Cinétiques des variations de la composition protéique du lait au cours d'une mammite expérimentale à *Escherichia coli*

Isabelle Michelutti^{a*}, Yves Le Roux^a, Pascal Rainard^b,
Bernard Poutrel^b, François Laurent^a

^a Laboratoire de sciences animales, associé à l'Inra,
École nationale supérieure d'agronomie et des industries alimentaires,
Institut national polytechnique de Lorraine, université Henri-Poincaré-Nancy-I,
2, avenue de la Forêt-de-Haye, B.P. 172, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy, France
^b Laboratoire de pathologie infectieuse et immunologie, Inra, 37380 Nouzilly, France

(Reçu le 28 septembre ; accepté le 3 mars 1999)

Abstract — Sequential changes in milk protein composition after experimental *Escherichia coli* mastitis. Milk protein composition was determined between 0 and 72 h after infection during experimentally induced *E. coli* mastitis of seven cows. In milk from infected quarters, contents of non protein nitrogen, total proteins and soluble proteins were significantly higher after 14 h and a maximum was reached at 48 h after infection (+44 %, +104 % and +574 % respectively). Casein content independently from time was reduced of 20 %. Proportions of β - and α -caseins were significantly lower at 24 h (–49 %) and between 48 and 72 h (–62 %) respectively. Proportion of pH 4.6 insoluble peptides including γ -caseins reached a maximum between 24 and 72 h (+580 %). These different kinetics can be explained by sequential origin of proteolysis; plasmin activity could be maximal before maximal activity of somatic cell proteases. Protein composition in milk from control quarters was also greatly modified. Regardless of time, soluble protein content increased (+68 %) and casein content decreased (–21 %). Significant proteolysis of β -casein occurred at 72 h (–25 %) accompanied by increase in relative proportion of pH 4.6 insoluble peptides (+50 %); this was probably due to higher milk plasmin activity levels. Therefore, interdependence was noticed between infected and uninfected quarters, probably through systemic response to *E. coli* infection. © Inra/Elsevier, Paris.

protein composition / casein / proteolysis / mastitis

Résumé — Les variations de la composition protéique du lait de sept vaches ont été déterminées de 0 à 72 h après infection expérimentale par *E. coli*. Dans le lait des quartiers infectés, les teneurs en azote non protéique et en protéines totales et solubles sont significativement plus élevées à 48 h. La teneur

* Correspondance et tirés à part. françois.laurent@ensaia.inpl-nancy.fr

en caséines indépendamment du temps a diminué de 20 %. Les parts relatives des caséines- β et - α_s sont significativement plus faibles à 24 h et entre 48 et 72 h respectivement. La part relative moyenne des peptides insolubles à pH 4,6 contenant les caséines- γ évolue en plateau entre 24 h et 72 h. Ces évolutions découleraient d'une séquentialité de l'origine de la protéolyse, la plasmine agissant plus précocement que les protéases des cellules somatiques. La composition du lait des quartiers témoins est également modifiée : indépendamment du temps, la teneur en protéines solubles augmente (+68 %), la teneur en caséines diminue (-21 %). La caséine- β est significativement dégradée à 72 h, probablement à cause d'une activité plus élevée de la plasmine. Ainsi, il existe une interdépendance entre quartiers infectés et non infectés quant aux variations de la composition protéique du lait dans le cas de mammites à *E. coli*. © Inra/Elsevier, Paris.

composition protéique / caséine / protéolyse / mammite

1. INTRODUCTION

Chez les bovins, la production de lait à dénombrement cellulaire élevé est associée à des changements importants de la composition du lait [17, 19]. Ces changements affectent la transformation fromagère et la qualité des produits laitiers [4, 19]. Ils sont partiellement expliqués par des modifications importantes de la composition protéique lors des mammites qui sont dues à trois mécanismes : la diminution de la synthèse protéique [15], la diffusion de composants variés du sang vers le lait [13, 21] et l'augmentation de la protéolyse.

Celle-ci est essentiellement expliquée par l'augmentation de l'activité des protéases endogènes [2, 17, 24] qui viennent du plasma sanguin ou des cellules somatiques. La protéolyse endogène entraîne une augmentation de la production des peptides insolubles à pH 4,6 contenant les caséines - γ , et des protéose-peptones [1, 3, 17]. La protéase du sang la plus étudiée est la plasmine (EC 3.4.21.7) [12, 14] et notamment son action sur la caséine- β [1, 3, 8]. Des niveaux élevés d'activité plasmine associés à des niveaux élevés de dénombrement cellulaire peuvent être expliqués par l'action des activateurs de plasminogène des leucocytes [14, 27, 28].

En général dans les laits à dénombrement cellulaire élevé, les variations de la teneur en

protéines totales sont considérées comme faibles [19]. La teneur en protéines solubles augmente de façon variable [4, 17, 21]. Enfin, la diminution de la teneur en caséines est essentiellement attribuée à l'augmentation de la protéolyse endogène des caséines- α_s et - β [2, 17, 24] d'où une augmentation de la part des caséines- γ dans les caséines totales [4, 17].

L'objectif de ce travail est l'étude en cinétique de l'incidence de mammites induites à *E. coli* sur les différents paramètres de composition protéique du lait de quartier, en suivant à la fois le quartier infecté et un quartier choisi comme témoin. Des variations maximales des paramètres de composition du lait sont attendues dans la mesure où ce modèle d'infection à *E. coli* conduit à des mammites à expression clinique. D'autre part, l'étude en cinétique lors des 72 premières heures après l'infection permet d'évaluer la précocité de la modification d'un paramètre donné et l'éventuelle synchronisation de l'évolution des différents paramètres. Les profondes modifications de composition protéique sont la résultante globale des trois mécanismes impliqués dans la détermination de la composition du lait. Notamment dans ce cas, contrairement à l'infusion d'endotoxine utilisée pour provoquer l'inflammation d'un quartier [2, 13, 15, 26], la protéolyse peut être due aux dégradations enzymatiques tant par la plasmine et les pro-

téases des cellules somatiques que par les protéases microbiennes de *E. coli*.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Animaux, épreuve et échantillonnage

Sept vaches multipares de race Prim'Holstein (numéro de lactation entre 2 et 5) ont été sélectionnées au laboratoire de pathologie infectieuse et immunologie (Inra Nouzilly). Avant l'inoculation, tous les quartiers de chaque vache étaient indemnes de germes pathogènes et le dénombrement cellulaire (DC) du lait était inférieur à 200 000 c.mL⁻¹. Au moment de l'inoculation, le stade de lactation moyen des animaux était de 47 ± 7 j.

