



**HAL**  
open science

**-Mieux comprendre la structure interne de la micelle de caséines et sa dynamique par RMN du Solide. Master CHIMIE Parcours Chimie Durable Organique (CD-Org)  
Mieux comprendre la structure interne de la micelle de caséines et sa dynamique par RMN du Solide**

Mharzi Alaoui Mohamed

► **To cite this version:**

Mharzi Alaoui Mohamed. -Mieux comprendre la structure interne de la micelle de caséines et sa dynamique par RMN du Solide. Master CHIMIE Parcours Chimie Durable Organique (CD-Org) Mieux comprendre la structure interne de la micelle de caséines et sa dynamique par RMN du Solide. Sciences du Vivant [q-bio]. 2020. hal-02926792

**HAL Id: hal-02926792**

**<https://hal.inrae.fr/hal-02926792v1>**

Submitted on 1 Sep 2020

**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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

**MHARZI ALAOUI - Mieux comprendre la structure interne de la micelle de caséines et sa dynamique par RMN du Solide.**



**Master CHIMIE**  
*Parcours Chimie Durable Organique (CD-Org)*

*Mieux comprendre la structure interne de  
la micelle de caséines et sa dynamique par  
RMN du Solide*

**M. Mohamed MHARZI ALAOUI**

**Mémoire de stage M2**

**02/03 au 21/08/2020 (6mois)**

**Pr. Thomas CROGUENEC**

**Dr. Claire ROILAND**

**Tuteur : Pr. Anne WADOUACHI**

# MHARZI ALAOUI - Mieux comprendre la structure interne de la micelle de caséines et sa dynamique par RMN du Solide.

## Sommaire

I.	Liste de tableaux et figures .....	3
II.	Remerciements .....	4
III.	Présentation de l'entreprise .....	5
IV.	Introduction .....	7
V.	Etat de l'art.....	8
A.	La micelle de caséine.....	8
1.	Caséines et mode d'interactions .....	8
2.	Nanoclusters de phosphate de calcium .....	9
3.	Modèles de structure micellaire de caséine .....	10
a)	Le modèle sous-micellaire de Schmidt <sup>23,24</sup> .....	10
b)	Le modèle de nanocluster de Holt .....	11
c)	Le modèle de double liaison de Home <sup>12</sup> .....	12
B.	Contrôle la taille de la micelle de caséine .....	12
C.	Propriétés des micelles de caséine .....	13
1.	Effet d'une baisse de pH .....	13
2.	Effet du traitement thermique .....	13
3.	Effet de la réticulation des micelles de caséines.....	14
D.	Etude des micelles de caséines par RMN de solide .....	14
VI.	Résultats et discussion .....	15
A.	Optimisation de la préparation des échantillons .....	16
1.	Préparation de la solution de PPCN .....	16
2.	Réticulation des micelles de caséines.....	16
3.	Déminéralisation des micelles de caséines .....	18
B.	Caractérisation des échantillons.....	19
1.	Mesure de taille par diffusion dynamique de lumière .....	19
2.	Dosage du Calcium .....	20
C.	Analyse des structures micellaire par RMN.....	20
D.	Résultats RMN des différentes solutions préparées .....	20
E.	Résultats RMN suite à la Minéralisation.....	25
VII.	Partie expérimentale .....	27
A.	Matériel.....	27
B.	Méthodes .....	27
1.	Préparation des échantillons .....	27
2.	Diffusion dynamique de lumière .....	28
3.	Inductively Coupled Plasma 'ICP' .....	29
C.	Analyse RMN.....	29
1.	Théorie RMN : Les interactions présente .....	30
2.	Condition expérimentale des mesures RMN du solide .....	31
a)	La simple impulsion (programme d'impulsion : ZG) .....	31
b)	Le découplage Phosphore – Protons (HPDEC) .....	31
c)	La polarisation croisée (CP).....	31
VIII.	Conclusion et perspectives .....	32
IX.	Référence .....	33
X.	Bilan Personnel.....	37
XI.	Convention de stage.....	38
XII.	Résumé .....	43

## I. Liste de tableaux et figures

Tableau 1: composition protéique moyenne du lait (lait de vache) et composition en acides aminés des caséines $\alpha$ S1, $\alpha$ S2, $\beta$ et $\kappa$ . <sup>8</sup> .....	8
Tableau 2: Mesure de taille par diffusion dynamique de lumière des différents échantillons .....	19
Tableau 3: Les paramètres utilisés ainsi que les proportions de chaque espèce présente. ....	26
Tableau 4: Rapport gyromagnétique et fréquence de Larmor pour différents noyaux.....	29
Tableau 5: interactions rencontrées en RMN du solide. ....	30
Figure 1: Représentation des assemblage de Caséines $\alpha$ S1 et $\beta$ . ....	9
Figure 2: Modèle sub-micellaire de Schmidt. ....	11
Figure 3: Modèle d'association des caséines en une structure micellaire selon Holt. ....	11
Figure 4: Modèle d'association des caséines en une structure micellaire selon Horne.....	12
Figure 5: modèle de croissance des micelles de caséines.....	12
Figure 6: Effet d'une acidification sur la structure (minéralisation, hydratation) de la micelle de caséines. ....	13
Figure 7: mécanisme de réticulation des protéines par la Transglutaminase. ....	14
Figure 8: Représentation d'un pont phosphocalcique montrant le pontage que le calcium crée entre le phosphate de calcium colloïdal et les phosphoserine.....	14
Figure 9: figure regroupe quelques expériences RMN, la polarisation croisée en statique. ....	15
Figure 10: Représentation de la micelle de caséines.....	16
Figure 11: Représentation de la micelle de caséines réticulée par la transglutaminase. ....	17
Figure 12: Explication de la libération de protons et de l'abaissement du pH lors de la réaction de réticulation.....	17
Figure 13: Représentation de la micelle de caséines réticulée déminéralisée. ....	18
Figure 14: Influence des ajouts minéraux sur les équilibres minéraux de la micelle de caséines. ....	19
Figure 15: a) Spectres RMN d'une solution de phospho-caseinate native à 60 g/L dans H <sub>2</sub> O (PPCN60), b) Zoom du spectre ZG du PPCN 60 g/L.....	21
Figure 16: Reconstruction du spectre CP de l'échantillon PPCN 60 g/L avec les valeurs du tenseur d'anisotropie ainsi mesurées. ....	22
Figure 17: Spectres ZG et CP de l'échantillon PPCN 60 g/L +TG comparés avec les spectres obtenus sur le PPCN 60 g/L native.....	22
Figure 18: a) Spectres ZG et CP de l'échantillon PPCN 60 g/L + TG déminéralisé comparés aux spectres obtenus sur le PPCN 60 g/L native, b) zoom des spectres ZG. ....	23
Figure 19: a) Spectres ZG et CP obtenus sur le PPCN 60 g/L+TG et déminéralisé puis additionné de CaCl <sub>2</sub> , b) zoom du spectre ZG. ....	24
Figure 20: Représentation schématique du rôle de calcium dans les micelles de caséine .....	25
Figure 21: Spectres ZG et CP des solution PPCN 60 g/L et PPCN 60 g/L + les minéraux, Calcium, magnésium et phosphore.....	26
Figure 22: Représentation schématique d'une expérience RMN .....	30
Figure 23: séquence de polarisation croisée dans le cas du proton et d'un noyau X. ....	32

---

## **II. Remerciements**

**« Le chercheur doit être libre de tenter des expériences audacieuses, de soutenir des théories révolutionnaires, voire paradoxales. Il doit disposer du droit à l'erreur ».** **Pierre Joliot**

*C'est avec un réel plaisir et une énorme joie que je procède à la rédaction de cette page de remerciements. Je remercie tout d'abord les membres du jury pour l'honneur qu'ils me portent en acceptant d'évaluer mon travail et le mémoire de stage en résultant. Je souhaite également remercier vivement le Dr. Catherine LIEVRE-DOLHEM, responsable master Chimie - Chimie Durable Organique et le Pr. Anne WADOUACHI. Sans oublier les enseignants de l'université de Picardie Jules Verne et le laboratoire de glycochimie des antimicrobiens et des agroressources (LG2A) qui m'ont enseigné jusqu'à l'obtention de mon diplôme de MASTER 2.*

*Ce travail a été réalisé au sein de l'Unité mixte de recherche Science & technologie du lait & de l'œuf (STLO) et l'institut des sciences chimiques de rennes (ISCR). Ainsi, je tiens à présenter ma reconnaissance et mes remerciements au Pr. Thomas CROGUENNEC et Dr. Claire ROILAND, qui ont été mes responsables de stage, Je leurs adresse de sincères remerciements chaleureux pour leur choix et la confiance qu'ils m'ont accordé afin de travailler sur leurs sujets, pour leurs conseils, encouragements, soutien, aide, disponibilités et discussions constructives.*

*Je remercie infiniment Dr. Said BOUHALLAB, notre chef d'équipe, pour tout son soutien, les réunions constructives avec lui, ses conseils, son aide, nos discussions et sa bonne humeur.*

*Je remercie chaleureusement le futur docteur Julien BAULAND, de m'avoir accompagné dès mon premier jour de stage, pour m'avoir donné l'occasion de travailler et développer une partie de son propre sujet de thèse, pour le temps qu'il m'a consacré et pour les discussions constructives, son aide et ses conseils.*

*Je remercie vivement, Marion LEMAITRE, Pascaline HAMON, Florence ROUSSEAU, Eric BEAUCHER, pour leurs formations, temps qui m'ont toujours accordé, gentillesse, soutien et aides.*

*Un grand merci aux futur docteurs Elise CHARTON et Ousmane SUWAREH pour leur soutient et pour leur bonne humeur ainsi que l'ambiance qu'ils ont créée.*

*Je remercie chaleureusement, Agnes DEMABRE, Laurence ADAMANDIDAS, Danielle GUILLOUX, Sylvie TOILLON, Nathalie LE MARRE et Monique BOURIEL pour leurs aides administratifs et informatique.*

*Je tiens à remercier tous les personnels de l'Institut national de la recherche agronomique et l'environnement (INRAE) & de l'école d'agronomie AGROCAMPUS OUEST c'est l'inverse l'Unité Mixte de Recherche STLO et de l'ISCR pour leur accueil et leur aide.*

*Enfin, je souhaite adresser un remerciement tout particulier à mes chers amis, Ikram ZARII, Mohamed LAHMYANI OKBI, Ismail IDBOURHIM et Othmane GENOUNI, qui m'ont toujours accompagné durant les années de fac et notamment lors de ce stage, leur présence, conseils, soutien, aide, partage d'informations et connaissances, discussions constructives et toutes autres choses que nous avons partagés ensemble durant des années.*

*Je dédie ce travail à mes parents et mes grands-parents. A mes sœurs, mes tantes, mes oncles. Sans vous je ne serai pas là où je suis actuellement. Merci infiniment et chaleureusement pour tout ce que vous avez fait pour moi, votre soutien durant toutes ces années, aide, encouragements et beaucoup de grandes choses, je vous aime à l'infini.*

**« Dans la vie, les hommes sont tributaires les uns des autres. Il y a donc toujours quelqu'un à maudire ou à remercier ».** **Madeleine Ferron**

### III. Présentation de l'entreprise

Ce stage conventionné de 6 mois de Master 2, s'est déroulé à Rennes, plus précisément sur deux lieux différents :

- 1) L'Unité Mixte de Recherche Science & technologie du lait & de l'œuf (STLO) 1253 est une UMR entre l'Institut national de la recherche agronomique et l'environnement (INRAE) & de l'école d'agronomie AGROCAMPUS OUEST.
- 2) L'institut des sciences chimiques de rennes (ISCR).

Le STLO, situé au 65 Rue de Saint-Brieuc, 35000 Rennes, est un laboratoire avec une surface de 4000 m<sup>2</sup> de laboratoires, qui héberge plus de 83 permanents dont 34 scientifiques, 25 doctorants et environ 10 masters. Autour de compétences en biochimie, procédés et microbiologie alimentaire, il construit un réseau dense de collaboration nationales et internationales. Le budget global de l'UMR STLO est d'environ 6,5 M€, 4,5 M€ provenant de financement publics (INRAE et AGROCAMPUS OUEST), ainsi que de contrats et de collaborations avec des partenaires privés français ou étrangers et des financements publics au niveau régional, national (ANR) ou même international (projets Européens).<sup>1</sup>



Le STLO travail sur 5 domaines principaux autour des matrices lait et œuf : <sup>1</sup>

1. Microbiologie des filières lait et œuf (MicroBio)
2. Interaction - structure – fonctionnalité des protéines et lipides (ISFPL)
3. Bio activité et nutrition (BN)
4. Procédés de séparation à membrane (PSM)
5. Séchage – matrices concentrées – fonctionnalités (SMCF)

Les missions du STLO sont les suivantes : <sup>1</sup>

- Développer une expertise publique sur les composants du lait et de l'œuf en explorant leur structure, leurs multiples fonctionnalités, leur digestibilité, qu'ils soient natifs ou soumis à divers procédés.
- Augmenter la qualité et la sécurité des produits laitiers fermentés et des ovoproduits par la connaissance de l'expression in situ des bactéries, la préservation et l'exploration de leur biodiversité.
- Former des étudiants de master et de doctorat et favoriser leur insertion dans la recherche, l'enseignement.
- Faire bénéficier la société et l'industrie des nouvelles avancées scientifiques au travers d'un partenariat régulier et diversifié.

## MHARZI ALAOUI - Mieux comprendre la structure interne de la micelle de caséines et sa dynamique par RMN du Solide.

Le deuxième lieu de stage est l'institut des sciences chimiques de Rennes (ISCR). Il se situe au 263 Avenue Général Leclerc, 35700 Rennes.



L'(ISCR – UMR 6226) est une Unité Mixte de Recherche associant le CNRS (INC et INSIS), l'Université de Rennes 1, l'École Nationale Supérieure de Chimie de Rennes (ENSCR) et l'Institut National des Sciences Appliquées de Rennes (INSA). Cet Institut, créé au 1er janvier 2006, résulte des regroupements successifs de l'ensemble des forces académiques en chimie sur le site de Rennes. Il rassemble début 2017 plus de 280 personnels permanents, dont environ 140 enseignant-chercheurs, 60 chercheurs CNRS et 80 Ingénieurs et Techniciens. <sup>2</sup>

Son organisation déconcentrée en huit équipes de taille variée permet de combiner aujourd'hui avec efficacité les avantages scientifiques d'une structure couvrant un vaste champ disciplinaire et le souci d'une gestion au plus près de chacun. <sup>2</sup>

1. Chimie et Ingénierie des procédés (CIP)
2. Chimie – Métallurgie (CMet)
3. Chimie Organiques et Interfaces (Coint)
4. Chimie du Solide et Matériaux (CSM)
5. Chimie Théorique Inorganique (CTI)
6. Matière condensée et Systémies Electroactifs (MaCSE)
7. Organométalliques : matériaux et Catalyse (OMC)
8. Verres et Céramiques (V&C)

La chimie rennaise possède une expertise indéniable pour la conception et la synthèse de molécules, de cristaux, de matériaux à façon, porteurs de fonctions ou de propriétés dédiées, par la mise en œuvre d'une très grande variété d'outils d'ingénierie des molécules et des matériaux. Cela concerne plus spécifiquement <sup>2</sup> :

- La chimie moléculaire (organique, organométallique et de coordination)
- Les matériaux issus de la chimie du solide et de la métallurgie
- La catalyse
- L'électrochimie
- La chimie théorique
- L'ingénierie des procédés chimiques

## IV. Introduction

Le lait est un liquide d'une couleur blanchâtre. Cette couleur est dû à la diffusion de la lumière par deux types de particules en suspension dans le sérum : les globules gras et les micelles de caséine.<sup>3</sup> Utilisé comme aliment depuis la naissance de l'être humain, le lait est secrété des glandes mammaires des mammifères femelles. Il constitue un élément important de notre alimentation. L'être humain consomme le lait produit par certains mammifères domestiqués, principalement celui des vaches, chèvres, brebis et quelques autres.

Le lait est composé majoritairement d'eau, de protéines, de glucides (le lactose), de matière grasse, des vitamines et des minéraux, notamment le calcium, le potassium, le magnésium, le phosphore pour les éléments majeurs... Le lait est la principale source de calcium et de phosphore de notre alimentation.

Le lait contient 3,3% de protéines, dont environ 80% de caséines et 20% de protéines de lactosérum, comme la  $\beta$ -lactoglobuline ( $\beta$ -LG) ou l' $\alpha$ -lactalbumine qui sont les deux protéines majeures du lactosérum.<sup>4,5</sup> Les caséines sont des phosphoprotéines qui s'associent entre elles et avec des éléments minéraux, principalement le calcium et le phosphore, pour former les micelles de caséines.<sup>6</sup>

A ce jour, la structure de la micelle de caséines est toujours débattue. La structure de la micelle de caséines est dynamique car elle évolue en fonction des conditions physicochimiques appliquées (variation de température, acidification, alcalinisation...). L'objectif du stage, est de mieux connaître la nature des éléments minéraux de la micelle de caséines et comprendre les interactions existantes entre caséines et ces éléments minéraux au sein de la micelle de caséines. En raison des caractéristiques de l'objet analysé, nous avons opté pour une étude des formes minérales ( $^{40}\text{Ca}$  et  $^{31}\text{P}$ ) de la micelle de caséines par résonance magnétique nucléaire du solide (RMN). Peu de chercheurs se sont intéressés à sa structure en utilisant la méthode d'analyse par RMN du solide.. Ainsi ce rapport se focalise sur les analyses des différentes formes de phosphore au sein de la micelle de caséines par RMN du solide.

Pour simplifier l'analyse, la démarche consistera à préparer plusieurs échantillons à partir d'une poudre de micelle de caséines (PPCN) reconstituée dans de l'eau distillé qui se distingueront par la composition en éléments minéraux dans la micelle de caséines :

- Dans les conditions naturelles, la micelle de caséines contient du calcium et du phosphate inorganique en équilibre avec la phase dispersante. Elle contient également du phosphate dit organique lié aux résidus sérine (phosphosérine) des caséines.
- Il est possible de vider les micelles de caséines de leur contenu en calcium et phosphore inorganique. Cependant cette opération conduit à une dissociation de la micelle de caséine à moins que celle-ci ne soit au préalable réticulé pas voie chimique ou enzymatique. La préparation d'un tel échantillon permettrait d'identifier le phosphore organique de la micelle de caséine
- L'ajout de minéraux tels que le calcium à des micelles de caséines préalablement vider de leur calcium et phosphore inorganique, permettra d'identifier le signal d'interaction du calcium avec le phosphore organique des caséines.<sup>7</sup>

Ces analyses seront complétées par l'analyse d'échantillons de micelle de caséines enrichis en calcium, phosphore et magnésium. Ces ajouts permettront de faire varier et valider l'attribution des formes minérales dans la micelle de caséines par évolution du spectre RMN de  $^{31}\text{P}$ .

