pour un rapport équimolaire en LYS et apo α-LA.

Le mécanisme d'assemblage entre le LYS et l'apo α-LA à 45°C est contrôlé par la concentration protéique, probablement par action sur la cinétique du processus. Ce

mécanisme apparaît original et nouveau. En effet, il est différent de ceux habituellement rencontrés lors des assemblages de biopolymères. Celui le plus fréquemment rencontré lors de la formation d'assemblage de biopolymères est le mécanisme de nucléation/croissance. Il est notamment impliqué dans la formation de fibres amyloïdes et dans le phénomène de coacervation complexe entre les protéines et les polysaccharides (Lomakin et al., 1996; Sanchez et al., 2002; Sanchez, Mekhloufi, & Renard, 2006; Chiti et al., 2006; Pellarin et al., 2007). Dans ce mécanisme, un complexe moléculaire forme tout d'abord une entité de base stable qui joue le rôle de « nuclei », cette phase constituant l'étape de nucléation. Puis dans la deuxième phase, d'autres molécules s'associent à cette entité de base ce qui permet l'élongation de la structure supramoléculaire, cette étape représente la phase de croissance. Le mécanisme de formation de microsphères entre le LYS et l'apo α-LA diffère du mécanisme de nucléation/croissance et s'apparente à un mécanisme faisant intervenir des étapes successives « d'agrégation/réorganisation ».

Conclusion et Perspectives

Les interactions et les assemblages protéiques sont des processus biologiques complexes à l'origine de différentes fonctionnalités. Durant ces dernières années, les études concernant les assemblages protéiques se sont accrues dans différents domaines scientifiques pour élucider leurs mécanismes de formation dans le but de contrôler ou encore inhiber leur formation. L'essor de ce nouveau champ d'investigation a été amplement facilité par le développement et le perfectionnement d'outils méthodologiques permettant l'étude et la caractérisation des assemblages protéiques.

Ainsi, les objectifs de ma thèse étaient d'étudier et de caractériser les interactions et les complexes moléculaires et/ou supramoléculaires formés dans le cas d'un mélange protéique binaire, incluant le lysozyme du blanc d'œuf de poule et l'α-lactalbumine bovine, dans le but d'apporter de nouvelles connaissances sur les mécanismes d'assemblage protéique. Notre stratégie a tout d'abord été de limiter le nombre de partenaires, deux dans notre étude (système « modèle »), pour ne pas complexifier les processus d'interaction et d'assemblage. Notre choix s'est donc porté sur ces deux protéines globulaires, largement étudiées et décrites, susceptibles d'interagir de part leurs propriétés physico-chimiques. De plus, notre choix a été guidé aussi par les propriétés structurales de l'un des deux partenaires, en l'occurrence l'α-lactalbumine, dont l'avantage est de pouvoir moduler sa conformation selon la présence ou l'absence de son cofacteur (le calcium) et les conditions physico-chimiques du milieu.

Dans ce travail, nous avons utilisé un certain nombre d'outils méthodologiques (biochimique, biophysique, physique) pour la caractérisation des complexes formés et le suivi des processus d'interaction et d'assemblage à différentes échelles s'échelonnant du moléculaire au macroscopique. Nous avons ainsi pu (i) caractériser les propriétés d'interaction et d'assemblage entre l'α-LA et le LYS, qui se sont avérées différentes selon la conformation de l'α-LA et les conditions physico-chimiques du milieu, et (ii) d'identifier les structures moléculaires et/ou supramoléculaires formées entre ces deux protéines.

Interaction moléculaire entre le LYS et l'α-LA (les formes holo et apo) :

Un des points clés de la compréhension des mécanismes d'assemblage réside dans l'identification et la caractérisation de l'étape moléculaire d'interaction indispensable à la formation éventuelle de structures supramoléculaires. Une des difficultés de ce travail de thèse a été de choisir et de mettre en œuvre les outils méthodologiques adéquats permettant

(i) l'identification d'un signal d'interaction entre le LYS et l'α-LA et (ii) la caractérisation des complexes formés. Après de nombreuses tentatives infructueuses par calorimétrie de titration isotherme, l'utilisation de deux techniques de fluorescence complémentaires (l'anisotropie de fluorescence et la mesure de temps de vie de fluorescence) a permis de mettre en évidence la formation d'hétérodimères ente l'α-LA et le LYS pour de faible concentration protéique à des températures de 10°C et 45°C. Les hétérodimères résultant de l'interaction entre l'α-LA et le LYS ont été aussi bien identifiés avec la forme chargée (holo α-LA) que déplétée (apo α-LA) en calcium de l'α-LA (Figure 41). Par conséquent, la conformation de l'α-LA influe peu sur ses propriétés thermodynamiques d'interaction avec le LYS. En modulant la force ionique de la solution, nous avons également montré l'implication des interactions électrostatiques dans l'interaction moléculaire entre ces deux protéines et la formation des hétérodimères. Ce dernier résultat est en adéquation avec les charges globales opposées portées par l'α-LA et le LYS dans ces conditions physico-chimiques.

Assemblage supramoléculaire entre le LYS et l'α-LA (les formes holo et apo) :

En dépit de la capacité du LYS à interagir avec les formes holo et apo de l'α-LA, les hétérodimères holo α-LA – LYS et apo α-LA – LYS se différencient de part leurs propriétés d'assemblage. Aucune structure supramoléculaire n'est observée suite à l'interaction entre le LYS et l'holo α-LA ; alors qu'au contraire, le LYS et l'apo α-LA interagissent et s'assemblent pour former des structures supramoléculaires aussi bien à 10°C qu'à 45°C (Figure 41). Les hétérodimères holo α-LA – LYS sont donc thermodynamiquement plus stables que les hétérodimères apo α-LA – LYS.

