

ÉTUDE IMMUNOLOGIQUE DE LA PROTÉOLYSE DE LA CASÉINE α PAR LA PRÉSURE

JEAN GARNIER

*Institut National de la Recherche Agronomique,
Station Centrale de Microbiologie et Recherches laitières, Jouy-en-Josas, S. et O. (France)*

(Reçu le 8 Juin, 1959)

SUMMARY

An immunologic study of the proteolysis of α -casein by rennet

Immunologically, α -casein constitutes a complex antigenic system comprising at least four antigenic substances. Subjected to immunoelectrophoresis, one of these four constituents appears to be particularly sensitive to the action of rennet. The attack of rennet on this constituent is presumably concerned in the transformation of α -casein into α -paracasein during coagulation.

INTRODUCTION

La formation de paracaséine α à partir de la caséine α soumise à l'action de la présure s'effectue au cours d'une protéolyse très limitée puisque 1 à 2 % seulement de l'azote de la caséine α devient soluble dans l'acide trichloracétique¹. D'autre part, le nombre de liaisons rompues que nous avons mesurées au cours de cette protéolyse s'est révélé particulièrement minime: 4 à 5 liaisons pour 10.000 liaisons peptidiques. Aussi l'activité de la présure ne peut être mise en évidence par les moyens ordinaires d'étude des protéolyses. Pourtant, la paracaséine α se distingue nettement par sa propriété de précipiter en présence des ions calcium et de former alors un coagulum.

Or, les techniques immunologiques, grâce à leur sensibilité, permettent de déceler des modifications très limitées du substrat si ces modifications ont porté sur le groupement antigénique de la molécule. En 1932, NICOLAS² a constaté des différences notables entre la paracaséine et la caséine vis à vis d'un sérum anti-caséine. Les groupements antigéniques de la caséine sont donc sensibles à l'action de la présure.

Aussi avons nous entrepris l'étude de la protéolyse de la caséine α^* par la présure cristallisée en suivant son action par immunoélectrophorèse et par l'étude des surnageants après précipitation spécifique. Nous avons opéré dans des conditions analogues à celles utilisées par LAPRESLE^{3,4} pour l'étude de la dégradation enzymatique de la sérum-albumine humaine.

TECHNIQUE

Immunisation

Six lapines adultes ont été immunisées selon la technique de FREUND⁵ en faisant

* Obligeamment fournie par le Dr. T. L. McMEekin à qui nous adressons ici tous nos remerciements.

trois injections, de 10 mg environ de caséine α chacune, séparées par une semaine d'intervalle. La production maximum d'anticorps se situe environ 8 à 15 jours après la dernière injection d'antigène. Le sang a été prélevé par ponction intracardiaque*.

Electrophorèse en gélose

L'électrophorèse en gélose a été conduite selon la technique décrite par GORDON et coll.⁶ et modifiée selon GRABAR et coll.⁷. Les conditions étaient les suivantes: solution de caséine α à 13 mg/ml: 0,06 ml, tampon véronal pH 8,2, force ionique 0,05 dans les bacs et 0,025 dans la gélose, tension 5 V/cm, durée 4 h. Les plaques ont été colorées à l'amidoschwarz après précipitation des protéines par l'acide acétique, et lues au photomètre.

Immunoélectrophorèse

Les analyses immunoélectrophorétiques ont été effectuées selon la méthode de GRABAR ET WILLIAMS^{7**} en utilisant 2 ml de sérum anticaséine α par immunoélectrophorèse. Par ailleurs les conditions d'électrophorèse sont les mêmes que celles de l'électrophorèse en gélose.

Protéolyse

Nous avons effectué la protéolyse en milieu NaCl 0.16 M à pH = 7 à 30° en utilisant une solution de présure cristallisée préparée par C. ALAIS⁸, à la concentration de 3,3 μ g ou 0,13 U.P./ml du mélange caséine α et présure. La concentration en caséine α selon les expériences est soit 11 mg, soit 13 mg/ml du mélange en réaction.

La présure est inactivée par un chauffage à 80° pendant 10 sec. ou en élevant le pH à 8,2 par addition de soude N. Nous avons vérifié que ces traitements n'entraînent pas de modification du comportement immunologique ou électrophorétique de la caséine α .

Le témoin correspondant au temps zéro est obtenu en ajoutant à la caséine α une solution de présure cristallisée préalablement portée à l'ébullition.