## MHARZI ALAOUI - Mieux comprendre la structure interne de la micelle de caséines et sa dynamique par RMN du Solide.

La première partie du stage s'attachera à déterminer les conditions de réticulation de la micelle de caséines par une enzyme, la transglutaminase, afin de pouvoir ensuite dépliées les micelles de caséines en éléments minéraux sans affecter sa structure protéique. La seconde partie du stage sera consacré à l'analyse par RMN du solide ( $^{31}\text{P}$ ) des différents échantillons.

## V. Etat de l'art

La majeure partie des protéines du lait, les caséines, forme des particules colloïdales, appelées micelles, le reste des protéines est dispersé dans le sérum ; la composition protéique moyenne d'un lait de vache est donnée dans le tableau suivant :

Tableau 1: composition protéique moyenne du lait (lait de vache) et composition en acides aminés des caséines  $\alpha\text{S1}$ ,  $\alpha\text{S2}$ ,  $\beta$  et  $\kappa$ .<sup>8</sup>

Protéines	Concentration (g/l)	Caséines				
		acides aminés	$\alpha\text{S1-B}$	$\alpha\text{S2}$	$\beta\text{-A2}$	$\kappa\text{-B}$
caseine $\alpha\text{S1}$	10.0	Asp	7	4	4	4
caséine $\alpha\text{S2}$	2.6	Asn	8	14	5	7
caséine $\beta$	9.3	Glu	25	25	17	13
caséine $\kappa$	3.7	Gln	14	15	22	14
caséine $\gamma$	0.8	Gly	9	2	5	2
protéose-peptones	0.8	Ala	9	8	5	15
lactalbumine $\alpha$	1.2	Val	11	14	19	11
lactoglobuline $\beta$	3.2	Leu	17	13	22	8
albumine du sérum	0.4	Ile	11	11	10	13
immunoglobuline	0.8	Ser	16	17	16	13
lactoferrine	0.1	Thr	5	15	9	14
transferrine	0.1	Cys-SH	-	2	-	2
membranes globules gras	0.4	Met	5	4	6	2
total	33.0	Lys	14	24	11	9
		His	5	3	5	3
		Arg	6	6	4	5
		Trp	2	2	1	1
		Tyr	10	12	4	9
		Phe	8	6	9	4
		Pro	17	10	35	20

Cette composition protéique moyenne du lait de vache a été donnée par Walstra et Jenness (1984).<sup>5</sup> Mercier et Brignon,<sup>8</sup> ont été les premières à donner une composition en acides aminés des caséines en nombre de résidus par mole.

### A. La micelle de caséine

Les micelles de caséines sont des particules quasi-sphériques d'une taille allant de 50 à 600 nm. Ce sont des structures colloïdales formées par les caséines du lait et du phosphate et du calcium sous forme de petits entités cristallines.<sup>4</sup> A 37 °C et au pH physiologique (pH 6.7), les micelles de caséines rassemblent presque toutes les caséines présentes dans le lait ainsi qu'une proportion élevée du calcium (environ 2/3) et du phosphate (environ 1/2) inorganique. Le poids moléculaire des micelles de caséines varie de  $10^6$  à  $10^9$  Dalton (environ  $10^8$  Dalton en moyenne).<sup>9</sup> De plus, il est important de noter que les micelles de caséines sont des assemblages constitués des caséines  $\alpha\text{S1}$ ,  $\alpha\text{S2}$ ,  $\beta$  et  $\kappa$  dans des proportions approximatives de 4/1/4/1. Les éléments minéraux, principalement le calcium et le phosphate, représente environ 7 % de la masse sèche des micelles de caséines.<sup>9</sup>

#### 1. Caséines et mode d'interactions

Les caséines sont des chaînes polypeptidiques d'environ 200 acides aminés avec des zones hydrophiles et hydrophobes très marquées. Sur la figure 1, les cercles en pointillés indiquent les zones potentielles d'interaction entre caséines. Le plus grand cercle représente la zone de répulsions électrostatiques résultant des charges négatives des caséines, en particulier les

## MHARZI ALAOUI - Mieux comprendre la structure interne de la micelle de caséines et sa dynamique par RMN du Solide.

résidus phosphosérines. Les plus petits cercles sont les zones d'attraction hydrophobe dans la micelle,<sup>10</sup> riches en acide aminés apolaires. Elles ont été déterminées par calculs d'interaction des protéines sur une surface hydrophobe.<sup>10</sup>

Les zones de répulsion des caséines cherchent à s'éloigner le plus possible les unes des autres, alors que les zones hydrophobes permettent des attractions entre caséines. Les analyses de calorimétrie à balayage différentiel,<sup>11,12</sup> ont conclu que les micelles de caséines se forment par ajout progressif de monomère. La première étape serait la formation de petits assemblages de caséines, comme illustré dans la figure 1.<sup>10</sup>

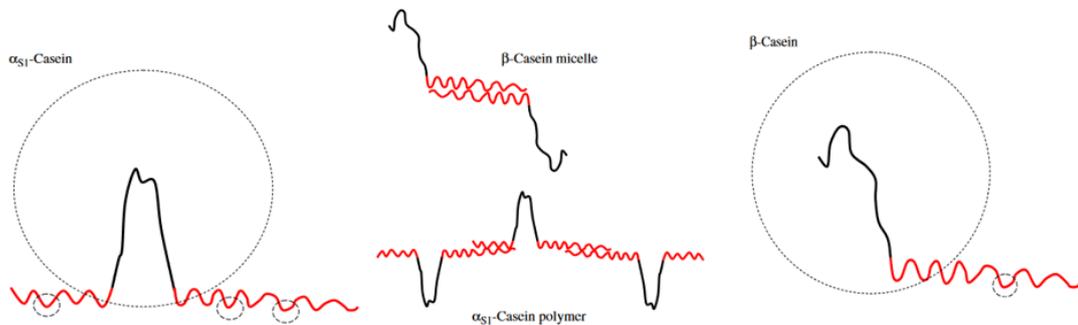


Figure 1: Représentation des assemblages de Caséines  $\alpha S1$  et  $\beta$ .

Cette représentation présente des structures polymériques générées lorsque les zones hydrophobes des caséines interagissent :

- Celle du haut, représente un assemblage de caséine  $\beta$ , dans laquelle seulement deux molécules interagissent entre elles.
- Celle du bas, représente un assemblage en forme de ver de caséine  $\alpha S1$ .

Les caséines  $\alpha S1$ ,  $\alpha S2$  et  $\beta$  sont sensibles au calcium avec lequel elles sont en interaction par leurs résidus phosphosérine. Il permet des associations entre assemblages de caséines  $\beta$  et de caséines  $\alpha S$  ou des assemblages mixtes formés par des caséines  $\beta$  et  $\alpha S$ . La caséine  $\kappa$  est insensible au calcium en raison de son faible degré de phosphorylation et elle assure la dispersion des autres caséines dans le lait.<sup>13,14</sup> Ainsi, la stabilité colloïdale du lait écrémé est due à la présence de caséine  $\kappa$  à la surface des micelles de caséine.<sup>15</sup>

Les zones de répulsions électrostatiques à l'intérieur et à l'extérieur de la micelle de caséines conduisent à une structure très ouverte, très hydratée, avec des valeurs d'hydratation typiques de 2–3 g H<sub>2</sub>O / g de protéine, selon la méthode de mesure.<sup>10</sup> La réduction des charges de la micelle de caséines en titrant suffisamment de groupes phosphoséryle et carboxyles lors d'un abaissement le pH pour atteindre le point isoélectrique des caséines (pH 4.6), conduit à solubilisation des éléments minéraux (calcium et phosphate inorganique), une libération d'eau et à leur précipitation.<sup>10</sup>

## 2. Nanoclusters de phosphate de calcium

La micelle de caséines permet au lait d'être sursaturé en phosphate de calcium. Essentiellement, elle met en suspension et transporte en toute sécurité à travers la glande mammaire le phosphate

## MHARZI ALAOUI - Mieux comprendre la structure interne de la micelle de caséines et sa dynamique par RMN du Solide.

et le calcium minéral, qui sont essentiels pour le développement des os et des dents du nourrisson allaitant.

Les micelles de caséines contiennent du phosphore sous 2 formes chimiques :

- Des dépôts de phosphate de calcium sous forme de petites entités cristallines ou amorphes.
- La sérine phosphorylée (phosphosérine) des caséines.<sup>16-18</sup>

Les dépôts de phosphate de calcium sont également décrits comme des nanoclusters de phosphate de calcium colloïdal (CCP).<sup>18,19</sup> La forme cristalline la plus appropriée du phosphate de calcium colloïdal (CCP) serait  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .<sup>20</sup>

Les nanoclusters de phosphate de calcium forment des points denses de 2-3 nm de diamètre au sein de la structure de la micelle de caséines, observée en microscopie électronique et responsable d'un pic de diffusion par mesure de diffusion des rayons X.<sup>14</sup>

Du point de vue minéral, les nanoclusters ressemblerait à une cristallisation « avortée » du phosphate de calcium. Sans la présence des caséines hautement phosphorylées, une précipitation massive de phosphate de calcium se produirait. Au cours d'une série d'études sur les interactions des caséines et du phosphate de calcium, Holt et ses collègues,<sup>21,22</sup> ont découvert que la fraction phosphopeptidique de la caséine  $\beta$  pouvait se lier et stabiliser le phosphate de calcium dans des solutions sursaturées conduisant à la formation de nanoclusters.<sup>14</sup> Il existe une controverse considérable sur la structure (cristalline ou amorphe) possible des nanoclusters et leur mode de formation.<sup>10</sup> Certains auteurs indiquent que les caséines, par leurs phosphosérines, limitent la croissance des nanoclusters et leur évolution en une structure cristalline stable alors que d'autres indiquent que les phosphosérines agissent comme points de nucléation à la formation des nanoclusters de phosphate de calcium.<sup>10</sup>

Malgré le rôle clé des éléments minéraux dans l'organisation et la dynamique des micelles de caséines, les interactions entre caséines et éléments minéraux ne sont toujours pas complètement élucidées.

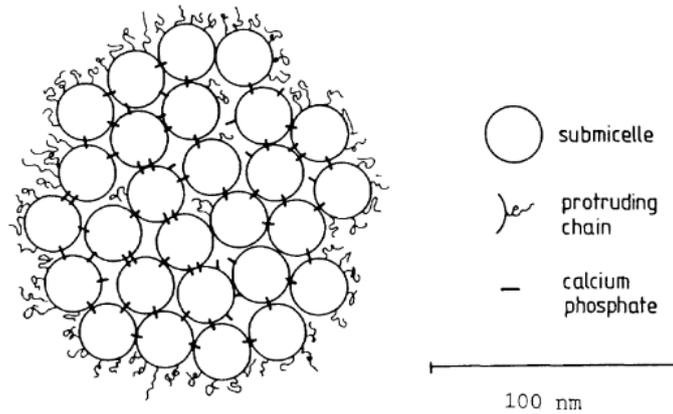
### 3. Modèles de structure micellaire de caséine

Au fil des années, les chercheurs ont décrit les micelles de caséines par différents modèles. En se basant sur les propriétés chimiques, biochimiques et physiques des micelles de caséines et des caséines individuelles, trois modèles principaux ont été décrits :

#### a) *Le modèle sous-micellaire de Schmidt*<sup>23,24</sup>

Dans le modèle sous-micellaire où sub-micellaire, les micelles de caséine sont composées de sous-unités protéiques plus petites, appelées les sous-micelles ou sub-micelles, reliées entre elles par des ponts formés par les nanoclusters de phosphate de calcium.<sup>10</sup> Le modèle suppose que les micelles sont constituées de sous-unités sphériques d'un diamètre variant de 10 nm<sup>25</sup> à 30 nm.<sup>26</sup> Les sub-micelles seraient composées de caséines  $\alpha\text{S1}$ ,  $\beta$  et  $\kappa$  stabilisées par des liaisons hydrophobes et des ponts calcique entre caséines (calcium ionique interagissant avec des phosphosérines de caséines).<sup>27</sup> Ces particules s'agrègeraient en une structure micellaire grâce à un "ciment", le phosphate de calcium colloïdal (CCP).<sup>3,26</sup>

**MHARZI ALAOUI - Mieux comprendre la structure interne de la micelle de caséines et sa dynamique par RMN du Solide.**

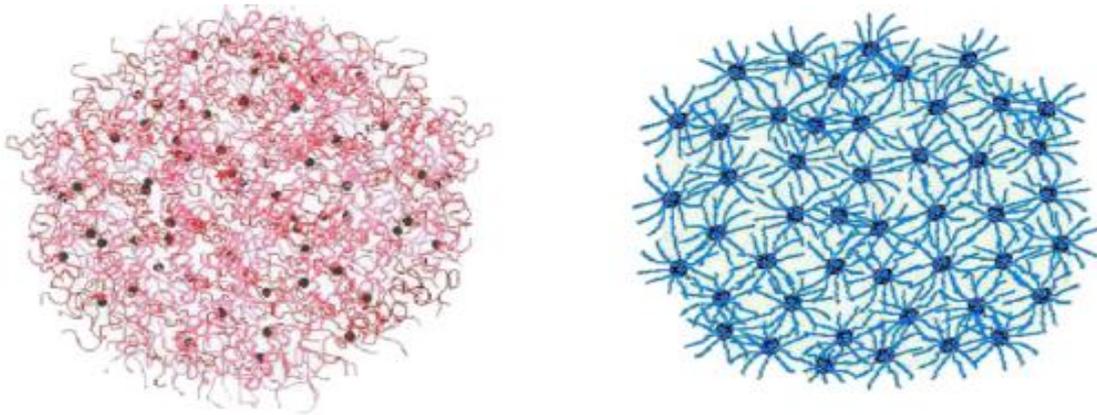


*Figure 2:Modèle sub-micellaire de Schmidt.*

*b) Le modèle de nanocluster de Holt*

Dans ce modèle, Holt <sup>21</sup> a considéré que la micelle est comme un gel protéique minéralisé et réticulé, les nanoclusters de phosphate de calcium colloïdal sont les agents responsables de la réticulation des protéines et de la cohésion du réseau.<sup>19,28</sup>

Il a proposé la représentation suivante :



*Figure 3:Modèle d'association des caséines en une structure micellaire selon Holt.*

La formation de nanoclusters avec un rayon de 2-3 nm constituerait un point d'ancrage pour plusieurs caséines par l'intermédiaire de leurs phosphosérines. Les zones hydrophobes des caséines projetées à la périphérie des nanoclusters interagiraient avec d'autres caséines par interactions hydrophobes qui à leur tour, pourraient lier d'autres nanoclusters de phosphate de calcium jusqu'à ce qu'un colloïde de taille limitée se forme. Il y a environ 800 nanoclusters de phosphate de calcium amorphe dans une micelle de caséine de taille moyenne (diamètre ~100 nm).<sup>14</sup>

c) *Le modèle de double liaison de Horne*<sup>12</sup>

Le modèle suivant, a été proposé par Horne.<sup>19</sup> En examinant la chimie de surface des caséines individuelles, il a conclu que les interactions hydrophobes (figure 4) et les ponts phosphocalciques (CCP) entre les protéines ont un rôle prépondérant pour leur association.

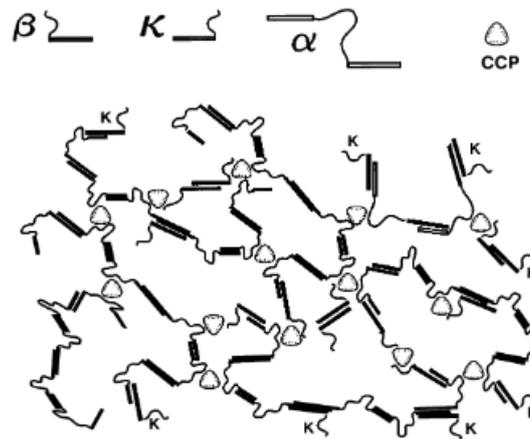


Figure 4: Modèle d'association des caséines en une structure micellaire selon Horne.

La nature amphiphile des caséines les fait agir davantage comme des copolymères de blocs de charge et d'hydrophobicité alternées, c'est-à-dire une zone de phosphopeptide chargée au niveau de la partie N-terminale et une zone hydrophobe au niveau de la partie C-terminale pour la caséine  $\beta$ , l'inverse pour les caséines  $\kappa$  et une zone chargée négativement entourée de deux zones hydrophobes pour la caséine  $\alpha$ S1.<sup>14</sup> Le mécanisme d'interaction est résumé dans Horne *et al.*<sup>29</sup>

## B. Contrôle la taille de la micelle de caséine

Kruif et Holt, suggèrent que la croissance de la micelle de caséines est due à un équilibre entre les interactions des caséines avec un ou plusieurs nanoclusters de phosphate de calcium.<sup>30</sup>

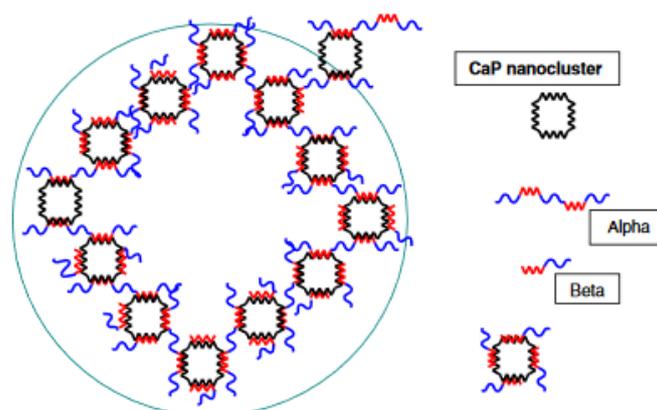


Figure 5: modèle de croissance des micelles de caséines.