Nous avons mis en évidence que la morphologie des structures supramoléculaires générées par l'assemblage des hétérodimères apo α-LA – LYS dépend de la température. Des agrégats sont générés pour de faible température (T = 10°C), alors que des particules sphériques originales (microsphères) sont formées à 45°C (Figure 41). La formation et l'orientation de ces deux structures supramoléculaires sont corrélées à la conformation de l'apo α-LA : les microsphères sont formées lorsque l'apo α-LA adopte une conformation de type « molten globule », alors que des agrégats sont générés lorsque la conformation de l'apo α-LA est dite « native-like ».

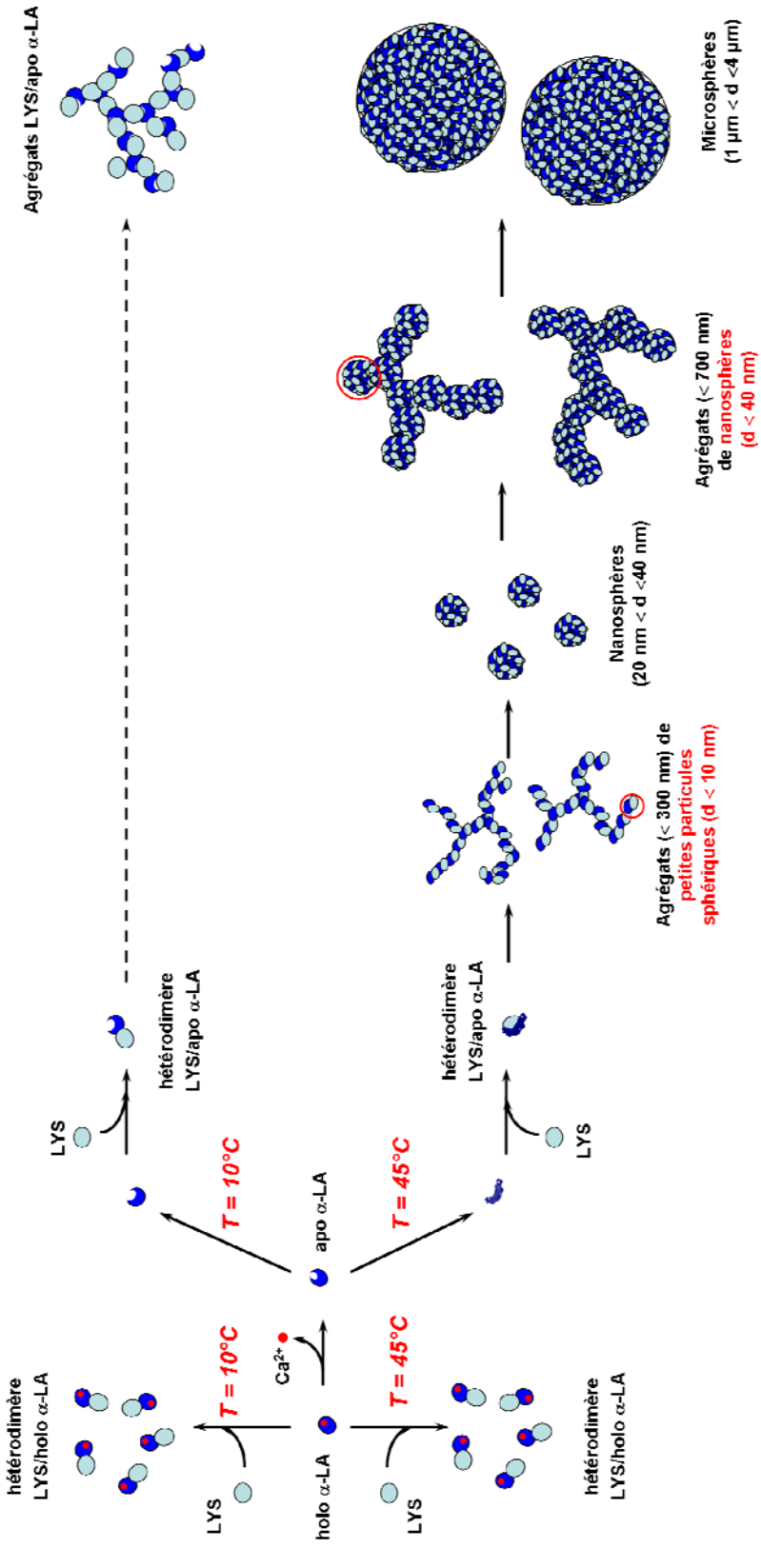

Figure 41. Processus d'interaction et d'assemblage entre le LYS et l'α-LA en fonction de la température, 10°C et 45°C.

Nous avons focalisé ce travail de thèse sur la caractérisation approfondie de ces structures sphériques du fait de leur originalité dans le cas de systèmes protéiques binaires. Nous avons tout d'abord étudié le processus de formation des microsphères par microscopie électronique à transmission. Ces études ont mis en évidence plusieurs étapes successives d'agrégation et de réorganisation d'assemblages protéiques à l'échelle mésoscopique (Figure 41). La formation des microsphères entre le LYS et l'apo α-LA semble donc suivre un processus d'assemblage original d'agrégation/réorganisation contrôlé cinétiquement par la concentration protéique (Figure 41). En utilisant une autre technique microscopique, la microscopie confocale à balayage laser, nous avons montré une répartition homogène du LYS et de l'apo α-LA au sein de ces microsphères avec une co-localisation parfaite des deux protéines.