La souche de *Escherichia coli* utilisée est la souche P4 de sérotype 032, dépourvue de capsule et séro-résistante, isolée à partir d'un cas spontané de mammité bovine au National Institute for Research in Dairying (Royaume-Uni). Une suspension, contenant environ 50 UFC dans 0,2 mL de solution d'eau physiologique stérile et apyrogène, a été injectée par le canal du trayon dans chaque quartier éprouvé juste après la traite correspondant au temps T0. Un seul quartier a été éprouvé par vache. Aucune des sept vaches n'a reçu d'antibiotiques dans les 4 j suivant l'infection.

Les numérations bactériennes ont été effectuées à partir du lait des premiers jets prélevés aseptiquement. La traite entière a été effectuée environ toutes les 12 h après l'épreuve. La production de chaque quartier a été mesurée et des échantillons de lait de quartier ont été prélevés pour analyses dans le cas des traites effectuées à T0, 14, 24, 48 et 72 h après l'inoculation. Le lait entier de quartier a servi pour la détermination du dénombrement cellulaire. Une partie (120 mL) a été congelée à -75 °C pour la mesure des paramètres de composition protéique. Dans certains cas, la baisse de production a été si importante que le volume de lait était insuffisant pour effectuer toutes les analyses. Le lait prélevé à T0 a servi de référence pour l'étude en cinétique.

2.2. Numérations bactériennes et cellulaires

Les laits prélevés aseptiquement ont été immédiatement exploités pour la détermination

des numérations bactériennes par la méthode d'étalement de 0,1 mL de lait sur gélose à 5 % de sang de mouton. Les mesures de dénombrement cellulaire du lait ont été effectuées avec un compteur Coulter, modèle ZM selon la Norme FIL 148 : 1992.

2.3. Analyses biochimiques

2.3.1. Teneurs en ANP, PS, PT et CN

La teneur en azote total (NT), la teneur en azote non protéique (ANP) après précipitation des protéines par l'acide trichloroacétique (concentration finale de 12 %), et la teneur en azote soluble (NS) après précipitation des caséines à pH 4,6 [22, 23] ont été déterminées par la méthode Kjeldhal (titration automatique sur un Vadopest 6 ; Gerhardt, Bonn, Allemagne).

Les teneurs en protéines totales (PT), en protéines solubles (PS) et en caséines (CN), exprimées en grammes par litre de lait, ont été obtenues à partir des teneurs en azote protéique ($NP = NT - ANP$), en azote soluble (NS) et en azote caséique ($NCN = NT - NS$) en les multipliant par les facteurs appropriés, à savoir 6,38 pour NP, 6,34 pour NS et 6,30 pour NCN [22].

2.3.2. Parts relatives des différentes caséines

Les pourcentages de caséines- α_s , - β , et - κ ainsi que la part des peptides insolubles à pH 4,6 incluant les caséines- γ , ont été déterminés en chromatographie liquide rapide d'échange d'ions (FPLC) avec une colonne Mono Q HR 5/5 échangeuse d'anions (Pharmacia, Uppsala, Suède), selon la procédure de Collin et al. [7] adaptée par Le Roux et al. [17].

2.4. Analyse statistique

Une analyse de variance en mesures répétées utilisant la procédure Mixed du logiciel SAS [25] a été réalisée sur les neuf paramètres mesurés. Le modèle inclut les effets fixes du traitement, du temps, et de l'interaction temps $\times$ traitement et l'effet animal (vache) a été randomisé. Les différences entre les moyennes ajustées par le modèle ont été évaluées par le test de Student avec un niveau α de probabilité de 0,05.

3. RÉSULTATS

3.1. Production, numérations bactériennes et cellulaires

L'inoculation a conduit à une infection par *E. coli* du quartier éprouvé pour les sept vaches, mise en évidence par une baisse de production, le diagnostic bactériologique et l'évolution du dénombrement cellulaire. La production de lait des quartiers éprouvés a été minimale 48 h après infection (figure 1), avec une diminution moyenne par rapport à T0 de 93 % (± 6). La production de lait des quartiers témoins a également baissé entre 24 et 72 h avec une diminution maximale moyenne de -72 % (± 26). L'aspect du lait n'a pas été modifié jusqu'à 10 h après infection pour tous les animaux, puis des grumeaux ont été observés dans le lait des quartiers infectés à partir de 14 h pour trois vaches sur sept, de 24 h pour trois vaches sur sept et de 48 h pour une vache sur sept. Les valeurs des numérations bactériennes du lait des quartiers infectés ont toujours dépassé 5 000 UFC·mL⁻¹ de 14 h à 72 h pour tous les animaux ; mesurées précisément pour deux animaux, elles ont atteint des valeurs maximales de $1,4 \cdot 10^7$ UFC·mL⁻¹. L'évolution du dénombrement cellulaire du lait des quartiers infectés a été relativement variable selon les animaux (figure 2). La

tendance générale montre que, pour la durée de cette étude, les maxima étaient atteints à 72 h voire à 48 h après infection, avec des valeurs comprises entre $4,1$ et $20,5 \cdot 10^6$ cellules·mL⁻¹.