Précipitation spécifique

Les précipitations spécifiques pour l'étude des surnageants ont été faites en ajoutant à 0,1 ml de sérum anti-caséine α , 0,1 ml d'une solution contenant des quantités croissantes de caséine α ayant subi l'action de la présure pendant un temps déterminé.

Les précipités sont conservés ensuite 1 h à 37° et 24 h à 5° puis centrifugés 20 min. à $2300 \times g$. Les surnageants ont été analysés selon la technique du disque (ring test), (a) avec le sérum anti-caséine α , (b) avec la caséine α non emprésurée et (c) avec la caséine α ayant subi le même temps d'action de la présure que la solution de caséine α utilisée pour la précipitation spécifique. Ces solutions de caséine α ont été employées à la concentration de 200 μ g/ml.

* Nous remercions ici M. PLOMMET qui a bien voulu se charger de ce travail.

** Nous remercions également Melle DURIEUX qui s'est chargée de la partie technique de ce travail.

RÉSULTATS

Electrophorèse en gélose (Fig. 1)

La caséine α sans présure présente un seul pic mais légèrement dissymétrique. Après 1 h d'action de la présure, ce pic se scinde en deux pics α_1 et α_2 . Le pic α_2 devient plus net après 6 h et 22 h d'action de la présure. Ce résultat concorde avec celui obtenu par NITSCHMANN et coll.⁹ en électrophorèse en phase liquide selon TISELIUS.

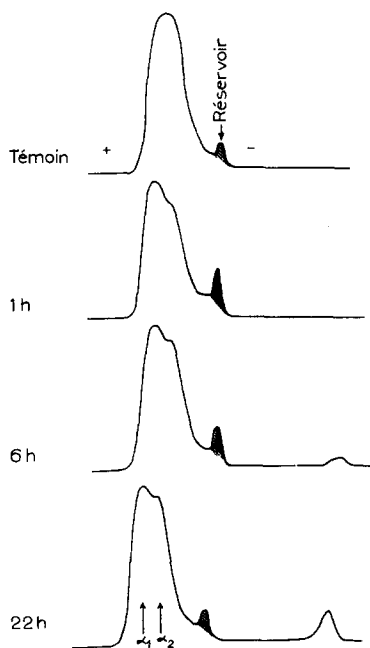


Fig. 1. Electrophorèse en gélose de la caséine α , sans présure (témoin) et après 1 h, 6 h, et 22 h d'empresurage. Présure inhibée par élévation du pH.

Il faut noter qu'au cours de l'action de la présure, il apparaît un nouveau composant migrant vers le pôle négatif. Il est déjà nettement visible sur le diagramme fait après 6 h d'action de la présure. Le diagramme d'électrophorèse de la solution de caséine α témoin n'est pas modifié si la solution est conservée à 30° pendant 22 h en présence de toluène.

Immunoélectrophorèse

La caséine α donne lieu à deux lignes de précipitation bien visibles (1 et 4) avec tous les sérums et à deux lignes supplémentaires très fines (2 et 3) avec certains sérums (Fig. 2). La ligne 4 se divise en deux du côté de la cathode. Ces lignes correspondent à

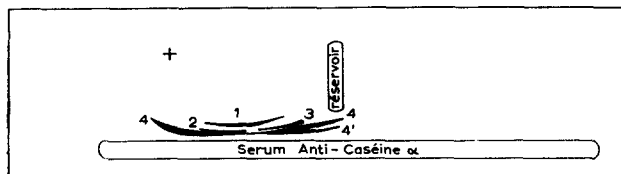


Fig. 2. Immunoélectrophorèse de la caséine α , schéma.

des antigènes ayant une mobilité électrophorétique très voisine dans les conditions étudiées. Au cours de l'action de la présure la ligne 1 s'estompe peu à peu pour disparaître complètement au bout d'une heure. La ligne 4 n'est pas modifiée ni dans sa forme ni dans sa position.

