



Développement d'une méthode de référence pour la caractérisation de la fraction protéique des laits

Guy MIRANDA, Marion FERRAND* & Patrice MARTIN

INRA - UMR1313 Génétique animale & Biologie intégrative équipe
« Lait Génome et Santé », Jouy-en-Josas

*Institut de l'élevage, Paris

www.phenofinlait.fr

phenofinlait@inst-elevage.asso.fr

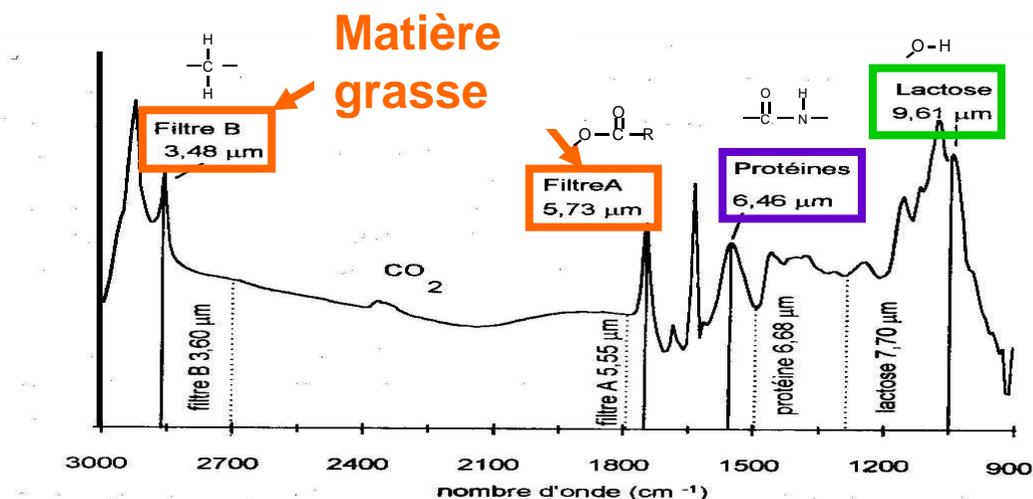
GABI
Généétique Animale & Biologie Intégrative

Phénofinlait

Journée nationale d'information, Maison du Lait - Paris, 1 avril 2010

Objectifs spécifiques

- Concevoir des outils de « phénotypage » pour un ensemble de caractéristiques de composition : protéines



« LactoScan »
ANR Génanimal 2008

- mise en relation des informations produites par une méthode de référence (à développer dans le cadre de « LactoScan ») et des données spectrales MIR (contrôle laitier)

Méthode de référence

Cahier des charges

« *LactoScan* »

Méthode de profiling protéique :

- hautement **résolutive**, fiable et robuste
- **identifier et quantifier** principales lactoprotéines,
- distinguer les différentes isoformes
- potentiellement adaptable à des analyses à grande échelle, en routine

(plan B en cas d'échec du MIR)

Quelles protéines ?

6 lactoprotéines majeures

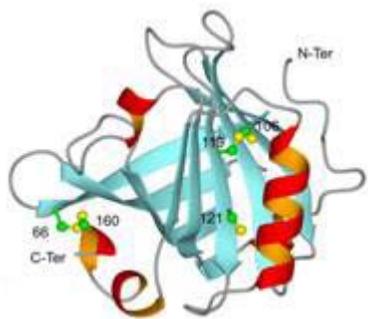
- Caséine α s1 (CSN1S1)
- Caséine α s2 (CSN1S2)
- Caséine β (CSN2)
- Caséine κ (CSN3)
- β -lactoglobuline
- α -lactalbumine

« *LactoScan* »

10 lactoprotéines

4 lactoprotéines « secondaires »

- Lactoferrine
- Lactoperoxidase
- Sérum albumine (SA)
- Sérum amyloïde A (SAA)



Quelles isoformes ?