Lorsque les zones phosphorylées d'une même caséine interagissent au niveau d'un seul nanocluster, le processus de croissance de l'assemblage est interrompu. Lorsqu'elles se partagent entre plusieurs nanoclusters la taille de l'assemblage augmente.<sup>19</sup>

## MHARZI ALAOUI - Mieux comprendre la structure interne de la micelle de caséines et sa dynamique par RMN du Solide.

La taille des micelles doit donc être fonction du nombre ou de la proportion des caséines capable d'interagir avec plusieurs nanoclusters. Le phénomène d'interaction étant un événement aléatoire, la taille des micelles de caséines doit donc également être aléatoire expliquant la large dispersion de taille des micelles de caséines.<sup>28</sup>

### C. Propriétés des micelles de caséine

#### 1. Effet d'une baisse de pH

La diminution du pH du lait solubilise le phosphate de calcium colloïdal (CCP).<sup>10,32</sup> La diminution des charges des caséines consécutive à la protonations des fonctions titrables lors de l'acidification conduit à un renforcement des interactions entre caséines et à une baisse de leur hydratation (Figure 6). Si le pH est maintenu au pH du lait natif alors que la micelle de caséines est déminéralisée (élimination du CCP), l'équilibre attraction hydrophobe / répulsion électrostatique entre caséines est en faveur de la répulsion, et la micelle se dissocie. En effet, les charges des caséines ne sont plus écrantées par le calcium ou les nanoclusters de phosphate de calcium contenus dans les micelles de caséines.<sup>10</sup>

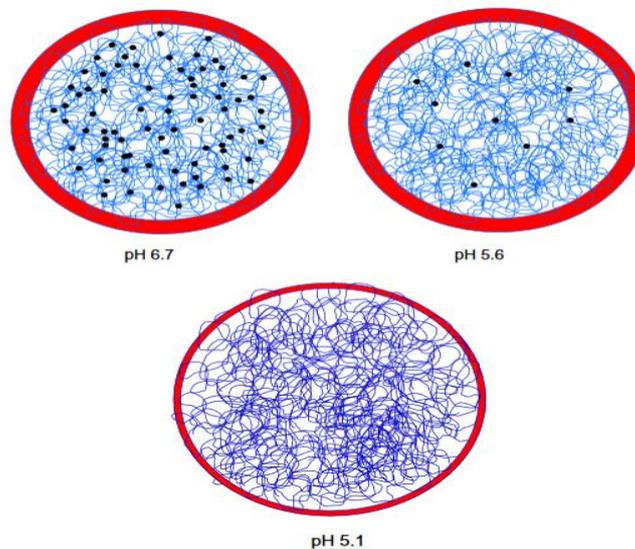


Figure 6: Effet d'une acidification sur la structure (minéralisation, hydratation) de la micelle de caséines.

Fox,<sup>33</sup> a conclu que l'augmentation du pH du lait à plus de 6,7 et jusqu'à 9,0 ne dissout pas le phosphate de calcium colloïdal mais au contraire augmente sa teneur dans les micelles de caséines. Par ailleurs, la turbidité du lait baisse progressivement jusqu'à devenir translucide en raison de l'augmentation des charges nettes des caséines qui provoque la dissociation progressive des micelles de caséines.<sup>10</sup>

#### 2. Effet du traitement thermique

Au pH physiologique (pH = 6,7), la micelle de caséines est très stable au traitement thermique : plusieurs heures à 90°C. Par contre sa stabilité est fortement réduite lorsque le pH diminue et se rapproche du point isoélectrique des caséines. À pH < 5,0. La micelle de caséines s'agrège en quelques minutes à 50°C.

### 3. Effet de la réticulation des micelles de caséines

La réticulation des protéines médiée par la transglutaminase (TGase) (Figure 7) est une transamidation entre les résidus Gln et Lys des protéines conduisant à la formation de liaisons isopeptidiques  $\gamma$ -glutamyl- $\epsilon$ -lysyl (rouge).<sup>34</sup>

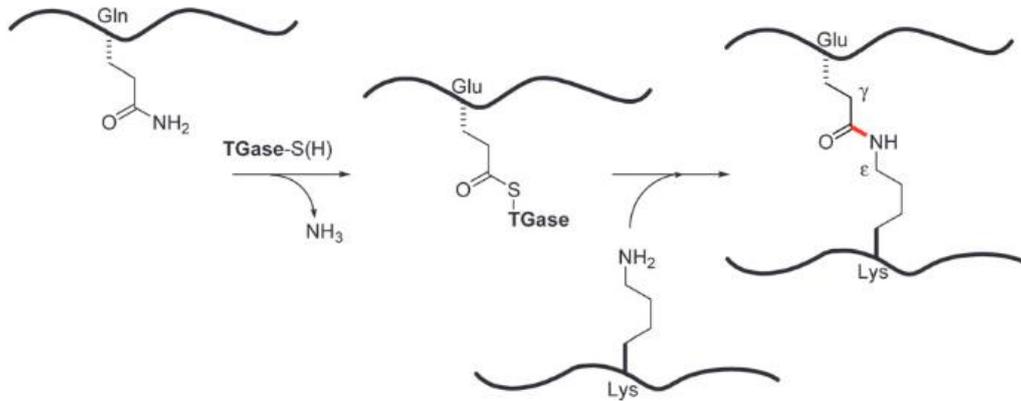


Figure 7: mécanisme de réticulation des protéines par la Transglutaminase.

Cette réticulation permet de maintenir la structure de la micelle de caséines quels que soient son niveau de minéralisation et le pH de la solution.

### D. Etude des micelles de caséines par RMN de solide

Selon Hindmarsh *et al.*,<sup>18</sup> les micelles de caséines contiennent du phosphore sous deux formes chimiques, organiques et inorganiques. La première (organique) correspond à de la sérine phosphorylée (phosphosérine) dans les caséines. La seconde (inorganique) correspond à des dépôts de phosphate de calcium qui sont également décrits comme des nanoclusters de phosphate de calcium colloïdal (CCP). Un point de vue actuellement accepté est que les micelles de caséine sont assemblées par liaison inter-protéines par des interactions hydrophobes et des ponts phosphocalciques faisant intervenir du calcium ionique en interaction avec les phosphosérines et du CCP.<sup>18</sup> Un pont phosphocalcique est illustré sur la figure 8 :

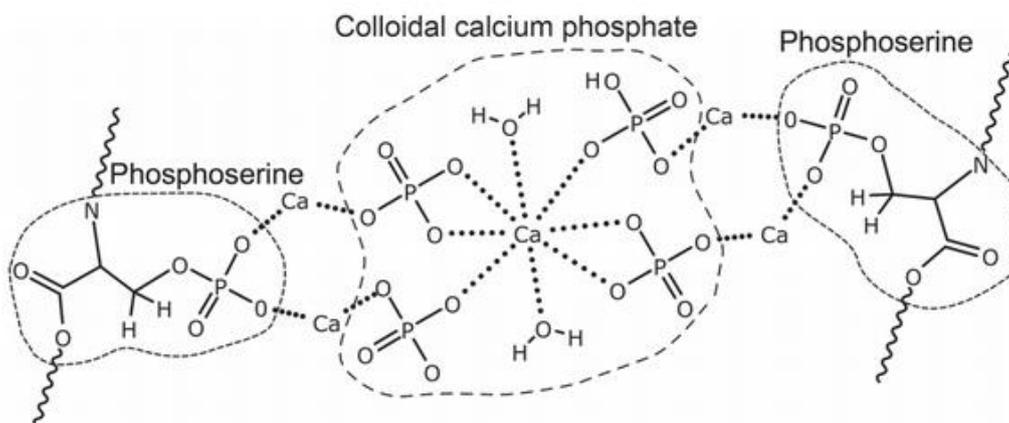


Figure 8: Représentation d'un pont phosphocalcique montrant le pontage que le calcium crée entre le phosphate de calcium colloïdal et les phosphosérine.

## MHARZI ALAOUI - Mieux comprendre la structure interne de la micelle de caséines et sa dynamique par RMN du Solide.

Le CCP est un sel inorganique amorphe et mobile.<sup>19</sup> Les résultats ont montré que la résonance magnétique nucléaire (RMN) à l'état solide du phosphore ( $^{31}\text{P}$ ) pouvait différencier les phases mobiles et immobiles des espèces de phosphore dans la micelle de caséine. Hindmarsh *et al.*<sup>18</sup> ont utilisés la polarisation croisée pour le montrer.

La polarisation croisée implique un transfert de polarisation d'un noyau abondant ( $^1\text{H}$ ) vers un noyau dilué ( $^{31}\text{P}$ ). L'expérience de polarisation croisée agit comme un filtre pour détecter uniquement la composante immobile (espèces rigides) dans un échantillon hétérogène. Cette expérience repose l'interaction dipolaire entre le proton et l'autre noyau.<sup>18</sup>

La RMN à l'état solide du  $^{31}\text{P}$  peut également fournir des informations sur l'organisation et le pourcentage des phosphates libres, organiques et inorganiques contenus dans les micelles de caséine.<sup>17</sup>

Les résultats expérimentaux de De Sa Peixoto *et al.*<sup>35</sup> indiquent clairement que l'augmentation de la concentration des micelles de caséines favorise les interactions dipolaires, autrement dit, cette augmentation de concentration est favorable à la polarisation croisée. La figure 9 présente les résultats obtenus par De Sa Peixoto *et al.*<sup>35</sup> L'expérience quantitative de gel de caséine à  $300 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  dans  $\text{H}_2\text{O}$  (A : spectre à gauche) montre la présence de plusieurs types de phosphore, qui peuvent être quantifier par reconstruction du spectre (A : reconstruction à droite). Sur le spectre D et F, on observe les résultats en polarisation croisée du gel de micelle à 300 et 400  $\text{g/L}$  dans  $\text{H}_2\text{O}$ . Ces spectres montrent les parties rigides de la micelle de caséine, qui sont attribuées aux phosphates organiques.

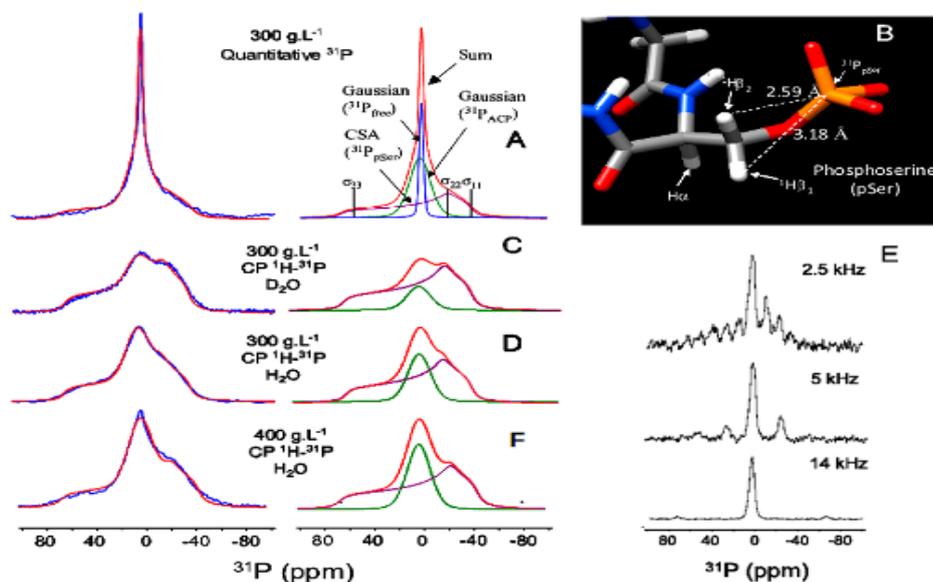


Figure 9: figure regroupe quelques expériences RMN, la polarisation croisée en statique.

Le volet RMN de ce stage s'appuie fortement sur cette publication,<sup>35</sup> dans les comparaisons et explications de nos résultats expérimentaux.

## VI. Résultats et discussion

## A. Optimisation de la préparation des échantillons

L'objectif principal de ce travail est de mieux comprendre la structure de la micelle de caséine par RMN de solide. Avant de détailler les différentes manipulations et résultats de RMN, il a fallu mettre au point la préparation des échantillons pour répondre à la stratégie visée, en particulier préparer une dispersion homogène de micelles de caséines réticulée par la transglutaminase avec différents niveaux de minéralisation.

### 1. Préparation de la solution de PPCN

Le PPCN est un concentré par microfiltration à 0.1  $\mu\text{m}$  de micelles de caséines à partir d'un lait écrémé qui a ensuite été concentré par évaporation et séché. La poudre obtenue est difficile à remettre en solution et ce d'autant plus que le temps de stockage de la poudre augmente sans que l'on sache actuellement quelle en est la raison. Plusieurs concentrations pour la re-solubilisation du PPCN ont été testés, 20, 40 et 60 g/L ainsi que plusieurs températures. La solubilisation du PPCN sous agitation lente a été suivie au cours du temps et considérée comme « totale » quand la taille des particules en solution était équivalente à la taille des micelles de caséines (environ 200 nm). Pour la suite du travail, une concentration de 60 g/L a été utilisée et le temps de solubilisation a été fixée à 3 heures à une température de 50 °C. Dans ces conditions, la poudre se solubilise correctement. Après l'étape de solubilisation, la solution contient des micelles de caséines avec la taille attendue mais aussi des éléments insolubles (sans doute des agrégats de micelles de caséines) qui décantent au cours du stockage de la solution.

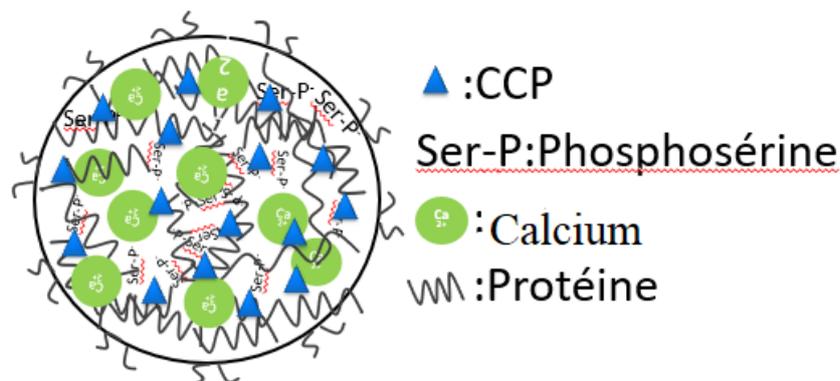


Figure 10: Représentation de la micelle de caséines.

Une centrifugation de la solution a permis de séparer la fraction soluble et non soluble. Après centrifugation le surnageant est récupéré.

### 2. Réticulation des micelles de caséines

Les micelles de caséines ont été traitées à la transglutaminase (TG) comme agent réticulant. Cette dernière a pour rôle la création de liaisons covalentes entre les caséines dans la micelle, comme montré sur la figure 11.

**MHARZI ALAOUI - Mieux comprendre la structure interne de la micelle de caséines et sa dynamique par RMN du Solide.**

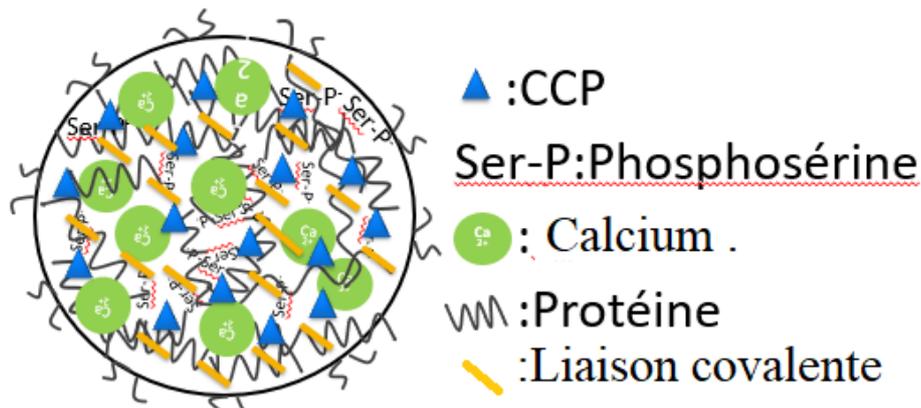


Figure 11: Représentation de la micelle de caséines réticulée par la transglutaminase.

L'objectif est ici d'avoir un niveau de réticulation suffisant pour que les micelles de caséines ne se dissocient pas lors de l'étape de déminéralisation. L'augmentation de la concentration en TG sera favorable pour cette réticulation. Par ailleurs, il existe un risque d'établissement de liaisons covalentes entre micelles de caséines qu'il faut éviter par une optimisation de la concentration en enzyme, du temps et de la température de réaction. Les réactions intermicellaires sont aussi favorisées lorsque la concentration en caséines augmente. Pour se faire plusieurs rapports massiques TG/caséines ont été testés. Les conditions idéales étaient d'ajouter de la TG à 0,5 g/L dans une solution de PPCN à 60 g/L.

Les résultats expérimentaux montrent une bonne réaction enzymatique en travaillant sous agitation magnétique au sein d'une étuve à 43 °C pendant une nuit complète au lieu d'utiliser le bain marie en condition statique.

Une fois la réaction de réticulation effectuée, l'enzyme est inactivée par traitement thermique au bain de marie à 75 °C pendant 10 min.

Nous avons observé une gélification systématique des solutions de micelles de caséines réticulées pendant le traitement d'inactivation de l'enzyme alors qu'une solution de micelles de caséines témoin (sans TG) restait liquide. La gélification était dû à la baisse du pH occasionnée par la réaction de réticulation. En effet l'analyse du pH de la solution de micelles de caséines avant (pH 7) et après réaction de réticulation (pH entre 5 et 6), indique une acidification. Cette acidification (libération de protons dans le milieu) s'explique par la différence de pK entre la fonction amine de la chaîne latérale de la lysine (pK=10.7), substrat de la réaction, et le l'ammoniac (pK=9.2), produit de la réaction.

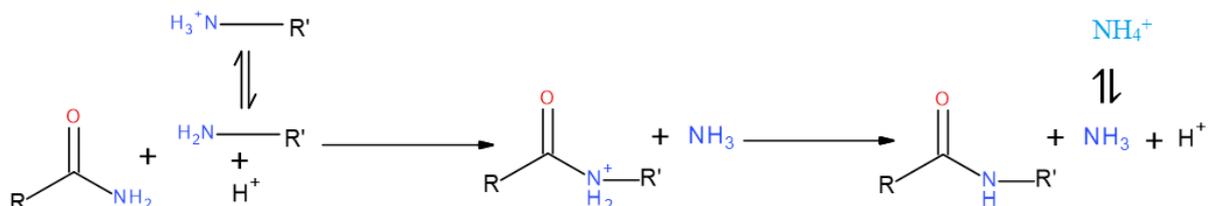


Figure 12: Explication de la libération de protons et de l'abaissement du pH lors de la réaction de réticulation.

## MHARZI ALAOUI - Mieux comprendre la structure interne de la micelle de caséines et sa dynamique par RMN du Solide.

Ainsi en remontant le pH de la solution de micelles de caséines réticulées à sa valeur initial (pH = 7) avant l'inactivation de la TG à 75 °C pendant 10 min, aucune gélification ne se produit.

### 3. Déminéralisation des micelles de caséines

L'intérêt de cette étape est de solubiliser et d'éliminer le phosphate de calcium colloïdal (CCP) des micelles de caséines afin de pouvoir identifier le signal en RMN du  $^{31}\text{P}$  d'une micelle de caséine ne contenant plus que le phosphore organique des phosphosérines des caséines.

