

# LA PROTEOSE PEPTONE 5, UNE INHIBITRICE POTENTIELLE DE LA LIPOLYSE SPONTANEE DU LAIT, MODULEE PAR L'ALIMENTATION DE LA VACHE LAITIERE.

Elise VANBERGUE<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> PEGASE, INRA, Agrocampus Ouest, 35042 Rennes, France.

<sup>2</sup> Institut de l'élevage, Monvoisin, 35910 Le Rheu, France.

## Résumé

La lipolyse « spontanée » (**LS**) est une réaction enzymatique, naturellement présente dans le lait, qui influence négativement les qualités organoleptiques et technologiques des produits laitiers. Elle résulte de l'action sur la matière grasse de la lipoprotéine lipase et de ses cofacteurs, produisant des acides gras libres. La LS est modulée par les facteurs d'élevage, notamment par l'alimentation. Cependant, les mécanismes exacts de cette réaction sont peu connus. Nous avons nourri 32 vaches laitières avec deux types de fourrages à deux niveaux d'apport alimentaire différents selon un schéma expérimental en inversion. Ces travaux ont permis d'identifier un inhibiteur potentiel de la LS : la protéose peptone 5, qui serait modulée par l'alimentation des vaches laitières. Ces résultats permettent une meilleure compréhension des mécanismes de la LS et participent à la diffusion de recommandations auprès des professionnels.

## Abstract

Spontaneous lipolysis (**SL**) impairs technological and sensory properties of milk and dairy products. Husbandry factors and especially nutritional factors are known to modulate SL levels, but the biochemical mechanisms remain unclear. This work studied the effects of feeding levels and type of forage on SL mechanisms. Thirty-two cows were divided into 4 groups according to diets based on corn silage or conserved grass. Two feeding levels were applied: "non-restricted", with cows fed ad libitum; "restricted", with cows fed at 75% of their ad libitum dry matter intake. The trial was conducted in a split-plot design experiment with main factor "nature of forages" and sub-factor "level of energy". Cows were followed during 12.5 weeks: 4 control weeks and 6 experimental weeks split into two 3-weeks periods separated by 14 days and 4 days of transition period. Milk samples were collected from morning and evening milkings at the end of each period to determine SL and milk parameters. Data analysis using SAS-software MIXED procedures found no statistically significant feeding level × forage-type interaction on SL. Feed-restricted cows tended to have higher SL levels in morning milks (0.60 vs 0.52 mEq/100 g fat) and even higher SL levels in evening milks (0.89 vs 0.58 mEq/100 g fat) compared to non-restricted cows. Cows fed corn silage tended to have higher SL in morning milks (0.72 vs 0.40 mEq/100 g fat) but evening milks showed no forage-type effect. Data analysis using SAS-software MIXED procedure found Log proteose peptone 5 was lower in milk from cows fed corn silage and strongly negatively correlated with SL. This suggests a potential inhibitor effect of proteose peptone 5 on SL, which would be modulated by diets.

## *Introduction et contexte : la lipolyse dans les élevages de vaches laitières*

### **1. La lipolyse, un problème agronomique**

On appelle lipolyse, la mise en œuvre d'un système enzymatique qui conduit à la formation d'acides gras libres dans le lait. Ces acides gras libres influencent négativement les qualités organoleptiques (goût rance) et technologiques des produits laitiers (*Scanlan, 1965 ; Deeth, 2006*). En France, dans 5 régions laitières, la lipolyse est un critère de paiement du lait de vache.

Les défauts de qualité organoleptique et technologique induits par la lipolyse ne peuvent être corrigés en aval de la filière. Ils justifient donc une étude approfondie des facteurs de variation de la lipolyse en amont de la filière.

### **2. La lipolyse est modulée par l'animal et les facteurs d'élevage**

On distingue trois types de lipolyse : la lipolyse spontanée (**LS**), la lipolyse induite et la lipolyse microbienne. Dans ma thèse, nous nous sommes intéressés à la **LS**. Elle se produit naturellement dans le lait, consécutivement à son refroidissement. C'est la fraction de la lipolyse qui dépend de l'animal (race, génétique, parité, stade de lactation) et des facteurs d'élevage (alimentation, traite).