Variants génétiques

Variants d'épissage

Modifications Post-traductionnelles
(glycosylation-phosphorylation)

Produits de protéolyse (caséines γ)



« LactoScan »

Variants génétiques

	CSN1S1 (α 1-casein)	CSN1S2 (α 2-casein)	CSN2 (β -casein)	CSN3 (κ -casein)	β -lacto	α -lacta
Cattle	7 variants A to G (+H)	4 variants A to D	9 variants (+ 4) A¹, A², A³, B to G (B², A⁴, A³Mong,)	4 variants (+5) A, B, C/D & E (F to J)	7 variants A to G	3 variants A to C
Goats	13 variants^a (+ null alleles)	6 variants ^b (+1 null allele)	3 variants (+ null alleles)	13 variants^c	no variants characteri zed so far ^d	-
Sheep	5 variants ^e A to E	3 variants ^e A to C	2 variants ^f	2 variants ^f	3 variants A to C	2 variants A & B

from Ng-Kwai-Hang & Grosclaude (2003)

- ^a Bevilacqua et al. (2002)
- ^b Sacchi et al. (2005)
- ^c Prinzenberg et al. (2005)
- ^d Ballester et al. (2005)
- ^e Chianese et al. (1996)
- ^f Ceriotti et al. (2004)

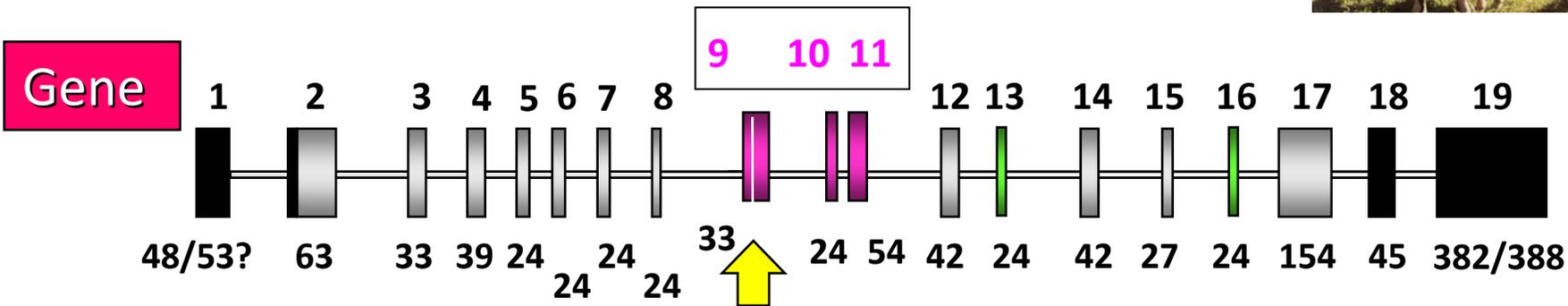


Variants d'épissage

CSN1S1F : une mutation « frame shift »

Une multiplicité de transcrits (protéines)

Une expression réduite (mRNA decay)



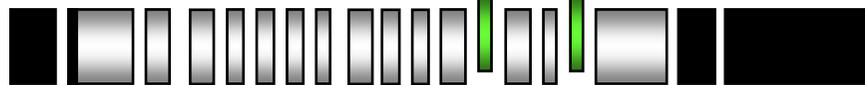
mRNA

brebis:

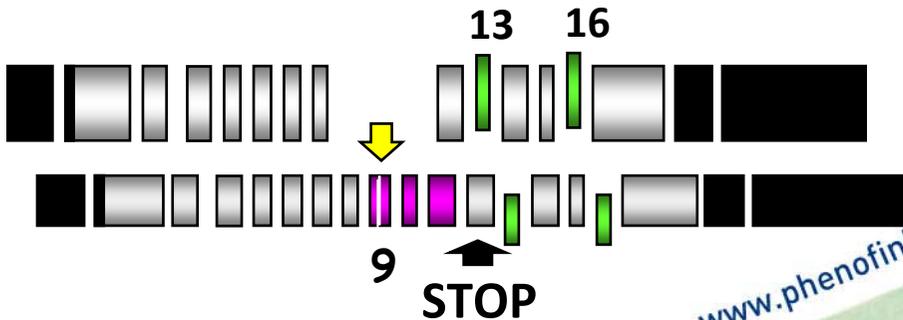
exon 16 absent

dans 20% des transcrits !

