



**HAL**  
open science

# Mécanismes de la protéolyse dans le lait lors de l'inflammation de la glande mammaire chez la vache laitière : activité des protéases leucocytaires et des protéases bactériennes (cas d'Escherichia coli)

Kahina Haddadi

► **To cite this version:**

Kahina Haddadi. Mécanismes de la protéolyse dans le lait lors de l'inflammation de la glande mammaire chez la vache laitière : activité des protéases leucocytaires et des protéases bactériennes (cas d'Escherichia coli). Sciences agricoles. Institut National Polytechnique de Lorraine, 2006. Français. NNT : 2006INPL021N . tel-01752478

**HAL Id: tel-01752478**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01752478>**

Submitted on 29 Mar 2018

**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.



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE



Ecole Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires

Ecole Doctorale : Sciences et Ingénierie des Ressources, Procédés, Produits et Environnement

## THÈSE

Pour l'obtention du grade de :

**DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE**

**DE LORRAINE**

Spécialité : **SCIENCES AGRONOMIQUES**

Présentée et soutenue publiquement par

**Kahina HADDADI**

**MECANISMES DE LA PROTEOLYSE DANS LE LAIT LORS DE  
L'INFLAMMATION DE LA GLANDE MAMMAIRE CHEZ LA VACHE  
LAITIÈRE**

**Activité des protéases leucocytaires et des protéases bactériennes (cas  
d'*Escherichia coli*)**

**Membres du Jury :**

**COULON** Jean Baptiste, Directeur de Recherche INRA, Clermont Ferrand, **(Rapporteur)**

**SEEGERS** Henri, Professeur, ENV de Nantes, **(Rapporteur)**

**HARDY** Joël, Professeur, ENSAIA-INPL, Nancy, **(Président)**

**LAURENT** François, Professeur, ENSAIA-INPL, Nancy, **(Examineur)**

**LE ROUX** Yves, Maître de Conférences, ENSAIA-INPL, Nancy, **(Examineur)**

Unité de Recherche : Animal et Fonctionnalités des Produits Animaux (URAFPA)



# *Avant Propos*



## REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé à l'Unité de Recherche : Animal et Fonctionnalités des Produits Animaux (URAFPA) de l'ENSAIA à l'Institut National Polytechnique de Lorraine (INPL) à Nancy. Je souhaite remercier le Professeur François Laurent, directeur de ma thèse, de m'avoir accueilli au sein de sa structure. Je le remercie aussi pour l'intérêt qu'il a témoigné à ce travail et sa disponibilité malgré ses responsabilités.

Je tiens principalement à remercier le gouvernement Algérien et le gouvernement Français de m'avoir octroyé une bourse doctorale de coopération, me permettant de réaliser ce travail. Je n'oublie pas de remercier le Professeur Bellal Directeur de l'INA d'Alger pour ses orientations. Je le remercie aussi pour la confiance qu'il a témoignée à mon égard.

Merci à Yves Le Roux pour sa grande disponibilité, son dynamisme et son sens du travail d'équipe. Je le remercie aussi pour la confiance qu'il m'a accordée depuis mon arrivée au laboratoire, pour nos nombreuses discussions sur le plan scientifique et relationnel. Merci aussi d'avoir toujours été là pendant toutes les expérimentations animales.

Je remercie également les membres du jury qui ont accepté de juger ce travail :

- Monsieur Jean Baptiste Coulon, Directeur de l'Unité de Recherche sur les Herbivores (INRA, Clermont Ferrand, Theix),
- Monsieur Henri Seegers, Directeur de l'UMR Gestion de la Santé Animale (ENVN, Nantes),
- Monsieur Joël Hardy, Professeur à l'ENSAIA (INPL, Nancy),
- Monsieur François Laurent, Professeur à l'ENSAIA (INPL, Nancy),
- Monsieur Yves Le Roux, Maître de conférences à l'ENSAIA (INPL, Nancy).

Je n'oublie pas de remercier M. Christian Burvenich, Professeur et directeur du département de Physiologie, Biochimie, Biométrie de l'Université de Gand (Belgique) pour l'accueil dans son laboratoire et la collaboration fructueuse qui s'est développée. Merci aussi à toute l'équipe, Frederic, Kristel, Ann et Etienne pour l'expérience qu'ils m'ont apportée.

Ce travail a fait aussi l'objet d'une collaboration avec le laboratoire d'Immunologie de la faculté de médecine à Nancy. Je remercie le Professeur Gilbert Faure de m'avoir permis de mener à bien mon projet. Merci à Christine Prin Mathieu pour l'énorme quantité de travail effectuée.

Je remercie également le Professeur Lotte Larsen du Département de Sciences Alimentaires (Danemark) pour l'intérêt qu'elle a témoigné pour ce travail, pour les résultats obtenus en immunoblot et pour sa sympathie.

Un grand merci au personnel du domaine expérimental de la Bouzule. Je remercie Henri Guimont, directeur de la ferme expérimentale mais aussi François Dugny pour son sens de l'organisation et sa bonne humeur.





Mes remerciements vont également au personnel permanent de l'Unité de Recherche : Animal et Fonctionnalités des Produits Animaux : Christine Grandclaudon, Claire Hognon et Jean Michel Girardet pour leur aide précieuse. Merci à Catherine Larrière pour son efficacité et sa bonne humeur. Je la remercie ainsi que Stefan Jurjanz, Maître de Conférence à l'URAFPA, pour sa participation aux essais.

Merci également à tous les thésards du laboratoire UR AFPA pour leur soutien et nos nombreux échanges. Merci aussi à Fatima pour son encadrement technique et son efficacité.

Mon dernier remerciement est pour mes parents, ma famille ainsi que mes amis, qui ont toujours su être présent malgré la distance qui nous séparait, et à mon mari pour sa patience et ses encouragements constants qui m'ont permis de terminer ce travail dans les meilleures conditions possibles. Merci à toi.



**LISTE DES ABREVIATIONS**

AA : acide aminé  
 $\alpha_2$ -AC :  $\alpha_2$ -antichymotrypsine  
 $\alpha_2$ -AP :  $\alpha_2$ -antiplasmine  
 $\alpha_1$ -AT :  $\alpha_1$ -antitrypsine  
 $\alpha_2$ -Mg:  $\alpha_2$ -macroglobuline  
ANP : azote non protéique  
AOAH : acyloxyacyl hydrolase  
AP : activité de la plasmine  
BC : bleu de Coomassie  
C : rapport (%) de masse de bisacrylamide sur la masse d'acrylamide + bisacrylamide  
cel/mL : cellules par millilitre  
CAPS : acide 3-(cyclohexylamino)-1-propanesulfonique  
CFU-Ba : *colony forming unit basophile* (unite formant une colonie basophile)  
CFU-E: *colony forming unit erythrocyte* (unite formant une colonie érythrocytaire)  
CFU-Eo: *colony forming unit eosinophile* (unite formant une colonie éosinophile)  
CFU-GM: *colony forming unit granulocyte monocyte* (unite formant une colonie monocyttaire)  
CFU-Meg: *colony forming unit megacaryocyte* (unite formant une colonie mégacaryocytaire)  
CHAPS: sulfonate de 3-[(cyclohexylamino)-diméthylammonio]-1-propane  
CLHP: chromatographie liquide à haute performance  
CN : caséine  
CNS : *coagulase negative Staphylococcus* (Staphylococcus à coagulase négative)  
CS : cellules somatiques  
DC : dénombrement cellulaire  
DMEMc : complete Dulbecco's modified Eagle medium  
DMSO: diméthyl sulfoxyde  
EDTA: éthylènediaminetétracétate  
EGF: *epithelial growth factor* (facteur de croissance epithelial)  
EGPA: électrophorèse en gel de polyacrylamide  
FGF : *fibroblast growth factor* (facteur de croissance fibroblastique)  
FPLC : *fast protein liquid chromatography* (chromatographie liquide rapide des protéines)  
GB : globule blanc  
GM-CSF : *granulocyte-monocyte colony stimulating factor* (facteurs stimulant les colonies granulo-monocytaires)  
GMP: glycomacropéptide  
GR: globule rouge  
Hpro: hydroxyproline  
Ig: immunoglobuline  
IGF: *insulin-like growth factor* (facteur de croissance de type insuline)  
IL : interleukine  
LBP : *lipopolysaccharide binding protein* (protéines de liaison du lipopolysaccharide)  
LDH : lactate deshydrogénase  
Lf : lactoferrine  
LPS : lipopolysaccharide d'*E. coli*  
m/v : masse sur volume  
mCD14 : *membrane CD14* (CD14 membranaire)  
MM : masse moléculaire  
MMP : *matrix metalloproteinase* (métalloprotéase matricielle)



MPO : Myéloperoxydase.  
NK : *natural killer* (cellule tueuse naturelle)  
Ns : azote soluble  
*P* : erreur de type I de rejeter l'hypothèse nulle  
PA : *plasminogen activator* (activateur de plasminogène)  
PAI : *plasminogen activator inhibitor* (inhibiteur de l'activateur de plasminogène)  
PAI-1 : *endothelial cell type PAI* (PAI de type cellulaire)  
PBS : *phosphate buffer saline* (tampon phosphate salin)  
PGE : prostaglandine E  
PGD-S : prostaglandine D synthase  
PI : post-inoculation  
PI : post-infusion  
PM : poids moléculaire  
PMN : polymorphonucléaire neutrophile  
PMSF : phénylméthylsulfonyl fluoride  
PP : protéose-peptones  
PVDF : polyvinylidene fluoride  
QI : quartier infusé ou infecté  
Rho : rhodamine  
SAB : sérum albumine bovine  
sCD14 : *soluble CD14* (CD14 soluble)  
SDS : sodium dodecyl sulfate (dodécyl sulfate de sodium)  
Std : standard  
T: rapport en pourcentage de la masse d'acrylamide + bisacrylamide sur le volume du gel  
TCA : trichloroacetic acid (acide trichloroacétique)  
TEMED : N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine  
TFA : trifluoroacetic acid (acide trichloroacétique)  
TIMP : *tissular inhibitor of metalloprotease* (inhibiteur tissulaire des métalloprotéases)  
TNF : *tumor necrosis factor* (facteur de la nécrose tumorale)  
t-PA : tissue-type plasminogen activator (activateur de plasminogène de type tissulaire)  
Tris : trihydroxyl-méthyl-amino-méthane  
u-PA : *urokinase-type plasminogen activator* (activateur de plasminogène de type urokinase)  
u-PAR : *urokinase-type plasminogen activator receptor* (récepteur de l'activateur du plasminogène de type urokinase)  
v/v : volume/volume  
VL : vache laitière



# *Sommaire*





## SOMMAIRE

<b>AVANT PROPOS</b> .....	1
<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b> .....	3
<b>SOMMAIRE</b> .....	5
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	10
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	12
<b>INTRODUCTION</b> .....	16
<b>SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	18
<b>I. INFLAMMATION DE LA GLANDE MAMMAIRE ET CONSEQUENCES SUR LA COMPOSITION DU LAIT</b> .....	18
I. 1. Les mammites.....	18
I. 1. 1. Mammites cliniques.....	18
I. 1. 2. Mammites subcliniques.....	19
I. 2. Les mécanismes impliqués dans le changement de la composition du lait.....	19
I. 2. 1. Perte de la production et modification des synthèses de lait.....	19
I. 2. 2. Augmentation de la perméabilité de la barrière sang/lait.....	20
I. 2. 2. 1. Passage des composants du lait vers le sang.....	21
I. 2. 2. 2. Passage de composés du sang vers le lait.....	21
I. 2. 2. 3. Passage des cellules du sang vers le lait.....	22
I. 2. 3. Augmentation des activités protéolytiques.....	22
<b>II. MECANISMES DE DEFENSE ET REPONSES INFLAMMATOIRES DE LA GLANDE MAMMAIRE BOVINE</b> .....	23
II. 1. Les organes de production des cellules hématopoïétiques.....	23
II. 2. La défense cellulaire.....	23
II. 2. 1. Les polymorphonucléaires neutrophiles.....	24
II. 2. 1. 1. Origine, étapes de la maturation.....	24
II. 2. 1. 2. Morphologie et contenu des PMN.....	25
II. 2. 1. 3. Rôle des PMN sur le site de l'infection.....	25
II. 2. 2. Les phagocytes mononucléaires (monocytes et macrophages).....	27
II. 2. 2. 1. Rôle des macrophages dans le lait.....	28
II. 2. 3. Les lymphocytes.....	28
II. 2. 4. Autres cellules rencontrées dans le lait.....	29
II. 3. Mécanismes mis en jeu dans le cas des infections mammaire à <i>E. coli</i> .....	29
<b>III. LES PROTEINES DU LAIT ET LA CASEINOLYSE</b> .....	31
III. 1. Les caséines constituant la micelle.....	31
III. 1. 1. La caséine $\alpha_{s1}$ .....	31
III. 1. 2. La caséine $\alpha_{s2}$ .....	31
III. 1. 3. La caséine $\beta$ .....	31
III. 1. 4. La caséine $\kappa$ .....	32
III. 2. La micelle de caséine.....	32
III. 3. Les protéines du lactosérum.....	33
III. 3. 1. La $\beta$ -lactoglobuline.....	33
III. 3. 2. L' $\alpha$ -lactalbume.....	33
III. 4. Origine de la protéolyse dans le lait et sensibilité des caséines à cette protéolyse.....	34
III. 4. 1. Les sources endogènes de la protéolyse.....	34

III. 4. 1. 1. Système plasmine-plasminogène.....	34
III. 4. 1. 2. Sensibilité des caséines au système plasmine-plasminogène.....	35
III. 4. 1. 3. Les protéases des cellules somatiques.....	36
III. 4. 1. 3. 1. Les protéases à sérine.....	36
III. 4. 1. 3. 2. Les métalloprotéases.....	37
III. 4. 1. 3. 3. Les protéases à cystéines.....	38
III. 4. 1. 3. 4. Les protéases aspartiques.....	38
III. 4. 1. 4. Sensibilité des caséines aux enzymes des cellules somatiques.....	39
III. 4. 1. 5. Les sources exogènes de la protéolyse.....	39
III. 4. 1. 6. Sensibilité des protéines du lait aux protéases bactériennes pathogènes.....	40
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>41</b>
<b>MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>42</b>
I. RECAPITULATIF DES ESSAIS.....	43
II. MESURES EFFECTUEES DIRECTEMENT SUR L'ANIMAL.....	43
II. 1. Prélèvement des premiers jets en conditions aseptiques.....	43
II. 2. Mesure de la production et prélèvement du lait.....	43
III. ANALYSES.....	43
III. 1. Préparation des échantillons de lait.....	43
III. 2. Isolement des cellules somatiques du lait.....	43
III. 3. Prélèvement de sang.....	44
III. 4. Préparation des échantillons de sang.....	44
III. 5. Préparation des fractions protéiques.....	44
III. 5. 1. Les caséines.....	44
III. 5. 2. Les protéines du lactosérum.....	44
III. 5. 3. Les protéose-peptones.....	45
III. 6. Électrophorèse en gel polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium.....	45
III. 7. Mesures des activités protéolytiques.....	46
III. 7. 1. Activité protéolytique des leucocytes du sang et du lait.....	46
III. 7. 2. Dosage de l'activité de la plasmine.....	47
III. 7. 3. Mesure des activités protéolytiques dans le lait par zymographie.....	47
III. 8. Fractionnement azoté du lait.....	48
III. 9. Immunoblotting.....	49
III. 10. Electrotransfert des protéines.....	49
III. 11. Révélation des gels par bleu de Coomassie.....	50
III. 12. Séparation des caséines par FPLC.....	50
<b>CHAPITRE 1. La protéolyse dans le lait et caractérisation des peptides issus de la fraction protéose-peptones dans le cas d'une mammite expérimentale à <i>E. coli</i>.....</b>	<b>51</b>
I. PROTOCOLE EXPERIMENTAL.....	51
I. 1. Sélection des animaux.....	51
I. 2. Inoculation.....	52
I. 3. Prélèvement de lait.....	52
I. 4. Hydrolyse enzymatique des caséines par un lysat des cellules somatiques.....	52