Par plusieurs études physico-chimiques, nous avons mis en évidence l'implication des interactions électrostatiques à longue distance comme moteur de cet assemblage et l'équimolarité des charges apportées par le LYS et l'apo α-LA au sein des microsphères. Par conséquent, la formation de ces structures supramoléculaires s'effectue par compensation de charge des protéines avec la libération des contre-ions dans le milieu, conférant une charge globale nulle aux microsphères. Ces études physico-chimiques ont également montré l'établissement d'autres types d'interaction à courte distance (associations hydrophobes, interactions de Van der Waals, etc) au sein des microsphères après leur formation contribuant à leur stabilisation.

Evolution thermique des structures supramoléculaires résultant de l'assemblage entre le LYS et l'apo α-LA :

Les études menées sur la stabilité thermique des agrégats et des microsphères ont révélées des propriétés thermodynamiques intéressantes et curieuses. Nous avons montré qu'après la formation d'agrégats à 5°C, l'augmentation de la température à 45°C entraîne une réorganisation de ces structures en microsphères (Figure 42). En revanche, l'abaissement de la température à 5°C après la formation de microsphères à 45°C ne modifie pas ces structures. Cependant l'abaissement de la température provoque leur agrégation en clusters de microsphères et leur stabilisation (Figure 42).

Le maintient des microsphères à 45°C conduit à leur fusion, puis à la formation d'un film protéique. Ce film protéique présente la particularité de se redisperser en microsphères

par simple abaissement de la température à 5°C (Figure 42). Par conséquent, la formation de film protéique à partir de microsphères présente la propriété d'être réversible par simple modification de la température.

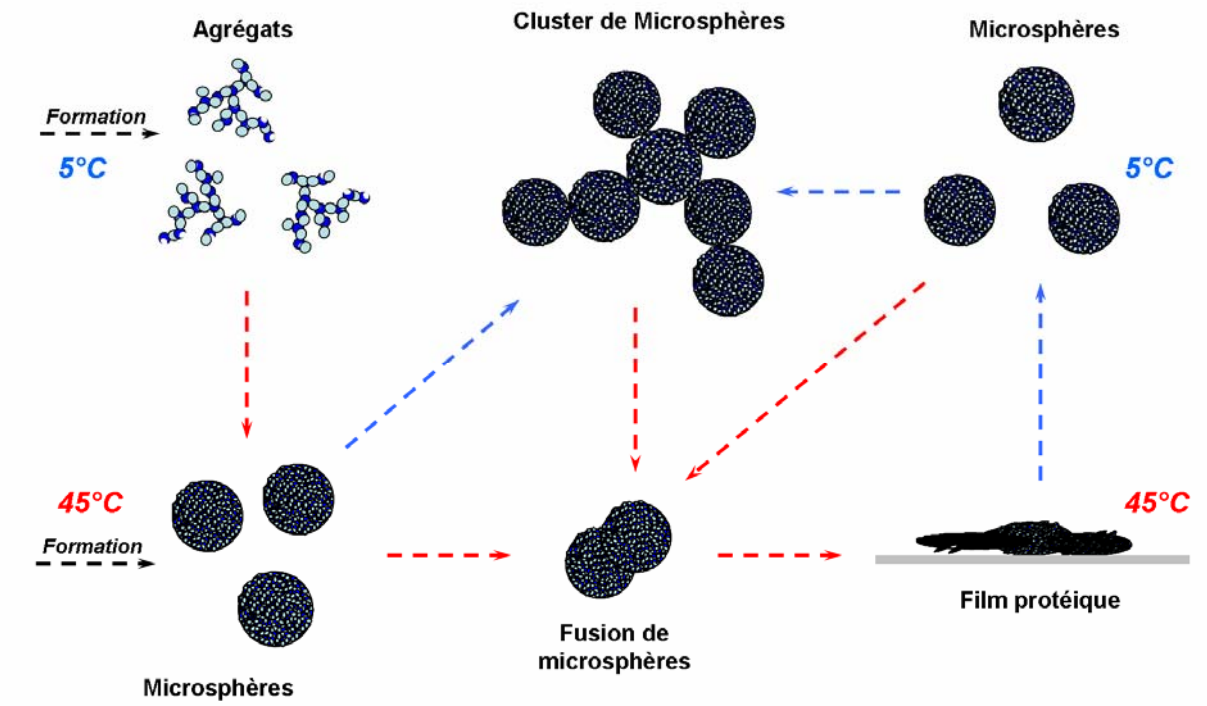

Figure 42. Evolution des structures supramoléculaires formées entre le LYS et l'apo α-LA à 5°C et 45°C en fonction de la température.

<u>Les perspectives de ce travail</u>

Ce travail de thèse a apporté des connaissances sur le mécanisme d'interaction et d'assemblages entre le LYS et l'α-LA et de manière générale sur les assemblages protéiques. Ce travail a également ouvert de nouvelles perspectives d'étude concernant l'assemblage entre ces deux protéines :

Perspectives d'étude à l'échelle moléculaire :

Concernant ce système protéique binaire, nous avons montré l'implication d'interactions électrostatiques lors de leur assemblage. Il serait donc intéressant de rechercher les acides aminés impliqués à la fois dans l'interaction moléculaire et l'assemblage protéique. Pour cela, il peut être envisagé de cibler les acides aminés potentiellement impliqués dans

l'interaction et l'assemblage, de les remplacer par mutagénèse dirigée par des acides aminés neutres d'un point de vue conformationnel pour la protéine et de tester l'interaction et l'assemblage entre la protéine recombinante et le second partenaire non modifié.