La plupart des études existantes concernant l'impact des facteurs d'élevage sur la LS ont été menées dans les années 1980 (*Chilliard et al., 1986*). Or, la génétique et l'alimentation des vaches laitières (**VL**) ont évolué conjointement depuis 30 ans et les connaissances acquises grâce à ces références ne permettent pas d'expliquer les fluctuations de la lipolyse dans les élevages actuels.

→ Le premier objectif de ma thèse était d'évaluer l'impact des différents facteurs d'élevage sur les niveaux de LS du lait. La finalité de l'étude était d'établir des recommandations auprès de l'ensemble de la filière.

### **3. Les mécanismes biochimiques de la lipolyse en question**

A l'échelle du lait, l'activité de la lipoprotéine lipase (**LPL**) et de ses cofacteurs, provoque l'hydrolyse de la matière grasse et la libération des acides gras libres dans le lait. Les cofacteurs de la LPL sont des protéines qui ont un rôle activateur ou inhibiteur de la réaction d'hydrolyse, influençant ainsi la vitesse de la réaction et donc les niveaux de LS.

Pas ou peu d'études ont fait le lien entre les facteurs d'élevage et les mécanismes mis en œuvre dans le lait pour moduler la LS. Cependant, la mise en évidence de bio-marqueurs de la LS, en lien avec des facteurs d'élevage, pourrait donner lieu à la mise en place d'outils facilitant le pilotage de la qualité des laits dans les élevages.

→ Le second objectif de ma thèse était d'identifier des cofacteurs (inhibiteurs et activateurs) de la LPL, en établissant des profils protéiques des laits dans le cadre d'une variation de l'alimentation.

## *Les variations de la lipolyse spontanée à l'échelle de l'animal*

Nous avons mis en place 5 essais pour répondre au premier objectif de ma thèse : déterminer l'impact des facteurs d'élevage sur les variations de la LS.

Suite à ces essais, les VL ont pu être classées en deux groupes selon leur phénotype : « susceptible » et « non susceptible » à la LS, confirmant l'importance de l'effet individu dans l'explication des niveaux de LS. Parmi les VL « susceptibles » à la LS, nous avons montré que la LS était

plus élevée chez les vaches Holstein que chez les vaches Normande ( $P < 0,001$ ). Chez les VL multipares à haut niveau de production, la LS était plus élevée en début de lactation qu'en milieu de lactation, probablement en raison d'un bilan énergétique négatif. Pour l'ensemble des VL « susceptibles », la LS était également plus élevée en fin de lactation qu'en milieu et en début de lactation ( $P < 0,001$ ). La LS était plus élevée dans les laits issus de la traite du soir que dans les laits issus de la traite du matin ( $0,03 < P < 0,001$ ) en raison de l'intervalle de traite de 10 h / 14 h ou des rythmes circadiens des VL. La LS augmentait avec l'augmentation de la fréquence de traite ( $P < 0,001$ ), avec la restriction alimentaire ( $P < 0,01$ ), lorsque les régimes à base d'herbe fraîche et d'herbe conservée étaient remplacés par des régimes à base d'ensilage de maïs ( $P < 0,05$ ).

Suite à cela, nous avons mis en place un protocole pour améliorer notre compréhension des mécanismes de la LS, notamment par la recherche des activateurs et inhibiteurs protéiques de la réaction enzymatique. C'est ce résultat de ma thèse que je vous présente aujourd'hui.

### *Les variations de la lipolyse spontanée du lait à l'échelle du lait*

#### **1. Protocole expérimental**

Dans ce protocole, trente-deux VL ont été réparties dans quatre lots, selon leur régime alimentaire, caractérisés par la nature du fourrage principal de la ration et le niveau d'apport alimentaire :

- un régime à base d'ensilage de maïs *ad libitum* (**Maïs100**)
- un régime à base d'ensilage de maïs « restreint » (**Maïs75**)
- un régime à base d'herbe conservée *ad libitum* (**Herbe100**)
- un régime à base d'herbe conservée « restreint » (**Herbe75**)