3.2. Évolution moyenne de la composition des laits de quartier lors des 72 premières heures après l'épreuve

3.2.1. Fractions azotées

Teneur en azote non protéique. Avant l'épreuve, la teneur en ANP du lait est en moyenne de 306 mg d'N·L⁻¹ dans le lait des quartiers éprouvés et celui des quartiers témoins. Dans le cas des quartiers infectés, la teneur en ANP est significativement plus élevée de 24 h à 72 h après infection (figure 3A). La valeur moyenne à 48 h est de 440 mg·L⁻¹ soit une augmentation de +44 % par rapport à la valeur initiale à T0. Les évolutions des quartiers infectés et témoins vont dans le même sens mais la teneur moyenne en ANP dans les quartiers témoins ne varie pas significativement quel que soit le temps de traite.

Teneur en protéines totales. Avant l'épreuve, la teneur moyenne en PT est de 25,5 et 26,3 g·L⁻¹ dans le lait des quartiers

Figure 1. Cinétiques de la production moyenne de lait des quartiers infectés avec *E. coli* (■) et des quartiers témoins (□). a, b, c, d moyennes significativement différentes à 5 %.

Figure 1. Kinetics of mean milk yield of quarters infected with *E. coli* (■) and control quarters (□). a, b, c, d means significantly different ($P < 0.05$).

Figure 2. Cinétiques du dénombrement cellulaire (DC) du lait des quartiers infectés avec *E. coli* (sept vaches) jusqu'à 72 h après l'épreuve.

Figure 2. Kinetics of somatic cell counts in milk from quarters infected with *E. coli* (seven cows) until 72 h after infection.

Figure 3. Cinétiques des teneurs moyennes en azote non protéique (A) et en protéines totales (B) dans le lait des quartiers infectés avec *E. coli* (■) et des quartiers témoins (□). a, b, c moyennes significativement différentes à 5 %.

Figure 3. Kinetics of mean contents of non proteinic nitrogen (A) and total proteins (B) in milk from quarters infected with *E. coli* (■) and control quarters (□). a, b, c means significantly different ($P < 0.05$).

infectés et témoins respectivement. Dans le lait des quartiers infectés, la teneur en PT moyenne augmente dès 14 h et les valeurs sont significativement différentes de celles du lait des quartiers témoins de 24 h à 72 h (figure 3 B). Le maximum est atteint à 48 h avec une valeur moyenne de $52,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($\pm 8,2$) et correspond à une augmentation moyenne de +104 %. Dans le lait des quartiers témoins, la teneur moyenne en PT ne varie pas significativement par rapport à T0.

Teneur en protéines solubles. Avant l'épreuve, la teneur moyenne en PS est de 4,7 et $4,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ dans le lait des quartiers infectés et témoins respectivement. Dans le lait des quartiers infectés, cette teneur aug-

mente dès 14 h et est significativement différente de celle du lait des quartiers témoins de 24 h à 48 h (figure 4 A). Un maximum est atteint à 48 h avec une valeur moyenne de $31,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($\pm 9,8$) soit une augmentation de +574 % par rapport à T0. Dans le lait des quartiers témoins, la teneur moyenne en PS ne varie pas significativement malgré une augmentation de +44 % à 48 h par rapport à T0, et ceci car la variabilité individuelle est importante. La quantité de protéines solubles (en g) sécrétée par les quartiers éprouvés peut être plus élevée à 14 h et 24 h après infection que la quantité sécrétée à T0 : c'est le cas de quatre vaches sur sept avec une augmentation maximale moyenne de

Figure 4. Cinétiques des teneurs moyennes en protéines solubles (A) et en caséines (B) dans le lait des quartiers infectés avec *E. coli* (■) et des quartiers témoins (□). a, b, c moyennes significativement différentes à 5 %.

Figure 4. Kinetics of mean contents of soluble proteins (A) and caseins (B) in milk from quarters infected with *E. coli* (■) and control quarters (□). a, b, c means significantly different ($P < 0.05$).

Figure 5. Cinétiques de la part relative de la caséine- κ dans le lait des quartiers infectés avec *E. coli* (■) et des quartiers témoins (□). a, b moyennes significativement différentes à 5 %.

Figure 5. Kinetics of mean proportion of κ -casein in milk from quarters infected with *E. coli* (■) and control quarters (□). a, b means significantly different ($P < 0.05$).

+45,4 % ($\pm 10,8$) par rapport à une valeur moyenne à T0 de 16,9 g par quartier éprouvé.

Teneur en caséines. Avant l'épreuve, la teneur moyenne en caséines totales est de 20,6 et 22,1 g·L⁻¹ dans le lait des quartiers infectés et témoins respectivement. L'effet du traitement sur la teneur en caséines est proche du seuil de signification ($p = 0,07$). Les teneurs moyennes en caséines du lait des quartiers infectés et témoins ont évolué de manière parallèle. La teneur en caséines a eu tendance à diminuer à 24 h de -17 % pour les quartiers infectés et de -6,7 % pour les quartiers témoins par rapport à T0 (figure 4 B). Une augmentation non significative a été observée à 48 h pour les quartiers infectés (+4,3 %) et témoins (+12,4 %).

3.2.2. Proportions des différentes caséines

Caséine- κ . Avant l'épreuve, la proportion moyenne en caséine- κ était de 15,2 % et 15,6 % dans le lait des quartiers infectés et témoins respectivement. Dans le lait des quartiers infectés, la part en caséine- κ ne varie pas significativement jusqu'à 24 h (figure 5). Une augmentation significative est observée à 48 h (+73 %) et à 72 h (+79 %).

Caséine- α_s . Avant l'épreuve, la part moyenne des caséines- α_s dans le lait des quartiers infectés et témoins est respectivement de 46,5 % et 47,6 %. Dans le lait des quartiers infectés, la part des caséines- α_s diminue dès 14 h et se trouve significativement plus faible qu'à T0 entre 24 h et 72 h après infection (figure 6 A). Au cours de la période étudiée, la part moyenne des caséines- α_s dans les caséines totales est minimale à 72 h [17,6 % ($\pm 4,1$)], ce qui représente une baisse de 62 % par rapport à T0. Dans le lait des quartiers témoins, la part des caséines- α_s ne varie pas significativement au cours du temps.