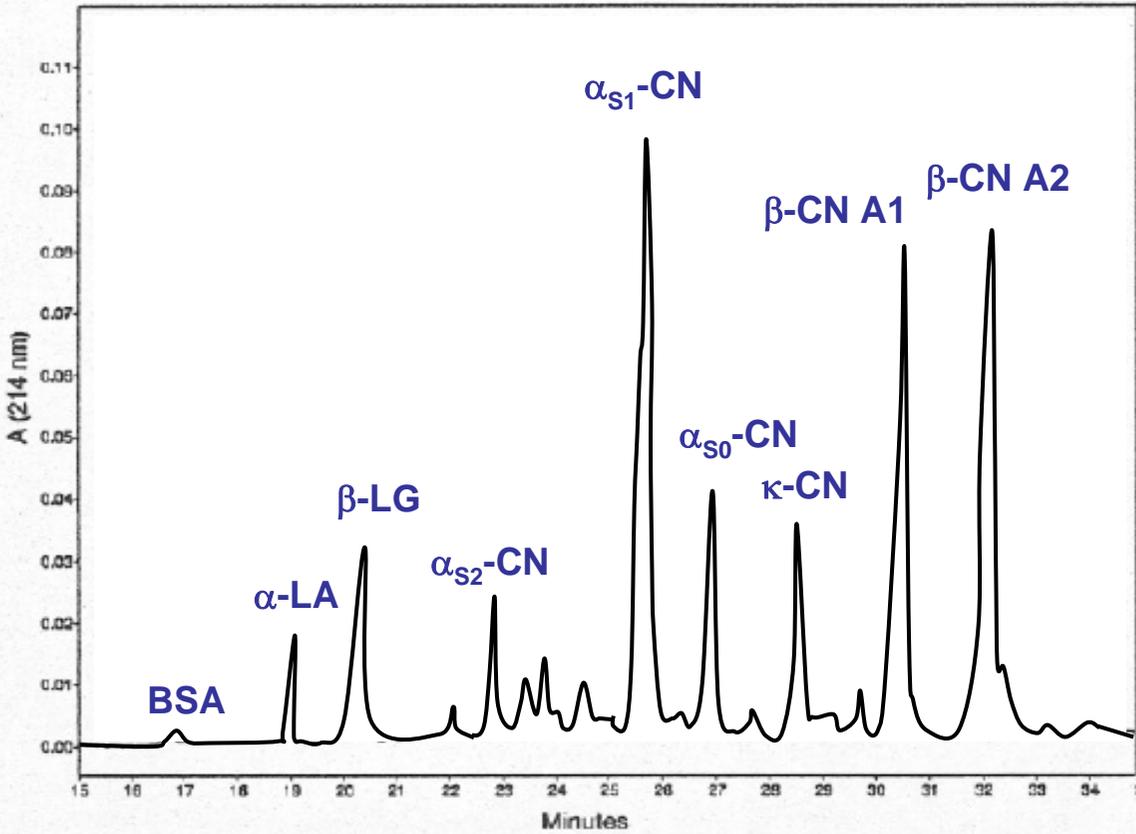
$\alpha 1$ -CasA



$\alpha 1$ -CasF



CZE (Capillary Zone Electrophoresis) electrophoregram of bovine (Dutch Holstein Frisian) raw milk of a single cow



Protein	CV (%)
α_{S2} -Casein	5.4
α_{S1} -Casein	1.9
κ -Casein	3.4
β -Casein	2.1
α -lactalbumin	4.3
β -lactoglobulin	4.2