I. 5. Analyse des données.....	53
II. RESULTATS.....	54
II. 1. Réponse clinique à <i>E. coli</i> .....	54
II. 2. Numération bactérienne et dénombrement cellulaire.....	54
II. 3. Activité de la plasmine.....	55
II. 4. composition protéique du lait.....	55
II. 4. 1. Les protéines du lactosérum.....	55
II. 4. 2. Les caséines.....	55
II. 4. 3. La fraction des protéose-peptones.....	56
II. 4. 3. 1. Variations quantitatives.....	56
II. 4. 3. 2. Variations qualitatives.....	56
II. 5. Potentiel caséinolytique des cellules somatiques.....	56
II. 6. Activités protéolytiques des PMN.....	57
II. 6. 1. Cytométrie de flux.....	57
II. 6. 2. Zymographie.....	57
II. 6. 2. 1. Activité protéolytique totale dans le lait.....	57
II. 6. 2. 2. Activité de la gélatinase dans le lait.....	57
II. 7. Maturité cellulaire.....	58
III. DISCUSSION.....	58
III. 1. Réponse clinique à l'inoculation d' <i>E. coli</i> .....	58
III. 2. Hypothèse sur la séquentialité de la protéolyse du lait.....	59
III. 2. 1. Les cellules somatiques.....	59
III. 2. 2. Numération bactérienne.....	59
III. 2. 3. L'activité de la plasmine.....	60
III. 2. 4. La fraction PP.....	60
III. 2. 5. Séquentialité.....	61
III. 3. Caséinolyse par les protéases leucocytaires.....	62
III. 4. Activité protéolytiques des PMN.....	62
III. 4. 1. Dans le sang.....	62
III. 4. 2. Dans le lait.....	63
III. 5. Activité totale des protéases dans le lait.....	63
III. 6. La maturité cellulaire.....	64
CONCLUSION.....	66
<b>CHAPITRE 2. Influence d'une inoculation d'<i>E. coli in vitro</i> dans un lait cru sur l'évolution de la composition du lait.....</b>	<b>68</b>
I. PROTOCOLE EXPERIMENTALE.....	68
I. 1. Cinétique de croissance d' <i>E. coli</i> dans du lait cru.....	68
I. 2. Cinétique de dégradation des caséines par les protéases d' <i>E. coli</i> .....	69
I. 2. 1. Préparation de l'extrait bactérien.....	69
I. 2. 2. Dégradation des caséines en solution par le surnageant bactérien.....	69
I. 3. Analyse des données.....	70
II. RESULTATS.....	70
II. 1. Origine de la protéolyse.....	70
II. 1. 1. Croissance bactérienne et valeur du pH.....	70

II. 1. 2. Activité de la plasmine.....	70
II. 1. 3. La fraction protéose-peptones.....	70
II. 1. 3. 1. Variation quantitative de la fraction PP.....	70
II. 1. 3. 2. Variation qualitative de la fraction PP.....	71
II. 1. 4. Activité de la collagénase.....	71
II. 2. Protéolyse et dégradation des caséines par le lysat bactérien.....	71
II. 2. 1. Evolution de la proportion en peptides insolubles à pH 4,6.....	71
II. 2. 2. Dégradation des caséines par les protéases d' <i>E. coli</i> .....	71
III. DISCUSSION.....	72
III. 1. Origine de la protéolyse.....	72
III. 1. 1. Croissance bactérienne et activité de la gélatinase.....	72
III. 1. 2. Activité de la plasmine.....	73
III. 1. 3. Teneur en fraction PP.....	73
III. 2. Evolution de la proportion en peptides insolubles à pH 4,6.....	75
III. 3. Dégradation des caséines en solution par le surnageant du lysat bactérien.....	75
CONCLUSION.....	77
<b>CHAPITRE 3 : Caractérisation des activités protéolytiques des cellules somatiques après l'infusion intramammaire du lipopolysaccharide (LPS) d'<i>E. coli</i></b> .....	78
I. PROTOCOLE EXPERIMENTAL.....	78
I. 1. Sélection des animaux.....	78
I. 2. Inoculation.....	78
I. 3. Prélèvement du lait et du sang.....	79
I. 4. Echantillon de cellules somatiques.....	79
I. 5. Séparation des neutrophiles selon le stade de maturité.....	79
I. 6. Immunoblotting.....	80
II. RESULTATS.....	81
II. 1. Signes cliniques de l'inflammation associée à l'infusion de LPS.....	81
II. 2. Dénombrement cellulaire.....	81
II. 2. 1. Dénombrement des leucocytes sanguins.....	81
II. 2. 2. Dénombrement en cellules somatiques du lait.....	81
II. 3. La fraction protéose-peptone.....	82
II. 4. Activité protéolytique des PMN.....	82
II. 4. 1. Activité protéolytique des cellules somatiques du sang.....	82
II. 4. 2. Activité protéolytique des surnageants des fraction cellulaires F1 et F2.....	82
II. 4. 3. Immunoblotting.....	82
III. DISCUSSION.....	83
III. 1. Recrutement des cellules immunitaires et teneur en PP.....	83
III. 2. Activité protéolytique des PMN.....	83
CONCLUSION.....	87

<b>DISCUSSION GENERALE</b> .....	88
APPORT DES MODELES <i>IN VIVO</i> D'INFECTION EXPERIMENTALE A <i>E. COLI</i> ET D'INFLAMMATION EXPERIMENTALE A LPS, ET DU MODELE <i>IN VITRO</i> D'INOCULATION EXPERIMENTALE DU LAIT DANS LA COMPREHENSION DE LA PROTEOLYSE.....	88
1. Réponse clinique, stimulation du système immunitaire et recrutement cellulaire lors de l'infection intramammaire à <i>E. coli</i> ou après infusion de LPS.....	89
2. Activités protéolytiques.....	90
2. 1. Activité de la plasmine.....	90
2. 2. Activité des protéases des cellules somatiques.....	91
3. La fraction PP.....	93
4. La séquentialité de la caséinolyse .....	95
<b>CONCLUSION GENERALE</b> .....	97
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	99
<b>PUBLICATIONS</b> .....	116
<b>RESUME</b> .....	117



**LISTE DES TABLEAUX**

**Tableau 1.** Evolution de la composition du lait dans le cas d'une mammite clinique.

**Tableau 2.** Variations maximales des teneurs en protéines solubles et en ions des laits dans le cas de mammites expérimentales induites par infusion expérimentale de LPS ou d'infection expérimentale d'*E. coli*.

**Tableau 3.** Composés enzymatiques et non enzymatiques présents dans les granules des granulocytes neutrophiles matures chez les bovins.

**Tableau 4.** Protéines antibactériennes des PMN bovins.

**Tableau 5.** Produits de sécrétion des macrophages.

**Tableau 6.** Propriétés des protéines de lait de vache selon Farrell (2004).

**Tableau 7.** Produits de la protéolyse des caséines par la plasmine.

**Tableau 8.** Caractéristiques des protéases d'origine endogène.

**Tableau 9.** Classification des métalloprotéases (MMP). Les MMP sont groupées en plusieurs classes en fonction de leurs structures.

**Tableau 10.** Produits de la protéolyse des caséines par les protéases des cellules somatiques.

**Tableau 11.** Localisation et propriétés des différentes protéases d'*Escherichia coli* (Chung, 1993, Maurizi, 1992).

**Tableau 12.** Récapitulatif des différentes analyses effectuées lors des trois essais.

**Tableau 13.** Séquençage amino-terminal des fragments P1, P2, E1, E2 et E3 trouvés dans la fraction PP et mis en évidence par EGPA-SDS.

**Tableau 14.** Séquençage amino-terminal des peptides P1, P2, E1, E2 et E3 trouvés dans la fraction PP et les sites de clivage des caséines.

**Tableau 15.** Sensibilité de dégradation des caséines exprimée en (%/h) par le lysat d'*E. coli*. Deux points portant une lettre identique dans chaque ligne ne diffèrent pas significativement. PI: post inoculation.

**Tableau 16.** Comparaison des réponses cliniques intervenant dans le phénomène d'inflammation de la glande mammaire dans les deux modèles de mammite *in vivo*.

**Tableau 17.** Variation pendant les mammites des concentrations des composants avec un effet activateur ou inhibiteur sur l'activité plasmine.





**Tableau 18.** Comparaison des valeurs d'IL-8, SAB et de LBP lors de la perméabilité de la barrière épithéliale au cours de mammites expérimentales à *E. coli* et à LPS.

**Tableau 19.** Comparaison des activités protéolytiques cellulaires au cours de modèles de mammites expérimentales *in vivo* à *E. coli* et à LPS et du modèle *in vitro* d'inoculation expérimentale de lait.



**LISTE DES FIGURES**

**Figure 1.** Mécanismes d'activations et différentes étapes de l'invasion des neutrophiles dans la glande mammaire d'après Diez-Fraile et al., 2002.

**Figure 2.** Diagramme récapitulatif de la protéolyse qui intègre l'ensemble des facteurs endogènes et exogènes.

**Figure 3.** Schéma de l'hématopoïèse (Revillard, 1998).

**Figure 4.** Schéma des différentes étapes de maturation des PMN (Bainton, 1971).

**Figure 5.** Photographie en microscopie électronique à transmission d'un polynucléaire neutrophile mature (humain) (Revillard, 1998).

**Figure 6 A.** Diagramme illustrant le phénomène de l'explosion respiratoire « Burst oxidation » au cours d'une mammite à *E. coli*.

**Figure 6 B.** Schéma représentant les mécanismes de destruction des bactéries par les protéines et les peptides antimicrobiens (PPA) des PMN (Levy, 2004).

**Figure 7.** Photographie en microscopie électronique à transmission d'*E. coli*. Représentation schématique de la structure interne d'*E. coli* (Hurlbert, 1999).

**Figure 8.** Diagramme représentant la molécule de lipopolysaccharide (LPS) de bactérie gram négative (Lanéelle et Asselineau, 1990).

**Figure 9.** Architecture de la micelle de caséine selon le modèle de Walstra et Jenness (1984).

**Figure 10.** Mécanismes de régulation de l'activité des MMP (Chantrain et DeClerck, 2002).

**Figure 11.** Schéma récapitulatif de la régulation de la caséinolyse endogène et exogène dans le lait.

**Figure 12.** Analyses effectuées sur le lait et le sang.

**Figure 13.** Evolution de la température rectale moyenne après inoculation intramammaire d'*Escherichia coli*.

**Figure 14.** Evolution de la production de lait après inoculation intramammaire d'*Escherichia coli*.

**Figure 15.** Evolution de la numération bactérienne (UFC) du lait du quartier infecté après inoculation intramammaire d'*Escherichia coli*.

**Figure 16.** Evolution du dénombrement cellulaire (DC) des laits des quartiers après inoculation intramammaire d'*Escherichia coli*.



**Figure 17.** Evolution de la concentration en leucocytes du sang après inoculation intramammaire d'*Escherichia coli*.

**Figure 18.** Evolution de l'activité de type plasmine dans les laits de quartier infectés après inoculation intramammaire d'*Escherichia coli*.

**Figure 19.** Valeur de la sérum albumine bovine (SAB) dans le lait infecté après inoculation intramammaire d'*Escherichia coli*. Les valeurs ont été mesurées par densitométrie sur un gel EGPA-SDS de lait écrémé.

**Figure 20.** Evolution de la composition des protéines dans le lait après inoculation intramammaire d'*Escherichia coli*. Les protéines ont été visualisées en électrophorèse EGPA-SDS.

**Figure 21.** Evolution de la teneur en protéose-peptones (PP) du lait de quartier infecté après inoculation intramammaire d'*Escherichia coli*.

**Figure 22.** Profil électrophorétique par EGPA-SDS des fractions représentatives de protéose-peptones isolées du lait à 0 h, 21 h et 24 h et mise en évidence de l'apparition des bandes électrophorétiques E1, E2, E3, P1 et P2 après inoculation intramammaire par *E. coli*.

**Figure 23.** Profil électrophorétique de caséinate de sodium mis en contact avec le lysat de cellules somatiques isolées dans le lait 12 h après infection intramammaire d'*E. coli* et incubé à 37 °C pendant 12 h.

**Figure 24.** Evolution des activités protéolytiques des PMN du sang et lait après infection intramammaire. Les activités moyennes des cathepsines, de la collagénase et de l'élastase ont été déterminées par cytométrie de flux.

**Figure 25.** Cinétique de l'activité protéolytique du lait après infection intramammaire d'*E. coli* en zymographie caséine.

**Figure 26.** Cinétique de l'activité gélatinolytique extracellulaire du lait après infection intramammaire d'*E. coli* en zymographie gélatine. Identification de la gélatinase par Western blot dans le lait après infection intramammaire par *E. coli*.

**Figure 27.** Evolution de la maturité des PMN du sang après infection intramammaire par *E. coli*. Les trois classes des PMN se distinguent en microscopie après coloration May-Grünwald et Giesma. PMN immatures, PMN à bandes et PMN matures.

**Figure 28.** Comparaison des profils de lait à 9 h après infection intramammaire par *E. coli* et de l'activité de la plasmine commerciale par zymographie caséine.

**Figure 29.** Echantillonnage et analyses effectuées à chaque prélèvement des différents laits.

**Figure 30.** Evolution de la croissance bactérienne de lait inoculé avec  $10^4$  ufc/mL après 24 h d'incubation à 37 °C.

**Figure 31.** Evolution du pH du lait témoin et du lait inoculé avec  $10^4$  ufc/mL d'*E. coli*, au cours de 24 h d'incubation à 37 °C.



**Figure 32.** Evolution de l'activité de type plasmine dans le lait inoculé avec  $10^4$  ufc/mL d'*E. coli* au cours de 24 h d'incubation à 37 °C et dans le lait témoin contenant 0,04 % de  $\text{NaN}_3$ .

**Figure 33.** Evolution de la teneur en protéose-peptones (PP) du lait inoculé avec  $10^4$  ufc/mL d'*E. coli* au cours de 24 h d'incubation à 37 °C et dans le lait témoin contenant 0,04 % de  $\text{NaN}_3$ .

**Figure 34.** Electrophorèse EGPA-SDS de la fraction protéose-peptones issue de lait inoculé par  $10^4$  ufc/ml d'*E. coli* et du lait contenant 0,01% d'azide de sodium au cours d'une cinétique de 24 h à 37 °C.