Caséine- β . Avant infection, la part moyenne de la caséine- β dans les caséines totales est respectivement de 33,3 % et 32,4 % dans les laits des quartiers infectés et témoins. Dans le lait des quartiers infectés, la part moyenne de la caséine- β est significativement inférieure dès 14 h après infection (-25 %) (figure 6 B). Elle est minimale 24 h après l'infection, et vaut 16,8 % des caséines totales soit une diminution de 49 % par rapport à T0. La part en caséine- β augmente ensuite progressivement mais est encore significativement inférieure à 72 h par rapport à la valeur à T0 (-29 %). Dans le lait des quartiers témoins, la part moyenne de la caséine- β a baissé entre 24 h et 48 h et

Figure 6. Cinétiques des proportions relatives dans les caséines totales, des caséines- α_s (A), de la caséine- β (B) et des peptides insolubles à pH 4,6 (C) dans le lait des quartiers infectés avec *E. coli* (■) et des quartiers témoins (□). a, b, c moyennes significativement différentes à 5 %.

Figure 6. Kinetics of mean proportions of α_s -casein (A), β -casein (B) and pH 4.6 insoluble peptides (C) in milk from quarters infected with *E. coli* (■) and control quarters (□). a, b, c means significantly different ($P < 0.05$).

est significativement plus faible à 72 h de 25 % par rapport à T0.

Caséine- γ et autres peptides insolubles à pH 4,6. Avant épreuve, la part des caséines- γ et autres peptides insolubles à pH 4,6 est en moyenne de 5,0 % et 4,4 % dans le lait des

quartiers infectés et témoins respectivement. Dans le lait des quartiers infectés, la part des peptides insolubles à pH 4,6 augmente significativement dès 14 h (+243 %) (figure 6 C). Un plateau est observé entre 24 h et 72 h avec un maximum à 48 h et qui

correspond à une augmentation de +578 % par rapport à T0. Dans le lait des quartiers témoins, la part des peptides insolubles à pH 4,6 présente une augmentation moyenne non significative par rapport à T0 d'environ +50 % entre 24 h et 72 h après infection (figure 6 C).

3.3. Variabilité individuelle

Dans l'ensemble, les paramètres suivent une même tendance avec cependant des intensités variables, et le maximum de variation peut être atteint à des temps différents selon les animaux. Pour les différents quartiers infectés, les teneurs individuelles en ANP, en protéines totales et en protéines solubles évoluent de manière relativement homogène ainsi que les parts relatives des caséine- κ et caséine- β (tableau I). À l'opposé, la teneur en caséines totales, la part en caséine- α_s , et la part des peptides insolubles à pH 4,6 présentent des profils d'évolution variables selon les animaux. Cette hétérogénéité de la répartition dans le temps explique que soit les variations ne sont pas significatives (cas de la teneur en caséines totales), soit que l'évolution moyenne sur l'ensemble des animaux apparaît en plateau (part des peptides insolubles à pH 4,6).

Dans le cas des quartiers témoins, seule la part de caséine- β présente une tendance claire avec une diminution à 72 h dans six cas sur sept. La répartition des temps correspondant aux maxima de réponse est diffuse pour l'ensemble des autres paramètres.

L'amplitude maximale de la réponse de chaque paramètre indépendamment du temps est également variable selon les individus, d'où le choix de comparer les moyennes des variations individuelles maximales pour un paramètre donné (tableau II). Pour chaque paramètre, la réponse des quartiers infectés évolue dans le même sens pour tous les animaux, bien qu'étant d'amplitude différente (tableau II). La protéolyse des caséines- α_s et - β est très importante et conduit à de fortes augmentations de la part relative des peptides insolubles à pH 4,6 avec cependant une variabilité élevée entre les animaux (tableau II).

La réponse des quartiers témoins indépendamment du temps est également variable entre individus, bien que les évolutions moyennes ne soient pas significatives. Les teneurs en protéines solubles et en protéines totales augmentent moins en moyenne que pour les quartiers infectés (tableau II). Pour deux quartiers sur sept, la teneur en ANP du lait ne varie pas ou a tendance à diminuer (-9 % et -25 % au

Tableau I. Variabilité dans la chronologie des réponses maximales des quartiers infectés par *E. coli*.

Table I. Relative quarter frequency of peak values at a given time after infection by *E. coli* for each parameter of milk composition.

Paramètres		Nombre de quartiers infectés atteignant leur maximum de variation à un temps de traite donné après infection			
		14 h	24 h	48 h	72 h
Azote non protéique	mg·L ⁻¹	...	2	5	...
Protéines totales	g·L ⁻¹	1	...	5	1
Protéines solubles	g·L ⁻¹	...	1	6	...
Caséines totales	g·L ⁻¹	3	2	1	1
Caséine- κ	%	...	...	5	2
Caséine- α_s	%	1	1	3	2
Caséine- β	%	...	6	1	...
Peptides insolubles à pH 4,6	%	1	3	2	1

Tableau II. Comparaison des paramètres de composition protéique des laits des quartiers infectés par *E. coli* et des quartiers témoins : valeur moyenne à T0 (V_{T0} moy) et moyenne des variations maximales individuelles (ΔV % $\pm$ écart type) au cours des 72 h après épreuve.

Table II. Comparison of milk protein composition between *E. coli* infected quarters and control quarters: mean value at T0 (V_{T0} moy) and averaged maximal variation (ΔV % $\pm$ SD) during the first 72 h after inoculation.