Après l'inactivation de la TG, la solution de micelles de caséines est placée à 4°C et conservée à cette température pendant l'acidification pour éviter la précipitation des protéines lorsque le pH sera proche de 4.6. Ici l'objectif est d'atteindre un pH d'environ 3-4, car dans cette gamme de valeurs de pH tous les éléments minéraux sont à l'état soluble. Pour des micelle de caséines à la concentration rencontrée dans le lait (25 g/L), l'acidification jusqu'à pH= 5,2 permet la solubilisation d'une grande partie du phosphate de calcium colloïdal.<sup>27</sup> A pH < 5,2 du calcium lié aux phosphosérines se solubilise et à pH < 4.0, il n'y a plus de calcium associé aux caséines. La solubilisation du phosphate de calcium colloïdal en fonction du pH est peu dépendante de la température.<sup>3,32</sup>

Après avoir tester plusieurs acides (acide chlorhydrique, acide sulfurique et l'acide citrique) et différentes concentrations en acide (0.5, 1, 2, et 5 M), nous avons fait le choix de travailler avec un mélange d'acide citrique 10% et d'acide chlorhydrique 5M dans une proportion de 10 : 1. L'anion citrate est un complexant du calcium et favorise la solubilisation du calcium micellaire. Par ailleurs il permet d'amortir la chute de pH.

Une fois la valeur de pH cible atteinte, la solution de micelles de caséines réticulées acidifiées est dialysée pour éliminer les éléments ioniques solubilisés.

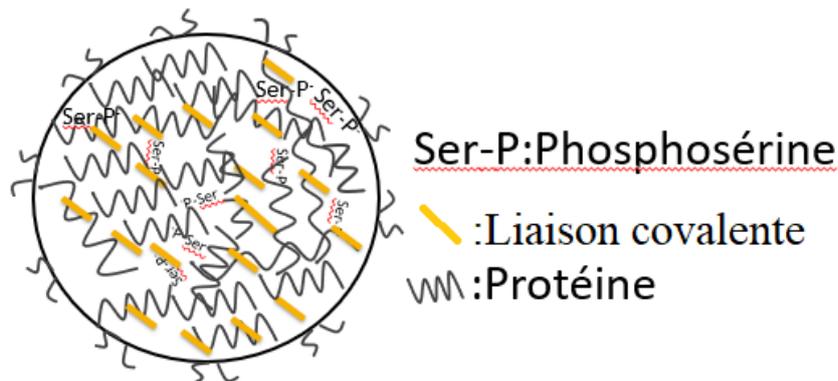


Figure 13: Représentation de la micelle de caséines réticulée déminéralisée.

A la fin de la dialyse, on récupère le contenu du boudin qui est ensuite alcalinisé à l'aide de la soude à 1M jusqu'à obtenir un pH =7 (figure 13). Ainsi les micelles de caséines réticulées, déminéralisée ou non seront analysées au même pH. La solution reste turbide (couleur blanche) après réticulation, preuve que la réticulation s'est bien passée. En absence de traitement à la TG, la solution serait devenue limpide en raison des répulsions importantes entre les caséines qui se seraient dissociées de la micelle.

Pour valider les attributions de signaux par RMN du solide  $^{31}\text{P}$  calcium, du magnésium, ou du phosphate ont été ajoutés à une solution de micelle de caséines. Comme ces différents éléments

## MHARZI ALAOUI - Mieux comprendre la structure interne de la micelle de caséines et sa dynamique par RMN du Solide.

interagissent avec la micelle de caséines, ils sont susceptibles de faire varier l'allure du spectre RMN. Pour ce faire, on a ajouté à la solution de phospho-caséinate native (PPCN) de départ du chlorure de calcium  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , chlorure de magnésium  $\text{MgCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  et phosphate de sodium monobasique  $\text{H}_2\text{PO}_4\text{Na}$ .

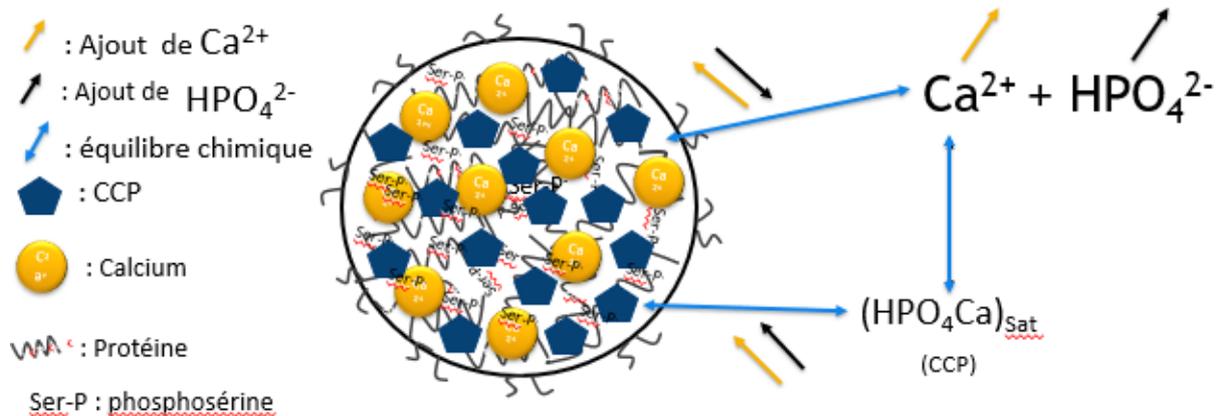


Figure 14: Influence des ajouts minéraux sur les équilibres minéraux de la micelle de caséines.

## B. Caractérisation des échantillons

### 1. Mesure de taille par diffusion dynamique de lumière

Les différents échantillons préparés ci-dessus ont été analysés par diffusion dynamique de la lumière qui permet par une mesure de mobilité des particules en solution de remonter à une dimension hydrodynamique en utilisant la loi de Stokes-Einstein.

On a mesuré 4 échantillons différents et les résultats expérimentaux sont données dans le tableau suivant :

Tableau 2: Mesure de taille par diffusion dynamique de lumière des différents échantillons

Echantillon	Taille (nm)
PPCN 60 g/L	181
PPCN 60 g/L réticulées	248
PPCN 60 g/L réticulées et déminéralisées	263
PPCN 60 g/L réticulées et déminéralisées + $\text{Ca}^{2+}$	260

Pour cette dernière solution, nous avons pris 10 ml d'une solution de PPCN 60 g/L déminéralisée et nous avons ajouté l'équivalent de 30 mg de chlorure de calcium di hydraté  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . La taille légèrement supérieure des micelles de caséines réticulées pourrait s'expliquer par la formation de liaisons covalentes intermicellaires par la TG.

Après ajout d'éléments minéraux à une solution de micelles de caséines, l'analyse de diffusion dynamique de lumière (DLS) montre que :

- ✓ PPCN 60 g/L à une taille moyenne de 181 nm.
- ✓ PPCN 60 g/L +  $\text{CaCl}_2$  à une taille moyenne de 270 nm.
- ✓ PPCN 60 g/L +  $\text{MgCl}_2$  à une taille moyenne de 216 nm.
- ✓ PPCN 60 g/L +  $\text{H}_2\text{PO}_4\text{Na}$  à une taille moyenne de 193 nm.

## 2. Dosage du Calcium

Les teneurs en calcium des différents échantillons obtenus par dosage ICP montrent que :

- ✓ La concentration du calcium du PPCN 60 g/L égale à 1,33 g/L.
- ✓ La concentration du calcium du PPCN 60 g/L réticulés et déminéralisé égale à 0,02 g/L.
- ✓ La concentration du calcium du PPCN 60 g/L réticulés et déminéralisé +  $\text{Ca}^{2+}$  égale à 0,57 g/L.

Ces résultats montrent que l'acidification et la dialyse ont bien fonctionné lorsque nous avons déminéralisé la solution de micelles de caséines (concentration de calcium de 0,02 g/L), ensuite la concentration augmente à 0,57 g/L après l'ajout du calcium, ce qui est conforme à ce qui est attendu.

## C. Analyse des structures micellaire par RMN

Tous les spectres présentés ont été obtenus à l'aide du logiciel **TopSpin**, version **3.6.2** de chez Bruker puis reconstruit avec le logiciel dmfit. Ce dernier permet la quantification relative et le traitement du signal de chaque espèce  $^{31}\text{P}$ .

Dans un premier temps, des tests d'analyses RMN sur le spectromètre 300MHz ont été réalisés sur 3 solutions de phospho-caséinate Native PPCN ayant des concentrations de 20, 40 et 60 g/L. Les résultats obtenus sur les solutions à 20 et 40 g/L n'ont pas été retenue car, à faible concentration, il est apparu difficile d'obtenir un spectre dans un temps d'expérience raisonnable. En effet, les expériences en polarisation croisée sont très peu sensibles et nécessitent donc des échantillons concentrés d'au moins 60 g/L.

Dans un deuxième temps, des tests en rotation à l'angle magique (MAS) sur le spectromètre de 300 MHz ont été effectués. La rotation à l'angle magique consiste en une rotation à grande vitesse autour d'un angle bien spécifique, appelé l'angle magique  $\theta = 54,7^\circ$ . Cette technique usuelle en RMN du solide permet de s'affranchir du caractère anisotrope des solides. Cependant, l'objectif de ce stage étant de chercher les caractéristiques des parties mobiles et rigides des solutions, il est donc essentiel de conserver les caractères anisotropes de nos échantillons.

Dans un dernier temps, nous avons donc axé notre travail sur les techniques permettant d'exprimer l'anisotropie. Tous les résultats expérimentaux qui seront présentés ont été enregistrés sur un spectromètre 600 MHz avec une sonde statique permettant de travailler avec un grand volume échantillon et donc d'acquérir les spectres dans un temps raisonnable (environ 24h/spectre). Pour chaque échantillon, 3 spectres ont été enregistrés. Le premier obtenu grâce à une simple impulsion (ZG) permet l'acquisition d'un spectre quantitatif représentatif des différents environnement phosphore contenue dans la solution. Le deuxième consistant en un découplage proton pendant l'acquisition (HPDEC) a pour but de différencier les environnements phosphore en fonction de leur proximité avec des atomes d'hydrogène. Le troisième spectre est acquis avec une technique de polarisation croisées (CP). Ce dernier permet d'éditer spectralement les parties rigides contenues dans les solutions.

## D. Résultats RMN des différentes solutions préparées

La figure 15 présente les 3 spectres (ZG, HPDEC et CP) obtenus sur une solution de phospho-caséinate native (PPCN) à 60 g/L (PPCN60). Les spectres ZG (en bleu sur la figure 15) et

**MHARZI ALAOUI - Mieux comprendre la structure interne de la micelle de caséines et sa dynamique par RMN du Solide.**

HPDEC (en vert sur la figure 15) montrent la présence de deux signaux fins ainsi qu'un pic large masqué en pied de pic avec un déplacement chimique d'une valeur moyenne de 0 ppm. Nous n'observons pas de différence notable entre le spectre ZG et HPDEC traduisant des couplages faibles entre le phosphore et le proton (les spectres HPDEC ne seront plus montrés dans la suite du rapport). Le spectre CP montre clairement un signal large ayant une forme caractéristique d'un signal statique possédant une anisotropie de déplacement chimique (CSA).

La figure 16 montre une reconstruction de ce signal ainsi que les valeurs du tenseur d'anisotropie de déplacement chimique ainsi mesurées. Ce tenseur présentant une anisotropie de l'ordre de 7 kHz est caractéristique des espèces rigides contenues dans la solution. Ce signal pourrait être attribué aux phosphates organiques des phosphosérines ( $R-CH_2-O-PO_3^{2-}$ ) contenu dans la structure primaire des caséines en interaction avec du calcium mais aussi à du CCP (phosphate de calcium colloïdal) sous forme amorphe.<sup>16,17,35</sup> L'attribution des deux autres signaux est plus délicate car les résultats de la bibliographie sont divergents. De Sa Peixoto *et al.*<sup>35</sup> n'observe qu'un signal fin centré sur 0 ppm qu'il attribue aux orthophosphates libres (pic fin) alors que Bak *et al.*,<sup>17</sup> et Thomsen *et al.*,<sup>16</sup> les attribuent aux phosphosérines de la caséine  $\kappa$  qui se projettent dans la phase aqueuse et sont considérées comme mobiles. Ces derniers observent un second signal fin centré sur 3 ppm qu'ils attribuent au CCP cristallisé et qui pourrait correspondre au pic fin résonant à 2,7 ppm dans notre analyse.

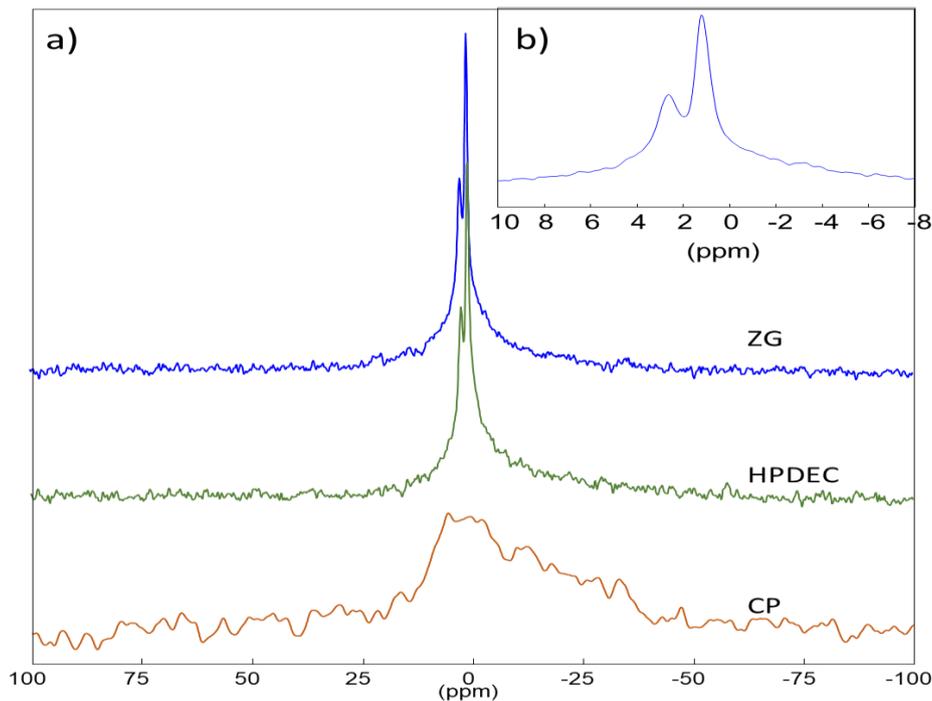


Figure 15: a) Spectres RMN d'une solution de phospho-caseinate native à 60 g/L dans H<sub>2</sub>O (PPCN60), b) Zoom du spectre ZG du PPCN 60 g/L.

**MHARZI ALAOUI - Mieux comprendre la structure interne de la micelle de caséines et sa dynamique par RMN du Solide.**

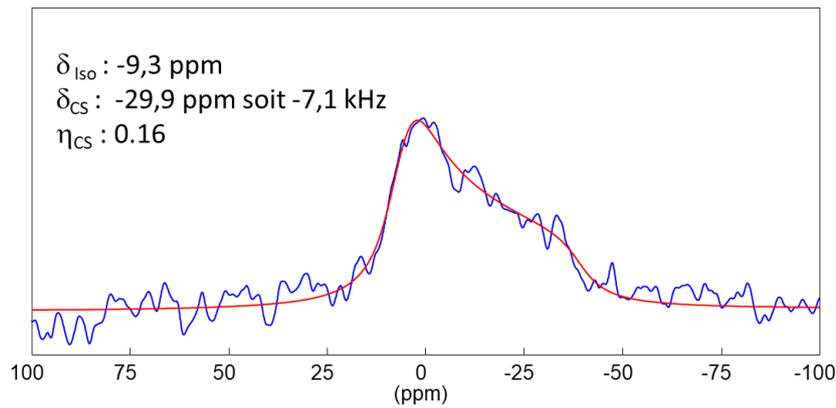


Figure 16: Reconstruction du spectre CP de l'échantillon PPCN 60 g/L avec les valeurs du tenseur d'anisotropie ainsi mesurées.

Nous avons dans un second temps vérifié l'effet de la réticulation des micelles de caséines par la TG (PPCN 60g/L +TG) sur le spectre RMN 31P. Les spectres ont été acquis dans les mêmes conditions expérimentales. La figure 17 montre les spectres ZG et CP pour le PPCN 60g/L native et le PPCN 60g/L +TG. On constate aucune différence entre les deux échantillons confirmant ainsi que le traitement à la TG n'a aucune influence sur la structure des micelles de caséines. Cependant on note que le transfert de polarisation (CP) est beaucoup moins efficace dans le cas de l'échantillon réticulé que pour l'échantillon native.

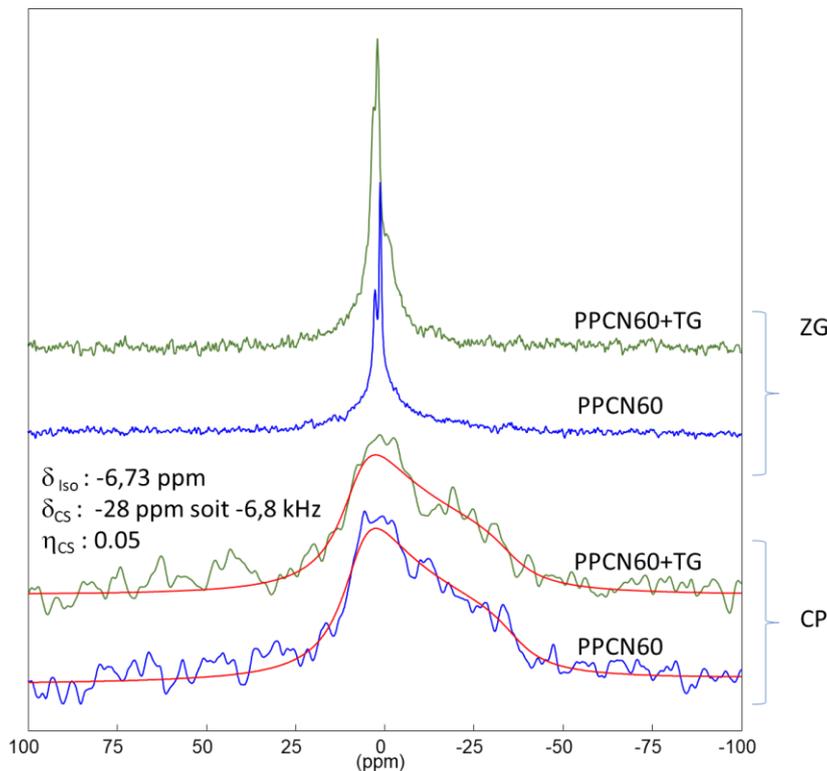


Figure 17: Spectres ZG et CP de l'échantillon PPCN 60 g/L +TG comparés avec les spectres obtenus sur le PPCN 60 g/L native.

Un traitement de déminéralisation a été ensuite appliqué à l'échantillon (PPCN 60 g/L+TG+dem). Il a pour but de supprimer les phosphates inorganiques tout en conservant les

**MHARZI ALAOUI - Mieux comprendre la structure interne de la micelle de caséines et sa dynamique par RMN du Solide.**

phosphates organiques des caséines. La figure 18 montre les spectres ainsi obtenus (ZG et CP) comparés aux spectres initialement obtenus sur l'échantillon PPCN 60g/L native.