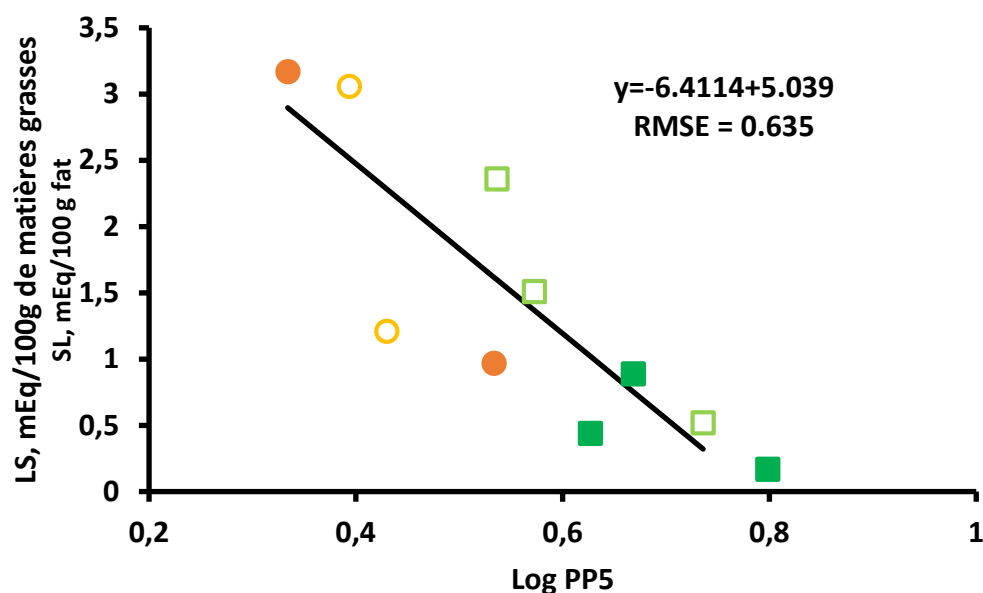
Pendant la période expérimentale, des prélèvements de lait ont été effectués pour déterminer les niveaux de LS et pour établir les profils protéiques des laits.

Le protocole détaillé de cet essai est proposé en annexe n°1.

#### **2. La protéose peptone 5, une inhibitrice de la lipolyse spontanée des laits ?**

Une corrélation négative entre la LS et le logarithme de la protéose peptone 5 (**LogPP5**), un produit de dégradation des  $\beta$ -Caséines, a été mise en évidence dans les laits issus de la traite du soir ( $N=10$ ,  $RMSE=0.635$ ; Figure 2). La PP5 aurait donc un rôle inhibiteur de la LS. Ce résultat confirme les conclusions d'Anderson (1981) qui avait mis en évidence que des ajouts dosés de PP5 entraînaient une diminution de la LS, mais n'est pas en accord avec celles de Chilliard (1986) qui montrait un effet activateur de la PP5 *in vitro*. C'est la première fois qu'une mesure à l'échelle physiologique du lait permet de mettre évidence un inhibiteur de la LS, en lien avec un facteur d'élevage : l'alimentation. Ces résultats mériteraient cependant d'être consolidés par un nombre plus important d'échantillons.

Les laits issus des VL du groupe « Maïs » ont présenté des pourcentages en PP5 inférieurs aux laits du groupe « Herbe » (2,70 % vs 4,63 %). Cela pourrait expliquer un niveau de LS plus important dans le groupe « Maïs ». L'alimentation de la VL entraînerait donc des modifications de l'équilibre entre les cofacteurs de la LPL.



**Figure n°2** : Corrélation entre la LS et le LogPP5 des lactosérums issus des laits du soir (N=10) -(● : Maïs100 ; ○ : Maïs75 ; ■ : Herbe100; □ : Herbe75) *Correlation between spontaneous lipolysis and log[protease peptone 5 (PP5)] in milk whey (N=10) from evening milks* (● : Corn100; ○ : Corn75; ■ : Grass100; □ : Grass75)