Les microsphères résultent de l'assemblage à 45°C de l'apo α-LA, sous une forme « molten globule », et du LYS sous forme native. Par conséquent, il serait intéressant de sonder d'éventuelles modifications structurales des protéines suite à la formation des microsphères. L'utilisation de la RMN et de la spectroscopie IR couplées au marquage spécifique au C^{13} et N^{15} d'un des deux partenaires s'avère être des méthodes de choix pour l'étude des structures secondaires et tertiaires des protéines. Cette perspective de travail fait notamment l'objet d'une ANR.

Dans notre système protéique, nous avons montré l'importance de la conformation « molten globule » de l'apo α-LA dans la formation de microsphères avec le LYS. Nous nous proposons de tester l'assemblage en utilisant du LYS provenant d'autres espèces et possédant un site spécifique de fixation du calcium. L'étude de l'assemblage entre le LYS de blanc d'œuf d'oie déplété en calcium (apo LYS) et l'holo α-LA pourrait confirmer l'importance de la conformation « molten globule » dans la formation des microsphères.

Perspectives d'étude physico-chimique :

Les études physico-chimiques réalisées sur les mélanges LYS/apo α-LA ont révélées des propriétés « physico-chimiques » différentes de celles rencontrées lors des assemblages impliquant des polymères, très flexibles, et des protéines. Par conséquent, la réalisation de diagrammes de phase sur les mélanges LYS/apo α-LA permettrait de compléter d'une manière systématique notre étude et d'apporter de nouveaux éléments de compréhension sur la physico-chimie et la thermodynamique contrôlant cet assemblage. Nous proposons par ailleurs de réaliser des études de cinétiques thermiques couplées à l'observation des structures supramoléculaires par microscopie afin de confirmer le mécanisme proposé quant à la transition et la réorganisation des agrégats LYS/apo α-LA en microsphères en fonction de la concentration et/ou de la température.

Perspectives d'étude à l'échelle macroscopique : le film protéique

La formation et l'évolution du film protéique formé suite au vieillissement de l'échantillon montrent des propriétés à la fois intéressantes et intrigantes. Par conséquent, des études supplémentaires portant notamment sur la transition de ce film vers les microsphères à

5°C semblent nécessaires pour comprendre le mécanisme permettant cette transition. L'utilisation de LYS et d'apo α-LA marquées sélectivement ainsi que différentes techniques microscopiques (confocale, à force atomique) peuvent constituer une approche appropriée pour étudier et élucider l'organisation et l'agencement de ce film protéique.

Il serait intéresant de caractériser ce film protéique pour déterminer ses propriétés rhéologiques et visco-élastiques. Ces études nécessitent l'utilisation de techniques adaptées faisant appel à un autre domaine de compétences.

Généralisation du système LYS/apo α-LA :

Des études d'interactions et d'assemblages entre d'autres protéines globulaires de charges opposées permettraient de nous renseigner sur la spécificité ou la généralisation potentielle des propriétés d'interaction et d'assemblage déterminées sur le système LYS/apo α-LA. L'approfondissement des conditions de formation, mais aussi de stabilité des microsphères et du film protéique constitue une voie d'ouverture à de nouvelles applications dans différents domaines.

Références Bibliographiques

A

Acharya, K. R., Stuart, D. I., Phillips, D. C., McKenzie, H. A., & Teahan, C. G. (1994). Models of the 3-dimensional structures of echidna, horse, and pigeon lysozymes - calcium-binding lysozymes and their relationship with α-lactalbumins. *Journal of Protein Chemistry,* 13, 569-584.

Anderson, P. J., Brooks, C. L., & Berliner, L. J. (1997). Functional identification of calcium binding residues in bovine α-Lactalbumin. *Biochemistry,* 36, 11648-11654.

Arnaudov, L. N., & de Vries R. (2005). Thermally induced fibrillar aggregation of hen egg white lysozyme. *Biophysical Journal,* 88, 515-526.

B

Bai, P., Song, J., Luo, L., & Peng, Z. Y. (2001). A model of dynamic side-chain--side-chain interactions in the α-lactalbumin molten globule. *Protein Science,* 10, 55-62.

Biesheuvel, P. M., Lindhoud, S., Cohen Stuart, M. A., & de Vries, R. (2006). Phase behavior of mixtures of oppositely charged protein nanoparticles at asymmetric charge ratios. *Physical Review e,* 73,

Biesheuvel, P. M., Lindhoud, S., de Vries, R., & Cohen Stuart, M. A. (2006). Phase behavior of mixtures of oppositely charged nanoparticles: heterogeneous Poisson-Boltzmann cell model applied to lysozyme and succinylated lysozyme. *Langmuir,* 22, 1291-1300.

Bouhallab, S., Henry, G., Caussin, F., Croguennec, T., Fauquant, J., & Mollé, D. (2004). Copper-catalyzed formation of disulfide-linked dimer of bovine β-lactoglobulin. *Le Lait,* 84, 517-525.

Brady, G. P., & Sharp, K. A. (1997). Entropy in protein folding and in protein-protein interactions. *Current Opinion in Structural Biology,* 7, 215-221.

Brew, K. (2003). α-Lactalbumin. In P. F. Fox, & P. L. H. McSweeney (Eds.), *Advanced Dairy Chemistry volume 1 Proteins* (pp. 387-419). New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.

Bromley, E., Krebs, M., & Donald, A. (2006). Mechanisms of structure formation in particulate gels of β-lactoglobulin formed near the isoelectric point. *The European Physical Journal E - Soft Matter,* 21, 145-152.

Bromley, E. H. C., Krebs, M. R. H., & Donald, A. M. (2005). Aggregation across the length-scales in β-lactoglobulin. *Faraday Discussion,* 128, 13-27.