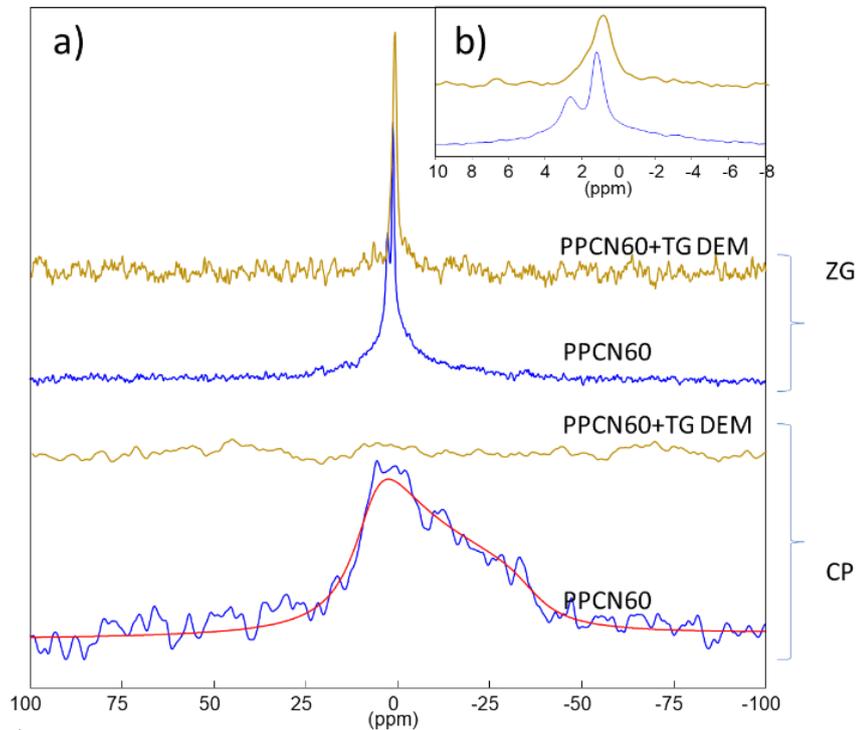


Figure 18: a) Spectres ZG et CP de l'échantillon PPCN 60 g/L + TG déminéralisé comparés aux spectres obtenus sur le PPCN 60 g/L native, b) zoom des spectres ZG.

On observe une disparition du pic fin situé à 2.7ppm et du pic anisotrope. Cela signifie que le traitement de déminéralisation a bien éliminé certaines formes de phosphate de la micelle de caséines. Le pic à 2.7 ppm pourrait être attribué aux orthophosphates en interaction avec le calcium sous forme de CCP dans la micelle de caséines. Il pourrait correspondre aux « phosphates cristallisés » (Bak *et al.*,<sup>17</sup> et Thomsen *et al.*,<sup>16</sup>) et aux « phosphates amorphes » (De sa Peixoto *et al.*,<sup>35</sup>) décrits dans la bibliographie. Dans notre cas, le CCP n'apparaît pas sous la forme d'un pic large traduisant un désordre structural, mais bien sous la forme d'un pic fin caractéristique d'une espèce mobile ou cristallisée. Cette différence peut s'expliquer au vu des concentrations des solutions étudiées. En effet, Peixoto *et al.*<sup>35</sup> ont travaillé avec des solutions très concentrées (200g/L, 300g/L et 400g/L) réduisant ainsi fortement la mobilité intrinsèque des espèces présentes. De plus, contrairement à ce qui était attendu, le spectre obtenu en polarisation croisée ne présente aucun pic caractéristique des phosphates organiques des phosphosérines contenus dans la structure primaire des caséines démontrant qu'en absence de phosphate inorganique et de calcium celles-ci sont mobiles. Une autre hypothèse serait que le transfert de polarisation était moins efficace que dans le cas du PPCN 60 g/L native comme nous l'avons vu précédemment que dans le cas de l'échantillons PPCN 60g/L +TG. Plusieurs hypothèses peuvent être évoquées pour expliquer cette perte d'efficacité :

- ✓ Soit l'augmentation du volume hydrodynamique entraînant une augmentation de la mobilité des protons et des phosphores dans les micelles de caséines par incorporation de molécules d'eau ; c'est une possibilité car la déminéralisation de la micelle de caséines augmente fortement les répulsions entre phosphosérines (forte densité de charge négative)

## MHARZI ALAOUI - Mieux comprendre la structure interne de la micelle de caséines et sa dynamique par RMN du Solide.

- ✓ Soit une diminution du temps de relaxation  $T_1$  caractéristique du transfert de polarisation devient défavorable (trop faible).

En effet, d'une part, des mesures par diffusion de la lumière ont montré que la taille des particules changeait lors de la réticulation et lors de la déminéralisation (cf tableau 2). Cette modification de la taille peut s'expliquer par un gonflement de la micelle de caséines en raison de l'augmentation de son hydratation et des répulsions fortes entre groupements chargés négativement car ceux-ci ne sont plus écrantés par du calcium, ou une réticulation intermoléculaire qui implique une modification de la taille et donc du volume de la micelle. Le transfert de polarisation étant fondé sur le couplage dipolaire entre les deux noyaux, phosphore et proton dans l'espace (cf. interaction RMN), il est fortement dépendant de la distance entre les deux noyaux ainsi que de la force de couplage dipolaire. Donc plus un échantillon présentera une mobilité intrinsèque forte (couplage dipolaire faible) et plus les distances interatomiques seront élevées et moins les techniques de polarisation croisées seront efficaces.

D'autre part, une limite aux techniques de RMN est le temps de vie du signal suivant le plan (X, Y) ou suivant l'axe Z. Ces temps de vie sont régis par des temps de relaxation intrinsèques aux noyaux observés et à son environnement. Dans le cas de la polarisation croisée, le temps de relaxation caractéristique est nommé  $T_1$ . Il correspond au temps de vie de l'aimantation  $^1\text{H}$  dans le repère tournant. Ce temps a pu être dégradé par la présence d'impuretés paramagnétiques de la TG par exemple.

Afin d'aller plus loin dans la compréhension du rôle du calcium dans la micelle de caséine, et dans l'attribution des pics de résonance, nous avons réintroduit du calcium (sous forme de  $\text{CaCl}_2$ ) dans la solution de phosphocaséinate Native PPCN à 60g/L réticulée (+TG) et déminéralisée.

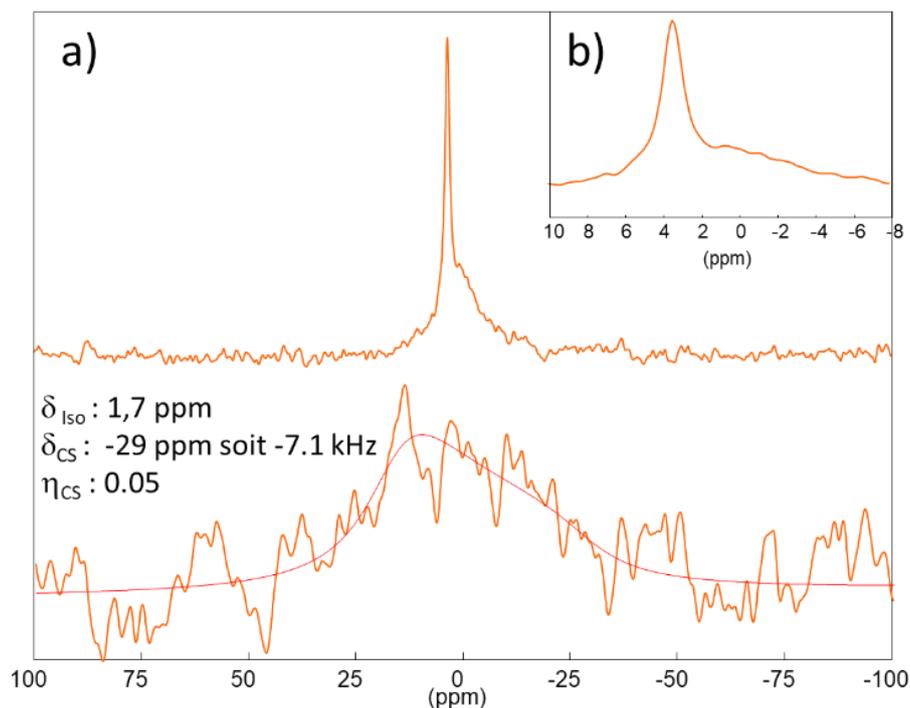


Figure 19:a) Spectres ZG et CP obtenus sur le PPCN 60 g/L+TG et déminéralisé puis additionné de  $\text{CaCl}_2$ , b) zoom du spectre ZG.

La figure 19 montre les spectres ZG et CP ainsi obtenus. Le spectre ZG présente un pic fin à environ 3,5 ppm alors que le pic à 0 ppm a disparu. L'apparition de ce pic fin absent du spectre de PPCN60 + TG déminéralisé pourrait être attribué à la résonance du phosphate de calcium colloïdal CCP ( $\text{HPO}_4\text{Ca}$ ), si la déminéralisation n'a pas été complète et qu'il restait du phosphate inorganique après la dialyse de notre échantillon. Ainsi dans l'échantillon réticulé et déminéralisé (figure 18) ce phosphate inorganique serait responsable du pic fin observé à 0 ppm. Une autre hypothèse est que les phosphosérines des caséines en absence de calcium deviennent mobiles et résistent à environ 0 ppm comme cela a été montré pour les phosphosérines de la caséine  $\kappa$ . En présence de calcium, elles résonneraient à 3.5 ppm sous la forme d'un pic fin (figure 19). Des résonances du  $^{31}\text{P}$  entre 2.8 et 3.3 ppm ont été observées lorsque du calcium est ajouté au phosphopeptide 1-25 de la caséine  $\beta$ .<sup>36</sup>

Le spectre CP montre un signal large de faible intensité. La reconstruction de ce spectre permet de déterminer une anisotropie de déplacement chimique de l'ordre du 7,1 kHz soit identique que dans le cas du PPCN60 native. De plus, alors que tout signal large était absent du spectre obtenu sur l'échantillon déminéralisé, sa présence sur le spectre de l'échantillon reminéralisé accreditte que le calcium fait un pontage avec les oxygènes liés au phosphore organique ( $\text{R-CH}_2\text{-O-P}(\text{O}_3^{2-})$ ) (figure 20). Il semblerait donc que les phosphosérines deviennent mobiles en raison des fortes répulsions électrostatiques au sein de la micelle de caséines en absence de calcium et ne soient pas visualisables lors de l'expérience de polarisation croisée.

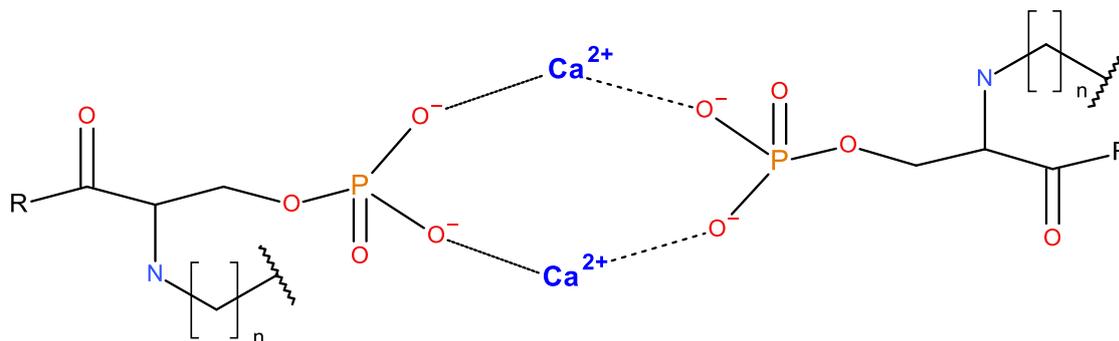


Figure 20: Représentation schématique du rôle de calcium dans les micelles de caséine

## E. Résultats RMN suite à la Minéralisation

L'intérêt de cette partie est l'étude de l'ajout de minéraux ciblés pour valider nos précédentes attributions et comprendre les équilibres micellaires. Nous avons donc ajouté à une solution de PPCN 60 native du  $\text{CaCl}_2$ , du  $\text{H}_2\text{PO}_4\text{Na}$  ainsi que du  $\text{MgCl}_2$ . L'ajout de calcium augmente, par interaction avec le phosphate inorganique de la phase soluble, la quantité de CCP dans la micelle de caséines, mais aussi la quantité de cations liés aux phosphosérines. Le magnésium a des propriétés similaires au calcium, mais sa teneur dans le lait est faible et la solubilité du phosphate de magnésium est supérieure à celle du phosphate de calcium. Ainsi l'ajout de magnésium dans une solution de PPCN augmente la part de cations liés aux phosphosérines des caséines et dans une moindre mesure la quantité de CCP. L'ajout de phosphate, par interaction

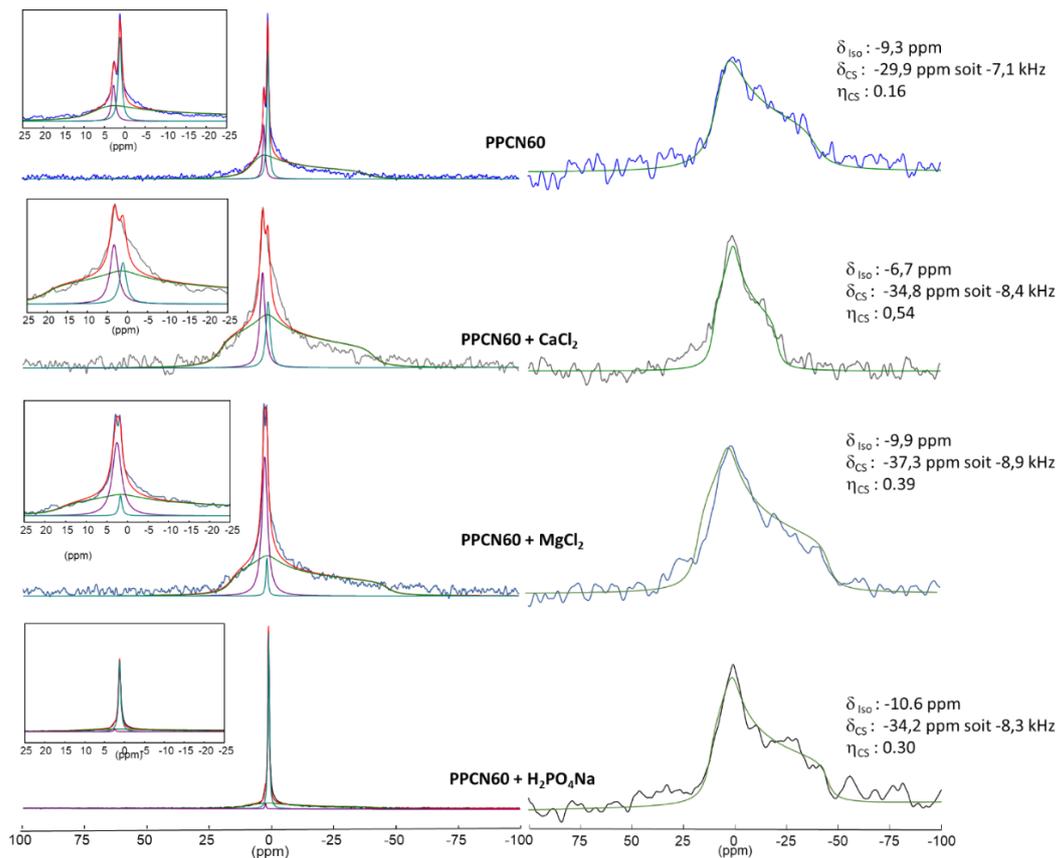
**MHARZI ALAOUI - Mieux comprendre la structure interne de la micelle de caséines et sa dynamique par RMN du Solide.**

avec le calcium, augmente la quantité de CCP et réduit la quantité de calcium lié aux phosphosérines.

La figure 21 montre les spectres ZG et CP obtenus pour chaque minéral introduit ainsi que les spectres du PPCN60 native pour comparaison. Chaque spectre est présenté avec sa reconstruction. Les paramètres utilisés ainsi que les proportions de chaque espèce présentes sont donnés dans le tableau 2.

*Tableau 3: Les paramètres utilisés ainsi que les proportions de chaque espèce présente.*

	P libre			CPP			Phosphosérine			
	$\delta_{iso}$ (ppm)	$fwhm$ (ppm)	I %	$\delta_{iso}$ (ppm)	$fwhm$ (ppm)	I %	$\delta_{iso}$ (ppm)	$\delta_{CS}$ (ppm)	$\eta_{CS}$	I %
PCCP60	1,1	1,0	19	2,7	1,1	9	-9,3	-29,3	0,16	72
PCCP60 + CaCl <sub>2</sub>	1,1	2,0	7	3,3	2,4	13	-6,7	-34,8	0,56	80
PCCP60 + MgCl <sub>2</sub>	1,7	0,9	3	2,5	2,6	30,5	-9,9	-37,0	0,39	66,5
PCCP60 ± H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Na	1,2	0,7	47	2,5	0,4	1	-10,7	-34,2	0,30	32



*Figure 21: Spectres ZG et CP des solution PPCN 60 g/L et PPCN 60 g/L + les minéraux, Calcium, magnésium et phosphore.*

Dans un premier temps, nous constatons que l'ajout de minéraux dans la solution de PPCN à 60g/L se traduit par une augmentation de l'anisotropie du déplacement chimique des espèces

## MHARZI ALAOUI - Mieux comprendre la structure interne de la micelle de caséines et sa dynamique par RMN du Solide.

minéralisées. En effet, l'anisotropie augmente de plus de 1000 Hz entre la solution native et celles minéralisées. Cela implique qu'un certain nombre de minéraux viennent à proximité voir même en pontage des phosphosérines ce qui est cohérent avec ce qui est attendu.

Dans un second temps, nous observons une modification des spectres ZG importante. En effet, les intensités relatives des pics situés entre 2,5 et 3,3 ppm et entre -1,1 et 1,7 ppm sont très affectés par la présence et la nature des minéraux introduits. Lorsque l'on ajoute du phosphate de sodium, comme attendu, la proportion de phosphate libre augmente fortement rendant difficile l'analyse des espèces phosphatés liées à la structure des micelles de caséine. Lorsque l'on ajoute du chlorure de calcium, nous observons une augmentation des teneurs en CCP et du signal des phosphosérines en interaction avec le calcium. Il faut cependant noter qu'un épaulement apparait sur le spectre vers 0 ppm. Il pourrait être la signature d'une résonance large attribuée à des phosphates de calcium amorphe.<sup>35</sup> La présence de cette espèce qui devrait être confirmée par des expériences complémentaires n'a pas été prise en compte dans la mesure d'intensité relative. Lorsque l'on ajoute du chlorure de magnésium, ce dernier réagit également avec du phosphate pour augmenter la proportion de CCP dans la micelle de caséines et le signal des phosphosérines en interaction avec des ions divalents.