**Figure 35.** Cinétique de l'activité de la gélatinase du lait inoculé par  $10^4$  ufc/mL d'*E. coli* en zymographie gélatine.

**Figure 36.** Evolution du pourcentage des CN- $\gamma$  du lait inoculé par  $10^4$  ufc/mL d'*E. coli* et du lait témoin contenant 0,04 % de  $\text{NaN}_3$ .

**Figure 37.** Suivi par EGPA-SDS de la cinétique d'hydrolyse des CN- $\alpha_s$ , - $\beta$  et - $\kappa$ , par le lysat d'*E. coli*.

**Figure 38.** Effet du pH sur la précipitation thermique des protéines sériques dans un lait à pH acide (Cayot et Lorient, 1998).

**Figure 39.** Dégradation totale des caséines - $\alpha_s$ , - $\beta$  et - $\kappa$  incubées séparément avec (5 g/mL) de lysat d'*E. Coli* dans un tampon d'acétate de sodium 0,2 M (m/v), pH 7,2 contenant 0,04 %  $\text{NaN}_3$  à 37 °C pendant 24 h.

**Figure 40.** Schéma du gradient utilisé pour la séparation des cellules myéloïdes du sang. Le tableau correspond à la distribution des cellules myéloïdes en pourcent dans les deux fractions du gradient de Percoll. La fraction F1 contiendrait des cellules à bandes segmentées, et la fraction F2 contiendrait des myélocytes primaires et des métamyélocytes selon Van Merris et al. (2001).

**Figure 41.** Evolution de la température rectale moyenne et individuelle après l'infusion intramammaire de 10  $\mu\text{g}$  de LPS d'*E. coli*.

**Figure 42.** Evolution de la production de lait après l'infusion intramammaire de 10  $\mu\text{g}$  de LPS d'*E. coli*. Les productions totales par traite des quatre quartiers et du quartier infusé seul ont été représentées.

**Figure 43.** Evolution de la concentration en leucocytes du sang après l'infusion intramammaire de 10  $\mu\text{g}$  de LPS d'*E. coli*.

**Figure 44.** Evolution du dénombrement cellulaire (DC) du lait de quartier éprouvé après l'infusion intramammaire de 10  $\mu\text{g}$  de LPS d'*E. coli*.

**Figure 45.** Evolution de la teneur en protéose-peptones (PP) du lait du quartier infusé après l'infusion intramammaire de 10  $\mu\text{g}$  de LPS d'*E. coli*.





**Figure 46.** Cinétique de l'activité de la gélatinase des cellules somatiques du sang lysées, après l'infusion intramammaire de 10 µg de LPS d'*E. coli*. Les activités ont été visualisées en zymographie gélatine.

**Figure 47.** Activité de la gélatinase dans le lysat cellulaire et dans les fractions F1 et F2 prélevées du sang à T 0 et à T 12 après infusion intramammaire de 10 µg de LPS d'*E. coli*. Les activités protéolytiques ont été visualisées par zymographie gélatine.

**Figure 48.** Suivi par immunodétection de la présence de la cathepsine D et B dans le lactosérum et lait en utilisant des anticorps spécifiques pour la cathepsine D bovine et des anticorps spécifiques pour la cathepsine B bovine.

**Figure 49.** Suivi par immunodétection de la présence de la cathepsine D dans les cellules lysées et les surnageants des fractions F1 et F2 utilisant des anticorps spécifique de la cathepsine D bovine.

**Figure 50.** Proposition de schéma des différents intervenants dans le mécanisme de la régulation de la plasmine pendant l'inflammation.



*Introduction  
Générale*



## **INTRODUCTION GENERALE**

L'inflammation de la glande mammaire ou mammite, est une pathologie ayant une répercussion économique en élevage laitier. En plus de l'altération de la qualité hygiénique du lait, les mammites se traduisent par une augmentation du dénombrement cellulaire associée à une forte activité protéolytique dans le lait induisant une modification de l'aptitude du lait à la transformation. Si d'un point de vue pathologique, les mammites sont bien connues, les mécanismes de la protéolyse lors de l'inflammation ont été peu abordés.

Dans le lait, au cours de l'inflammation, le processus de la protéolyse est un système complexe faisant intervenir seul ou en interaction plusieurs acteurs : les cellules somatiques, le système plasmine-plasminogène et la bactérie responsable de l'inflammation.

Le dénombrement cellulaire du lait est une numération globale des cellules somatiques qui traduit mal la variabilité des types cellulaires rencontrés et de leurs équipements protéolytiques. Ces cellules somatiques sont essentiellement des polymorphonucléaires neutrophiles (PMN) et des macrophages qui ne présentent pas les mêmes potentiels enzymatiques et dont les proportions peuvent être variables au cours de l'inflammation (Owen et Campbell., 1999).

Le système plasmine-plasminogène bien étudié dans les laits à faible dénombrement cellulaire, représente l'origine majeure de la protéolyse (Andrews, 1983). Par contre, au cours de l'inflammation, ce système a été peu étudié même si de nombreux auteurs s'accordent pour le considérer comme un élément clé dans la régulation de la protéolyse (Andrews, 1983; Moussaoui et al., 2002).

Enfin, des travaux récents sur ce sujet ont majoritairement été réalisés sur des modèles d'inflammations expérimentales utilisant le LPS d'*E. coli* (Moussaoui et al., 2002), modèle dans lequel l'acteur bactérien n'est pas présent. Une meilleure connaissance du rôle des bactéries pathogènes dans les mécanismes de la protéolyse au cours de l'inflammation semble être nécessaire.

L'objectif de ce travail est de mettre en évidence le rôle des différents acteurs intervenant dans la protéolyse au cours d'une mammite, en se focalisant sur les interactions entre le système plasmine-plasminogène, les cellules somatiques et l'acteur bactérien.



Notre étude abordera trois questionnements :

- La description de la protéolyse dans un système complexe associant l'ensemble des facteurs endogènes (système plasmine/plasminogène, cellules somatiques) et exogènes (bactéries).
- Le rôle spécifique des bactéries dans la protéolyse.
- L'influence des différents stades de maturité des PMN dans la protéolyse du lait.

La démarche utilisée pour répondre à ces objectifs fait appel à trois modèles expérimentaux :

1. La description de la protéolyse dans le lait induite par l'ensemble des facteurs endogènes et exogènes est étudiée à l'aide du modèle d'infection expérimentale à *E. coli*, via la caractérisation des produits de dégradation de la caséinolyse (particulièrement la fraction PP).
2. Le rôle spécifique des bactéries est abordé à l'aide d'un modèle *in vitro* d'inoculation expérimentale du lait par la caractérisation du changement de composition du lait au cours de la cinétique de croissance d'*E. coli*.
3. Le dernier questionnement relatif à l'influence des stades de maturité des PMN dans la protéolyse du lait est renseigné par l'utilisation du modèle de mammité expérimentale à LPS.





*Synthèse  
Bibliographique*



## **CHAPITRE I**

### **I. INFLAMMATION DE LA GLANDE MAMMAIRE ET CONSEQUENCES SUR LA COMPOSITION DU LAIT**

#### **I. 1. Les Mammites**

La mammite peut se définir par l'état inflammatoire d'un ou de plusieurs quartiers de la mamelle quelle que soit l'origine traumatique, physique, chimique ou biologique. Par opposition sera considérée comme normale, une mamelle sans signe visible d'un état pathologique avec un lait exempt d'agents pathogènes et des caractéristiques cellulaires et physico-chimiques normales (Schepers *et al.*, 1997)

Dans l'espèce bovine, la mamelle est constituée de quatre quartiers indépendants vis-à-vis de l'infection. Le lait contenu dans ces quartiers est normalement sain. L'infection d'un quartier par un pathogène de la mamelle se fait principalement par voie ascendante, via le canal du trayon (Poutrel, 1992).

Une infection mammaire n'est due en général qu'à un seul micro-organisme. Les caractéristiques de l'infection, sa sévérité et sa persistance dépendent des micro-organismes impliqués (Poutrel, 1986).

Classiquement, on distingue trois types de symptômes :

1. des symptômes généraux, c'est-à-dire des modifications plus au moins importantes de l'état général telles une perte de l'appétit, une absence de rumination ou de la fièvre.
2. des symptômes locaux, qui s'observent au niveau de la mamelle et se traduisent par des signes classiques de l'inflammation.
3. des symptômes fonctionnels traduisant l'atteinte de la fonction de sécrétion et se manifestant par des modifications de la quantité et de la qualité du lait.

Deux grandes formes de mammites sont observées :

##### **I. 1. 1. Mammites cliniques**

Les mammites cliniques sont une inflammation très brutale de la mamelle, elles peuvent être aiguës ou subaiguës. La mamelle est alors extrêmement congestionnée, douloureuse, chaude et volumineuse. La sécrétion lactée est soit interrompue, soit très modifiée et présente alors un aspect séreux, aqueux ou hémorragique. Les mammites cliniques aiguës sont généralement dues à des entérobactéries, notamment *Escherichia coli*, et à *Streptococcus uberis*, présentes dans l'environnement (Poutrel, 1986). A priori, détectée par l'éleveur, le lait des quartiers



mammiteux est normalement écarté et n'influence donc théoriquement pas la composition du lait de tank.

### **I. 1. 2. Mammites subcliniques**

Lors des mammites subcliniques l'inflammation est modérée, elle ne présente aucun des signes précédemment évoqués : l'état général est normal, la mamelle cliniquement saine et le lait ne présente aucune modification macroscopique. Par contre l'examen cytologique et bactériologique du lait met en évidence une augmentation parfois considérable du nombre des polynucléaires. De même, son analyse biochimique révèle des modifications importantes de la composition du lait. Selon Nielsen (1995), un animal est considéré sain, si le lait des quatre quartiers présente une concentration cellulaire inférieure à 200 000 cell/mL pendant quatre traites consécutives. Cette donnée varie selon les auteurs. Une mammite subclinique sera considérée comme modérée si la concentration cellulaire du lait de quartier se situe entre 500 000 et 1 000 000 cell/mL et comme sévère si la concentration cellulaire dépasse le million de cellules par mL.

## **I. 2. Les mécanismes impliqués dans le changement de la composition du lait**

La présence dans la mamelle de germes pathogènes est le facteur majeur induisant une augmentation de la concentration cellulaire.

Les variations de la composition du lait et l'augmentation de la concentration cellulaire ont trois origines principales : une baisse des synthèses, une augmentation de la perméabilité de la barrière épithéliale sang-lait et une augmentation des activités enzymatiques.

### **I. 2. 1. Perte de la production et modification des synthèses de lait**

De nombreux composants du lait sont spécifiquement synthétisés par les lactocytes (cellules épithéliales mammaires). Sont trouvés les caséines, ainsi que diverses protéines, le lactose, les triglycérides constituant la matière grasse. Ainsi lors de l'inflammation de la glande mammaire, les disponibilités en substrat et en énergie peuvent être limitantes.

Silanikove et al. (2000) montrent que le fragment  $\beta$ -CN (f1-18) résultant de l'hydrolyse de la  $\beta$ -CN par la plasmine, est directement impliqué dans la baisse de synthèse des cellules épithéliales par blocage des canaux  $K^+$  sur la face apicale des cellules épithéliales.



Selon les travaux de Michelutti, (1998), la teneur en caséines baisse dans le lait dans le cas de l'infusion d'endotoxine d'*E. coli*. Cette diminution, a été attribuée à une baisse de synthèse générale, expliquée par une réponse systémique de la mamelle à l'endotoxine.

La synthèse du lactose est affectée à la fois par la disponibilité en glucose (source d'énergie et substrat) et par la diminution de synthèse des protéines notamment de l' $\alpha$ -lactalbumine (Massart-Leën *et al.* 1994). Une baisse de la teneur en citrate, excrété par les cellules épithéliales, est également observée en cas d'inflammation (Hamann et Krömker, 1997).

Les évolutions de la concentration en matière grasse et de la composition en triglycérides sont variables. Dans le cas de mammites cliniques, la quantité de matière grasse peut diminuer faiblement, mais cet effet peut être contrebalancé par la baisse de production qui entraîne une concentration de la matière grasse nouvellement synthétisée, notamment dans le cas des quartiers adjacents à un quartier enflammé. La baisse de la synthèse des triglycérides dans le lait de mammite serait associée à une réduction de l'activité de la déshydrogénase isocitrate (E.C. 1.1.1.42) (Massart-Leën *et al.* 1994).

Outre ces phénomènes liés à une baisse de l'aptitude aux synthèses des cellules sécrétrices, la baisse de sécrétion du lait par un quartier peut être directement due à l'altération de la perméabilité de l'épithélium sécréteur voire à la destruction des cellules sécrétrices par les leucocytes en cas de diapédèse prolongée (Sordillo *et al.*, 1997), ainsi que, par l'invasion des cellules sécrétrices par des bactéries comme *S. aureus* (Bayles *et al.*, 1998).

### **I. 2. 2. Augmentation de la perméabilité de la barrière sang/lait**

La réaction inflammatoire entraîne la formation d'un œdème et l'augmentation du flux sanguin au niveau du site de l'infection. Le sang affluant transporte des composants pouvant interagir biochimiquement avec la barrière épithéliale, comme des enzymes solubles et les cellules leucocytaires.

Le passage du sang vers le lait des granulocytes neutrophiles se fait grâce à la libération d'enzymes lysosomales, d'hydrolases acides et d'autres produits telles que les collagénases qui endommagent indirectement les tissus, surtout après la mort des leucocytes (Targowski, 1983). Ils peuvent être responsable directement de la formation de "trous" dans la barrière

**Tableau 1.** Evolution de la composition du lait dans le cas d'une mammite clinique.

<b>Composé</b>	<b>Mammite clinique à <i>E. coli</i></b>
<p><b>Réponse cellulaire</b></p> <p>Cellules somatiques</p> <p>PMN</p> <p>Macrophages</p> <p>Lymphocytes</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• x 7,7 à 436 (Michelutti <i>et al.</i>, 1999)</li> <li>• x 260 (Vangroenweghe <i>et al.</i>, 2004)</li> <li>• x 13 (Riollet <i>et al.</i>, 1999)</li> <li>• -98% (Riollet <i>et al.</i>, 1999)</li> <li>• -89% (Riollet <i>et al.</i>, 1999)</li> </ul>
<p><b>Activité sécrétoire</b></p> <p>Production de lait (L/24h/Quartier)</p> <p>Lactose</p> <p>Caséines</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• -82% (Vangroenweghe <i>et al.</i>, 2004)</li> <li>• -52% (Vangroenweghe <i>et al.</i>, 2004)</li> <li>• -17% (Michelutti <i>et al.</i>, 1999)</li> </ul>
<p><b>Perméabilité de la barrière sang-lait</b></p> <p>SAB</p> <p>K<sup>+</sup></p> <p>Na<sup>+</sup></p> <p>Cl<sup>-</sup></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• x 7 (Vangroenweghe <i>et al.</i>, 2004)</li> <li>• -40% (Vangroenweghe <i>et al.</i>, 2004)</li> <li>• x 2 (Vangroenweghe <i>et al.</i>, 2004)</li> <li>• x 2,3 (Vangroenweghe <i>et al.</i>, 2004)</li> </ul>
<p><b>Activités protéolytiques</b></p> <p>Plasmine</p> <p>collagénase</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• x 7 (Moussaoui <i>et al.</i>, 2002)</li> <li>• +2433% (Raulo <i>et al.</i>, 2002)</li> </ul>



épithéliale ou au niveau des cellules épithéliales individuelles par destruction de la membrane cytoplasmique (Nickerson & Pankey, 1984).