Paramètres		Quartiers infectés		Quartiers témoins	
		V_{T0} moy	ΔV % ($\pm$ ET)	V_{T0} moy	ΔV % ($\pm$ ET)
Teneurs en :					
Azote non protéique	mg·L ⁻¹	306	+44,1 ($\pm$ 16,2)	306	+44,7 ($\pm$ 33,9)
Protéines totales	g·L ⁻¹	25,6	+111 ($\pm$ 44)	26,3	+38,7 ($\pm$ 31,4)
Protéines solubles	g·L ⁻¹	4,7	+653 ($\pm$ 266)	4,0	+67,9 ($\pm$ 62,8)
Caséines	g·L ⁻¹	20,6		22,1	
diminution moyenne	%		20,4 ($\pm$ 13,2)		- 21,1 ($\pm$ 7,2)
augmentation moyenne	%		+24,7 ($\pm$ 2,9)		+38,6 ($\pm$ 31,4)
Proportions moyennes en :					
Caséine- κ	%	15,2	+86,0 ($\pm$ 38,9)	15,6	+35,1 ($\pm$ 62,0)
Caséine- α_s	%	46,5	-66,2 ($\pm$ 12,2)	47,6	-6,10 ($\pm$ 2,87)
Caséine- β	%	33,3	-51,0 ($\pm$ 15,0)	32,4	-25,9 ($\pm$ 7,4)
Peptides insolubles à pH 4,6					
dont caséines- γ	%	5,0	+890 ($\pm$ 628)	4,4	+120 ($\pm$ 92)

maximum). Dans la majorité des cas (cinq quartiers témoins sur sept), la teneur en ANP augmente autant en moyenne dans le lait des quartiers témoins que dans celui des quartiers infectés (tableau II) ; l'écart type à la moyenne est cependant plus élevé que pour les quartiers infectés du fait d'une augmentation très élevée de la part d'un individu. La teneur en caséines diminue autant en moyenne dans le lait des quartiers témoins que dans celui des quartiers infectés (tableau II). La part relative en caséine- α_s ne varie pas significativement dans le lait des quartiers témoins (figure 6 A), car les variations individuelles observées sont faibles (tableau II). Bien que la part relative des peptides insolubles à pH 4,6 ne varie pas significativement dans le lait des quartiers témoins (figure 6 C), son augmentation pour tous les animaux n'est pas négligeable (tableau II). Ceci traduit l'existence d'une protéolyse dans le lait des quartiers témoins, protéolyse qui affecte significati-

vement la part de la caséine- β (figure 6 B). Elle reste cependant inférieure à la protéolyse observée dans les quartiers infectés (tableau II).

4. DISCUSSION

Les valeurs maximales de dénombrement cellulaire du lait atteintes après ces infections à *E. coli* sont élevées mais très variables, ce qui est conforme aux études précédentes avec des valeurs maximales de 7 à 35·10⁶ c·mL⁻¹ entre 0 et 32 h [20] ou de 15·10⁶ c·mL⁻¹ à 36 ou 48 h après l'infection [26]. Les numérations bactériennes du lait variaient de 1,3·10⁵ UFC·mL⁻¹ à 4,5·10⁵ UFC·mL⁻¹ dans l'essai de Vandeputte-Van Messom et al. [26], ce qui est beaucoup plus faible que les valeurs obtenues dans cet essai probablement du fait d'une fréquence de traite plus élevée.

Lohuis et al. [18] ont montré que l'infection par *E. coli* entraîne des diminutions de l'appétit, de la fréquence et de l'amplitude des contractions du rumen qui sont minimales entre 10 et 12 h après infection et peuvent persister jusqu'à 36 h. Associés à une diminution importante de la production de lait, ces phénomènes pourraient expliquer une augmentation de la teneur en ANP à la fois dans les quartiers éprouvés et témoins du fait d'une augmentation de la teneur en urée. L'augmentation de la teneur en ANP ainsi que la baisse de production à la fois dans les quartiers éprouvés et témoins suggèrent l'idée d'une réponse systémique de l'organisme suite à l'infection d'un quartier par *E. coli*. L'augmentation de la perméabilité de la barrière épithéliale pourrait également favoriser le passage de composés sanguins comme les acides aminés libres qui peuvent s'accumuler dans le lait faute d'être incorporés dans des protéines du fait d'une baisse de synthèse générale par les cellules sécrétrices. Une production d'acides aminés libres pourrait également avoir eu lieu sous l'action de protéases et de peptidases. Cet aspect ne semble pas avoir fait l'objet d'études antérieures.

L'augmentation significative de la teneur en protéines totales observée dans le lait des quartiers infectés s'explique par une très forte augmentation de la teneur en protéines solubles, maximale 48 h après infection, qui n'est pas compensée par la baisse de la teneur en caséines. La quantité de protéines solubles sécrétée par ces quartiers a augmenté et ceci malgré la diminution de production de lait ; cette observation traduit une forte augmentation de la perméabilité de la barrière épithéliale aux protéines dans les premiers temps de l'inflammation. En effet, alors que la teneur en protéines solubles synthétisées par la glande mammaire diminue dans le cas d'une infection par *E. coli* [26], l'afflux des protéines venant du sang est responsable de l'augmentation de la teneur en protéines solubles du lait. Dans le lait de quartiers infectés, les teneurs en IgG1 et IgG2 peuvent atteindre jusqu'à

4 g·L⁻¹, la teneur en IgM jusqu'à 1,5 g·L⁻¹ [21]. Mais c'est la teneur en sérum albumine bovine qui augmente le plus atteignant jusqu'à 10 à 15 g·L⁻¹ 50 h après infection [26], voire 20 g·L⁻¹ entre 10 h et 32 h [21]. Dans notre essai, la teneur en protéines solubles a atteint des valeurs plus élevées jusqu'à 42 g·L⁻¹. Il aurait été intéressant de connaître la part de la BSA et des immunoglobulines dans ces variations, d'autres protéines pouvant également participer à l'augmentation de cette teneur.