---

## VII. Partie expérimentale

### A. Matériel

La poudre de phospho-caseinate native (PPCN) a été préparée au laboratoire dans les semaines qui ont précédées le stage. Elle a été préparée à partir d'un lait acheté dans une ferme locale qui a dans un premier temps été écrémé. Le lait écrémé est ensuite micro-filtré sur une membrane de taille de pore 0,1 $\mu$ m pour concentrer les micelles de caséines et laisser passer à travers les pores de la membrane, les protéines de lactosérum, le lactose et les minéraux solubles. Le concentré par microfiltration est ensuite évaporé sous vide et séché sur la tour semi-industriel Bionov.<sup>37</sup> La poudre est composée à 91% (p / p) de solides totaux (TS), 85,6% de caséines TS, 8,5% de minéraux TS et 4,6% de matière protéique.<sup>38</sup>

La transglutaminase utilisée lors de ce stage a été achetée chez AJINOMOTO, référence TRANSGLUTAMINASE ACTIVA YG AJINOMOTO. Le chlorure de calcium di hydraté  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (MM=147 g/mol) (pureté de 99 %), le chlorure de magnésium hexa-hydraté  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (MM = 203 g/mol) (pureté de 99 %), le phosphate de sodium monobasique  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (MM=119,98 g/mol) (pureté > 99 %) et l'azide de sodium  $\text{NaN}_3$  ont été acheté chez SIGMA ALDRICH.

Les boudins de dialyse (*Diamètre = 20,4 mm ; Largeur plate 31 $\pm$ 2 mm ; volume / longueur = 3,3 ml/cm ; longueur = 30m*) de seuil de coupure 6-8 kDa provenaient de chez SpectraPor.

### B. Méthodes

#### 1. Préparation des échantillons

Du PPCN a été dispersé dans de l'eau distillée pour obtenir une concentration en micelles de caséines de 20, 40 et 60 g/L. Le mélange a été placé sous agitation magnétique pendant 3 heures à température 45-50 °C. le pH de la solution a été fixé à 7.

## MHARZI ALAOUI - Mieux comprendre la structure interne de la micelle de caséines et sa dynamique par RMN du Solide.

Après solubilisation, les solutions de PPCN ont été centrifugées sur une centrifugeuse BECKMAN COULTER, AVANTI J-26S XP rotor de type JA – 25 – 50 à une vitesse de rotation :  $5000 \times g$  ; Temps de rotation : 5 min à une température de  $4^\circ\text{C}$ .

Dans 10 ml de la solution précédemment préparée, de la transglutaminase (TG) a été ajouté à des rapports massiques TG/caséines allant 1/240 à 1/12. Le mélange a été placé sous agitation magnétique dans une étuve à  $45^\circ\text{C}$  pendant une nuit complète.

Après réaction de réticulation, le pH de la solution est remonté à 7 et la TG est inactivée par traitement thermique à  $75^\circ\text{C}$ .

Après refroidissement à  $4^\circ\text{C}$ , la solution est acidifiée à un pH de 3 à 4, à l'aide de quelques gouttes d'un mélange d'acides, HCl 5 M / acide Citrique 10% dans une proportion 1/10.

Une fois la solution acidifiée l'échantillon est placé dans un boudin de dialyse. Le principe était de placer la solution à déminéraliser dans un sac de dialyse dont la taille de pores permet de retenir les protéines et de laisser diffuser les éléments de plus petites tailles (minéraux). Le boudin de dialyse est placé dans un premier bain de dialyse légèrement acidifié avec un mélange d'acide citrique à 10 % M, de l'acide chlorhydrique à 5M, dans une proportion de 10 :1 respectivement afin de maintenir phosphate inorganique et le calcium à l'état soluble ( $400 \mu\text{L}$  du mélange d'acides dans de l'eau). Les autres bains ne contenant que  $20 \mu\text{L}$  d'acide chlorhydrique à 5M.

Après dialyse le pH de la solution est remonté à 7 à l'aide de la soude 1M.

Ensuite et comme étape final pour ce traitement, on rajoute l'équivalent de 3 mg d'azide  $\text{NaN}_3$  pour empêcher le développement bactérien.

Pour des réactions complémentaires, dans 10 ml d'une solution de PPCN précédemment solubilisé 60 g/L et centrifugé, on rajoute l'équivalent de 30 mg de chlorure de calcium  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 40 mg de chlorure de magnésium et 26 mg de phosphate de sodium monobasique  $\text{H}_2\text{PO}_4\text{Na}$ . On laisse sous agitation magnétique à température ambiante pendant 2 heures.

## 2. Diffusion dynamique de lumière

La taille des particules a été déterminée par mesure de diffusion dynamique de lumière à l'aide d'un ZETASIZER NANO SERIES.

Le principe de la mesure est le suivant : en solution, les particules se déplacent de manière aléatoire à une vitesse qui dépend de leur volume hydrodynamique. La taille des particules est alors évaluée par mesure de fluctuation temporelle de l'intensité diffusée par ces particules en mouvement, lorsqu'elles sont éclairées par un faisceau laser. La vitesse de déplacement des particules est définie par le coefficient de diffusion (D). La taille des particules est calculée à partir du coefficient de diffusion translationnelle en utilisant l'équation de Stokes-Einstein :

$$d(h) = \frac{KT}{3 \pi \eta D}$$

K : constante de Boltzman

T : température absolue

$\eta$  : viscosité du solvant

D : coefficient de diffusion de translation

### 3. Inductively Coupled Plasma ‘ICP’

Le dosage du calcium a été effectué par ICP pour Inductively coupled plasma à l’aide l’iCAP 6000 Series, de chez ThermoFisher SCIENTIFIC. L’ICP’ fonctionne avec le plasma d’un gaz rare, souvent l’argon qui permet à un échantillon liquide d’être vaporisé et aux éléments minéraux présents d’être atomisé. Chaque élément émet une radiation qui lui est propre et l’intensité de la radiation est proportionnelle à la quantité d’élément dans la solution. Avant analyse, l’échantillon est dilué avec un acide fort (acide nitrique).

### C. Analyse RMN

La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) est une technique analytique, de spectroscopie, qui exploite les propriétés magnétiques de certains noyaux atomiques comme par exemple le proton ( $^1\text{H}$ ), le carbone ( $^{13}\text{C}$ ), le phosphore ( $^{31}\text{P}$ ), etc. En effet, si un noyau possède un spin nucléaire  $I$  non nul ( $A$  ou  $Z$  impair), alors, en présence d’un champ magnétique intense (noté  $B_0$ ), son moment magnétique  $\mu$  (résultant des spins nucléaire) s’aligne alors suivant le champ  $B_0$ . Des transitions entre niveaux d’énergie peuvent alors avoir lieu (Effet Zeeman) par application d’une onde électromagnétique de fréquence  $\nu_0$  appelée fréquence de Larmor proportionnelle au champ appliqué et au rapport gyromagnétique du noyau ( $\gamma$ ) :  $\nu_0 = \frac{\gamma B_0}{2\pi}$

Le tableau ci-dessous résume les informations nécessaires à prendre en compte avant de réaliser une expérience de RMN :

Tableau 4: Rapport gyromagnétique et fréquence de larmor pour différents noyaux.

Isotope	Spin	Abondance naturelle %	Rapport gyromagnétique ( $10^7 \text{ rad T}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )	Fréquence de Larmor $\nu_0$ (MHz) pour $B_0=7,05 \text{ T}$	Fréquence de Larmor $\nu_0$ (MHz) pour $B_0=14 \text{ T}$
$^1\text{H}$	$\frac{1}{2}$	99,98	26,752	300	600,130
$^2\text{H}$	1	$1,5 \cdot 10^{-2}$	4,106	46,051	92,124
$^{13}\text{C}$	$\frac{1}{2}$	1,108	6,728	75,432	150,90
$^{17}\text{O}$	$\frac{5}{2}$	$3,7 \cdot 10^{-2}$	-3,628	40,670	81,33
$^{31}\text{P}$	$\frac{1}{2}$	100	10,481	121,442	242,93

Pour obtenir un signal RMN, on vient alors perturber le moment magnétique en lui appliquant un champ radiofréquence  $B_{RF}$  (impulsion) perpendiculairement à  $B_0$ . L’aimantation macroscopique bascule alors d’un angle proportionnel à l’intensité de champs  $B_{RF}$  et à la durée de l’impulsion. Après l’impulsion, l’aimantation revient dans sa position d’équilibre (suivant  $B_0$ ) en décrivant un mouvement de précession. C’est ce mouvement de précession libre (free induction decay : FID) qui est détecté en RMN. Une transformée de Fourier est alors employée pour passer le signal temporel en signal fréquentiel (spectre).

**MHARZI ALAOUI - Mieux comprendre la structure interne de la micelle de caséines et sa dynamique par RMN du Solide.**

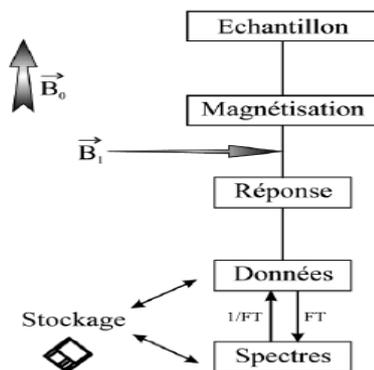


Figure 22: Représentation schématique d'une expérience RMN

### 1. Théorie RMN : Les interactions présente

Dans un échantillon, les interactions entre les spins nucléaires et les champs locaux internes à l'échantillon viennent modifier les niveaux d'énergie. Les interactions rencontrées en RMN sont les suivantes :

Tableau 5: interactions rencontrées en RMN du solide.

Interaction	Nature	Interactions	Ordre de grandeur des interactions (Hz)
<b>Déplacement chimique</b>	Ecrantage électronique	Premiers voisins, coordinence, ...	$\sim 0-10^4 - 10^5$
<b>Dipolaire</b>	Couplage entre spins voisins	Proximité spatiale, distances	$\sim 0-10^4$
<b>Quadripolaire (<math>I &gt; 1/2</math>)</b>	Gradient de champ électrique	Géométrie	$\sim 0-10^6$
<b>Couplage Indirecte ou couplage scalaire (J)</b>	Couplage spin-spin via les électrons de la liaison	Liaisons, distances	$\sim 0-10^2$

La force de ces interactions est fortement dépendante de la nature de l'échantillon. En effet, dans un milieu isotrope et mobile (liquide), seuls le couplage J et le déplacement chimique isotrope seront visibles sur les spectres. A l'inverse, en milieu anisotrope et rigide (solide), toutes les interactions pourront s'exprimer sur le spectre. De plus, elles traduiront par des formes complexes l'anisotropie du milieu.

Le couplage dipolaire est l'interaction permettant l'utilisation de la polarisation croisée (discutée ci-après). Il traduit la proximité spatiale entre spins (inversement proportionnel au cube de la distance entre 2 spins). Cette interaction est fortement affectée par la mobilité. En effet plus un milieu aura une dynamique élevée et moins le couplage dipolaire sera important.

L'anisotropie de déplacement chimique est due à la forme du nuage électronique du noyau observé. Dans un milieu anisotrope, l'anisotropie de déplacement se traduit par un tenseur 3x3 qui peut se résumer à ses 3 valeurs propres :  $\delta_{iso}$ ,  $\delta_{CS}$  et  $\eta_{CS}$ . Il en résulte un spectre large de

## MHARZI ALAOUI - Mieux comprendre la structure interne de la micelle de caséines et sa dynamique par RMN du Solide.

forme complexe (cf. figure CSA PPCN60, page 22). Dans le cas d'un milieu mobile, l'anisotropie devient nulle, le déplacement chimique est alors réduit à son terme isotrope ( $\delta_{iso}$ ).

### 2. Condition expérimentale des mesures RMN du solide

Les spectres  $^{31}\text{P}$  ont été obtenus en utilisant un spectromètre Bruker de champ magnétique 14T travaillant à des fréquences de Larmor de 600 MHz et de 242 MHz pour le proton et le phosphore 31, respectivement. Le spectromètre RMN solide utilisé lors de ce stage est de marque Bruker. Il est constitué d'un aimant Ascend 600 SB (standard bore) et d'une console AVANCE III 600. Nous avons utilisé une sonde statique avec 2 canaux nommés H et X, les tubes dans lesquels étaient placés les échantillons étaient en verre amagnétique, sans fer et de diamètre de 5 mm.

3 manipulations différentes ont été mises en place lors de ce travail :

#### a) *La simple impulsion (programme d'impulsion : ZG)*

Le programme d'impulsion nommé ZG est une expérience en 1-D standard. Cette séquence d'impulsion consiste à basculer l'aimantation d'un angle proportionnel à la puissance et à la durée de l'impulsion. Le signal sera alors maximal quand l'aimantation bascule d'un angle de  $90^\circ$  par rapport à l'axe du champ  $B_0$ . Il est important de noter que la simple impulsion ZG est quantitatif.

Pour les spectres obtenus avec une simple impulsion, nous avons utilisé une simple impulsion d'une durée de 4,8  $\mu\text{s}$ , nommé P1, à une puissance de 150 watt nommé P1 1, le temps de recyclage d1 (ou le temps d'attente entre 2 pulses) était de 20 secondes. Le signal a été acquis avec 8192 points (Td), échantillonnés tous les 2  $\mu\text{s}$ . (dw, temps d'échantillonnage (dwell time)).

#### b) *Le découplage Phosphore – Protons (HPDEC)*

Le programme d'impulsions de découplage à haute puissance (HPDEC High power decoupling en anglais) est une acquisition appliquée pour supprimer les effets du couplage hétéronucléaire. La source la plus courante de couplage dipolaire est l'interaction entre les spins  $^1\text{H}$  et ceux du noyau observé. L'application d'une irradiation à haute puissance à la fréquence de la résonance  $^1\text{H}$  fait que ces spins subissent des transitions répétées à une vitesse déterminée par l'amplitude de l'irradiation. Si la vitesse est suffisamment rapide, les noyaux souhaités peuvent être observés sans les effets d'élargissement du couplage dipolaire.<sup>39</sup>

Pour les manipulations de découplage Phosphore – Protons (HPDEC), les conditions expérimentales ont été les mêmes que pour la ZG. Pendant l'acquisition, un découplage SPINAL 64, avec un temps de 10,6  $\mu\text{s}$  nommé PCPD2, à une puissance de 50 watt nommé PLW12 est ajouté.

#### c) *La polarisation croisée (CP)*

La polarisation croisée est une technique qui permet le transfert d'une polarisation d'un noyau A vers un noyau B moins sensible. Cette technique est fortement utilisée en RMN à l'état solide, néanmoins elle peut être utilisée en RMN à l'état liquide.

Après avoir excité le spin abondant A (impulsion  $90^\circ$ ), on applique simultanément deux champs radiofréquence sur le noyau A et B. Si les champs RF appliqués vérifient la relation de Hartmann-Hahn :

## MHARZI ALAOUI - Mieux comprendre la structure interne de la micelle de caséines et sa dynamique par RMN du Solide.

$$\omega_A = \omega_B$$
$$\gamma_A B_{RFA} = \gamma_B B_{RFB}$$

Alors il y a un transfert de polarisation du noyau A vers le noyau B.

La figure ci-dessous montre la séquence de polarisation croisée dans le cas du proton et d'un noyau X.

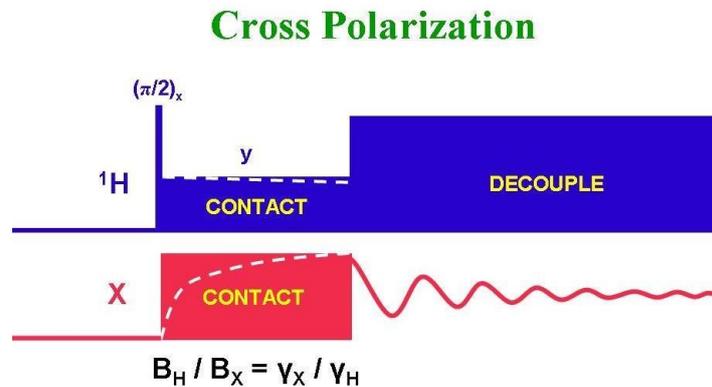


Figure 23: séquence de polarisation croisée dans le cas du proton et d'un noyau X.

En ce qui concerne la polarisation croisée, les conditions expérimentales ont été les mêmes que celles utilisées lors des expériences en découplage HPDEC. On ajoute cette fois un temps de contact P15 de 1000  $\mu$ s permettant la communication du proton vers le phosphore, on parle alors de transfert d'aimantation du proton vers le phosphore. Le temps de recyclage peut alors être raccourci à 2  $\mu$ s, car il dépend maintenant des temps de relaxation caractéristiques du proton et non plus de ceux du phosphore.

## VIII. Conclusion et perspectives

Lors de stage, l'objectif principal était de mieux comprendre la structure de la micelle de caséine par RMN de solide. Grâce à nos résultats expérimentaux et l'aide des différentes méthodologies décrites dans la littérature, nous avons réussi à montrer la présence de plusieurs formes de phosphore dans la solution de micelle de caséines : le phosphate inorganique libre ou en interaction avec le calcium sous forme de CCP amorphe ou cristallisé et les phosphosérines (phosphate organique constituant les micelles de caséines). Actuellement il n'existe pas de méthode de dosage sélectif du calcium participant au CCP et du calcium lié aux phosphosérines dans la micelle de caséines. Ces quantifications pourraient être approchées par RMN du  $^{31}\text{P}$ .

De plus, nous avons montré que l'ajout de minéraux tels que le calcium ou le magnésium, avait un grand intérêt pour l'étude du rôle de ces constituants dans la structure de la micelle de caséines, en particulier celui des minéraux en pontage avec les phosphates organiques liés aux protéines. Le travail, initié lors de ce stage, montre des premiers résultats très intéressants :

- ✓ Pontage des phosphosérines par du  $\text{Ca}^{2+}$  lors de la reminéralisation des micelles,
- ✓ Différenciation des phosphosérines libres et des phosphosérines en interaction avec du calcium ou du CCP.
- ✓ Evolution des interactions au sein de la micelle de caséines suite à l'ajout d'éléments minéraux

## MHARZI ALAOUI - Mieux comprendre la structure interne de la micelle de caséines et sa dynamique par RMN du Solide.

L'un des challenges de ce stage était de réticuler les micelles de caséines dans une solution suffisamment concentrée, pour pouvoir ensuite réaliser des analyses RMN dans un temps suffisamment court ( $\leq 24$ h). Cette partie était laborieuse et l'information de la réussite de la réticulation, n'était connue qu'après acidification, dialyse et neutralisation, par visualisation de l'aspect (turbidité) et mesure de taille de la solution traitée à la transglutaminase. Une validation plus rapide en ajoutant des agents de type SDS (dodécylsulfate de sodium ou laurylsulfate connue sous sa forme chimique  $C_{12}H_{25}NaO_4S$  ou d'autres détergents), qui dissocient tous les éléments qui ne sont pas liés de manière covalente pourra être envisagée. Si la taille des micelles de caséines est conservée, c'est que la réticulation a bien fonctionné ; dans le cas contraire, la présence de particules de faible taille indiquera que la réaction de réticulation n'a pas eu lieu.