#### **I. 2. 2. 1. Passage des composants du lait vers le sang**

Plusieurs composants du lait synthétisés exclusivement par les lactocytes peuvent être retrouvés dans le sang dans le cas de mammite aiguë par une fuite des composés du lait vers le sang dans des conditions inflammatoires extrêmes.

Ainsi, le lactose de faible poids moléculaire est capable de passer de la glande mammaire à la circulation sanguine. De la même façon, après infusions d'endotoxine bactérienne, des caséines et de l' $\alpha$ -lactalbumine ont été retrouvées dans le sang (MacFadden et al., 1988). Ainsi, les protéines et autres composants du lait peuvent passer dans le sang par les mêmes voies utilisées par les leucocytes pour passer dans le lait (Tableau 1), ce passage apparaît très minoritaire en comparaison avec le passage sang-lait (McFadden et al., 1988).

#### **I. 2. 2. 2. Passage de composés du sang vers le lait**

La sérum albumine bovine (SAB), non synthétisée par les lactocytes, est un indicateur de la perméabilité de la barrière épithéliale dans le sens sang-lait. En cas d'inflammation, la teneur en SAB augmente de façon très variable dans le lait des quartiers éprouvés selon les essais de mammites expérimentales (Tableau 2). Ces différences sont également observées pour les immunoglobulines IgG1, IgG2 et IgM, la teneur en IgG1 étant celle qui augmente le plus dans le cas de mammite à *E. coli* (Caffin et Poutrel, 1988).

Chez la vache saine, les ions  $\text{Cl}^-$  et  $\text{Na}^+$  sont plus concentrés dans le sang que dans le lait, et inversement pour les ions  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$  et  $\text{PO}_4^{3-}$ . L'existence de ces gradients d'ions est liée à l'imperméabilité de l'épithélium sécréteur, d'une part par l'existence des jonctions serrées entre les cellules, et d'autre part à la présence de canaux ioniques au niveau de la membrane plasmique permettant le passage intracellulaire des ions (Shennan et Peaker, 2000).

La variation des concentrations en ions au cours des mammites reflètent les changements de perméabilité de la mamelle (Tableau 1): les teneurs du lait en ions chlorure et sodium augmentent (Le Roux *et al.*, 1995a) alors que les teneurs en ions calcium, phosphore et potassium diminuent (Munro et al., 1984).

**Tableau 2.** Variations maximales des teneurs en protéines solubles et en ions des laits dans le cas de mammites expérimentales induites par infusion expérimentale de LPS ou d'infection expérimentale d'*E. coli*.

Teneurs des composés	Quartier témoin	Quartier éprouvé	Conditions et références
IgG1 (g/L)	0,56 0,24 ND	1,35 0,67 2,5 à 3,95	100 µg LPS (Guidry et al., 1983) 10 µg LPS <i>E. coli</i> ; 10 <sup>4</sup> UFC (Rainard et Caffin, 1983)
IgG2 (g/L)	0,24 0,08 ND	1,46 0,59 2,5 à 4,4	100 µg LPS (Guidry et al., 1983) 10 µg LPS <i>E. coli</i> ; 10 <sup>4</sup> UFC (Rainard et Caffin, 1983)
IgM (g/L)	ND	0,9 à 1,5	<i>E. coli</i> ; 10 <sup>4</sup> UFC (Rainard et Caffin, 1983)

De nombreux composés peuvent passer du sang au lait en profitant de l'augmentation de la perméabilité de la barrière épithéliale (protéases, acides gras libres). L'imperméabilité pourrait se rétablir différemment selon la nature des lésions occasionnées par l'inflammation. Ainsi McFadden et al., (1988) ont rapporté que les lésions au niveau des cellules épithéliales commençaient à se refermer dès 15 à 18 h après une infection à *E. coli*.

### **I. 2. 2. 3 Passage des cellules du sang vers le lait**

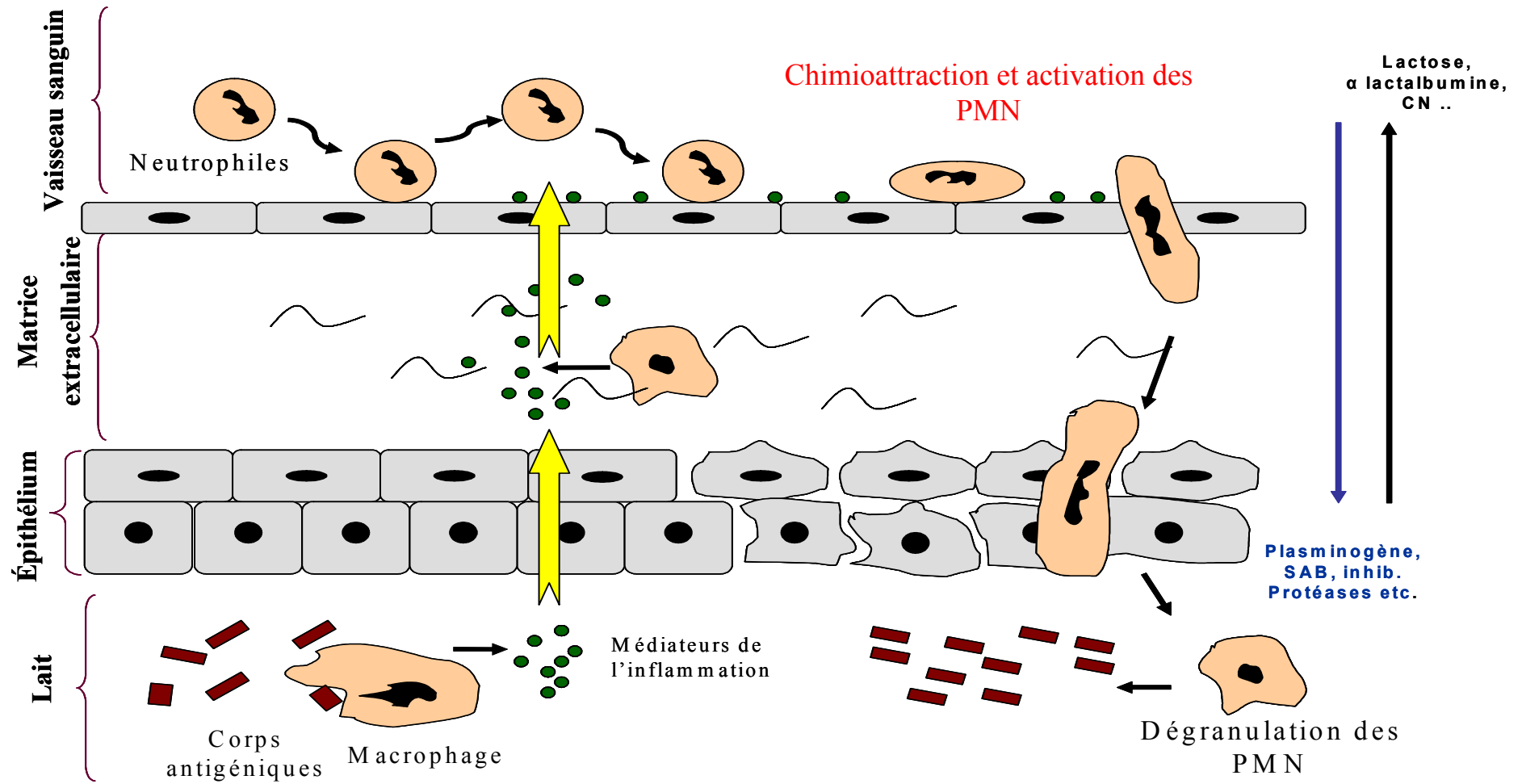
Dans le lait de quartiers non infectés, les cellules somatiques prédominantes sont les macrophages (35%) suivi par les neutrophiles (26%), les lymphocytes (24%) et les cellules épithéliales (15%) (Paape *et al.*, 1991). A la suite d'une infection, le nombre de neutrophiles augmente dans la région entourant la glande mammaire. Les neutrophiles migrent dans le lait où ils expriment leur potentiel bactéricide. Ainsi, un grand nombre de PMN sont recrutés dans le compartiment lait par l'intermédiaire de facteurs chimiotactiques afin de détruire les bactéries (Tableau 1, Figure 1) (Martinet et Houdebine, 1993 ; Riollet *et al.*, 1999).

### **I. 2. 3. Augmentation des activités protéolytiques**

Dans le lait la protéolyse a deux origines principales : bactérienne ou native. La protéolyse d'origine microbienne (protéolyse exogène) a surtout été étudiée dans le cas de contamination du lait après la traite (notamment par la flore psychrotrophe). La protéolyse induite par ce type de flore provoque une dégradation des caséines préférentiellement dans l'ordre  $\kappa \gg \beta > \alpha$  (Fairbairn & Law, 1986 ; Grieve & Kitchen., 1985) ; elle n'est significative, que pour des contaminations supérieures à  $10^6 - 10^7$  germes/mL (Guinot-Thomas *et al.*, 1995). Par contre, les effets spécifiques et directs des protéases des bactéries pathogènes pour la mamelle dans la protéolyse du lait ont été très peu étudiés (Figure 2).

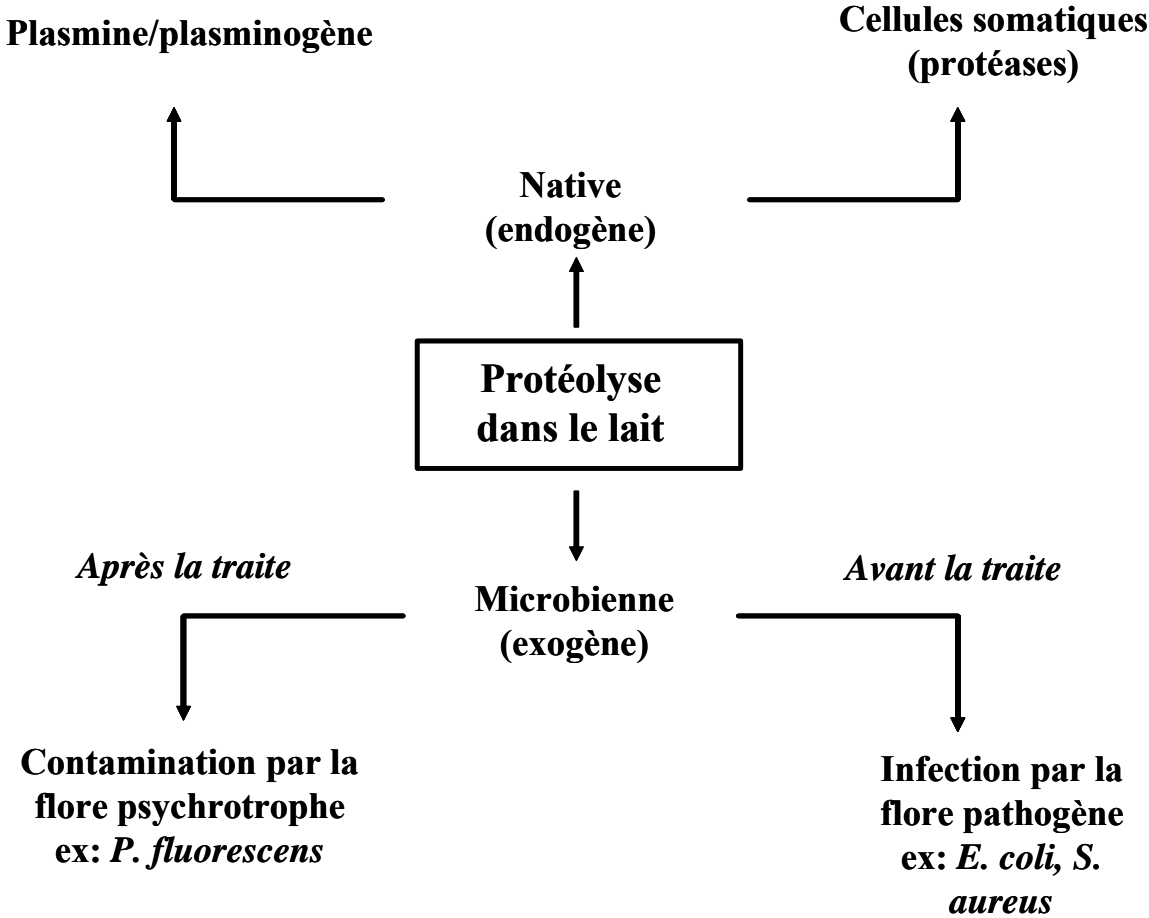
La protéolyse endogène ou native est due d'une part aux protéases venant directement du sang, et notamment la plasmine reconnue comme étant responsable de l'essentiel de la protéolyse des caséines dans le lait à faible concentration cellulaire (Andrew, 1983), et d'autre part, la protéolyse d'origine cellulaire. Cette protéolyse a été mise en évidence, *in vitro*, indépendamment des autres acteurs enzymatiques intervenant dans le lait sur les différents types de caséines (Moussaoui et al., 2002, 2003).

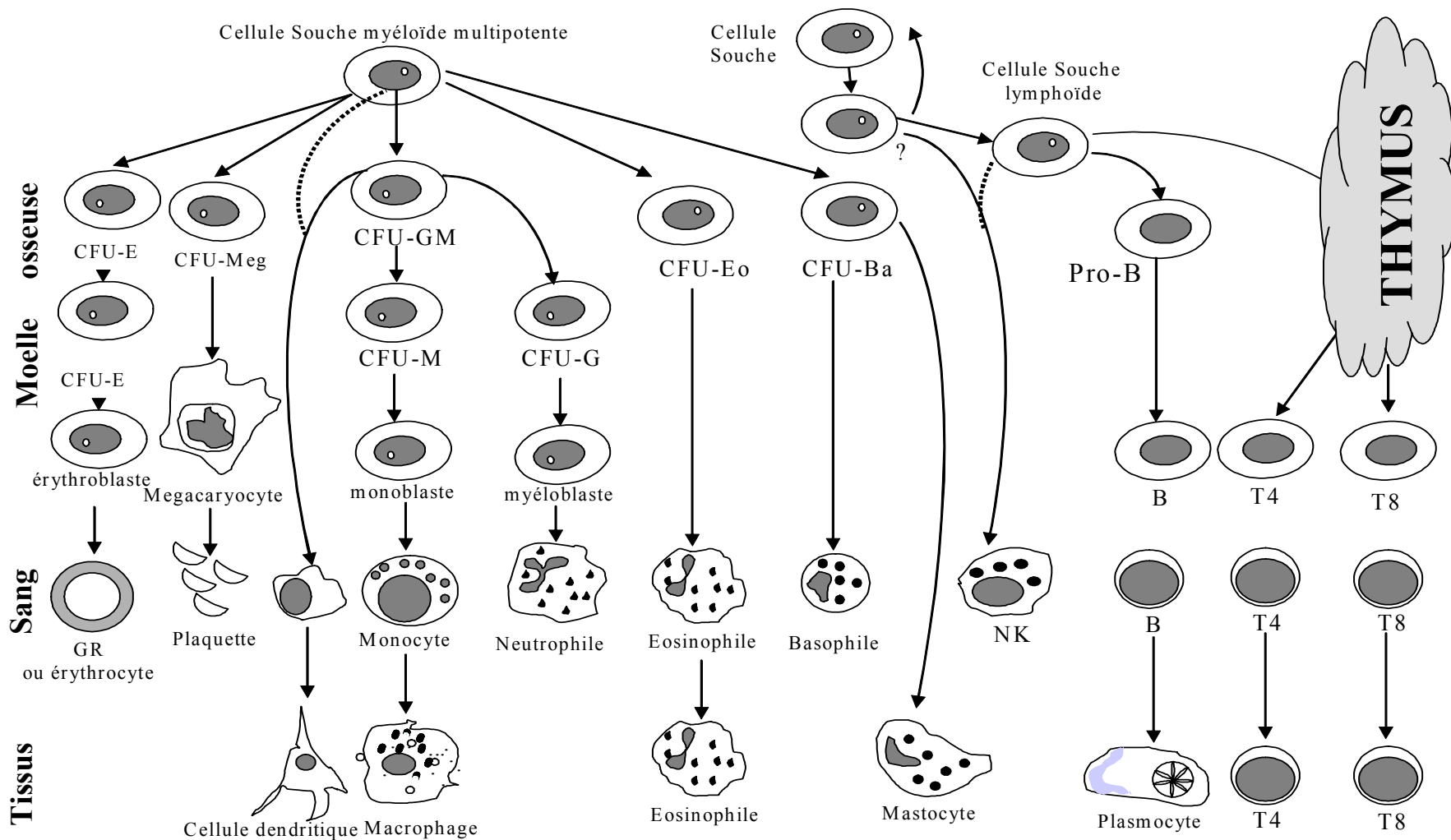
## ACTIVATION PROGRESSIVE



**Figure 1.** Mécanismes d'activations et différentes étapes de l'invasion des neutrophiles dans la glande mammaire d'après Diez-Fraile et al., 2002. PMN = polymorphonucléaire neutrophile.