LS : lipolyse spontanée – SL : Spontaneous lipolysis

### Conclusion

Ma thèse a permis de faire le point en 2016 sur les facteurs de variation de la lipolyse spontanée pour répondre à une demande de l'Interprofession laitière et a contribué à une meilleure compréhension des mécanismes biochimiques. A l'échelle de l'animal, nous avons pu identifier des leviers d'action pour maîtriser la lipolyse spontanée en élevage. Des grilles d'audit peuvent être utilisées à cette fin. Les résultats que nous avons obtenus nous permettent de penser à un déterminisme génétique de la lipolyse spontanée. Deux populations de VL ont été mises en évidence : les VL « susceptibles » et les VL « non susceptibles » à la lipolyse spontanée. Un travail sur l'héritabilité de ce caractère pourrait conduire à son utilisation dans les schémas de sélection. En ce qui concerne la maîtrise des facteurs de variations, les points de vigilance et les solutions diffèrent selon les systèmes d'élevage. Différents points doivent faire l'objet d'une attention particulière : fréquence de traite dans les systèmes robotisés (2 fois par jour en moyenne), les VL à plus de 6 mois de gestation (augmentation possible de la LS) et couverture des besoins énergétiques des VL, surtout en début de lactation.

A l'échelle du lait, l'étude des profils protéiques a permis de mettre en évidence une corrélation négative entre les niveaux de lipolyse spontanée et le logarithme de la protéose peptone 5, suggérant le rôle inhibiteur de cette protéine dans la réaction de lipolyse. Les niveaux de protéose peptone 5, plus faibles dans les lots nourris à base d'ensilage de maïs dans cet essai, pourraient expliquer les niveaux de lipolyse spontanée plus élevés. Cette étude a participé à l'acquisition de connaissances sur les mécanismes de la lipolyse spontanée. Des recherches complémentaires doivent être faites pour confirmer le rôle inhibiteur de PP5 et déterminer sa spécificité. La technique que nous avons utilisée pour établir les profils protéiques, la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse est longue et fastidieuse et la limite de détection de cette méthode ne permet pas d'identifier l'ensemble des peptides du lait. D'autres techniques de protéomique permettraient d'avoir un plus

haut débit et d'identifier ces fragments peptidiques. L'existence de bio-marqueurs de la lipolyse spontanée pourrait donner lieu à la mise en place d'outils permettant la détection des laits lipolysés dans les élevages et aidant au pilotage du troupeau.

## *Références*

Anderson, M. 1981. Inhibition of lipolysis in bovine milk by proteose peptone. *Journal of Dairy Research* 48(2):247-252.

Chilliard, Y. 1986. Revue bibliographique: Variations quantitatives et métabolisme des lipides dans les tissus adipeux et le foie au cours du cycle gestation-lactation. 1re partie: chez la ratte. *Reproduction*

Deeth, H. C. 2006. Lipoprotein lipase and lipolysis in milk. *International Dairy Journal* 16(6):555-562.

Institut National de la Recherche Agronomique (INRA). 2007. Ruminant nutrition: Recommended allowances and feed tables (ed. R. Jarrige), John Libbey, London, UK.

Jensen, H.B., Poulsen, N.A., Møller, H.S., Stensballe, A. et L.B Larsen. 2012. Comparative proteomic analysis of casein and whey as prepared by chymosin-induced separation, isoelectric precipitation or ultracentrifugation. *J. Dairy Res.* 79, 451-458.

Miranda, G., Krupova, Z., Bianchi, L., et P.Martin. 2013. A novel LC-MS protein profiling method to characterize and quantify individual milk proteins and multiple isoforms. The 10th International Symposium on Milk Genomics and Human Health. October 13th, 2013, Davis, California.