Dans leur étude, Vandeputte-Van Messom et al. [26] avaient rapporté une baisse de la teneur en caséines. La diminution de la teneur en caséines totales dans le lait des quartiers éprouvés, qui était attendue, est généralement attribuée à une baisse de synthèse par la glande mammaire. Dans notre essai, la quantité de caséines sécrétée par quartier diminue parallèlement à la baisse de la production de lait. Cependant, la diminution de la teneur en caséines est relativement variable selon les individus. De plus, elle est moins importante que prévue, ce qui peut s'expliquer par des aspects méthodologiques. En effet, les peptides insolubles à pH 4,6 précipitant avec les caséines, la mesure de la teneur en caséines totales surestime donc la teneur réelle en caséines- α_s , β et κ quand la part relative des peptides insolubles à pH 4,6 est élevée, ce qui est le cas pour cet essai entre 24 h et 72 h. L'impact de la protéolyse sur la teneur en caséines totales est dans ces conditions difficile à estimer. Enfin, si les augmentations temporaires observées dans la teneur en caséines totales sont inattendues, elles peuvent avoir deux explications : soit un effet de concentration des caséines lié à la baisse de la production de lait, soit une synthèse compensatrice de caséines par les quartiers non infectés [15]. Cette dernière hypothèse semble cependant moins probable dans notre essai du fait de la diminution après épreuve de la quantité totale de caséines sécrétées par les quartiers éprouvés et témoins à chaque traite.

Cet essai montre clairement qu'il existe une interdépendance entre les quartiers non infectés et infectés sur le plan de la composition biochimique du lait. Vandeputte-Van Messom et al. [26] avaient mentionné une baisse de la production de lait dans les quartiers non infectés de -31 % à -61 %, avec une baisse de la teneur en caséines. Dans notre essai, la teneur en caséines totales peut diminuer autant dans les quartiers non infectés que dans les quartiers infectés. L'hypothèse d'une baisse de synthèse des caséines affectant de la même façon tous les quartiers de la glande mammaire (réponse systémique) peut être avancée.

Les variations de nombreux paramètres dans le lait des quartiers témoins ne sont pas statistiquement significatives du fait de la non-simultanéité des maxima, c'est pourquoi nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux variations maximales indépendamment du temps (*tableau II*). Une élévation de la teneur en protéines solubles dans le lait de tous les quartiers témoins est notée et traduit une altération de la barrière épithéliale dans ces quartiers. Une augmentation significative de la teneur en sérum albumine bovine dans le lait des quartiers témoins avait été montrée dans le cas d'une injection intramammaire de 500 µg d'endotoxine d'*E. coli* dans le quartier éprouvé de la même mamelle [10]. Le changement de perméabilité des quartiers non infectés serait dépendant de la diffusion d'un médiateur, comme l'histamine, des quartiers éprouvés vers les quartiers témoins [10]. Les baisses occasionnelles des teneurs en protéines solubles sont faibles et restent inexplicables. Enfin, les évolutions de la fraction des peptides insolubles à pH 4,6 montrent qu'il existe également une protéolyse des caséines dans le lait des quartiers non infectés, probablement liée au passage d'enzymes solubles du sang vers le lait suite à l'augmentation de la perméabilité de l'épithélium.

La protéolyse et l'évolution des parts relatives des différentes caséines du lait de quartiers infectés par *E. coli* ne paraît pas

avoir fait l'objet d'études antérieures en cinétique. Faute d'éléments susceptibles de l'informer, l'hypothèse retenue pour la suite du développement est que la synthèse de chaque caséine se réalise à la même vitesse, et que la baisse de synthèse des caséines affecte toutes les caséines- α_s , β et κ de la même façon.

L'augmentation de la part relative de la caséine- κ dans le lait des quartiers infectés est a priori surprenante. En effet, l'évolution communément décrite la concernant est plutôt une diminution de la teneur en caséine- κ en relation avec une augmentation de la protéolyse d'origine microbienne comme dans le cas des bactéries psychrotrophes [9]. Cependant aucune étude ne mentionne l'existence dans le lait cru d'une protéolyse de la caséine- κ par les protéases d'*E. coli*, bien que les numérations bactériennes de lait prélevé stérilement puissent dépasser $1 \cdot 10^7$ UFC·mL⁻¹. Cette augmentation de la part relative de la caséine- κ n'est pas incompatible avec un maintien ou une baisse de la teneur globale de cette caséine dans la mesure où la caséine- κ est relativement moins sensible que les caséines- β et α_s à l'action de la plasmine et des enzymes des cellules somatiques. Cependant dans ces conditions expérimentales, la méthode utilisée en FPLC semble conduire à une surestimation de la part de la caséine- κ dans les caséines totales. En effet, la caséine- κ et des peptides issus de la protéolyse des autres caséines et insolubles à pH 4,6 peuvent n'être qu'imparfaitement séparés par élution en FPLC sur colonne Mono Q ; c'est notamment le cas du fragment 106-199 de la caséine- α_{s1} (peptide Y) identifié par Le Bars et Gripon [16] et qui est élué dans la même zone de gradient que la caséine- κ par cette méthode de séparation.

La modification des proportions en caséines- α_s et β dans le lait des quartiers infectés s'explique par une protéolyse qui peut avoir trois origines : les enzymes plasmatiques c'est-à-dire essentiellement la plasmine, mais aussi les protéases des cellules somatiques et les protéases bactériennes.

Cette protéolyse globale est parfaitement illustrée par l'augmentation dès 14 h puis l'évolution en plateau de la part relative des peptides insolubles à pH 4,6 entre 24 h et 72 h après infection. Cependant les diminutions décalées des parts relatives en caséine- β et en caséines- α_s étaient inattendues et ce décalage traduit une succession des phases de la protéolyse. En effet, pour six vaches sur sept, le minimum de la part en caséine- β est atteint 24 h après infection et correspond au début de l'augmentation de la part relative des peptides insolubles à pH 4,6. Cette dernière reste élevée jusqu'à 72 h alors que la part moyenne de la caséine- β augmente au-delà de 24 h, dénotant alors une protéolyse de la caséine- β plus faible. Le maintien d'un niveau élevé de la fraction des peptides insolubles à pH 4,6 s'expliquerait donc par une protéolyse croissante des caséines- α_s . Enfin, il est intéressant de noter qu'une protéolyse importante de la caséine- β a eu lieu dès 14 h après l'infection voire avant 14 h, alors que l'aspect du lait ne présentait pas de modifications visibles pour l'éleveur dans quatre cas sur sept.