**Figure 2.** Diagramme récapitulatif de la protéolyse qui intègre l'ensemble des facteurs endogènes et exogènes.





**Figure 3.** Schéma de l'hématopoïèse. Ba=basophile; CFU=colonie formant unité; E=érythroblaste; Eo=Eosinophile;GM=granulocyte-monocyte; GR=globule rouge; M=monocyte; Meg=mégacaryocyte; NK=natural killer ou cellule tueuse; Pro B=progéniteur lymphocyte B (Revillard,1998).

## CHAPITRE II

### II. MECANISMES DE DEFENSE ET REPONSES INFLAMMATOIRES DE LA GLANDE MAMMAIRE BOVINE

#### II. 1. Les organes de production des cellules hématopoïétiques

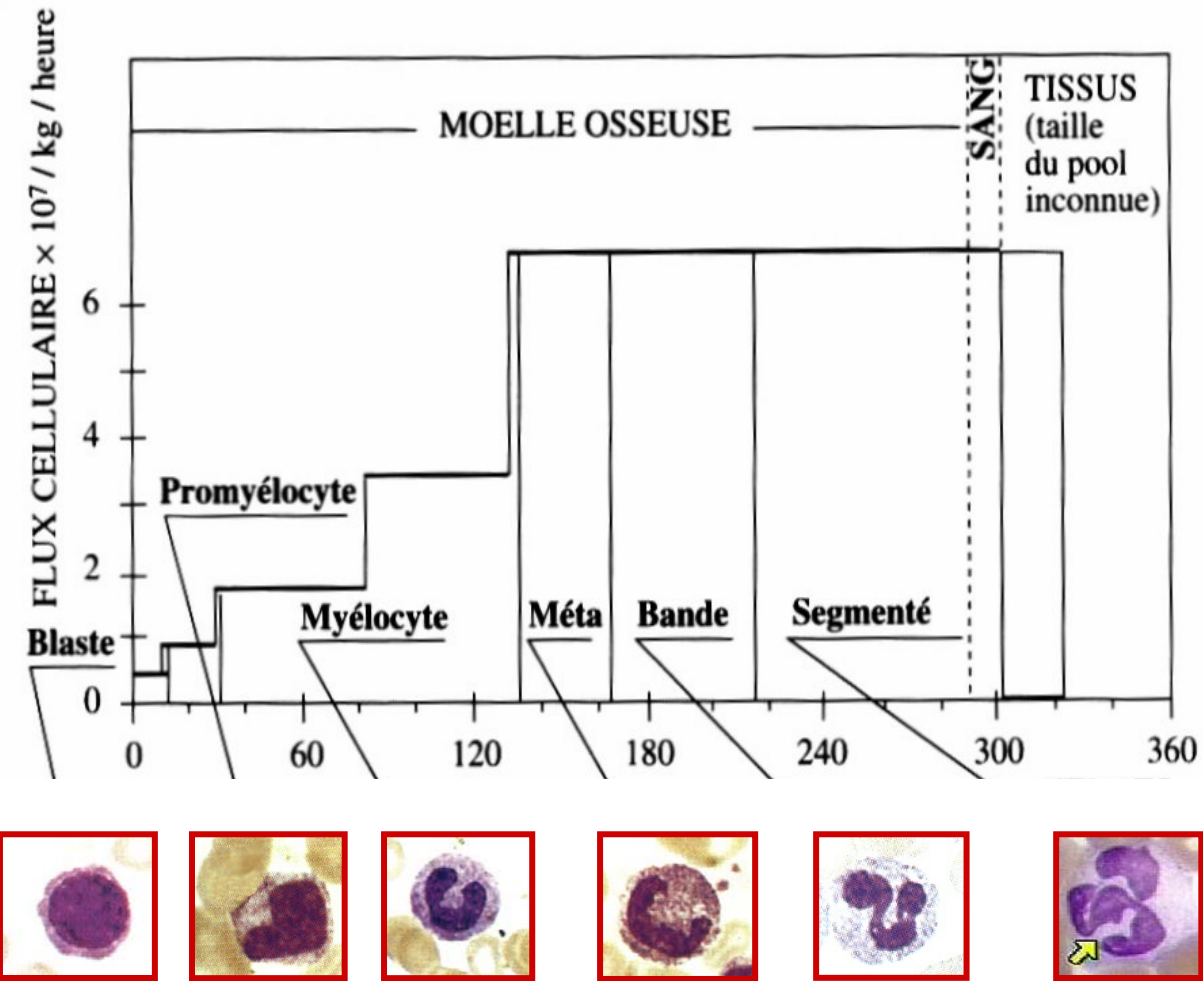
La différenciation des cellules du système immunitaire au niveau des trois compartiments de l'organisme est présente dans la figure 3.

Le système immunitaire a pour fonction d'assurer la protection de l'organisme contre les agressions. Son fonctionnement repose sur des cellules immunocompétentes, qui appartiennent à deux lignées de cellules sanguines, la lignée lymphoïde et la lignée myéloïde. L'hématopoïèse est caractérisée par des étapes de différenciation, définies par des modifications phénotypiques. Certaines cellules mononucléées de la moelle osseuse et du sang, cultivées *in vitro* en milieu semi-solide peuvent donner des colonies clonales de granulocytes ou polynucléaires et de monocytes. Ce progéniteur commun aux deux lignées est communément appelé CFU-GM (*Colony Forming Unit Granulocyte Monocyte*). Une colonie mixte peut être obtenue à partir d'une seule cellule. Celle-ci répond *in vivo* et *in vitro* à plusieurs cytokines : IL3 (interleukine 3) et GM-CSF (*Granulocyte Monocyte-Colony Stimulating Factor*). Cette cellule perd ensuite son aptitude à donner des monocytes et devient monopotente. Elle passe ensuite au stade CFU-G (*Colony Forming Unit Granulocyte*) dont la maturation en granulocytes neutrophiles nécessite le facteur G-CSF (*Granulocyte Colony Stimulating Factor*) (Vainchenker, 1992).

#### II. 2. La défense cellulaire

Les cellules somatiques du lait sont constituées de différents types cellulaires qui sont en très grande majorité des leucocytes, et notamment des granulocytes neutrophiles, des macrophages et des lymphocytes. Après que les bactéries ont pénétré le canal de trayon, les cellules résidentes et les cellules nouvellement recrutées dans la mamelle vont jouer un rôle pivot dans le contrôle de l'infection. Les bactéries agissent sur le recrutement des leucocytes directement ou indirectement par l'intermédiaire de facteurs chimiotactiques, tels que les entérotoxines ou les composés de la paroi bactérienne. Si les bactéries sont capables de résister à la première réponse leucocytaire, alors l'inflammation de la glande mammaire continue avec la migration des cellules somatiques à travers les cellules épithéliales sécrétrices. Différentes études ont montré que la sévérité et la persistance d'une mammite sont

Figure 4. Schéma des différentes étapes de maturation des PMN (Bainton, 1971).





liées à la rapidité de la réponse migratoire des leucocytes et à l'activité bactéricide des cellules sur le site de l'infection (Sordillo et al., 1997).

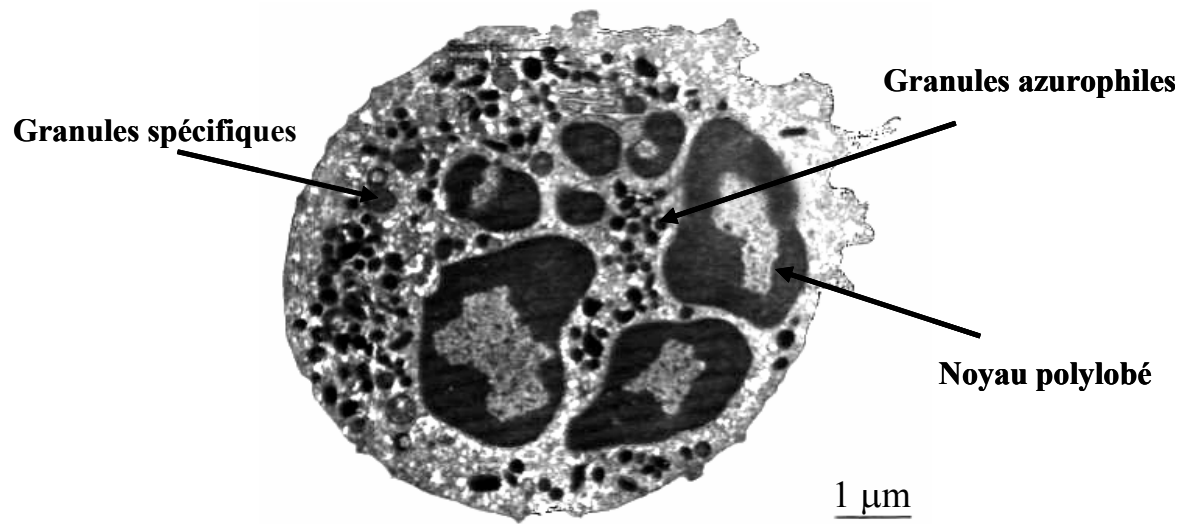
### **II. 2. 1. Les polymorphonucléaires neutrophiles**

Les granulocytes ou les polymorphonucléaires neutrophiles (PMN) constituent la première ligne de défense contre les pathogènes, après leur pénétration dans la mamelle, en les ingérant et en les détruisant par phagocytose. Le PMN n'est pas le type leucocytaire majoritaire du sang chez les bovins : le sang contient entre 600 et 4000 PMN par  $\mu\text{L}$  (2000/ $\mu\text{L}$  en moyenne), ce qui représente 15 à 45 % des leucocytes sanguins (Jain, 1993). Dans le lait d'un quartier non infecté, les PMN représentent 3 à 25 % des cellules somatiques ; en cas d'infection, ils deviennent majoritaires et peuvent dépasser 90 % (Sordillo et al., 1997 ; Paape et al., 2003).

#### **II. 2. 1. 1. Origine, étapes de la maturation**

Les cellules de la lignée granulocytaire se forme dans la moelle osseuse. Cinq divisions surviennent entre les trois premiers stades de maturation (myéloblaste, promyélocyte et myélocyte) (figure 4). Après le stade de myélocyte, la cellule n'est plus capable de mitose. Cette maturation dure environ deux semaines durant lesquelles sont élaborées de nombreuses protéines empaquetées dans les différentes populations granulaires (Jains, 1993 ; Revillard, 1998). Il faut 4 à 6 jours pour qu'un PMN mature migre de la moelle osseuse vers le sang chez les bovins. Une fois dans le sang, les PMN ont une durée de demi-vie courte de l'ordre de  $9 \pm 3$  h chez les ruminants. Ils sont répartis de manière assez égale entre le compartiment circulant et le compartiment marginal (la rate) (Jain, 1993). Ce sont les premières cellules à migrer du sang vers les tissus du fait de leur grande capacité à se déformer et à se mouvoir à l'aide de pseudopodes. Ce phénomène de la diapédèse est unidirectionnel et est orienté le long d'un gradient chimique, il a lieu sous l'action de nombreux facteurs chimioattractifs, comme des composés du complément (C5a), divers lipopolyosides et le leucotrène B4 (Jain, 1993 ; Sordillo et al., 1997 ; Gougerot-Pocidallo, 2002 ; Paape et al., 2003). Plusieurs études montrent l'existence d'une production locale des cytokines inflammatoires pendant l'infection, ceci suggère leur implication dans le recrutement des cellules immunitaires dans le site inflammatoire. La durée de survie des leucocytes dans les tissus est de deux à trois jours mais cette période est considérablement réduite dans les conditions pathologiques (Jain, 1993).

**Figure 5.** Photographie en microscopie électronique à transmission d'un polynucléaire neutrophile mature (humain) (Revillard, 1998).



### **II. 2. 1. 2. Morphologie et contenu des PMN**

Les PMN matures sont des cellules différenciées qui ne peuvent pas se multiplier. Elles ont un diamètre de 7 à 10  $\mu\text{m}$  dans le lait de vache (McDonald et Anderson, 1981). Le rapport nucléo-plasmique est faible (environ 0,3), le noyau est formé de masses arrondies de contour plus au moins régulier et reliées par des filaments d'épaisseur inégale (Figure 5). Les PMN immatures se reconnaissent au faible nombre de lobes voire à l'absence de segmentation. L'appareil de Golgi est rudimentaire, et le PMN ne serait pas capable de reconstituer ses granulations quand son stock s'est épuisé au cours de phénomènes de phagocytose ou de dégranulation (Paape et al., 2003). Il existe différents types de granules qui caractérisent la maturation des PMN : primaire ou azurophile, secondaire ou spécifique, tertiaire ou à gélatinase (Tableau 3). Chaque type de granule exprime un marqueur spécifique avec respectivement, la myéloperoxydase, la lactoferrine et la gélatinase ou la collagénase IV; chaque marqueur est lui-même spécifique de l'étape de maturation cellulaire (Faurischou et Borregaard, 2003). Les protéases à sérine (élastase et cathepsine G) sont exprimées dans les granules azurophiles à des stades très précoces de type promyélocyte et ceci jusqu'au stade métamyélocyte (Takeuchi et al., 1987). Les métalloprotéases comme les collagénases sont exprimées au niveau des granules à gélatinase à partir de stades plus tardifs notamment par des métamyélocytes et les cellules à bande (Owen et Campbell, 1999). Les protéases acides comme les cathepsines B, C, D, H et L sont localisées au niveau de lysosomes (Tokunaga et al., 1996).