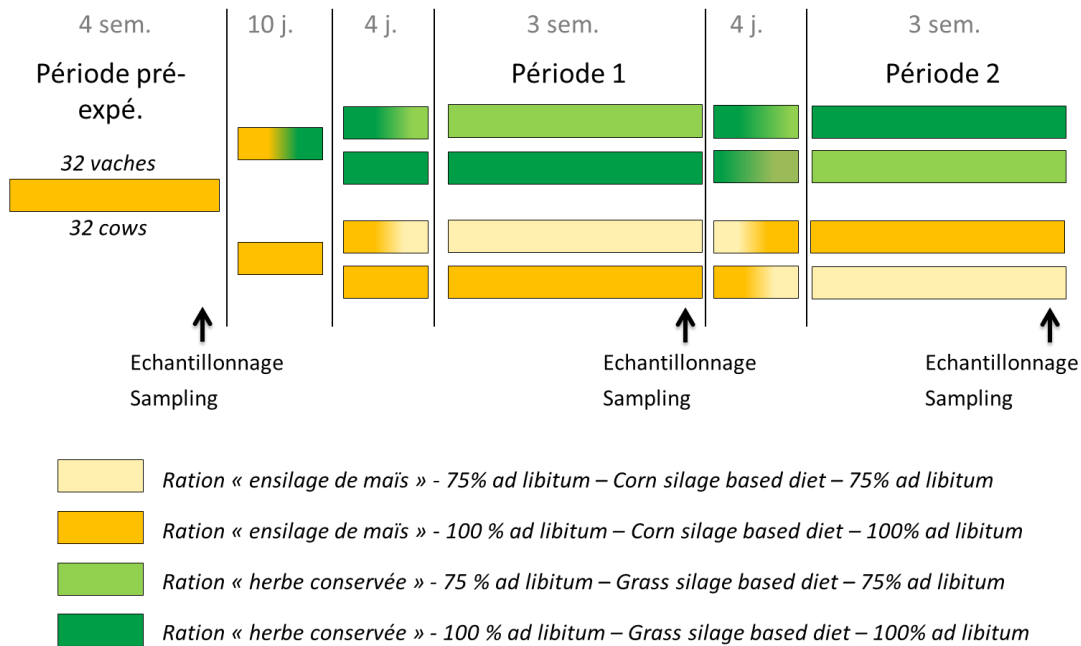
Scanlan, R. A., L. A. Sather, et E. A. Day. 1965. Contribution of free fatty acids to flavor of rancid milk. *Journal of Dairy Science* 48(12):1582-1584

Shipe, W. F., G. F. Senyk, et K. B. Fountain. 1980. Modified copper soap solvent extraction method for measuring free fatty acids in milk. *Journal of Dairy Science* 63(2):193-198.

## Annexe n° 1 : Protocole expérimental

### 1. Animaux et schéma expérimental

Trente-deux VL multipares, de race Holstein, en milieu de lactation, ont été réparties en 4 lots selon un schéma expérimental en inversion partielle à deux facteurs : la nature du fourrage et le niveau d'alimentation. Une illustration du schéma expérimental est présentée en **figure n°1**.



**Figure n°1** : Représentation du schéma expérimental de l'essai - Experimental design.

Quatre régimes alimentaires, caractérisés par la nature du fourrage et le niveau d'apports alimentaires ont été distribués. Les régimes alimentaires ont été formulés sur une base d'ensilage de maïs ou sur une base d'herbe conservée (enrubannage d'herbe et fétuque déshydratée) en respectant les recommandations nutritionnelles établies par l'INRA, pour des régimes distribués *ad libitum* (*Institut National de la Recherche Agronomique, 2007*). Deux niveaux d'alimentation ont été appliqués : « non restreint », avec des VL nourries *ad libitum* et « restreint » avec des VL nourries à 75 % de leur ingestion *ad libitum*. L'expérimentation s'est déroulée sur une période de 12,5 semaines, d'avril à juin 2015. La période pré-expérimentale, d'une durée de 4 semaines a été suivie d'une période expérimentale de 8,5 semaines divisée en deux périodes. Pendant la période pré-expérimentale, l'ensemble des VL a reçu un régime alimentaire formulé à base d'ensilage de maïs *ad libitum* (**Maïs100**). Pendant la première période d'expérimentation, les 8 VL de chaque lot ont reçu respectivement :

- un régime à base d'ensilage de maïs *ad libitum* (**Maïs100**)
- un régime à base d'ensilage de maïs « restreint » (**Maïs75**)
- un régime à base d'herbe conservée *ad libitum* (**Herbe100**)
- un régime à base d'herbe conservée « restreint » (**Herbe75**)

Pendant la deuxième période d'expérimentation, les VL ont reçu le même fourrage qu'en première période et les niveaux d'apport alimentaire ont été inversés.