Etudes des surnageants après précipitation spécifique

Les résultats concernant la caséine α sont indiqués dans la première colonne horizontale (caséine α) du Tableau I. Lorsque 0,1 ml de l'anti-sérum et 0,1 ml de différentes dilutions de caséine α sont mélangés et qu'après centrifugation l'on recherche dans les surnageants la présence d'antigènes ou d'anticorps non précipités, l'on constate que dans les trois premiers surnageants (4, 8 et 16 μg de caséine α /ml de sérum) il y a seulement un excès d'anticorps. Puis dans les surnageants 32, 48, 65 et 97 $\mu\text{g}/\text{ml}$ il y a toujours un excès d'anticorps mais aussi un excès d'antigènes. Enfin

TABLEAU I
ÉTUDE DES SURNAGEANTS APRÈS PRÉCIPITATION SPÉCIFIQUE

Antigène* $\mu\text{g}/\text{ml}$	4	8	16	32	48	65	97	130	195	260	520
Caséine α											
Paracaséine α 1 h **											
Paracaséine α 6 h **				I	II					III	
Paracaséine α 24 h **											

* Caséine α ou paracaséine α après 1 h, 6 h ou 24 h d'action de la présure en $\mu\text{g}/\text{ml}$ de protéine ajoutés par ml de sérum anti-caséine α pour effectuer la précipitation spécifique.

** Temps d'action de la présure.

I ----: Limite des zones d'excès d'antigènes.

II ———: Limite des zones d'excès d'anticorps lorsque les surnageants sont analysés avec l'antigène utilisé pour la précipitation spécifique.

III - - - - -: Limite des zones d'excès d'anticorps lorsque les surnageants sont analysés avec la caséine α .

pour des concentrations plus élevées en caséine α , il n'y a plus d'anticorps présents dans les surnageants mais seulement de l'antigène en excès. La zone de superposition des excès d'antigènes et d'anticorps a été délimitée dans le Tableau I par la ligne en tirets I, limite d'excès d'antigènes, entre 16 et 32 $\mu\text{g}/\text{ml}$ et par la ligne en trait plein II, limite d'excès d'anticorps, entre 97 et 130 $\mu\text{g}/\text{ml}$. La présence de cette zone est importante à noter. Elle indique que la caséine α ne donne pas de zone d'équivalence et qu'elle est constituée alors par un mélange d'antigènes ayant chacun un point d'équivalence différent des autres, ce qui confirme les résultats déjà obtenus en milieu gélifié.

Une étude similaire a été faite avec les différentes paracaséines α , après 1 h, 6 h, et 24 h d'action de la présure, en les utilisant comme antigène pour précipiter les anticorps du sérum anti-caséine α .

La recherche des antigènes présents dans les surnageants montre que la limite d'excès d'antigènes pour les trois paracaséines α est la même que celle de la caséine α (limite I du Tableau I).

Pour rechercher les anticorps contenus dans les surnageants nous nous sommes

servis de deux antigènes différents: la paracaséine α utilisée pour la précipitation spécifique et la caséine α .

Par exemple si la précipitation spécifique a été faite avec la paracaséine α après 1 h d'action de la présure (deuxième colonne horizontale du Tableau I), cette même paracaséine α est utilisée pour déceler la présence des anticorps dans les surnageants. Cette recherche permet de tracer comme pour la caséine α , une limite d'excès d'anticorps ou limite II du Tableau I. Pour des concentrations en paracaséine α plus petites que 65 $\mu\text{g/ml}$ de sérum, il y a dans les surnageants un excès d'anticorps. Cette limite II est la même pour les trois paracaséines α , donc quelque soit le temps d'action de la présure entre 1 h et 24 h. La limite d'excès d'antigènes étant située entre 16 et 32 $\mu\text{g/ml}$, il existe donc toujours une zone de non équivalence, mais cette zone est plus étroite que celle de la caséine α .

La recherche des anticorps contenus dans les surnageants peut également se faire en utilisant la caséine α . Ceci donne lieu à une nouvelle limite d'excès d'anticorps, représentée dans le Tableau I par la ligne en pointillée III. Le fait d'abord que cette limite III existe, indique que pour une concentration suffisamment grande en paracaséine α (ici 520 $\mu\text{g/ml}$ de sérum), tous les anticorps sont précipités par la paracaséine α . Celle-ci contient donc encore tous les groupements antigéniques de la caséine α mais en quantité moindre, car il faut 520 μg de paracaséine α pour saturer les anticorps saturés par 130 μg de caséine α .

Le fait que les limites II et III d'excès d'anticorps ne coïncident pas, signifie qu'il existe des surnageants qui précipitent encore avec la caséine α par la méthode du disque, alors qu'ils ne précipitent plus avec la paracaséine α . Une façon de traduire cette observation est de supposer, comme l'ont fait dans des circonstances analogues LAPRESLE ET DURIEUX⁴, que l'action enzymatique produit des antigènes "incomplètement précipitants" qui sont capables de se combiner avec les anticorps anti-caséine α . Ces antigènes précipitent seulement avec les surnageants correspondant au début de la courbe de précipitation spécifique, qui sont les plus riches en anticorps.