Burgess, D. J. (1990). Practical analysis of complex coacervate systems. *Journal of Colloid and Interface Science,* 140, 227-238.

Bushmarina, N. A., Blanchet, C. E., Vernier, G., & Forge, V. (2006). Cofactor effects on the protein folding reaction: Acceleration of α-lactalbumin refolding by metal ions. *Protein Science,* 15, 659-671.

C

Campoy, A. V., & Freire, E. (2005). ITC in the post-genomic era...? Priceless. *Biophysical Chemistry,* 115, 115-124.

Caussin, F., Famelart, M. H., Maubois, J. L., & Bouhallab, S. (2003). Mineral modulation of thermal aggregation and gelation of whey proteins: from β-lactoglobulin model system to whey protein isolate. *Le Lait,* 83, 353-364.

Chiti, F., & Dobson, C. M. (2006). Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annual Review of Biochemistry,* 75, 333-366.

Chrysina, E. D., Brew, K., & Acharya, K. R. (2000). Crystal structures of apo- and holo-bovine α-lactalbumin at 2.2A° resolution reveal an effect of calcium on inter-lobe interactions. *The Journal of Biological Chemistry,* 275, 37021-37029.

Clarke, A. W., Arnspang, E. C., Mithieux, S. M., Korkmaz, E., Braet, F., & Weiss, A. S. (2006). Tropoelastin massively associates during coacervation to form quantized protein spheres. *Biochemistry,* 45, 9989-9996.

Cooper, A., Johnson, C. M., Lakey, J. H., & Nollmann, M. (2001). Heat does not come in different colours: entropy-enthalpy compensation, free energy windows, quantum confinement, pressure perturbation calorimetry, solvation and the multiple causes of heat capacity effects in biomolecular interactions. *Biophysical Chemistry,* 93, 215-230.

Cooper, C. L., Goulding, A., Kayitmazer, A. B., Ulrich, S., Stoll, S., Turksen, S., Yusa, S., Kumar, A., & Dubin, P. L. (2006). Effects of polyelectrolyte chain stiffness, charge mobility, and charge sequences on binding to proteins and micelles. *Biomacromolecules,* 7, 1025-1035.

Cousin, F., Gummel, J., Ung, D., & Boue, F. (2005). Polyelectrolyte-protein complexes: structure and conformation of each specie revealed by SANS. *Langmuir,* 21, 9675-9688.

Croguennec, T., Molle, D., Mehra, R., & Bouhallab, S. (2004). Spectroscopic characterization of heat-induced nonnative β-lactoglobulin monomers. *Protein Science,* 13, 1340-1346.

D

De La Fuente, M. A., Singh, H., & Hemar, Y. (2002). Recent advances in the characterisation of heat-induced aggregates and intermediates of whey proteins. *Trends in Food Science & Technology,* 13, 262-274.

de Vries, R., & Cohen Stuart, M. (2006). Theory and simulations of macroion complexation. *Current Opinion in Colloid and Interface Science,* 11, 295-301.

Diamond, R. (1974). Real-space refinement of the structure of hen egg-white lysozyme. *Journal of Molecular Biology,* 82, 371-391.

Donato, L., Alexander, M., & Dalgleish, D. G. (2007). Acid gelation in heated and unheated milks: interactions between serum protein complexes and the surfaces of casein micelles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 55, 4160-4168.

Donato, L., Guyomarc'h, F., Amiot, S., & Dalgleish, D. G. (2007). Formation of whey protein/κ-casein complexes in heated milk: Preferential reaction of whey protein with κ-casein in the casein micelles. *International Dairy Journal,* 17, 1161-1167.

Doublier, J.-L., Garnier, C., Renard, D., & Sanchez, C. (2000). Protein-polysaccharide interactions. *Current Opinion in Colloid and Interface Science,* 5, 202-214.

F

Farrell, H., Cooke, P., Wickham, E., Piotrowski, E., & Hoagland, P. (2003). Environmental influences on bovine κ-casein: reduction and conversion to fibrillar (amyloid) structures. *Journal of Protein Chemistry,* 22, 259-273.

Forge, V., Wijesinha, R. T., Balbach, J., Brew, K., Robinson, C. V., Redfield, C., & Dobson, C. M. (1999). Rapid collapse and slow structural reorganisation during the refolding of bovine α-lactalbumin. *Journal of Molecular Biology,* 288, 673-688.

Forster, S., & Konrad, M. (2003). From self-organizing polymers to nano- and biomaterials. *Journal of Materials Chemistry,* 13, 2671-2688.

France, R. M., & Grossman, S. H. (2000). Acrylamide quenching of apo- and holo α-lactalbumin in guanidine hydrochloride. *Biochemical and Biophysical Research Communication,* 269, 709-712.

G

Gabler, R. 1978. Electrical Interactions in Molecular Biophysics.

Galazka, V. B., Dickinson, E., & Ledward, D. A. (2000). Influence of high pressure processing on protein solutions and emulsions. *Current Opinion in Colloid and Interface Science,* 5, 182-187.

Goers, J., Permyakov, S. E., Permyakov, E. A., Uversky, V. N., & Fink, A. L. (2002). Conformational prerequisites for α-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.

Greene, L. H., Grobler, J. A., Malinovskii, V. A., Tian, J., Acharya, K. R., & Brew, K. (1999). Stability, activity and flexibility in α-lactalbumin. *Protein Engineering,* 12, 581-587.

Griko, Y. V., & Remeta, D. P. (1999). Energetics of solvent and ligand-induced conformational changes in α-lactalbumin. *Protein Science,* 8, 554-561.