Intégration de la surface des pics

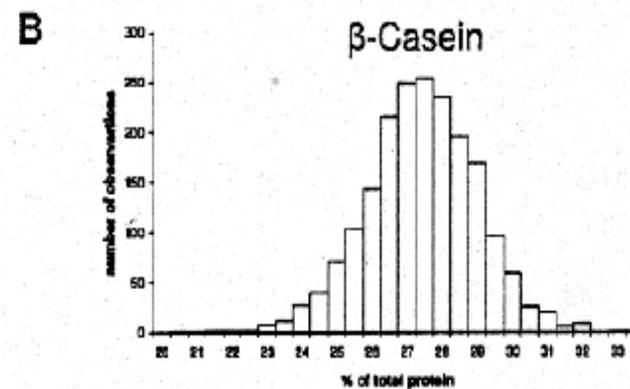
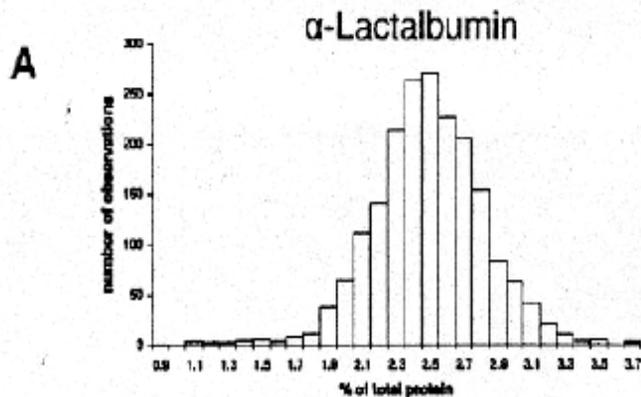
Reproductibilité de la mesure (n=20) de quantification des lactoprotéines majeures. (CV = Coefficient of Variation)

Quantités moyennes (en % de la quantité totale de protéine) fourchette de variation

2 000 laits analysés
pour déterminer la variation
de la composition protéique
du lait (Holstein-Frisonne)

J. Heck et al., 2006

Protein	Mean (range) (% of total protein)	CV (%)
α -lactalbumin	2.4 (0.9-3.7)	13.0
β -lactoglobulin	8.3 (4.1-12.9)	14.4
α_{S2} -Casein-11P	3.5 (1.1-5.4)	16.4
α_{S1} -Casein-8P	21.2 (12.6-25.8)	6.5
α_{S1} -Casein-9P	7.4 (3.1-12.9)	14.9
κ -Casein-1P	4.0 (2.3-6.4)	14.3
β -Casein-5P	27.2 (20.4-33.4)	5.8



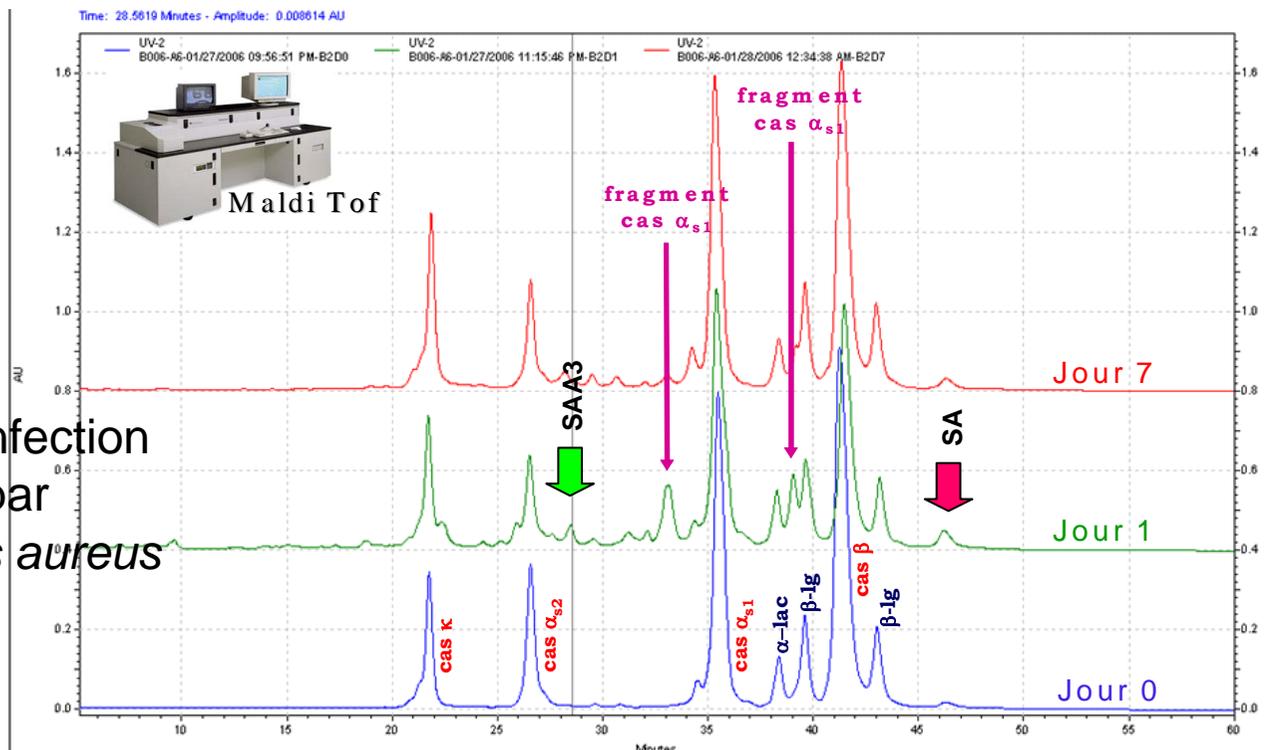
Variation in quantity of A: α -lactalbumin; B: β -casein in 2000 samples
(expressed as percent of total protein)