La traite, biquotidienne, était effectuée à 7h00 et à 17h00. La production laitière a été évaluée pour chaque traite et les taux butyreux et protéiques ont été évalués trois fois par semaine pendant la

durée de l'expérimentation. Des prélèvements de lait supplémentaires ont été réalisés à la fin de la période pré-expérimentale et à la fin de chaque période expérimentale. Ces prélèvements de lait ont été réalisés en salle de traite, sur des bidons dérivateurs, pour recueillir des échantillons représentatifs de la traite complète des VL.

## 2. Mesure de la lipolyse spontanée des laits.

Les prélèvements destinés à l'analyse de la LS ont été réalisés sur les 32 VL de l'essai, deux jours consécutifs, lors de la traite du matin et du soir. Deux tubes de 50 mL de lait par VL ont été collectés pour calculer la LS par différence entre la quantité d'acides gras libres présente après 24 h de stockage du lait (tube n°2) et la quantité d'acides gras libres initialement présente dans le lait (tube n°1). Immédiatement après la traite, un des échantillons (tube n°1) était chauffé au bain marie à 100°C pendant 2,5 min pour stopper l'activité lipasique, puis conservé à 4°C. L'autre échantillon (tube n°2) était conservé à 4°C pendant 24 h avant d'être chauffé au bain marie, comme précédemment décrit, puis replacé à 4°C. La quantité d'acides gras libres a été déterminée par la méthode des savons de cuivre (CV inter-essai = 2,0 % ; CV intra-essai = 1,5 %) (Shipe *et al.*, 1980).

## 3. Mesure du profil protéique des laits.

Les prélèvements destinés à l'analyse du profil protéique des laits ont été réalisés sur 12 VL, lors de la traite du soir. Trois VL par lot ont été choisies de manière à couvrir une large gamme de niveau de LS. Deux résultats aberrants ont été exclus de l'analyse statistique. Les profils protéiques ont été établis sur le lait et sur le lactosérum par la méthode décrite par Miranda *et al.* (2013) fondée sur l'utilisation de chromatographie liquide associée à de la spectrométrie de masse. Les lactosérums ont été obtenus par précipitation isoélectrique comme décrit par Jensen *et al.* (2012).

## 4. Analyses statistiques et calculs

Les analyses statistiques ont été faites via le logiciel SAS. Le seuil de significativité a été fixé à  $P < 0,05$ . La tendance à  $P < 0,10$ . La normalité des données a été vérifiée par le test de Shapiro-Wilk. Les effets du type de fourrage et du niveau d'apports alimentaires sur la LS des laits ont été évalués par la procédure MIXED de SAS (N= 128). Les VL ont été traitées comme « effet aléatoire » au sein de l'effet de « la nature du fourrage » selon le modèle suivant :  $LS_{ijkl} = \mu + \text{Traite}_i + \text{Période}_j + \text{Fourrage}_k + \text{Niveau\_alim}_l + \text{Fourrage}_k \times \text{Niveau\_alim}_l + \text{Traite}_i \times \text{Fourrage}_k + \text{Traite}_i \times \text{Niveau\_alim}_l + \text{Période}_j \times \text{Fourrage}_k + \text{Traite}_i \times \text{Fourrage}_k \times \text{Niveau\_alim}_l + \text{Période}_j \times \text{Fourrage}_k \times \text{Niveau\_alim}_l + \text{Cov}_{ijkl} + \epsilon_{ijkl}$  où  $\text{Cov}_{ijkl}$  est la valeur de LS mesurée pendant la période expérimentale et  $\epsilon_{ijkl}$  la valeur résiduelle.

Les effets du type de fourrage et du niveau d'apport alimentaire sur le profil protéique des laits ont été évalués séparément par la procédure GLM de SAS (N=11) selon les modèles suivants :  $\text{Profil\_prot}_{ij} = \mu + \text{Fourrage}_i + \epsilon_{ij}$ , and,  $\text{Profil\_prot}_{ij} = \mu + \text{Niveau\_alim}_i + \epsilon_{ij}$  où  $\epsilon_{ij}$  est la valeur résiduelle.

L'analyse des corrélations entre la LS et le profil protéique des laits a été effectuée par la procédure MIXED de SAS (N=10).