### **II. 2. 1. 3. Rôle des PMN sur le site de l'infection**

Les PMN constituent une des premières lignes de défense contre les agents pathogènes. Le PMN joue notamment un rôle critique dans la défense de l'organisme contre les infections bactériennes et fongiques. Le PMN pourrait également jouer un rôle protecteur dans certaines infections virales. Les propriétés antivirales des défensines expliquent peut être l'activité virulicide des PMN (Paape et al. 2003). Les étapes conduisant à la destruction des bactéries par les PMN sont très souvent imbriquées. Ces étapes font intervenir l'adhérence du PMN à la cellule endothéliale, le déplacement vers le site infectieux, le contact avec la bactérie suivie de phagocytose ou de bactéricidie par des mécanismes dépendants ou indépendants de l'oxygène (Gougerot-Pocidalò, 2002).

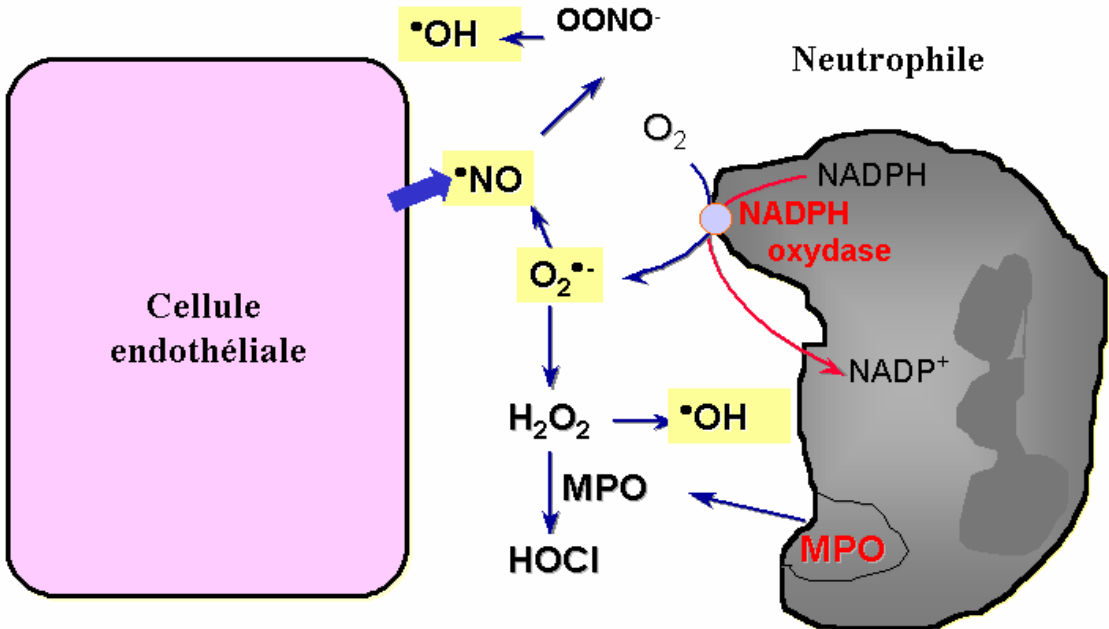
Sur le site de l'infection, le rôle des PMN est de phagocyter et de tuer les bactéries pathogènes. L'aptitude à la phagocytose des PMN du sang bovin est augmentée par la mise en

**Tableau 3.** Composés enzymatiques (en gras) et non enzymatiques présents dans les granules des granulocytes neutrophiles matures chez les bovins.

Granules primaires	Granules secondaires	Granules tertiaires
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Myéloperoxydase</b></li> <li>• <b>Protéines cationiques</b></li> <li>• <b>Lysozyme</b></li> <li>• <b>Protéases acides cathepsine B et D</b></li> <li>• <b>Protéases neutres</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Cathepsine G</b></li> <li>- <b>Elastase</b></li> <li>- <b>Collagénase non spécifique</b></li> <li>- <b>Protéinase 3</b></li> </ul> </li> <li>• Phosphatase acide</li> <li>• Mucopolysaccharides sulfatés</li> <li>• Défensines</li> <li>• Arylsulfatase</li> <li>• Estérase chloroacétate</li> <li>• Enzymes hydrolytiques acides <ul style="list-style-type: none"> <li>- <math>\beta</math>-Galactosidase</li> <li>- <math>\beta</math>-Glucuronidase</li> <li>- <math>\beta</math>-Glycerophosphatase</li> <li>- 5'-Nucléosidase</li> <li>- <math>\alpha</math>-Mannosidase</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Phosphatase alcaline</b></li> <li>• <b>Lysozyme</b></li> <li>• <b>Collagénase spécifique</b></li> <li>• <b>Activateurs du plasminogène</b></li> <li>• Lactoferrine</li> <li>• Aminopeptidase</li> <li>• Facteur inactivateur du C5</li> <li>• Phospholipase A2</li> <li>• Transcobalamine I</li> <li>• Récepteurs membranaires de l'adhésion leucocytaire</li> <li>• Histaminase</li> <li>• Récepteurs pour le CR3, CR3bi, et le cytochrome b558 de la laminine</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Cathepsine B</b></li> <li>• <b>Cathepsine D</b></li> <li>• <b>Gélatinase</b></li> <li>• Phosphatase acide</li> <li>• Arylsulfatase B</li> <li>• <math>\beta</math>-Glycérophosphatase</li> <li>• Mucosubstance acide</li> </ul>

d'après Jain, 1993

**Figure 6 A.** Diagramme illustrant le phénomène de l'explosion respiratoire « Burst oxidation » au cours d'une mammite à *E. coli*.



MPO : Myélopéroxydase

**Figure 6 B.** Schéma représentant les mécanismes de destruction des bactéries par les protéines et les peptides antimicrobiens (PPA) des PMN (Levy, 2004).

1° : dégranulation des neutrophiles dans le phagolysosome

2° : dégranulation des neutrophiles dans l'espace extracellulaire ainsi que dans le phagolysosome

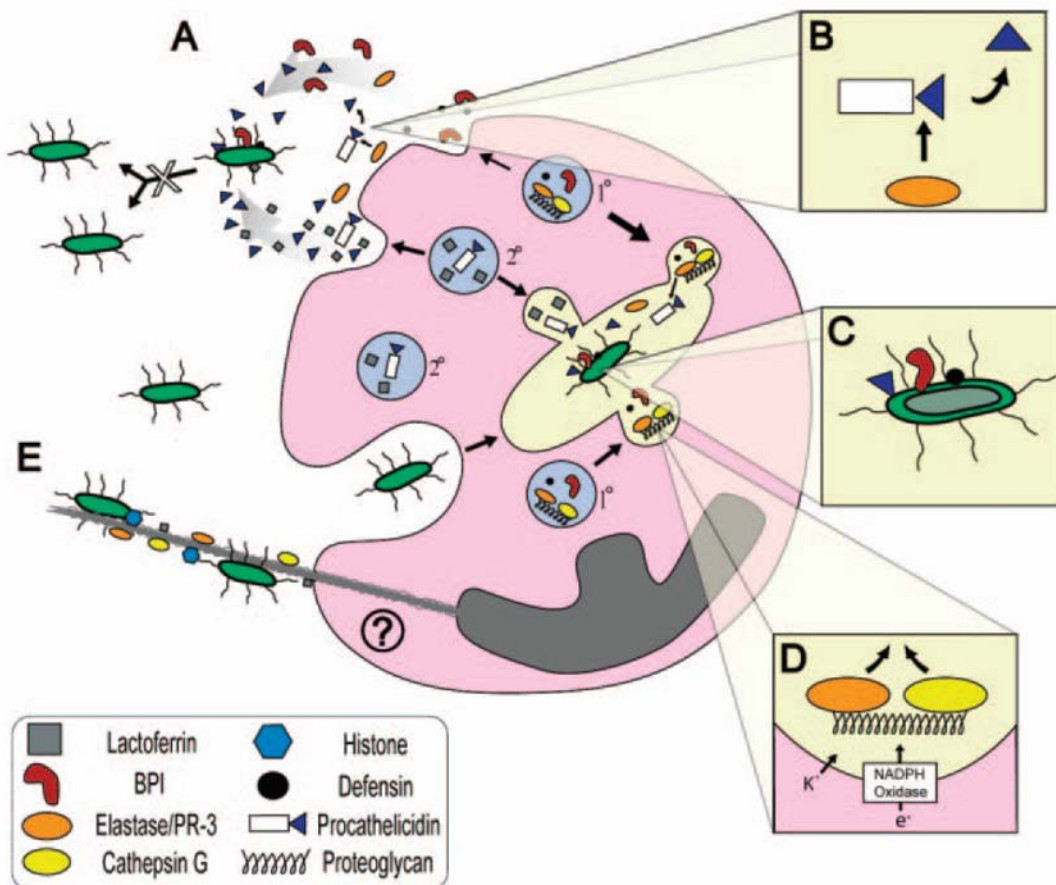
A : Action extracellulaire des PPA.

B : Clivage et libération des PPA.

C : Attaque synergétique des PPA tel que BPI, défensines sur la membrane bactérienne.

D : Réduction du la NADPH, passage des ions  $K^+$ , de l'élastase et de la Cathepsine G à travers la membrane du phagolysosome causant l'attaque protéolytique de la cible bactérienne.

BPI: Bactericidal permeability increasing protein.



présence avec l'interféron- $\gamma$ , le facteur  $\alpha$  de nécrose des tumeurs (TNF-  $\alpha$ ) et l'interleukine-1  $\alpha$  (Semnani et al., 1993). Le principal mécanisme de destruction des bactéries est oxygène dépendant via le phénomène de "l'explosion respiratoire" ou "Burst oxidation" (augmentation du métabolisme oxydatif), qui produit les radicaux hydroxyles et oxygénés. Après leur ingestion, les bactéries sont tuées par l'action des ions superoxyde ( $O_2^-$ ) et du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). Cette activité respiratoire oxydative est réduite chez les PMN qui viennent d'être libérés de la moelle osseuse (Figure 6) (Paape et al., 1991 ; Sordillo et al., 1997). De plus, la concentration en oxygène du lait est environ 100 fois plus faible que dans le sang, et cette faible présence inhibe la production du peroxyde d'hydrogène, ce qui limite l'efficacité de ce système antimicrobien dans le lait (Sordillo et al., 1997). La phagocytose (diapédèse, ingestion et stimulation) est un mécanisme consommateur d'énergie, et les PMN utilisent la voie métabolique des hexoses monophosphates pour oxyder le glucose en  $CO_2$  et en pentose. Le lait contenant du glucose en faible concentration et le fait que les leucocytes ne sont pas capables d'utiliser le lactose comme source d'énergie, rend les leucocytes du lait dépendants de leur réserve intracellulaire en glycogène (Targoski, 1983). De plus, les phagocytes du lait ou du colostrum ingèrent des globules gras (Poutrel, 1986 ; Paape, 1975, 1977b, 2000), de la caséine (Dulin et al., 1988 ; Russell et al., 1977) ou des débris cellulaires. C'est pourquoi dans le lait, les neutrophiles comme les macrophages sont moins efficaces que dans le sang pour accomplir la phagocytose (Outteridge et Lee, 1981 ; Paape et al., 1981 ; Dosogne et al., 2001). Cette efficacité réduite des PMN du lait pourrait expliquer qu'ils doivent être en grand nombre pour prévenir l'infection.

La majorité des bactéries sont détruites rapidement par les cellules phagocytaires, cependant certaines bactéries, parmi lesquelles *Brucella abortus*, *Listeria monocytogenes* et *S. aureus*, peuvent survivre et même se multiplier dans les cellules phagocytaires (Paape & al., 1991 ; Targowski, 1983).

Les bactéries peuvent également être tuées par un mécanisme indépendant de l'oxygène. Il est initié par la fusion des phagosomes avec les lysosomes refermant de la lactoferrine, les enzymes lysosomiales et des protéines cationiques antibactériennes. La plupart des connaissances sur l'activité des PMN sont basées sur des études concernant les PMN humains. Cependant, les PMN de différentes espèces animales peuvent différer par des caractéristiques fonctionnelles importantes. Par exemple, les PMN bovins isolés à partir du sang n'ont pas de récepteur au « N-formyl-méthionyl-leucyl-phenylalanine » (fMLP) et n'ont apparemment pas de lysozyme dans leurs lysosomes (Styrt, 1989).

**Tableau 4.** Protéines antibactériennes des PMN bovins.

Localisation	Protéine	Poids moléculaire (kDa)	Concentration ( $\mu\text{g}/10^6$ PMN)	Activité
Granules primaires	Défensines $\beta$	4	Nd	B $\pm$ , L, VE, p, Mam
	Serprocidines	30	1 – 2,5	B $\pm$ , L, p, Mam
	BPI <sup>a</sup>	50 - 60	1,5	B <sup>-</sup>
Granules secondaires	Phospholipase	14	0,05 – 0,5	B $\pm$
	Lactoferrine	78	3	B $\pm$ , L
Granules tertiaires	Bactenecines (Cathelicidines)	11 – 20	2 – 3	B $\pm$ , L
	Lactoferrine	78	3	B $\pm$ , L

<sup>a</sup> Bactericidal/Permeability-increasing proteins

Nd : Non déterminé

B : bactéries (Gram + ou -) ; L : Levures ; p : parasites métazoaires ; VE : virus enveloppé ; Mam ; cellules des mammifères

(D'après Elsbach, 1998)



Les protéines cationiques des granules des neutrophiles bovins sont différentes de celles décrites dans les autres espèces. Toutes ces protéines ont une activité bactéricide pour des bactéries particulières et sont considérées comme jouant un rôle important dans les mécanismes de défense non spécifiques (tableau 4). Parmi ces protéines, les défensines sont des peptides de 30 à 40 acides aminés. Leur activité est maximale à pH 7 et elles agissent donc précocement après la formation des phagolysosomes, avant leur acidification. Il existe des défensines  $\alpha$  et  $\beta$ , les granules des neutrophiles bovins ne contenant que des  $\beta$ -défensines. Les acides formés dans les phagolysosomes contribuent également à la bactéricidie (Reeves et al., 2002).

### **II. 2. 2. Les phagocytes mononucléaires (monocytes et macrophages)**

En l'absence d'infection du quartier, les macrophages représentent le type cellulaire dominant du lait avec 35 à 80 % des cellules somatiques (Lee et al., 1980 ; Paape et al., 1991). Les macrophages sont capables de phagocytose et participent à la réponse immunitaire spécifique en jouant un rôle dans le déclenchement et l'expression des réponses immunitaires (digestion et présentation de l'antigène). Ce sont aussi des cellules sécrétrices des facteurs du complément (Paape et al., 2003).

Le temps nécessaire à la production des monocytes dans la moelle osseuse et à leur migration vers le sang est d'environ 50 à 60 h. Contrairement aux PMN, il n'y a pas de réserve de monocytes dans la moelle osseuse. Dans le système vasculaire, 25 % des monocytes sont circulants, alors que 75 % sont dans le compartiment marginal (rate). La durée de vie des monocytes dans le sang varie de 36 h à 4 jours (Jain, 1993).