Ces observations accréditent l'idée d'une origine variable de la protéolyse entre 0 et 72 h après l'infection par *E. coli*. Compte tenu de la forte sensibilité de la caséine- β à la plasmine, et d'un dénombrement cellulaire inférieur à $3,5 \cdot 10^6$ cellules·mL⁻¹ jusqu'à 24 h inclus dans six cas sur sept, la plasmine est sans doute responsable de cette augmentation de la protéolyse entre 0 h et 24 h. La diminution de l'intensité de la protéolyse de la caséine- β , traduite par un retour vers la normale de sa proportion dans les caséines totales, pourrait s'expliquer par une diminution de l'activité de la plasmine. Après 24 h, la protéolyse concerne à la fois les caséines- β et - α_s et est maximale pour les caséines- α_s , en relation avec l'activité des enzymes des cellules somatiques du lait réputées hydrolyser les caséines à des vitesses différentes, dans l'ordre : $\alpha_{s1} > \beta > \alpha_2 > \kappa$ [11]. Des protéases de *E. coli* sont également susceptibles de dégrader les caséines- α_s [5, 6]

et la caséine- β [27] mais rien ne permet de vérifier l'existence d'une protéolyse due à *E. coli* dans cet essai.

Une protéolyse dans le lait des quartiers témoins est observée (tableau II) par l'augmentation de la part relative des peptides insolubles à pH 4,6 surtout entre 24 h et 72 h après infection. Cette augmentation peut être aussi importante pour le quartier témoin que pour le quartier infecté. Dans la mesure où les quartiers témoins ne sont pas infectés, la protéolyse a alors une origine strictement endogène. La part relative des caséines- α_s évoluant peu alors que celle de la caséine- β peut diminuer de manière importante, ceci suggère que la protéolyse dans le lait des quartiers témoins serait essentiellement liée à l'activité de la plasmine. Le minimum de la part relative en caséine- β dans le lait des quartiers témoins est atteint à 72 h dans six cas sur sept ce qui impliquerait une activité de la plasmine maximale entre 48 et 72 h. La plasmine et le plasminogène venant du sang, le maximum de l'activité plasmine est attendu lorsque la teneur en protéines solubles dans le lait est maximum, traduisant une altération maximale de la barrière épithéliale. Or le maximum de la teneur en protéines solubles peut être atteint à 24 h, 48 h ou 72 h après infection. De plus, le maximum de protéolyse de la caséine- β n'a pas lieu au même moment pour le lait des quartiers infectés et témoins, ce qui pourrait suggérer que la perméabilité de la barrière épithéliale est affectée de façon décalée entre les différents quartiers. Les évolutions des paramètres non parallèles au cours du temps suggèrent que certains mécanismes sont dissociés dans le temps comme le recrutement cellulaire et l'afflux des protéines du sang, remarque antérieurement rapportée par Rainard et Caffin [21]. Il semblerait donc que les mécanismes de réponse à l'infection sont particulièrement complexes et très variables selon les individus, surtout dans le cas des quartiers témoins.

5. CONCLUSION

L'étude de l'évolution de la composition protéique des laits provenant de quartiers infectés par *E. coli* a permis de montrer des augmentations significatives des teneurs en azote non protéique, en protéines solubles totales, et en protéines totales ainsi que la diminution non significative de la teneur en caséines totales. L'étude cinétique a permis de confirmer la non simultanéité de certaines réponses comme l'afflux des protéines du sang et la protéolyse de la caséine- β . Une évolution séquentielle de la protéolyse des caséines- α_s et - β a également été mise en évidence, la caséine- β étant la plus altérée 24 h après infection alors que la part moyenne des caséines- α_s est minimum entre 24 h et 72 h après infection. La part des peptides insolubles à pH 4,6 résultant de la protéolyse augmente dès 14 h après l'infection et reste très élevée entre 24 h et 72 h. Ces travaux ont également mis en évidence la forte variabilité de la composition du lait des quartiers non infectés utilisés comme témoins sur les mamelles éprouvées. Les teneurs en azote protéique, en protéines solubles et en caséines évoluent dans le même sens que pour les laits des quartiers infectés. Une protéolyse significative de la caséine- β a été mise en évidence dans tous les cas, en relation avec un doublement de la part relative des peptides insolubles à pH 4,6.

Au vu de ces premiers résultats, obtenus dans des conditions expérimentales favorisant des réponses très marquées, il serait important d'étudier plus particulièrement l'évolution de la protéolyse endogène en cherchant à faire la part de la protéolyse due à la plasmin et celle due aux enzymes des cellules somatiques en ayant recours à un modèle de mammites induites par injection intramammaire d'endotoxine. Enfin, l'altération de la composition protéique du lait en cinétique et l'interdépendance des quartiers pourraient également être vérifiées dans le cas des mammites subcliniques.

REMERCIEMENTS

Nous remercions C. Riollot du laboratoire PII, Centre Inra de Nouzilly pour la mise en place de l'expérimentation et les prélèvements supplémentaires. Nous la remercions avec T. Cochar et J. Dufrenoy du laboratoire PII, ainsi que C. Grandclaude du laboratoire de sciences animales pour leur contribution aux analyses.