Intérêt d'un tel niveau de qualification

1 - Pour l'éleveur : santé animale (SA et SAA) (juste rémunération des efforts consentis)



« Genoma » : Infection expérimentale par *Staphylococcus aureus* (chez la brebis)



Intérêt d'un tel niveau de qualification

2 - Pour le transformateur : impacts technologiques



- Phosphorylation des caséines et stabilité thermique
- Rendement fromager, temps de prise et raffermissement du caillé :



- variants génétiques (e.g. caséine $\kappa B > A$),
- variants d'épissage (e.g. caséine $\alpha s1 A$),
- phosphorylation (caséine $\alpha_{s1}-8P$ vs $\alpha_{s0}-9P$),



Un programme R&D pour les filières laitières de demain **PhénoFinlait**

Intérêt d'un tel niveau de qualification

3 - Pour le consommateur : valeur santé du lait (variant $\beta A1$)

Medical Hypotheses (2001) 68(2), 262-272
© 2001 Harcourt Publishers Ltd
doi: 10.1054/mehy.2000.1265, available online at <http://www.idealibrary.com> on **IDEAL**[®]

β -casein A¹, ischaemic heart disease mortality, and other illnesses

C. N. S. McLachlan
A2 Corporation Ltd, Devonport, Auckland, New Zealand

Summary The risk factors identified with cardiovascular disease studied in the WHO MONICA project have been shown to have a limited relationship with the coronary heart disease mortality rates between centres, and in mirroring the historical rise and decline in deaths from the disease. Here we show that correlation of the calculated consumption of the milk protein, β -casein A¹ (excluding milk protein in cheese) against ischaemic heart disease (IHD) mortality has a $r^2 = 0.86$. In the states of the former West Germany, where the breed composition of regional cattle herds has remained virtually constant since the 1950s, IHD mortality by state correlates with the estimated consumption of β -casein A¹. Information on other recognized dietary risk factors does not indicate any significant regional difference. Similarly, the populations of Toulouse in France and Belfast in Northern Ireland have almost identical collective 'traditional' risk factors for heart disease, yet the respective mortality rates vary more than threefold. People from Northern Ireland are estimated to consume 3.23 times more β -casein A¹, excluding cheese, than the French. The remarkable agreement between mortality and the consumption of this allele suggests that this factor is worthy of serious consideration as a potential source of cardiovascular disease when taken in conjunction with regional variations in the traditional risk factors. β -casein A¹ consumption also correlates strongly with type 1 diabetes incidence in 0-14-year-olds, suggesting that IHD and diabetes may share at least one causative risk factor. © 2001 Harcourt Publishers Ltd



Journée nationale d'information Maison du Lait - Paris, 1 avril 2010

www.phenofinlait.fr



Un programme R&D pour les filières laitières de demain

PhénoFinlait

Intérêt d'un tel niveau de qualification

Diabetologia (1999) 42: 292–296

3 - Pour le consommateur :