Gummel, J., Boue, F., Deme, B., & Cousin, F. (2006). Charge stoichiometry inside polyelectrolyte-protein complexes: a direct SANS measurement for the PSSNa-Lysozyme system. *Journal of Physical Chemistry B,* 110, 24837-24846.

Gummel, J, 2006 Structures et mécanismes de formation de complexes polyélectrolyte-protéine. 1-228.

H

Hagolle, N., Relkin, P., Popineau, Y., & Bertrand, D. (2000). Study of the stability of egg white protein-based foams: effect of heating protein solution. *Journal of the Science of Food and Agriculture,* 80, 1245-1252.

Hendrix, T., Griko, Y. V., & Privalov, P. L. (2000). A calorimetric study of the influence of calcium on the stability of bovine α-lactalbumin. *Biophysical Chemistry,* 84, 27-34.

Hiraoka, Y., & Sugai, S. (1985). Equilibrium and kinetic study of sodium- and potassium-induced conformational changes of apo α-lactalbumin. *International Journal of Peptide and Protein Research,* 26,

Howell, N., Yeboah, N., & Lewis, D. (1995). Studies on the electrostatic interactions of lysozyme with α-lactalbumin and β-lactoglobulin. *International Journal of Food Science & Technology,* 30, 813-824.

Hu, J., Yu, S., & Yao, P. (2007). Stable amphoteric nanogels made of ovalbumin and ovotransferrin via self-assembly. *Langmuir,* 23, 6358-6364.

I

Ibrahim, H. R., Taniyama, N., & Aoki, T. (2004). Distinct dimerization between α–lactalbumin and lysozyme exhibiting novel antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Letters in Drug Design & Discovery,* 1, 101-109.

Ipsen, R., & Otte, J. (2007). Self-assembly of partially hydrolysed α-lactalbumin. *Biotechnology Advances,* 25, 602-605.

Ivinova, O. N., Izumrudov, V. A., Muronetz, V. I., Galaev, I. Y., & Mattiasson, B. (2003). Influence of complexing polyanions on the thermostability of basic proteins. *Macromolecular Bioscience,* 3, 210-215.

K

Krebs, M. R. H., Bromley, E. H. C., Rogers, S. S., & Donald, A. M. (2005). The mechanism of amyloid spherulite formation by bovine insulin. *Biophysical Journal,* 88, 2013-2021.

Krebs, M. R. H., Devlin, G. L., & Donald, A. M. (2007). Protein particulates: Another generic form of protein aggregation? *Biophysical Journal,* 92, 1336-1342.

Krebs, M. R. H., Wilkins, D. K., Chung, E. W., Pitkeathly, M. C., Chamberlain, A. K., Zurdo, J., Robinson, C. V., & Dobson, C. M. (2000). Formation and seeding of amyloid fibrils from wild-type hen lysozyme and a peptide fragment from the β-domain. *Journal of Molecular Biology,* 300, 541-549.

Kuwajima, K. (1996). The molten globule state of α-lactalbumin. *FASEB Journal,* 10, 102-109.

Kuwajima, K., Harushima, Y., & Sugai, S. (1986). Influence of Ca^{2+} binding on the structure and stability of bovine α-lactalbumin studied by circular dichroism and nuclear magnetic resonance spectra. *International Journal of Peptide and Protein Research,* 27, 18-27.

L

Lechevalier, V., Nau, F., & Anton, M. (2007). De l'oeuf aux ovoproduits. In TEC & DOC (Eds.), *Science des aliments: Technologie des produits alimentaires* (pp. 107-133). Paris:

Lomakin, A., Chung, D. S., Benedek, G. B., Kirschner, D. A., & Teplow, D. B. (1996). On the nucleation and growth of amyloid β-protein fibrils: Detection of nuclei and quantitation of rate constants. *Proceedings of the National Academy of Sciences,* 93, 1125-1129.

Lomakin, A., Teplow, D. B., Kirschner, D. A., & Benedek, G. B. (1997). Kinetic theory of fibrillogenesis of amyloid β-protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences,* 94, 7942-7947.

M

Majhi, P. R., Ganta, R. R., Vanam, R. P., Seyrek, E., Giger, K., & Dubin, P. L. (2006). Electrostatically driven protein aggregation: β-lactoglobulin at low ionic strength. *Langmuir,* 22, 9150-9159.

McKenzie, H. A., & White, F. H. J. (1991). Lysozyme and α-lactalbumin: structure, function, and interrelationships. *Advances in Protein Chemistry,* 41, 173-315.

Meyer, E. E., Rosenberg, K. J., & Israelachvili, J. (2006). Inaugural article: Recent progress in understanding hydrophobic interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences,* 103, 15739-15746.

Mizuguchi, M., Nara, M., Kawano, K., & Nitta, K. (1997). FT-IR study of the Ca^{2+}-binding to bovine α-lactalbumin: Relationships between the type of coordination and characteristics of the bands due to the Asp COO^- groups in the Ca^{2+}-binding site. *FEBS Letters,* 417, 153-156.

Mok, K. H., Pettersson, J., Orrenius, S., & Svanborg, C. (2007). HAMLET, protein folding, and tumor cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications,* 354, 1-7.

Mossa, S., Sciortino, F., Tartaglia, P., & Zaccarelli, E. (2004). Ground-state clusters for short-range attractive and long-range repulsive potentials. *Langmuir,* 20, 10756-10763.

P

Pan, X., Yu, S., Yao, P., & Shao, Z. (2007). Self-assembly of β-casein and lysozyme. *Journal of Colloid and Interface Science,* 316, 405-412.