REFERENCES

- [1] Andrews A.T., Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins, *J. Dairy Res.* 50 (1983) 45-55.
- [2] Andrews A.T., Breakdown of caseins by proteinases in bovine milks with high somatic cell counts arising from mastitis or infusion with bacterial endotoxin, *J. Dairy Res.* 50 (1983) 57-66.
- [3] Andrews A.T., Alichanidis E., Proteolysis of caseins and the proteose-peptone fraction of bovine milk, *J. Dairy Res.* 50 (1983) 275-290.
- [4] Auldust M.J., Coats S., Sutherlands B.J., Mayes J.J., McDowell G.H., Rogers G.L., Effects of somatic cell count and stage of lactation on raw milk composition and the yield and quality of Cheddar cheese, *J. Dairy Res.* 63 (1996) 269-280.
- [5] Charette M.F., Henderson G.W., Markovitz A., ATP hydrolysis-dependent protease activity of the *lon* (*capR*) protein of *Escherichia coli* K-12, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 4728-4732.
- [6] Chung C.H., Proteases in *Escherichia coli*, *Science* 262 (1993) 372-374.
- [7] Collin J.C., Kokelaar A., Rollet-Repecaud O., Delacroix-Buchet A., Dosage des caséines du lait de vache par électrophorèse et par chromatographie liquide rapide d'échange d'ions (FPLC®) : comparaison des résultats, *Lait* 71 (1991) 339-350.
- [8] Eigel W.N., Formation of γ_1 -A², γ_5 -A² and γ_3 -A caseins by in vitro proteolysis of β -casein A² with bovine plasmin, *Int. J. Biochem.* 8 (1977) 187-192.
- [9] Fairbairn D.J., Law B.A., Proteinases of psychrotrophic bacteria: their production, properties, effects and control, *J. Dairy Res.* 53 (1986) 139-177.
- [10] Fox L.K., Heald C.W., Gwazdauskas F.C., Vinson W.E., Concentrations of glucocorticoids, bovine serum albumin, and somatic cells in mastitic milk, *J. Dairy Sci.* 64 (1981) 2258-2261.
- [11] Grieve P.A., Kitchen B.J., Proteolysis in milk: the significance of proteinases originating from milk leucocytes and a comparison of the action

- of leucocyte, bacterial and natural milk proteinases on casein, *J. Dairy Res.* 52 (1985) 101–112.
- [12] Grufferty M.B., Fox P.F., Milk alkaline proteinase, *J. Dairy Res.* 55 (1988) 609–630.
- [13] Guidry A.J., Ost M., Mather I.H., Shainline W.E., Weinland B.T., Sequential response of milk leucocytes, albumin, immunoglobulins, monovalent ions, citrate, and lactose in cows given infusions of *Escherichia coli* endotoxin into the mammary gland, *Am. J. Vet. Res.* 44 (1983) 2262–2267.
- [14] Heegaard C.W., Rasmussen L.K., Andreasen P.A., The plasminogen activation system in bovine milk: differential localization of tissue-type plasminogen activator and urokinase in milk fractions is caused by binding to casein and urokinase receptor, *Biochim. Biophys. Acta.* 1222 (1994) 45–55.
- [15] Kaartinen L., Veijalainen K., Kuosa P.L., Pyörälä S., Sandholm M., Endotoxin-induced mastitis: inhibition of casein synthesis and activation of the caseinolytic system, *J. Vet. Med. B* 35 (1988) 353–360.
- [16] Le Bars D., Gripon J.C., Hydrolysis of α_s -casein by bovine plasmin, *Lait* 73 (1993) 337–344.
- [17] Le Roux Y., Colin O., Laurent F., Proteolysis in samples of quarter milk with varying somatic cell counts. I. Comparison of some indicators of endogenous proteolysis in milk, *J. Dairy Sci.* 78 (1995) 1289–1297.
- [18] Lohuis J.A.C.M., Schukken Y.H., Henricks P.A.J., Heyneman R., Burvenich C., Verheijden J.H.M., Van Miert A.S.J.P.A.M., Brand A., Preinfection functions of blood polymorphonuclear leukocytes and the outcome of experimental *Escherichia coli* mastitis in the cow, *J. Dairy Sci.* 73 (1990) 342–350.
- [19] Munro G.L., Grieve P.A., Kitchen B.J., Effect of mastitis on milk yield, milk composition, processing properties and yield and quality of milk products, *Austr. J. Dairy Techn.* 39 (1984) 7–16.
- [20] Rainard P., Experimental mastitis with *Escherichia Coli*: sequential response of leukocytes and opsonic activity in milk of immunised and unimmunised cows, *Ann. Rech. Vét.* 14 (1983) 281–286.
- [21] Rainard P., Caffin J.P., Sequential changes in serum albumin, immunoglobulin (IgG1, IgG2, IgM) and lactoferrin concentrations in milk following infusion of *Escherichia coli* into the udder of immunised and unimmunised cows, *Ann. Rech. Vét.* 14 (1983) 271–279.
- [22] Ribadeau-Dumas B., Grappin R., Milk protein analysis, *Lait* 69 (1989) 357–416.
- [23] Rowland S.J., The precipitation of the proteins in milk, I caseins, II total proteins, III globulins, IV albumin and proteose-peptone, *J. Dairy Res.* 9 (1938) 30–40.
- [24] Saeman A.E., Verdi R.J., Galton D.M., Barbano D.M., Effect of mastitis on proteolytic activity in bovine milk, *J. Dairy Sci.* 71 (1988) 505–512.
- [25] SAS® User's Guide: Statistics, Version 6.11 Edition, 1997, SAS Inst., Inc., Cary, NC.
- [26] Vandeputte-Van Messom G., Burvenich C., Roets E., Massart-Leën A.-M., Heyneman R., Kremer W.D.J., Brand A., Classification of newly calved cows into moderate and severe responders to experimentally induced *Escherichia coli* mastitis, *J. Dairy Res.* 60 (1993) 19–29.
- [27] Verdi R.J., Barbano D.M., Effect of coagulants, somatic cell enzymes, and extracellular bacterial enzymes on plasminogen activation, *J. Dairy Sci.* 74 (1991) 772–782.
- [28] Zachos T., Politis I., Gorewit R.C., Barbano D.M., Effect of mastitis on plasminogen activator activity of milk somatic cells, *J. Dairy Res.* 59 (1992) 461–467.