Diabetologia

© Springer-Verlag 1999

valeur santé du lait (variant β A1)

Articles

Type I (insulin-dependent) diabetes mellitus and cow milk: casein variant consumption

R.B. Elliott¹, D.P. Harris², J.P. Hill², N.J. Bibby¹, H.E. Wasmuth³

¹ Department of Paediatrics, School of Medicine, Auckland, New Zealand

² Food Science Section, New Zealand Dairy Research Institute, Palmerston North, New Zealand

³ Diabetes Research Institute, University of Düsseldorf, Germany

Summary Previously published Type I (insulin-dependent) diabetes mellitus incidence in 0 to 14-year-old children from 10 countries or areas was compared with the national annual cow milk protein consumption. Countries which were selected for study had appropriate milk protein polymorphism studies, herd breed composition information and low dairy imports from other countries.

Total protein consumption did not correlate with diabetes incidence ($r = +0.402$), but consumption of the β -casein A¹ variant did ($r = +0.726$). Even more pronounced was the relation between β -casein (A¹+B) consumption and diabetes ($r = +0.982$).

These latter two cow caseins yield a bioactive peptide β -casomorphin-7 after in vitro digestion with intestinal enzymes whereas the common A² variant or the corresponding human or goat caseins do not.

β -casomorphin-7 has opioid properties including immunosuppression, which could account for the specificity of the relation between the consumption of some but not all β -casein variants and diabetes incidence. [Diabetologia (1999) 42: 292–296]

Keywords Milk, casein, epidemiology, immunosuppression, beta-casomorphin.



Journée nationale d'information Maison du Lait - Paris, 1 avril 2010

phenofinlait.fr



Un programme R&D pour les filières laitières de demain

PhénoFinlait

Quelle option technologique ?

Le résultat d'un long processus exploratoire ...

D'abord : EC (option retenue par NL*)

collaboration Beckman

* « *Dutch Milk Genomics Initiative* »

Méthode insuffisamment résolutive pour répondre aux exigences du cahier des charges : solution MS ?

Pb : Incompatibilité urée / MS !

Au final : RP-HPLC

Mises au point et développement d'une méthode compatible avec la MS pour l'introduire comme « seconde dimension », en ligne



Dispositif couplage LC/MS

LC = RP-HPLC (Dionex Intelligent LC)
MS = MicroTOF focus (Bruker)

matériel disponible à Jouy (début mars 2010)

analyses « sous traitées »
(ISIS, Strasbourg en sept 2009)

Résultats décevants !

→ solution alternative :