Une mesure de taille conforme ne veut pas dire que le rendement de réticulation est proche de 100%, car la mesure de diffusion de lumière fait la part belle aux particules de taille importante. Il faudrait vérifier par électrophorèse, chromatographie de gel filtration ou par ultracentrifugation analytique si après réticulation des particules de petite taille ou des caséines individuelles coexistent avec des micelles de caséines de taille conforme.

Après la déminéralisation, des ajouts de calcium et de phosphate en quantité variable, séparément ou en même temps, pourrait être réalisé pour valider les attributions des pics de  $^{31}P$  RMN. Il est également important de vérifier l'efficacité de l'analyse en cross polarisation du produit déminéralisé.

Un travail complémentaire sur le noyau du calcium serait également utile, tout en sachant que ce dernier est très peu abondant et atypique.

---

## IX. Référence

- (1) Internet de l'unité STLO Science et Technologie du Lait et de l'Oeuf - Organisation <https://www6.rennes.inrae.fr/stlo/UMR-STLO/Organisation> (accessed Aug 5, 2020).
- (2) Le mot du Directeur | Institut des Sciences Chimiques de Rennes <https://iscr.univ-rennes1.fr/fr/le-mot-du-directeur> (accessed Aug 5, 2020).
- (3) Desobry-Banon, S. Sylvie Desobry-Banon. Modification de la structure des micelles de caséine lors de l'acidification par hydrolyse de Glucono-Delta-Lactone. Biotechnologies. Institut National Polytechnique de Lorraine, 1991. Français.  $\diamond$ NNT : 1991INPL077N  $\diamond$ .  $\diamond$ tel-01776196  $\diamond$   
Modification de la structure des micelles de caséine lors de l'acidification par hydrolyse de Glucono-Delta-Lactone <https://scanr.enseignementsup-recherche.gouv.fr/publication/these1991INPL077N> (accessed Mar 31, 2020).
- (4) Hsieh, J.-F.; Pan, P.-H. Proteomic Profiling of the Coagulation of Milk Proteins Induced by Chymosin. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60* (8), 2039–2045. <https://doi.org/10.1021/jf204582g>.
- (5) Larsen, L. B.; Wedholm, A.; Møller, H. S.; Andrén, A.; Lindmark-Månsson, H. Proteomic Study of Regressions between Milk Yield and Whey Protein Composition. *J. Anim. Feed Sci.* **2007**, *16* (Suppl. 1), 200–206. <https://doi.org/10.22358/jafs/74194/2007>.
- (6) LÉONIL, J.; M.-C. MICHALSKI; P. MARTI. Les structures supramoléculaires du lait : structure et impact nutritionnel de la micelle de caséine et du globule gras

- <https://www6.inrae.fr/productions-animales/2013-Volume-26/Numero-2-pp.-69-236> (accessed Mar 30, 2020).
- (7) Baomy, J.-J.; Guenot, P.; Sinbandhit, S.; Brulé, G. Study of Calcium Binding to Phosphoserine Residues of  $\beta$ -Casein and Its Phosphopeptide (1–25) by  $^{31}\text{P}$  NMR. *J. Dairy Res.* **1989**, *56* (3), 403–409. <https://doi.org/10.1017/S0022029900028879>.
  - (8) Brignon, G.; Dumas, B. R.; Mercier, J.-C.; Pelissier, J.-P.; Das, B. C. Complete Amino Acid Sequence of Bovine AS2-Casein. *FEBS Lett.* **1977**, *76* (2), 274–279. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(77\)80167-1](https://doi.org/10.1016/0014-5793(77)80167-1).
  - (9) Fox, P. F.; Brodtkorb, A. The Casein Micelle: Historical Aspects, Current Concepts and Significance. *Int. Dairy J.* **2008**, *18* (7), 677–684. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.03.002>.
  - (10) Horne, D. S. Chapter 6 - Casein Micelle Structure and Stability. In *Milk Proteins (Third Edition)*; Boland, M., Singh, H., Eds.; Academic Press, 2020; pp 213–250. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815251-5.00006-2>.
  - (11) de Kruif, C. G.; Grinberg, V. Y. Micellisation of  $\beta$ -Casein. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2002**, *210* (2), 183–190. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(02\)00371-0](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(02)00371-0).
  - (12) Portnaya, I.; Cogan, U.; Livney, Y. D.; Ramon, O.; Shimoni, K.; Rosenberg, M.; Danino, D. Micellization of Bovine  $\beta$ -Casein Studied by Isothermal Titration Microcalorimetry and Cryogenic Transmission Electron Microscopy. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54* (15), 5555–5561. <https://doi.org/10.1021/jf060119c>.
  - (13) de Kruif, C. G.; Zhulina, E. B.  $\kappa$ -Casein as a Polyelectrolyte Brush on the Surface of Casein Micelles. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **1996**, *117* (1), 151–159. [https://doi.org/10.1016/0927-7757\(96\)03696-5](https://doi.org/10.1016/0927-7757(96)03696-5).
  - (14) X. Qi, P. Studies of Casein Micelle Structure: The Past and the Present. *Le Lait* **2007**, *87* (4–5), 363–383.
  - (15) Carroll, R. J.; Farrell, H. M. Immunological Approach to Location of  $\kappa$ -Casein in the Casein Micelle by Electron Microscopy. *J. Dairy Sci.* **1983**, *66* (4), 679–686. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(83\)81845-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(83)81845-1).
  - (16) Thomsen, J. K.; Jakobsen, H. J.; Nielsen, N. C.; Petersen, T. E.; Rasmussen, L. K. Solid-State Magic-Angle Spinning  $^{31}\text{P}$ -NMR Studies of Native Casein Micelles. *Eur. J. Biochem.* **1995**, *230* (2), 454–459. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1995.tb20582.x>.
  - (17) Bak, M.; Rasmussen, L. K.; Petersen, T. E.; Nielsen, N. C. Colloidal Calcium Phosphates in Casein Micelles Studied by Slow-Speed-Spinning  $^{31}\text{P}$  Magic Angle Spinning Solid-State Nuclear Magnetic Resonance. *J. Dairy Sci.* **2001**, *84* (6), 1310–1319. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)70160-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)70160-9).
  - (18) Hindmarsh, J. P.; Watkinson, P. Experimental Evidence for Previously Unclassified Calcium Phosphate Structures in the Casein Micelle. *J. Dairy Sci.* **2017**, *100* (9), 6938–6948. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12623>.
  - (19) Horne, D. S. Casein Interactions: Casting Light on the Black Boxes, the Structure in Dairy Products. *Int. Dairy J.* **1998**, *8* (3), 171–177. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(98\)00040-5](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(98)00040-5).
  - (20) Holt, C.; Kemenade, M. J. J. M. van; Nelson, L. S.; Sawyer, L.; Harries, J. E.; Bailey, R. T.; Hukins, D. W. L. Composition and Structure of Micellar Calcium Phosphate. *J. Dairy Res.* **1989**, *56* (3), 411–416. <https://doi.org/10.1017/S0022029900028880>.
  - (21) Holt, C. Casein Micelle Substructure and Calcium Phosphate Interactions Studied by Sephacryl Column Chromatography. *J. Dairy Sci.* **1998**, *81* (11), 2994–3003. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75863-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75863-1).
  - (22) Holt, C.; Timmins, P. A.; Errington, N.; Leaver, J. A Core-Shell Model of Calcium Phosphate Nanoclusters Stabilized by Beta-Casein Phosphopeptides, Derived from

- Sedimentation Equilibrium and Small-Angle X-Ray and Neutron-Scattering Measurements. *Eur. J. Biochem.* **1998**, 252 (1), 73–78. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1998.2520073.x>.
- (23) Slattery, C. W.; Evard, R. A Model for the Formation and Structure of Casein Micelles from Subunits of Variable Composition. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct.* **1973**, 317 (2), 529–538. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(73\)90246-8](https://doi.org/10.1016/0005-2795(73)90246-8).
- (24) Walstra, P. Casein Sub-Micelles: Do They Exist? *Int. Dairy J.* **1999**, 9 (3), 189–192. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(99\)00059-X](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(99)00059-X).
- (25) Shimmin, P. D.; Hill, R. D. An Electron Microscope Study of the Internal Structure of Casein Micelles. *J. Dairy Res.* **1964**, 31 (1), 121–123. <https://doi.org/10.1017/S0022029900017982>.
- (26) Morr, C. V. Effect of Oxalate and Urea upon Ultracentrifugation Properties of Raw and Heated Skimmilk Casein Micelles. *J. Dairy Sci.* **1967**, 50 (11), 1744–1751. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(67\)87710-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(67)87710-5).
- (27) Desobry-Banon, S. Modification de La Structure Des Micelles de Caséine Lors de l'acidification Par Hydrolyse de Glucono-Delta-Lactone. thesis, Vandoeuvre-les-Nancy, INPL, 1991.
- (28) Holt, C. Structure and Stability of Bovine Casein Micelles. In *Advances in Protein Chemistry*; Anfinsen, C. B., Richards, F. M., Edsall, J. T., Eisenberg, D. S., Eds.; Academic Press, 1992; Vol. 43, pp 63–151. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(08\)60554-9](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(08)60554-9).
- (29) Horne, D. S. A Balanced View of Casein Interactions. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2017**, 28, 74–86. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2017.03.009>.
- (30) De Kruif, C. G.; Holt, C. Casein Micelle Structure, Functions and Interactions. In *Advanced Dairy Chemistry—1 Proteins: Part A / Part B*; Fox, P. F., McSweeney, P. L. H., Eds.; Springer US: Boston, MA, 2003; pp 233–276. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8602-3\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8602-3_5).
- (31) Horne, D. S. Casein Micelle Structure: Models and Muddles. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2006**, 11 (2), 148–153. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2005.11.004>.
- (32) Dalglish, D. G.; Law, A. J. R. PH-Induced Dissociation of Bovine Casein Micelles. II. Mineral Solubilization and Its Relation to Casein Release. *J. Dairy Res.* **1989**, 56 (5), 727–735. <https://doi.org/10.1017/S0022029900029290>.
- (33) Fox, P. F. Milk Proteins: General and Historical Aspects. In *Advanced Dairy Chemistry—1 Proteins: Part A / Part B*; Fox, P. F., McSweeney, P. L. H., Eds.; Springer US: Boston, MA, 2003; pp 1–48. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8602-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8602-3_1).
- (34) K. Oteng-Pabi, S.; Pardin, C.; Stoica, M.; W. Keillor, J. Site-Specific Protein Labelling and Immobilization Mediated by Microbial Transglutaminase. *Chem. Commun.* **2014**, 50 (50), 6604–6606. <https://doi.org/10.1039/C4CC00994K>.
- (35) De Sa Peixoto, P.; Silva, J. V. C.; Laurent, G.; Schmutz, M.; Thomas, D.; Bouchoux, A.; Gésan-Guiziou, G. How High Concentrations of Proteins Stabilize the Amorphous State of Calcium Orthophosphate: A Solid-State Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Study of the Casein Case. *Langmuir* **2017**, 33 (5), 1256–1264. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b04235>.
- (36) Holt, C.; Wahlgren, N.; DRAKENBERG, T. Ability of a  $\beta$ -Casein Phosphopeptide to Modulate the Precipitation of Calcium Phosphate by Forming Amorphous Dicalcium Phosphate Nanoclusters. *Biochem. J.* **1996**, 314 ( Pt 3), 1035–1039. <https://doi.org/10.1042/bj3141035>.

**MHARZI ALAOUI - Mieux comprendre la structure interne de la micelle de caséines et sa dynamique par RMN du Solide.**

- (37) Pouliot, M.; Pouliot, Y.; Britten, M.; Maubois, J. L.; Fauquant, J. Study of the Dissociation of  $\beta$ -Casein from Native Phosphocaseinate. *Le Lait* **1994**, 74 (5), 325–332. <https://doi.org/10.1051/lait:1994527>.
- (38) Pierre, A.; Fauquant, J.; Graet, Y. L.; Piot, M.; Maubois, J. L. Préparation de phosphocaséinate natif par microfiltration sur membrane. *Le Lait* **1992**, 72 (5), 461–474. <https://doi.org/10.1051/lait:1992534>.
- (39) Pulse programs - National Ultra-high Field NMR Facility for Solids [http://nmr900.ca/pp\\_hpdec.html](http://nmr900.ca/pp_hpdec.html) (accessed Jul 20, 2020).

## **X. Bilan Personnel**

*Ce stage de six mois, qui s'est déroulé entre le laboratoire Science & technologie du lait & de l'œuf (STLO) qui est l'unité mixte de recherche (UMR) 1253 INRA / AGROCAMPUS OUEST, et l'institut des Sciences Chimiques de Rennes (UMR 6226), représente pour moi ma deuxième expérience dans le domaine et le monde de la recherche.*

*Cette expérience est la première qui s'est déroulée loin de ma ville d'origine, Amiens (France). Ce stage m'a permis de développer plusieurs choses : accroître et améliorer mon sens de l'autonomie, acquérir de nouvelles compétences, devenir encore plus mature et responsable de mes propres réflexions et décisions, pour un travail plus précis, rapide et répondant aux besoins d'une problématique posée.*

*Mes responsables de stage ont été très pédagogiques avec moi, puisqu'ils ont pris le temps de m'expliquer le sujet et l'ensemble des missions que je devais réaliser en amont, ils m'ont accompagné pour me guider, ils m'ont laissé la responsabilité d'utiliser des instruments qui sont très sensibles et très chers, notamment les instruments et les spectromètres de RMN 300 et 600 MHz. Cela m'a permis d'acquérir de nouvelles compétences, ainsi qu'une expérience professionnelle solide et très variée.*

*Ce stage m'a permis de mieux connaître le fonctionnement de la RMN du solide, même s'il est vrai que j'ai eu des cours théoriques sur le sujet, mais rien ne vaut la pratique.*

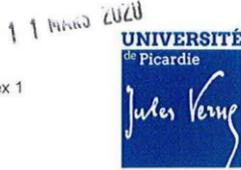
*Cependant, ce stage s'est déroulé dans des laboratoires et instituts qui s'intéressent fortement à la recherche, le développement et l'innovation, en côtoyant des professeurs, des docteurs, des ingénieurs, des enseignants et maîtres de conférences, doctorants et stagiaires, directeurs et responsables des laboratoires et projets, des techniciens, des agents administratifs et même des informaticiens et d'autres, j'ai appris beaucoup de choses, notamment sur la gestion et l'organisation. Et être prêt physiquement et moralement pour toute nouvelle aventure quelle qu'elle soit, thèse ou autre, au plan national comme à l'international.*

*Être confiné en télétravail et durant toute la période du confinement, fut la seule chose que je n'avais pas prévu auparavant ; sans cette période, j'aurais développé encore mes compétences et pu aller plus loin dans la recherche et le développement du sujet de stage.*

*Au final, je tire un bilan très positif, riche en expériences, en développement personnel et de belles rencontres, de cette deuxième expérience professionnelle pleine de découvertes. Je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont aidé. Merci du fond du cœur.*

## **XI. Convention de stage**

Université de Picardie Jules Verne  
Direction de l'Orientation  
et de l'Insertion Professionnelle  
10 rue Frédéric Petit - 80048 Amiens Cédex 1  
Tél : 03 22 80 69 42  
doip@u-picardie.fr



Année universitaire : 2019-2020



### **CONVENTION DE STAGE (stage effectué dans le cadre de la formation initiale et en France)**

Vu la loi n°2014-788 du 10 juillet 2014 tendant au développement, à l'encadrement des stages et à l'amélioration du statut des stagiaires,  
Vu le décret n°2014-1420 du 27 novembre 2014 relatif à l'encadrement des périodes de formation en milieu professionnel,  
Vu le code de l'éducation, notamment ses articles L.124-1 à L.124-20 et D.124-1 à D.124-9,  
Vu l'arrêté du 29 décembre 2014,  
Vu le code du travail,  
Vu le code de la Sécurité sociale

**La présente convention intervient entre :**

**l'Université de Picardie Jules Verne**, représentée par son Président Monsieur Mohammed BENLAHSEN, ci-après désignée « l'université »

et

**l'organisme d'accueil UMR INRAE-AGROCAMPUS OUEST STLO**  
Adresse : 65 rue de Saint Briec 35042 RENNES, FRANCE

Tél : **Non renseigné**  
représenté par **Madame Hélène LUCAS**  
ci-après désigné « l'organisme d'accueil »

et

**Monsieur MHARZI ALAOUI MOHAMED**  
Adresse personnelle : 1 RUE FRANCS JUGES APPARTEMENT 102 AMIENS 80000 AMIENS (80021), FRANCE  
Tél : 0629488018, portable : 06.50.91.99.37 / Mail : mohamed.mharzialaoui@etud.u-picardie.fr  
Inscrit(e) en (intitulé complet de la formation) : **MASTER 2 CHIMIE - CHIMIE DURABLE ORGANIQUE**  
Volume horaire annuel de la formation : **au minimum de 200 heures.**

#### **Article 1 – OBJET DE LA CONVENTION**

La présente convention règle les rapports de l'organisme d'accueil avec l'Université et le stagiaire.

#### **Article 2 - PROJET PÉDAGOGIQUE ET CONTENU DU STAGE**

##### **2-1 Projet, objectifs et finalités du stage**

Le stage correspond à une période temporaire de mise en situation en milieu professionnel au cours de laquelle l'étudiant acquiert des compétences professionnelles et met en œuvre les acquis de sa formation en vue d'obtenir un diplôme ou une certification et de favoriser son insertion professionnelle. Le stagiaire se voit confier une ou des missions conformes au projet pédagogique défini par son établissement d'enseignement et approuvées par l'organisme d'accueil.

Le volume pédagogique annuel de la formation est de 200 heures au minimum par année d'enseignement hors période de stage. Le programme du stage est établi par le tuteur de stage dans l'organisme d'accueil et par l'enseignant référent au sein de l'université et en fonction du programme général suivi par l'étudiant et de sa spécialisation.  
Nombre d'ECTS délivrés pour le stage (le cas échéant) : **30.**

##### **2-2 Mission du stage, activités et compétences**

La mission du stage est la suivante : **Mieux comprendre la structure interne de la micelle de caséines et sa dynamique par RMN du Solide.**

Elle est portée à la connaissance du stagiaire qui l'accepte.

Les activités confiées au stagiaire en fonction des objectifs de la formation sont définies ci-après : **Approfondir les connaissances sur la nature des interactions entre protéines et minéraux de la micelle de caséines. En modulant la composante minérale de la micelle de caséines soit par enrichissement soit par déplétion sélective du calcium et du phosphate inorganique colloïda.** Les compétences à acquérir ou à développer sont celles attendues par un étudiant inscrit en **MASTER 2 CHIMIE - CHIMIE DURABLE ORGANIQUE.**

# MHARZI ALAOUI - Mieux comprendre la structure interne de la micelle de caséines et sa dynamique par RMN du Solide.

## Article 3 - MODALITÉS DU STAGE

### 3-1 Statut du stagiaire

Le stagiaire, pendant la durée de son stage dans l'organisme d'accueil, conserve son statut d'étudiant.