Les résultats présentés dans le Tableau I correspondent à ceux donnés par un sérum particulier. Tous les sérums étudiés donnent des résultats analogues mais avec des variations individuelles jouant principalement sur la largeur des zones de non équivalence.

Nous avons également étudié un certain nombre de réactions croisées. Le sérum anti-caséine α réagit avec la caséine β de vache, la caséine totale de brebis et la caséine totale de chèvre, et, naturellement, avec la caséine totale de vache.

Par contre si le lait de vache donne une réaction positive par la technique du disque avec le sérum anti-caséine α , le lait de truie ne donne aucune réaction. Cela laisserait supposer que la caséine de truie aurait une spécificité immunologique complètement différente de celle de la caséine α de vache.

CONCLUSION

La caséine α à l'électrophorèse en phase liquide ou en milieu gélifié se comporte comme un produit homogène. L'étude immuno-électrophorétique révèle qu'elle est complexe et constituée par au moins quatre composants distincts. Cette composition complexe est en accord avec les travaux récents de WAUGH et coll.¹⁰, de McMEEKIN et coll.¹¹, de LONG et coll.¹² montrant que la caséine α comprend un composant

particulièrement sensible à l'action de la présure κ ou α_2 , un autre composant en faible proportion λ et un composant résiduel α_1 .

Pendant l'attaque de la présure, l'une des lignes de précipitation de la caséine α données par immunoélectrophorèse disparaît. Ceci est également en accord avec l'hypothèse que l'un des composants de la caséine α est particulièrement sensible à l'action de la présure et que de son attaque résulte l'instabilité des autres composants vis à vis des ions Ca^{++} , ce qui entraînerait la coagulation du complexe.

L'interprétation de l'étude des surnageants est très limitée en raison même de la complexité de la caséine α . Néanmoins au cours de l'action de la présure, le nombre de groupements antigéniques semble diminuer car il faut trois à quatre fois plus de paracaséine α pour saturer tous les anticorps. De plus, par l'épreuve du disque, la paracaséine α ne précipite qu'avec des surnageants contenant un taux élevé d'anticorps. Ceci est certainement en rapport avec la disparition de la ligne 1 observée en immunoélectrophorèse.

Toutes ces transformations immunologiques ont lieu au cours du temps nécessaire à la coagulation appelée phase primaire d'action de la présure et sont donc certainement en relation avec la coagulation elle-même. La phase secondaire de protéolyse générale qui se poursuit après ne modifie pas les propriétés immunologiques de la paracaséine α .

RÉSUMÉ

Au point de vue immunologique la caséine α se présente comme un système antigénique complexe comprenant au moins quatre constituants antigéniques. Par immunoélectrophorèse, un surtout des quatre constituants se montre sensible à l'action de la présure. L'attaque de ce constituant doit être en rapport avec la transformation de la caséine α en paracaséine α au cours du phénomène de la coagulation.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ HS. NITSCHMANN ET W. KELLER, *Helv. Chim. Acta*, 38 (1955) 942.
- ² E. NICOLAS, *Lait*, 12 (1932) 593.
- ³ C. LAPRESLE, *Ann. inst. Pasteur*, 89 (1955) 654.
- ⁴ C. LAPRESLE ET J. DURIEUX, *Ann. inst. Pasteur*, 92 (1957) 62.
- ⁵ E. A. KABAT ET M. M. MAYER, *Experimental Immunochimistry*, p. 544.
- ⁶ A. H. GORDON, B. KEIL, K. ŠEBESTA, O. KNESSL ET F. ŠORM, *Coll. trav. chim. tchécoslov.*, 15 (1950) 1.
- ⁷ P. GRABAR ET C. A. WILLIAMS, *Bioch. Biophys. Acta*, 17 (1955) 67.
- ⁸ C. ALAIS, *Ann. technol. agr. (Paris)*, 1 (1955) 113.
- ⁹ HS. NITSCHMANN ET W. LEHMANN, *Experientia*, 3 (1947) 153.
- ¹⁰ D. F. WAUGH ET P. H. VON HIPPEL, *J. Am. Chem. Soc.*, 78 (1956) 4576.
- ¹¹ T. L. MCMEEKIN, M. L. GROVES ET N. J. HIPPEL, *131st Meeting of the Am. Chem. Soc.*, 1957, 65c.
- ¹² J. LONG, Q. VON WINKLE ET I. A. GOULD, *J. Dairy Sci.*, 41 (1958) 317.