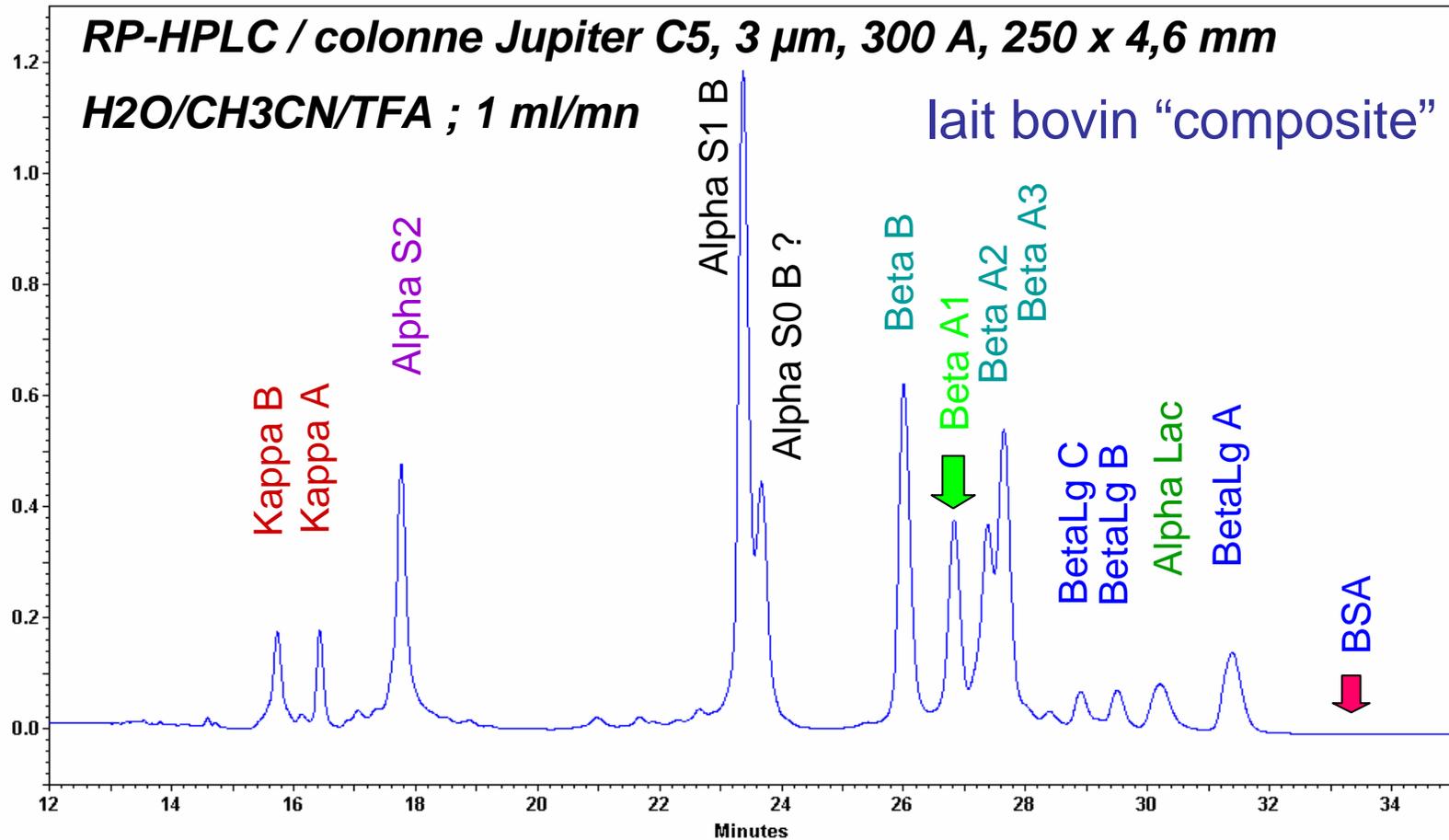
Méthode RP-HPLC « conventionnelle »





Lactoprotéines majeures

(programmes ANR Genanimal : « Genoma » et « Genomilk Fat »)





Possibilité d'établir équations de prédiction ?

Sur cette base :

- Analyse de 86 laits bovins (Holstein x Normande) du Domaine expérimental du Pin-au-haras
- Quantification des différentes « classes » de protéines (sur 67 laits)

6 protéines majeures (caséines κ , α s1, α s2 et β , β -Lg, α -Lac)

1 fraction glycolysée (caséine κ)

18 variants (dont certains très peu représentés)

Méthode : PLS ou AG+PLS

Résultats (PLS2)

en g/100 ml autres<16%	n	Mean	Sd	RMSEP	RMSEP/M.	R2_CV
<i>kappa cas</i>	67	0,34	0,042	0,027	7,98	0,59
kappa gly	67	0,13	0,027	0,020	15,66	0,46
<i>alpha s2 cas.</i>	67	0,28	0,036	0,023	8,35	0,56
<i>alpha s1 cas.</i>	67	0,88	0,080	0,047	5,31	0,65
<i>beta cas.</i>	67	1,12	0,097	0,063	5,68	0,57
beta Ig	67	0,32	0,060	0,052	15,88	0,26
alpha lac AA	67	0,14	0,020	0,019	13,17	0,10
autres	67	0,45	0,066	0,061	13,47	0,14

Conclusions

- Possibilité de prédire les protéines majeures du lait avec une erreur relative de 5 à 15%
- Prédiction difficile s'agissant des variants génétiques de ces protéines
- Pas d'amélioration nette des prédictions par l'utilisation des algorithmes génétiques
- Nécessité d'avoir plus de laits pour affiner ces résultats
- La méthode de référence : en bonne voie !