Le monocyte est généralement de forme sphérique et les limites cytoplasmiques sont nettes, le cytoplasme contient de très nombreuses granulations azurophiles et expriment des protéases à sérine et des protéases aspartiques (Senior et al., 1983). Les monocytes expriment à leur surface membranaire des protéases à sérine. Les activateurs de types urokinase (u-PA) s'associent à leur récepteur (u-PAR) lié à la membrane, et activent les monocytes et polarisent la migration cellulaire ou la diapédèse (Estreicher et al., 1990). Le macrophage a un diamètre qui varie de 10 à 45  $\mu\text{m}$  dans le lait de vache (McDonald et Anderson, 1981). Les macrophages isolés du lait peuvent contenir des bactéries, des micelles de caséine, des globules gras et des débris cellulaires, notamment des granulocytes dégénérés (Nickerson et Heald, 1983).

**Tableau 5.** Produits de sécrétion des macrophages.

<p><b>ENZYMES</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Lysozyme</b> (muramidase)</li> <li>• <b>Protéases neutres</b>  <ul style="list-style-type: none"> <li>activateur du plasminogène</li> <li>collagénase</li> <li>élastase</li> <li>angiotensine convertase</li> </ul> </li> <li>• <b>Hydrolases acides</b>  <ul style="list-style-type: none"> <li>protéases</li> <li>lipases</li> <li>désoxyribonucléases</li> <li>arginases</li> <li>phosphatases</li> <li>glucidases</li> <li>sulfatases</li> </ul> </li> </ul>	<p><b>RADICAUX OXYGENES LIBRES</b></p> <p>Peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)            Ion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)            Radical hydroxyle (OH<sup>·</sup>)            Singulet d'oxygène (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>)</p>
<p><b>COMPOSANTS DU COMPLEMENT</b></p> <p>C1, C4, C2, C3, C5            Facteur B, Facteur D            Properdine            C3b inactivateur            B-1H</p>	<p><b>LIPIDES BIOREACTIFS</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Métabolites de l'acide arachidonique</b>  <ul style="list-style-type: none"> <li>Prostaglandines E2</li> <li>6 Kéto-prostaglandine F1</li> <li>Thromboxane</li> <li>Leucotriène B4</li> <li>SRS</li> </ul> </li> <li>• <b>Facteurs activateurs de plaquettes</b></li> </ul> <p><b>FACTEURS REGULATEURS DE LA SYNTHÈSE DES PROTÉINES</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Hépatocytes</b>  <ul style="list-style-type: none"> <li>Sérum amyloïde A</li> <li>Haptoglobuline</li> </ul> </li> <li>• <b>Cellules synoviales</b>  <ul style="list-style-type: none"> <li>Collagénase</li> </ul> </li> </ul>
<p><b>INHIBITEURS ENZYMATIQUES DE LA PLASMINE</b></p> <p>α<sub>2</sub> macroglobuline</p>	<p><b>FACTEURS REGULATEURS DE LA PROLIFÉRATION CELLULAIRE</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Lymphocytes T</li> <li>• Cellules médullaires</li> <li>• Angiogénèse</li> </ul>
<p><b>PROTÉINES DE TRANSPORT</b></p> <p>Transferrine            Transcobalamine II            Fibronectine</p>	<p><b>FACTEURS INHIBITEURS DE LA REPLICATION</b></p> <p>Lymphocytes            Cellules tumorales            Virus            bactéries</p>
<p><b>NUCLEOSIDES ET MÉTABOLITES</b></p> <p>Thymidine            Acide urique</p>	

D'après Nathan et al., 1980. Cité par Lagrange, (1987).

### **II. 2. 2. 1. Rôle des macrophages dans le lait**

Les macrophages jouent un rôle dans les défenses non spécifiques précoces par la phagocytose en ingérant des bactéries et des débris cellulaires. La destruction des micro-organismes par la libération des radicaux oxygénés libres est probablement minoritaire, du fait de la faible pression en oxygène du lait. D'autres mécanismes pourraient intervenir, la simple adhésion des germes aux macrophages déclenchant la sécrétion d'un grand nombre de composés (Lagrange, 1987) (tableau 5).

La phagocytose par les macrophages sensibilisés du lait peut être augmentée par la présence d'anticorps opsonisants spécifiques des pathogènes. Comme les neutrophiles, l'ingestion de globules gras et de caséines diminue l'aptitude à la phagocytose par rapport aux cellules du sang. Les activités phagocytaires et bactéricides sont particulièrement diminuées lors de la période entourant la mise bas (Sordillo et al., 1997).

### **II. 2. 3. Les lymphocytes**

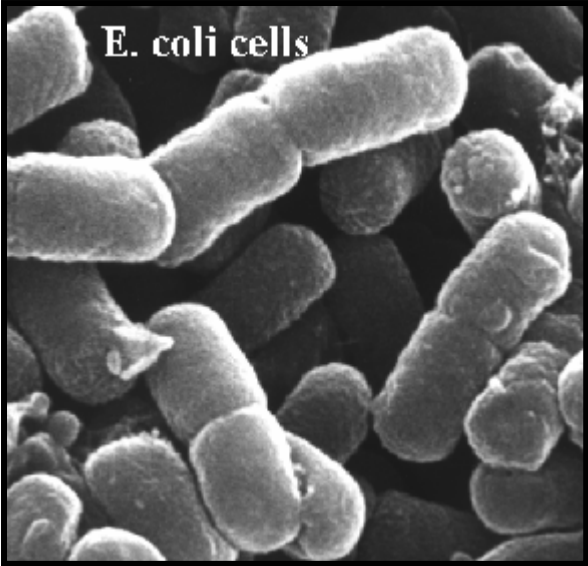
Les cellules B et les cellules T sont les deux principaux types de lymphocytes capable de reconnaître les antigènes grâce à des récepteurs membranaires spécifiques. Dans le lait des quartiers non infectés, les lymphocytes constituent 10 à 25 % des cellules somatiques. Un déficit des lymphocytes B serait observé dans le sang des vaches avec une mammite (Paape et al., 1991).

Les lymphocytes B et T se différencient dans des organes lymphoïdes primaires différents. Une partie de ces cellules migre par la circulation sanguine vers les organes lymphatiques secondaires. De nombreux lymphocytes matures peuvent survivre plusieurs années et jouer le rôle de cellules-mémoire (Roitt et al., 1994).

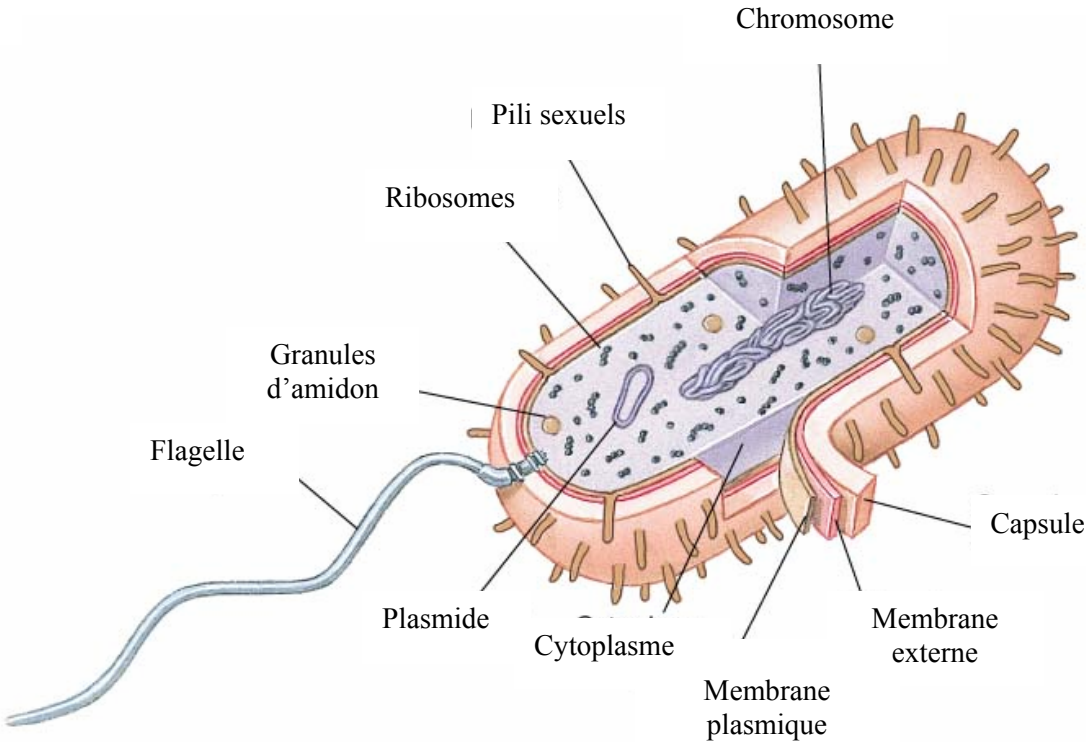
Une classe de lymphocytes T ( $\gamma\delta$ ) a fait l'objet de nombreuses spéculations quant à ses fonctions biologiques : ils seraient essentiellement associés à la protection des surfaces épithéliales, où ces cellules migrent et circulent peu. Ces cellules peuvent intervenir dans la cytotoxicité avec une implication variable du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) (destruction des cellules épithéliales altérées), et pourraient intervenir dans certaines activités des cellules tueuses naturelles (cellules NK) (Sordillo et al., 1997).

**Figure 7.** (A) Photographie en microscopie électronique à transmission d'*E. coli* (2  $\mu\text{m}$  / 0,5  $\mu\text{m}$ ). (B) Représentation schématique de la structure interne d'*E. coli* (Hurlbert, 1999).

A.



B.



#### **II. 2. 4. Autres cellules rencontrées dans le lait**

Il est également possible de trouver dans le lait des granulocytes éosinophiles (contenant de l'élastase et des collagénases interstitielles à l'intérieur de leurs granules cytoplasmiques), ainsi que de rares granulocytes basophiles (Davis et al., 1984).

On trouve également des cellules épithéliales provenant de la desquamation des épithéliums de la glande mammaire : lactocytes, cellules des canaux. A l'exception des cellules sécrétrices, elles sont généralement de petite taille (10 à 20 µm) (Poutrel, 1986).

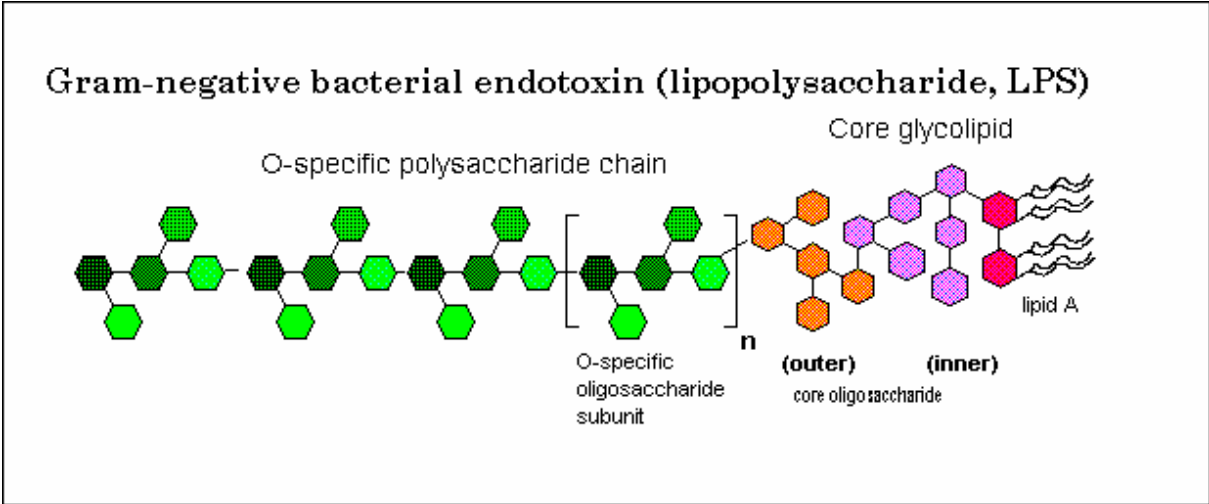
#### **II. 3. Mécanismes mis en jeu dans le cas des infections mammaires à *E. coli***

*E. coli* est une bactérie Gram négative, aérobie anaérobie facultative, non sporulante, peu mobile et isolée. Les souches isolées de mammites et caractérisées sérologiquement sont très diverses ; la majorité sont encapsulées (antigène K), ce qui explique la diversité des mécanismes mis en jeu par les bactéries. *E. coli* possède plusieurs enveloppes ainsi que des appendices externes, la membrane plasmique de la paroi bactérienne est constituée de polysaccharides ramifiés, la membrane externe quant à elle est constituée de molécules appelées lipopolysaccharides (LPS) (Figure 7). Les mammites colibacillaires ne sont pas très contagieuses dans le sens où la transmission d'un quartier à un autre n'est pas la principale cause de nouvelles infections. L'infection colibacillaire est généralement de courte durée. La forme suraiguë est rare, elle aboutit avec la forme aiguë à la mort de 7 % des vaches atteintes et à 20 % de réformes en cours de lactation. La forme aiguë est souvent éliminée spontanément en moins de 2 à 3 jours. Environ 34 % des quartiers atteints ne reprennent pas la lactation. Enfin, il existe une forme subaiguë ne présentant pas de symptômes généraux et dont les symptômes locaux sont d'intensité modérée, avec une durée courte de quelques heures (Rainard, 1985).

La pénétration des colibacilles dans la citerne est suivie par une phase de latence (période d'incubation) qui est d'environ 12 h. Les colibacilles n'adhèrent pas aux cellules épithéliales *in vivo*. Le déclenchement de la réaction inflammatoire est brutal et majoritairement dû à la libération d'endotoxines (Rainard, 1985).

Le lipopolysaccharide d'*E. coli* (LPS) est une endotoxine synthétisée dans la membrane cytoplasmique de la bactérie et transférée vers la membrane externe, il en constitue le deuxième élément majeur. Cette toxine n'est pas neutralisée par un anticorps homologue. Il contient une partie protéique, une partie polysaccharidique et une partie lipidique, chaque partie ayant une ou plusieurs fonctions biologiques.

**Figure 8.** Diagramme représentant la molécule de lipopolysaccharide (LPS) de bactérie gram négative (Asselineau et Lanéelle, 1998).



Le polysaccharide O, hydrophile, intervient dans les interactions bactérie-hôte. La partie oligosaccharidique, chargée dans la partie proximale, maintient les propriétés de la membrane externe (barrière) et évite la phagocytose de surface. Le lipide A joue un rôle dans l'assemblage de la membrane externe. C'est le lipide A qui est responsable de l'inflammation et joue un rôle de médiateur chimiotactique (Figure 8) (Neidhardt, 1987).

La glande mammaire est relativement désarmée face aux colibacilles. Elle recrute la plupart de ses défenses par l'intermédiaire de la réaction inflammatoire qui mobilise des protéines plasmatiques et les PMN, et stimule la synthèse locale de la lactoferrine.