Pedersen, J. B., Fojan, P., Sorensen, J., & Petersen, S. (2006). Towards Control of aggregational behaviour of α-lactalbumin at acidic pH. *Journal of Fluorescence,* 16, 611-621.

Pellarin, R., Guarnera, E., & Caflisch, A. (2007). Pathways and intermediates of amyloid fibril formation. *Journal of Molecular Biology,* 374, 917-924.

Permyakov, E. A., & Berliner, L. J. (2000). α-Lactalbumin: structure and function. *FEBS Letters,* 473, 269-274.

Pfeil, W., & Sadowski, M. (1985). A scanning calorimetric study of bovine and human apo α-lactalbumin. *Studia Biophysica,* 109,

Pike, A. C., Brew, K., & Acharya, K. R. (1996). Crystal structures of guinea-pig, goat and bovine α-lactalbumin highlight the enhanced conformational flexibility of regions that are significant for its action in lactose synthase. *Structure,* 4, 691-703.

Polverino de Laureto, P., Frare, E., Gottardo, R., van Dael, H., & Fontana, A. (2002). Partly folded states of members of the lysozyme/lactalbumin superfamily: A comparative study by circular dichroism spectroscopy and limited proteolysis. *Protein Science,* 11, 2932-2946.

Q

Qasba, P. K., & Kumar, S. (1997). Molecular divergence of lysozymes and α-lactalbumin. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology,* 32, 255-306.

R

Rogers, S. S., Krebs, M. R. H., Bromley, E. H. C., van der Linden, E., & Donald, A. M. (2006). Optical microscopy of growing insulin amyloid spherulites on surfaces in vitro. *Biophysical Journal,* 90, 1043-1054.

S

Sanchez, C., Mekhloufi, G., & Renard, D. (2006). Complex coacervation between β-lactoglobulin and acacia gum: A nucleation and growth mechanism. *Journal of Colloid and Interface Science,* 299, 867-873.

Sanchez, C., Mekhloufi, G., Schmitt, C., Renard, D., Robert, P., Lehr, C. M., Lamprecht, A., & Hardy, J. (2002). Self-assembly of β-lactoglobulin and acacia gum in aqueous solvent: structure and phase-ordering kinetics. *Langmuir,* 18, 10323-10333.

Sanguansri, P., & Augustin, M. A. (2006). Nanoscale materials development - a food industry perspective. *Trends in Food Science and Technology,* 17, 547-556.

Schmitt, C., Sanchez, C., Desobry-Banon, S., & Hardy, J. (1998). Structure and Technofunctional Properties of Protein-Polysaccharide Complexes: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition,* 38, 689-753.

Schmitt, C., Sanchez, C., Lamprecht, A., Renard, D., Lehr, C. M., de Kruif, C. G., & Hardy, J. (2001). Study of β-lactoglobulin/acacia gum complex coacervation by diffusing-wave spectroscopy and confocal scanning laser microscopy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces,* 20, 267-280.

Selzer, T., Albeck, S., & Schreiber, G. (2000). Rational design of faster associating and tighter binding protein complexes. *Natural Structural & Molecular Biology,* 7, 537-541.

Shih, P., Holland, D. R., & Kirsch, J. F. (1995a). Thermal stability determinants of chicken egg-white lysozyme core mutants: hydrophobicity, packing volume, and conserved buried water molecules. *Protein Science,* 4, 2050-2062.

Shih, P., & Kirsch, J. F. (1995b). Design and structural analysis of an engineered thermostable chicken lysozyme. *Protein Science,* 4, 2063-2072.

Stevens, L. (1991). Egg white proteins. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology,* 100, 1-9.

Svensson, M., Sabharwal, H., Hakansson, A., Mossberg, A. K., Lipniunas, P., Leffler, H., Svanborg, C., & Linse, S. (1999). Molecular characterization of α-lactalbumin folding variants that induce apoptosis in tumor cells. *Journal of Biological Chemistry,* 274, 6388-6396.

T

Takase, K. (1998). Reactions of denatured proteins with other cellular components to form insoluble aggregates and protection by lactoferrin. *FEBS Letters,* 441, 271-274.

Tanford, C. (1997). How protein chemists learned about the hydrophobic factor. *Protein Science,* 6, 1358-1366.

Thorn, D. C., Meehan, S., Sunde, M., Rekas, A., Gras, S. L., MacPhee, C. E., Dobson, C. M., Wilson, M. R., & Carver, J. A. (2005). Amyloid fibril formation by bovine milk κ-casein and its inhibition by the molecular chaperones α_s- and β-casein. *Biochemistry,* 44, 17027-17036.

Turgeon, S. L., Schmitt, C., & Sanchez, C. (2007). Protein-polysaccharide complexes and coacervates. *Current Opinion in Colloid and Interface Science,* 12, 166-178.

U

Ueda, T., Masumoto, K., Ishibashi, R., So, T., & Imoto, T. (2000). Remarkable thermal stability of doubly intramolecularly cross-linked hen lysozyme. *Protein Engineering,* 13, 193-196.

V

van der Linden, E., & Venema, P. (2007). Self-assembly and aggregation of proteins. *Current Opinion in Colloid and Interface Science,* 12, 158-165.

Veprintsev, D. B., Permyakov, E. A., Kalinichenko, L. P., & Berliner, L. J. (1996). Pb^{2+} and Hg^{2+} binding to α-lactalbumin. *Biochemistry and Molecular Biology International,* 39, 1255-1265.

Veprintsev, D. B., Permyakov, S. E., Permyakov, E. A., Rogov, V. V., Cawthern, K. M., & Berliner, L. J. (1997). Cooperative thermal transitions of bovine and human apo α-lactalbumins: evidence for a new intermediate state. *FEBS Letters,* 412, 625-628.