### 3-2 Dates, durée et temps de présence

La durée du stage s'évalue en fonction du temps de présence du stagiaire au sein de l'organisme d'accueil (1 jour = 7 heures, 1 mois = 22 jours).

Les dates du stage sont fixées : du **02 mars 2020** au **21 août 2020**.

représentant une durée totale effective de : **119 jours**

Le stagiaire sera présent **du lundi au vendredi**

(préciser la fréquence - Ex : tous les jours, 1 semaine sur 2, tous les lundis et jeudis, du ... au ... et du ... au ...).

Un avenant à la convention pourra être établi en cas de modification des modalités de stage faite à la demande de l'organisme d'accueil et du stagiaire.

La durée cumulée des périodes de stage ne peut dépasser six mois par année d'enseignement.

La date de fin de stage ne peut être postérieure au 30 septembre de l'année en cours. Si tel était le cas, le stagiaire doit se réinscrire à l'université et une nouvelle convention doit être établie.

### 3-3 Horaires et conditions particulières

La durée hebdomadaire de présence du stagiaire dans l'organisme d'accueil suit les règles applicables aux salariés de l'organisme, elle sera de : **35 heures**.

Lorsque le stage implique des conditions de travail particulières (travail de nuit, dimanche ou jours fériés, etc...) la nature et la durée de ces obligations doivent être spécifiées précisément ci-dessous :

**Jours fériés décomptés. déplacements prévus sur les deux sites pendant la période du stage.**

### 3-4 Lieu de stage

Le stage se déroulera dans les locaux de l'organisme d'accueil à l'adresse suivante :

**263 avenue du Général Leclerc 35700 RENNES, FRANCE**

dans le service suivant : **Institut des Sciences Chimiques de RENNES**

### 3-5 Accueil et encadrement

Le stagiaire est suivi régulièrement par l'enseignant référent désigné par l'université qui s'assure du bon déroulement du stage et du respect des stipulations de la convention : (nom, prénom) **Madame Dolhem Catherine**

L'organisme d'accueil nomme un tuteur de stage chargé de l'accueil et de l'accompagnement du stagiaire et garant du respect des stipulations pédagogiques de la convention : (nom, prénom) **Monsieur Croguennec Thomas**

## Article 4 - GRATIFICATION – AVANTAGES EN NATURE – REMBOURSEMENT DE FRAIS

**4-1** Lorsque la durée du stage au sein d'une même entreprise, administration publique, assemblée parlementaire, assemblée consultative, association, ou tout autre organisme d'accueil sur le territoire français, est supérieur à deux mois consécutifs (44 jours ou 308 heures), ou, au cours d'une même année universitaire, à deux mois consécutifs ou non, le stage fait l'objet d'une gratification versée mensuellement avec effet rétroactif au 1er mois.

La durée du stage s'apprécie compte-tenu de la présente convention et des éventuels avenants ayant pour effet de la prolonger.

La gratification est fixée par convention de branche ou accord professionnel, ou à défaut à 15% du plafond horaire de la sécurité sociale défini en application de l'article L 241-3 du code de la sécurité sociale.

La gratification due par une administration, un établissement public ou tout organisme de droit public ne peut être cumulée avec une rémunération versée par ce même organisme d'accueil au cours de la période concernée. Le montant de cette gratification ne peut excéder le montant minimum légal.

**4-2** Lorsque la durée du stage est inférieure ou égale à deux mois, sur le territoire français, l'organisme d'accueil peut décider de verser une gratification.

**4-3** Montant de la gratification versée mensuellement en euros : **Non renseigné**

Le montant légal s'élève à de 3.90 euros de l'heure de présence -

En cas de versement forfaitaire, une régularisation interviendra en fin de stage en fonction du nombre d'heures réellement effectuées.

La gratification est due sans préjudice du remboursement des frais engagés par le stagiaire pour effectuer son stage et des avantages offerts, le cas échéant, pour la restauration, l'hébergement et le transport.

En cas d'interruption ou d'arrêt de la présente convention, le montant de la gratification due au stagiaire est proratisé en fonction de la durée du stage effectué.

**4-4** Dans les organismes de droit privé, le stagiaire bénéficie des protections et droits mentionnés aux articles L 1121-1, L 1152-1 et L 1153-1 du code du travail.

Il accède au restaurant d'entreprise ou aux titres-restaurant prévus à l'article L3262-1 du code du travail, à la prise en charge des frais de transport prévue à l'article L 3261-2 du même code et aux activités sociales et culturelles mentionnées à l'article L2323-83 du code du travail, dans les mêmes conditions que les salariés.

Liste des avantages accordés : **Néant**

# MHARZI ALAOUI - Mieux comprendre la structure interne de la micelle de caséines et sa dynamique par RMN du Solide.

4-5 Dans les organismes de droit public, les trajets effectués par le stagiaire entre son domicile et son lieu de stage sont pris en charge dans les conditions fixées par le décret 2010-676 du 21 juin 2010 instituant une prise en charge partielle du prix des titres d'abonnement correspondant aux déplacements effectués par les agents publics entre leur résidence habituelle et leur lieu de travail. Le stagiaire accueilli dans un organisme de droit public et qui effectue une mission dans ce cadre, bénéficie de la prise en charge de ses frais de déplacement temporaire selon la réglementation en vigueur. Est considéré comme résidence administrative le lieu du stage indiqué dans la présente convention.

Liste des avantages accordés : **Néant**

## Article 5 - PROTECTION SOCIALE

Pendant la durée du stage, le stagiaire reste affilié à son système de sécurité sociale antérieur. Tous les stagiaires bénéficient d'une protection contre les risques accidents du travail et maladies professionnelles. Ils sont rattachés au régime général de la Sécurité Sociale.

Le paiement des cotisations accidents du travail et maladies professionnelles auprès de la Caisse Primaire d'Assurance Maladie (CPAM) est assuré obligatoirement par l'Université ou le rectorat de l'académie en l'absence de gratification ou lorsque la gratification est égale ou inférieure à 15% du plafond horaire de la sécurité sociale. C'est la CPAM du lieu du domicile du stagiaire qui est compétente en matière d'accident du travail.

5-1 Gratification inférieure ou égale à 15% du plafond horaire de la sécurité sociale : la gratification de stage n'est pas soumise à cotisation sociale.

Le stagiaire bénéficie de la législation sur les accidents de travail au titre du régime étudiant de l'article L 412-8-2 du code de la Sécurité Sociale.

En cas d'accident survenant au stagiaire, soit au cours des activités dans l'organisme d'accueil, soit au cours du trajet, soit sur les lieux rendus utiles pour les besoins de son stage, l'organisme d'accueil envoie la déclaration à la CPAM en mentionnant l'Université de Picardie Jules Verne comme employeur, avec copie à l'université (n° de SIRET de l'Université Picardie Jules Verne : 19801344300017).

5-2 Gratification supérieure à 15% du plafond horaire de la sécurité sociale : les cotisations sociales sont calculées sur le différentiel entre le montant de la gratification et 15% du plafond horaire de la Sécurité Sociale.

Le stagiaire bénéficie de la couverture légale en application des dispositions des articles L 411-1 et suivants du code de la Sécurité Sociale. En cas d'accident survenant au stagiaire, soit au cours des activités dans l'organisme d'accueil, soit au cours du trajet, soit sur des lieux rendus utiles pour les besoins de son stage, l'organisme d'accueil, employeur, effectue toutes les démarches nécessaires auprès de la CPAM et informe l'université dans les meilleurs délais.

## Article 6 - RESPONSABILITE CIVILE ET ASSURANCES

L'organisme d'accueil et le stagiaire déclarent être garantis au titre de la responsabilité civile.

Compagnie d'assurance du stagiaire : **AXA FRANCE IARD N° 1743420304**

Quelle que soit la nature du stage, le stagiaire s'engage à se couvrir par un contrat individuel d'assurance accident.

Lorsque l'organisme d'accueil met un véhicule à la disposition du stagiaire, il lui incombe de vérifier préalablement que la police d'assurance du véhicule couvre son utilisation par un stagiaire.

Lorsque dans le cadre de son stage, le stagiaire utilise son propre véhicule ou un véhicule prêté par un tiers, il déclare expressément à l'assureur dudit véhicule cette utilisation et le cas échéant, s'acquitte de la prime afférente.

## Article 7 - REGLEMENT INTERIEUR ET DISCIPLINE

Durant son stage, le stagiaire est soumis à la discipline et aux clauses du règlement intérieur qui lui sont applicables et qui sont portées à sa connaissance avant le début du stage, notamment en ce qui concerne les horaires, et les règles d'hygiène et de sécurité en vigueur dans l'organisme d'accueil. Toute sanction disciplinaire ne peut être décidée que par l'université. L'organisme d'accueil informe l'université des manquements et lui fournit le cas échéant les éléments constitutifs.

En cas de manquement particulièrement grave à la discipline, l'organisme d'accueil se réserve le droit de mettre fin au stage tout en respectant les dispositions détaillées à l'article 9.

## Article 8 – AUTORISATIONS D'ABSENCE ET CONGES

En France (sauf en cas de règles particulières applicables dans certaines collectivités d'outre-mer françaises ou dans des organismes de droit public), en cas de grossesse, de paternité ou d'adoption, le stagiaire bénéficie de congés et d'autorisations d'absence d'une durée équivalente à celle prévue pour les salariés aux articles L.1225-16 à L.1225-28, L.1225-35, L.1225-37, L.1225-48 du code du travail.

Pour les stages dont la durée est supérieure à deux mois et dans la limite de la durée maximale de 6 mois, des congés ou autorisations d'absence sont possibles.

Nombres de jours de congés autorisés : un jour par mois à partir du 3ème mois, avec effet au 1er mois du stage.

Les autorisations d'absence doivent être prévues si possible dès l'établissement de la convention ou demandés au plus tard deux semaines avant l'absence (cf le formulaire obligatoire disponible sur la plateforme « stages / emplois »).

# MHARZI ALAOUI - Mieux comprendre la structure interne de la micelle de caséines et sa dynamique par RMN du Solide.

## Article 9 - INTERRUPTION, PROLONGATION ET RUPTURE

Lorsque le stagiaire interrompt son stage pour un motif lié à la maladie, à un accident, à la grossesse, à la paternité, à l'adoption ou, en accord avec l'établissement, en cas de non-respect des stipulations pédagogiques de la convention ou en cas de rupture de la convention à l'initiative de l'organisme d'accueil, l'UPJV valide la période de stage, même s'il n'a pas atteint la durée prévue dans le cursus, ou propose au stagiaire une modalité alternative de validation de sa formation. En cas d'accord des parties à la convention, un report de la fin du stage, en tout ou partie, est également possible par la rédaction d'un avenant.

Pour toute autre interruption temporaire du stage (absence injustifiée...), l'organisme d'accueil avertit l'université par courrier. En cas d'accord des parties à la convention, un report de la fin du stage est possible afin de permettre la réalisation de la durée totale du stage prévue initialement. Ce report fera l'objet d'un avenant à la convention de stage.

Un avenant à la convention de stage pourra être établi en cas de prolongation du stage sur demande conjointe de l'organisme d'accueil et du stagiaire, dans le respect de la durée maximale fixée par la loi (6 mois) et de l'échéance du 30 septembre.

Toute difficulté survenue dans le déroulement du stage devra être portée à la connaissance de tous les intéressés afin d'être résolue au plus vite.

En cas de volonté d'une des trois parties (organisme d'accueil, université, stagiaire) d'arrêter définitivement le stage, celle-ci devra immédiatement en informer les deux autres parties par écrit. Les raisons invoquées seront examinées en étroite concertation. La décision définitive d'arrêt du stage ne sera prise qu'à l'issue de cette phase de concertation. Un avenant de rupture sera établi.

## Article 10 - DEVOIR DE RESERVE ET CONFIDENTIALITÉ

Le devoir de réserve est de rigueur absolue et apprécié par l'organisme d'accueil compte-tenu de ses spécificités. Le stagiaire prend donc l'engagement de n'utiliser en aucun cas les informations recueillies ou obtenues, aux fins de publication ou de communication à des tiers, sans accord préalable de l'organisme d'accueil, y compris le rapport de stage. Cet engagement vaudra non seulement pour la durée du stage mais également après son expiration. Le stagiaire s'engage à ne conserver, emporter, ou prendre copie d'aucun document ou logiciel, de quelque nature que ce soit, appartenant à l'organisme d'accueil, sauf accord de ce dernier.

Dans le cadre de la confidentialité des informations contenues dans le rapport, l'organisme d'accueil peut demander une restriction de la diffusion du rapport, voire le retrait de certains éléments confidentiels.

Les personnes amenées à en connaître sont contraintes par le secret professionnel à n'utiliser ni ne divulguer les informations du rapport.

## Article 11 - PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE

Conformément au code de la propriété intellectuelle, si le travail du stagiaire donne lieu à la création d'une œuvre protégée par le droit d'auteur ou la propriété industrielle (y compris un logiciel), si l'organisme d'accueil souhaite l'utiliser et que le stagiaire en est d'accord, un contrat devra être signé entre le stagiaire (auteur) et l'organisme d'accueil.

Devront notamment être précisés l'étendue des droits cédés, l'éventuelle exclusivité, la destination, les supports utilisés et la durée de la cession, ainsi que, le cas échéant, le montant de la rémunération due au stagiaire au titre de la cession. Cette clause s'applique quel que soit le statut de l'organisme d'accueil.

## Article 12 - RECRUTEMENT

S'il advenait qu'un contrat de travail prenant effet avant la date de fin du stage soit signé avec l'organisme d'accueil, la présente convention deviendrait caduque ; le stagiaire ne relèverait plus de la responsabilité de l'université. Cette dernière devrait impérativement en être avertie avant la signature du contrat de travail.

## Article 13 - FIN DE STAGE – RAPPORT - EVALUATION – DELAI DE CARENCE

À l'issue du stage, l'organisme d'accueil délivre au stagiaire une attestation de stage dont le modèle figure en annexe. Il remplit également une fiche d'évaluation de l'activité du stagiaire qu'il retourne à l'université.

Le stagiaire doit remettre un rapport de stage à l'enseignant référent ainsi qu'à l'organisme d'accueil.

Par ailleurs, il saisit sur la Plateforme « stages / emplois » le formulaire dans lequel il évalue la qualité de l'accueil dont il a bénéficié au sein de l'organisme d'accueil.

Ce document d'évaluation n'est pas pris en compte dans son évaluation ou dans l'obtention du diplôme ou de la certification.

Le tuteur de stage de l'organisme d'accueil ou tout autre membre de cet organisme appelé à se rendre à l'université dans le cadre de la préparation, du déroulement et de la validation du stage, ne peut prétendre à une quelconque prise en charge ou indemnisation de la part de l'université.

L'accueil successif de stagiaires, au titre de conventions de stage différentes, pour effectuer des stages dans un même poste, n'est possible qu'à l'expiration d'un délai de carence égal au tiers de la durée du stage précédent. Cette disposition n'est pas applicable lorsque ce stage précédent a été interrompu avant son terme à l'initiative du stagiaire.

## Article 14 - DROIT APPLICABLE – TRIBUNAUX COMPETENTS

La présente convention est régie exclusivement par le droit français. Tout litige non résolu par voie amiable sera soumis à la compétence de la juridiction française compétente.

**MHARZI ALAOUI - Mieux comprendre la structure interne de la micelle de caséines et sa dynamique par RMN du Solide.**

Fait à Amiens, le 13 février 2020

Le stagiaire,

21 FEV. 2020

Le Représentant de l'organisme,  
(signature et tampon)

La Présidente du  
Centre INRAE Bretagne-Normandie

Hélène LUCAS

Le Président  
Mohammed BENLAHSEN

L'Ingénieur d'Études

Yahya NAJJARI



Annexe à la convention :

- Attestation de fin de stage à renseigner par l'organisme d'accueil

## XII. Résumé

**Sujet :** Mieux comprendre la structure interne de la micelle de caséines et sa dynamique par RMN du Solide.

Les micelles de caséines sont connues dans le domaine alimentaire pour leurs propriétés techno-fonctionnelles (agents émulsifiant, gélifiant...) et leur intérêt nutritionnel. L'objectif de ce travail consiste à approfondir les connaissances de la nature des interactions entre protéines et minéraux de la micelle de caséines, afin de mieux maîtriser les propriétés des micelles de caséines. Pour y parvenir, nous avons modulé la composante minérale de la micelle de caséines soit par enrichissement soit par déplétion sélective du calcium et du phosphate inorganique colloïdal (CCP) et en utilisant la RMN du solide des noyaux  $^{31}\text{P}$  et  $^1\text{H}$ .

Les résultats expérimentaux semblent prometteurs, puisque nous avons réussi à déduire à l'aide des outils RMN du solide plusieurs formes du phosphore dans la micelle de caséines : à l'aide de l'acquisition ZG nous avons réussi à identifier le phosphate inorganique libre ou participant au CCP ; avec la polarisation croisée, les phosphosérines en interaction avec le calcium (phosphate organique lié aux protéines) ont été caractérisées.

Dans le même cadre de ce travail, plusieurs tests sont actuellement à l'essai pour améliorer les expériences de cross polarisation des solutions dépourvues de calcium car dans ces conditions, nous n'avons pas pu identifier le phosphore organique des micelles de caséines.

*Mots clés : micelle de caséine – RMN du solide – Cross polarisation (CP) – ZG – phosphate libre, phosphate organique et phosphate inorganique (CCP).*

**Subject:** Better understand the internal structure of the casein micelle and its dynamics by solid-state NMR.

Casein micelles are known in the food industry for their techno-functional properties (emulsifying, gelling agents, etc.) and their nutritional value. The objective of this work is to deepen knowledge of the nature of interactions between proteins and minerals in the casein micelle, in order to better understand the properties of casein micelles. To achieve this, we modulated the mineral component of the casein micelle either by enrichment or by selective depletion of calcium and colloidal inorganic phosphate (CCP) and using solid-state NMR of the  $^{31}\text{P}$  and  $^1\text{H}$  nuclei.

The experimental results seem promising, since we have succeeded in deducing with the help of solid-state NMR tools several forms of phosphorus in the casein micelle: using the ZG acquisition we have succeeded in identifying the free inorganic phosphate or CCP participant; with cross polarization, phosphoserines interacting with calcium (organic phosphate bound to proteins) were characterized.

In the same context of this work, several tests are currently being tested to improve the cross-polarization experiments of calcium-free solutions because under these conditions, we were not able to identify the organic phosphorus of the casein micelles.

*Key words: casein micelle - solid NMR - Cross polarization (CP) - ZG - free phosphate, organic phosphate and inorganic phosphate (CCP).*