Visschers, R. W., & de Jongh, H. H. J. (2005). Disulphide bond formation in food protein aggregation and gelation. *Biotechnology Advances,* 23, 75-80.

W

Walsh, D. M., Lomakin, A., Benedek, G. B., Condron, M. M., & Teplow, D. B. (1997). Amyloid β-protein fibrillogenesis. Detection of a protofibrillar intermediate. *Journal of Biological Chemistry,* 272, 22364-22372.

Walstra, P. 2003. Physical Chemistry of Foods.

Wang, K. J., Lai, P., & Li, S. S. (2004). High resolution high-performance liquid chromatography separation of polyglutamic acids. *Analytical Biochemistry,* 332, 199-201.

Weijers, M., Barneveld, P. A., Cohen Stuart, M. A., & Visschers, R. W. (2003). Heat-induced denaturation and aggregation of ovalbumin at neutral pH described by irreversible first-order kinetics. *Protein Science,* 12, 2693-2703.

Weinbreck, F., de Vries, R., Schrooyen, P., & de Kruif, C. G. (2003). Complex coacervation of whey proteins and gum arabic. *Biomacromolecules,* 4, 293-303.

Wijesinha-Bettoni, R., Gao, C., Jenkins, J. A., Mackie, A. R., Wilde, P. J., Mills, E. N. C., & Smith, L. J. (2007). Heat treatment of bovine α-lactalbumin results in partially folded, disulfide bond shuffled states with enhanced surface activity. *Biochemistry,* 46, 9774-9784.

Y

Yu, S., Yao, P., Jiang, M., & Zhang, G. (2006). Nanogels prepared by self-assembly of oppositely charged globular proteins. *Biopolymers,* 83, 148-158.

Z

Zhang, S. (2003). Fabrication of novel biomaterials through molecular self-assembly. *Nature Biotechnology,* 21, 1171-1178.

Zhang, S., Marini, D. M., Hwang, W., & Santoso, S. (2002). Design of nanostructured biological materials through self-assembly of peptides and proteins. *Current Opinion in Chemical Biology,* 6, 865-871.

Interactions et assemblages entre l'α-lactalbumine et le lysozyme : mécanismes, structures et stabilité

L'assemblage des protéines est une problématique fondamentale d'intérêt pour différents secteurs (alimentaire, médical, pharmaceutique, etc.). La compréhension des mécanismes à l'origine des interactions initiales et des assemblages protéiques offre la possibilité de contrôler et d'orienter le processus de formation ainsi que la nature et les propriétés fonctionnelles des structures supramoléculaires résultantes. L'objectif de la thèse était d'acquérir de nouvelles connaissances à différentes échelles d'étude sur les mécanismes d'assemblages protéiques et les structures supramoléculaires dans un mélange protéique binaire incluant deux protéines globulaires de charge globale opposée à pH neutre : le lysozyme (LYS) et l'α-lactalbumine (α-LA). L'utilisation de techniques de fluorescence a permis de caractériser l'interaction moléculaire et la formation d'hétérodimères entre ces deux protéines aussi bien avec les formes chargée (holo α-LA) et déplétée (apo α-LA) en calcium de l'α-LA. La formation de ces hétérodimères s'effectue par la mise en œuvre d'interactions électrostatiques. Les propriétés d'assemblage de ces hétérodimères sont différentes et intimement liées à la stabilité de l'α-LA. Les hétérodimères LYS – holo α-LA ne semblent pas former de structures supramoléculaires, alors que les hétérodimères LYS – apo α-LA s'assemblent en agrégats ou en structures sphériques selon la conformation de l'apo α-LA. Une conformation de type « molten globule » de l'apo α-LA favorise la formation de microsphères. Ces dernières sont constituées de LYS et d'apo α-LA en quantité équimolaire qui sont parfaitement co-localisés au sein de la microstructure. Ce travail souligne le rôle clé joué par la conformation et la flexibilité des protéines dans la formation et l'orientation des assemblages entre protéines alimentaires.

Mots-clé : assemblage protéique, lysozyme, α-lactalbumine, conformation protéique, agrégats, microsphères, structures supramoléculaires.

Interactions and assemblies between α-lactalbumin and lysozyme: mechanisms, structures and stability

Understanding the mechanisms of protein-protein interactions and assemblies is of relevant interest in many research areas (food, medical, pharmaceutical) that allows a better control of overall processes and properties of resulting supramolecular structures. The aim of my thesis work was to acquire knowledges at different scales from protein assemblies at molecular level to the resulting supramolecular structures. This work was performed using a protein binary system including two oppositely charged globular proteins at neutral pH: lysozyme (LYS) and α-lactalbumin (α-LA). Fluorescence technics allow us to characterise molecular interaction and formation of heterodimers between LYS and the two forms of α-LA i.e. calcium loaded (holo) or calcium free (apo) α-LA. The formation of these heterodimers was driven by electrostatic forces. Assembly properties of these heterodimers are distinct and strongly linked to the stability of α-lactalbumin. LYS – holo α-LA heterodimers do not seem to self-assemble further into supramolecular structures, while LYS – apo α-LA heterodimers self-assemble into aggregates or microspheres according to the conformation of apo α-LA. A "molten globule" conformation of apo α-LA induces the formation of microspheres. Their formation follows an original nucleation and reorganisation mechanism. These microspheres contain equimolar ratio of both proteins that are perfectly co-localised within the overall microstructure. This work highlights the key role of protein conformation and flexibility in the formation and modulation of food protein assemblies.

Keywords: protein assemblies, lysozyme, α-lactalbumin, protein conformation, aggregates, microspheres, supramolecular structures.