Le complément joue un rôle très efficace dans le cas des souches sensibles à l'action du complément dites séro-sensibles, et dans ce cas l'infection ne provoque pas de mammites cliniques (Rainard, 1985). Quant à la lactoferrine, elle joue un rôle bactériostatique tardif et seulement dans les cas où l'inflammation est importante, lorsque sa concentration augmente et que celle en citrate baisse (Rainard, 1985).

Ce sont les PMN qui jouent un rôle essentiel dans la protection de la glande mammaire contre les colibacilles en participant d'une part à l'entretien de la réaction inflammatoire et d'autre part en phagocytant les bactéries. Pour être ingérées par les PMN, les bactéries doivent être opsonisées (fixation des opsonines sur les bactéries, pour favoriser leur phagocytose par les leucocytes) et l'activité opsonisante est limitée dans le lait : si les souches non capsulées de colibacilles isolés de mammites sont opsonisées par du lait de mi-lactation, les souches capsulées ne le sont pas et résistent à la phagocytose (Rainard, 1985). Les PMN du lait sont capables de détoxifier le LPS grâce à l'enzyme hydrolase acyloxyacyl, dont l'activité augmente significativement dès 12 h après le début de l'infection par *E. coli* (McDermott et al., 1991).

**Tableau 6.** Propriétés des protéines de lait de vache selon Farrell (2004)

Protéines	composition dans le lait écrémé (g/L)	Variants génétiques	Poids moléculaire (kDa)	point isoionique	point isoélectrique	Résidu Cystéine
CN- $\alpha_{s1}$	12 – 15	B	23,615	4,92 – 5,05	4,44 – 4,76	Pas de résidu Cys
		C	23,542	5,00 – 5,35	ND	
CN- $\alpha_{s2}$	3 – 4	A	25,226	ND	ND	2 résidus Cys
CN- $\beta$	9 – 11	A <sup>1</sup>	24,023	5,41	ND	Pas de résidu Cys
		A <sup>2</sup>	23,983	5,30	4,83 – 5,07	
		B	24,092	5,53	ND	
CN- $\kappa$	2 – 4	A	19,037	5,77 (5,35)	5,45 – 5,77	2 résidus Cys
		B	19,006	6,07 (5,37)	5,3 – 5,8	
$\beta$ -Lactoglobuline	2 – 4	A	18,363	5,35	5,13	5 résidus Cys
		B	18,277	5,41	5,13	
$\alpha$ -Lactalbumine	0,6 – 1,7	B	14,178	ND	4,2 – 4,5	8 résidus Cys
Serum albumine	0,4	A	66,399	5,13	4,7 – 4,9	35 résidus Cys
Immunoglobuline G1	0,3 – 0,6	ND	161,000	ND	5,5 – 6,8	
Immunoglobuline G2	0,05	ND	150,000	ND	7,5 – 8,3	
Immunoglobuline A	0,01	ND	385,000 – 417,000	ND	ND	
Immunoglobuline M	0,09	ND	1,000,000	ND	ND	
Lactoferrine	0,02 – 0,1	ND	76,110	8,95	8,8	34 résidus



## CHAPITRE III

### III. LES PROTEINES DU LAIT ET LA CASEINOLYSE

#### III. 1. Les caséines constituant la micelle

##### III. 1. 1. La caséine $\alpha_{s1}$ :

La caséine  $\alpha_{s1}$  est la protéine la plus abondante du lait : 10 g/L pour 26 g/L de caséine ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\kappa$  et  $\gamma$ ) et 33 g/L de protéines (Ribadeau-Dumas et Grappin, 1989). Elle est constituée par un composé majeur et un composé mineur avec une chaîne peptidique dont les séquences d'acides aminés sont identiques (Mercier et al., 1971) et différents seulement dans leur degré de phosphorylation. Le composé mineur contient en plus un résidu sérine phosphorylé à la position 41 (Eigel et al., 1984). La séquence complète de la caséine  $\alpha_{s1}$  est composée de 199 résidus. La CN $\alpha_{s1}$  ne possède pas de résidu cystéine. Huit variants génétiques sont connus et sont désignés dans l'ordre décroissant de mobilité électrophorétique (Tableau 6) : A, B, C, D, E, F, G et H (Farrell et al., 2004) dont trois nouveaux :  $\alpha_{s1}$  variant F,  $\alpha_{s1}$  variant G et le variant H. Le phénotype B de la caséine  $\alpha_{s1}$  est le plus abondant dans le lait. Pour une vache Holstein-Frisonne, la fréquence de ce variant est de 87 à 99 % (Rameuf et al., 1991). Le variant B est prédominant dans le lait de *Bos taurus* (Eigel et al., 1984).

##### III. 1. 2. La caséine $\alpha_{s2}$ :

Le lait contient en moyenne 2,6 g/L de caséine  $\alpha_{s2}$  (Ribadeau-Dumas et Grappin, 1989). Elle est constituée par deux composés majeurs et plusieurs composés mineurs avec des variations du niveau de phosphorylation post traductionnelle (Swaisgood, 1992). La caséine  $\alpha_{s2}$  est très riche en résidus phosphosérine et lysine. Les caséines désignées par  $\alpha_{s2}$ ,  $\alpha_{s3}$ ,  $\alpha_{s4}$  et  $\alpha_{s6}$ , après migration électrophorétique en milieu réducteur et dissociant, possèdent la même structure primaire et se différencient par le nombre de résidus phosphorylé. La protéine référence des caséines  $\alpha_{s2}$  est la CN-  $\alpha_{s2}$  A-11P constituée de 207 résidus (Hoagland et al., 2001).

##### III. 1. 3. La caséine $\beta$

La caséine  $\beta$  est présente en forte proportion dans le lait 9,3 g/L dans le lait sur les 26 g/L de caséines au total (Ribadeau-Dumas et Grappin, 1989). Sa masse moléculaire est de 23,983 kDa. Douze variants génétiques ( $A^1$ ,  $A^2$ ,  $A^3$ , B, C, D, E, F, G,  $H^1$ ,  $H^2$ , I) de la caséine  $\beta$  sont actuellement recensés (Farrell et al., 2004) avec majoritairement les variants  $A^1$  et  $A^2$  retrouvés dans le lait en moyenne à 58,3% et 37,5% respectivement (Remeuf et al., 1991). La structure primaire de la caséine  $\beta$   $A^2$ -5P contient 209 résidus ; elle ne contient pas de résidu



cystéine. Il faut souligner la très forte proportion de résidus prolines (17% de la séquence primaire). Cette richesse en résidus prolines influe sur la structuration de la protéine en raison des courbures que ces résidus induisent (Swaisgood, 1982). La caséine  $\beta$  possède une forte hydrophobie, c'est aussi la protéine où la répartition en une zone hydrophobe (C-terminale) et en une zone hydrophile (N-terminale) est la plus marquée (Aoki et al., 1990). Compte tenu de cette balance hydrophile/hydrophobe, la caséine  $\beta$  est fortement susceptible de s'associer avec d'autres protéines (Kumosinski et al., 1993), particulièrement avec certains segments de caséine  $\alpha_{s1}$  et  $\alpha_{s2}$  (Mercier et al., 1971).

### **III. 1. 4. La caséine $\kappa$**

La teneur moyenne de la caséine  $\kappa$  est de 3,3 g/L dans le lait (Ribadeau-Dumas et Grappin, 1989). Onze variants génétiques (A, B, C, E, F<sup>1</sup>, F<sup>2</sup>, G<sup>1</sup>, G<sup>2</sup>, H, I, J) de la caséine  $\kappa$  sont actuellement recensés (Farrell et al., 2004) avec majoritairement les variants A et B retrouvés dans le lait en moyenne de 75 à 85% pour la caséine  $\kappa$  A et de 15 à 25% de la caséine  $\kappa$  B (Rameuf et al., 1991). La structure primaire de la caséine  $\kappa$  A-1P contient 169 résidus. La caséine  $\kappa$ , est après la caséine  $\beta$ , la plus hydrophobe des caséines ; la partie qui correspond au glycomacropéptide (106 – 169) est de nature très hydrophile et donne un caractère amphiphile à la protéine (Swaisgood, 1982). La partie N-terminale (1–105) appelé para-caséine  $\kappa$  est légèrement cationique et très hydrophobe et reste associée à la micelle. La caséine  $\kappa$  est caractérisée par sa glycosylation des résidus thréonines 131, 133, 135 et 136 (Jolles et al., 1972 ; Mercier et al., 1971). Une fois phosphorylée, la caséine  $\kappa$  occuperait une position plus interne dans la micelle car elle est susceptible de s'associer à d'autres caséines, alors que les caséines  $\kappa$  O-glycosylées seraient exposées au solvant et occuperaient une position externe (Cheftel et al., 1985).

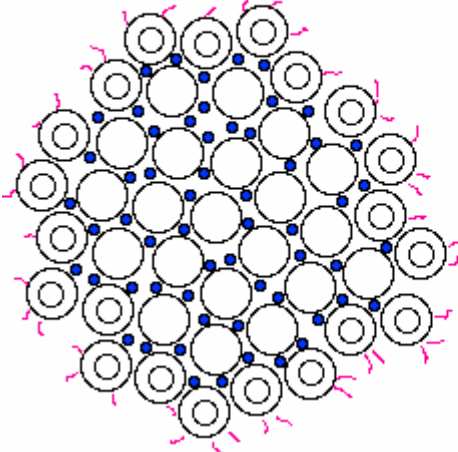
Si la caséine  $\kappa$  existe sous forme de monomérique, elle existe surtout en forme de polymères correspondant à des monomères de caséine  $\kappa$  associés par des ponts disulfures (Vreeman et al., 1981 ; Pepper et Farrell, 1982). Toutefois, il semblerait que le degré de polymérisation de la caséine  $\kappa$  est inversement relié au degré de glycosylation (Groves et al., 1992).

### **III. 2. La micelle de caséine**

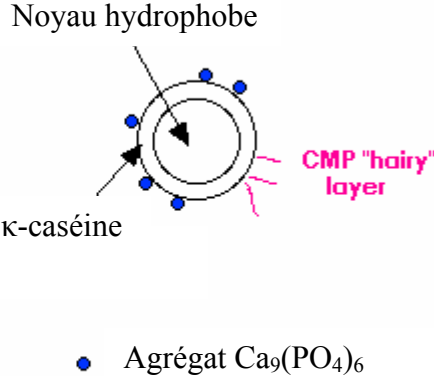
La phase caséique est structurée en micelle dont le diamètre varie de 30 à 600 nm. Actuellement deux techniques sont utilisées pour mesurer la taille des micelles : les méthodes granulométriques et les méthodes de microscopie électronique. Le diamètre moyen

**Figure 9.** Architecture de la micelle de caséine selon le modèle de Walstra et Jenness (1984).

**Micelle de caséine**



**Caséine submicelle**



généralement admis est voisin de 180 nm, quelle que soit la technique d'analyse (Figure 9) (Banon et Hardy, 1991 ; Ghazarossian, 1996 ; Wade et al., 1996).

La micelle contient environ 92 à 93 % (m/m) de protéines, principalement des caséines en proportions variables. Le rapport moyen dans la micelle  $\alpha_{s1}/\alpha_{s2}/\beta/\kappa$  est d'environ 4/1/3,7/1,4. La proportion de caséines  $\kappa$  serait plus forte dans les submicelles périphériques (Walstra, 1990).

La stabilité micellaire dépend de l'équilibre minéral du milieu. L'étude de l'effet des paramètres physicochimiques du milieu sur la stabilité permet de caractériser les forces contribuant à l'intégrité de la micelle (Walstra, 1990).

### **III. 3. Les protéines du lactosérum**

Le lactosérum regroupe des protéines majeures : la  $\beta$ -lactoglobuline et l' $\alpha$ -lactalbumine et des protéines mineures telles que : les immunoglobulines, la sérum albumine bovine, la lactoferrine, la lactoperoxydase, la phosphatase alcaline, la catalase, la sulfhydryle oxydase, la lactophorine (ou composant PP3), le lysozyme (EC 3.2.1.24), la plasmine (EC 3.4.21.7) et les fragments peptidique solubles issus de l'hydrolyse de caséines.

#### **III.3.1. La $\beta$ -lactoglobuline**

La  $\beta$ -lactoglobuline est la protéine majeure du lactosérum, sa teneur dans le lait varie entre 2 et 4 g/L, elle est constituée de 162 résidus (Léonil et al., 1995). La  $\beta$ -lactoglobuline comporte 2 ponts disulfure ainsi qu'une fonction thiol libre sur le résidu cystéine 121 (Eigel et al. 1984). La présence de ce groupe nucléophile permet la possibilité de formation de ponts disulfure variables. On dénombre actuellement onze variants génétiques, mais les plus fréquents sont les variants A et B avec une fréquence respective de 46 à 50% et de 50 à 54% pour les vaches Holstein-Frisonne (Rameuf et al., 1991).

#### **III. 3. 2. L' $\alpha$ -lactalbumine**

La teneur moyenne en  $\alpha$ -lactalbumine dans le lait est de 1,2 à 1,5 g/L, sa masse moléculaire est de 14,2 kDa. Il s'agit d'une métalloprotéine dont la structure est fortement ordonnée par des ponts disulfure et un cation. L' $\alpha$ -lactalbumine est constituée de 123 résidus (Brew et al., 1970). Une cinquantaine de résidus d'acides aminés sont identiques en séquence à ceux de lysosymes de diverses origines animales (Archarya et al., 1989). L' $\alpha$ -lactalbumine possède les mêmes propriétés dans l'activité de lyse des parois bactériennes que le lysosyme, seules diffèrent les vitesses de réaction (White et al., 1993). Il existe 3 variants génétiques A, B et C.



L' $\alpha$ -lactalbumine B est la plus fréquemment rencontrée dans le lait, à la place du résidu Arg<sub>10</sub> du variant B, on trouve pour le variant A le résidu Gln<sub>10</sub> (Gordon, 1971).

### **III. 4. Origine de la protéolyse dans le lait et la sensibilité des caséines à cette protéolyse**

#### **III. 4. 1. Les sources endogènes de la protéolyse**

##### **III. 4. 1. 1. Système plasmine plasminogène**

La plasmine (EC 3.4.21.7), de masse moléculaire 88 kDa, est une protéase alcaline appartenant à la famille des protéases à sérine existant principalement sous la forme inactive (proenzyme), le plasminogène. La structure du plasminogène bovin diffère principalement du plasminogène humain par 5 délétions (Val<sub>447</sub>, Val<sub>448</sub>, Leu<sub>449</sub>, Pro<sub>359</sub>, Thr<sub>574</sub>) et une insertion (Pro<sub>65</sub>) ; l'homologie globale des deux séquences est de 80% (Schaller *et al.*, 1985). Ce précurseur, synthétisé au niveau du foie, est composé chez l'homme de 786 résidus d'acides aminés, la liaison 577-578 est clivée lors de l'activation en plasmine pour former la chaîne lourde 1-577 et la chaîne légère 578-786 (Humbert *et al.*, 1990 ; Eigel *et al.*, 1979).

Le pH optimal est légèrement alcalin (environ 8), mais la zone d'activité de la plasmine s'étend de 5 à 9. En dehors de cette plage, la plasmine est inactivée. Grufferty et Fox (1988) observent qu'il n'y a pas de perte d'activité dans une zone de pH comprise entre 4,8 et 6,6 pendant une heure. A un pH de 4,6 une grande partie de l'activité de la plasmine n'est plus située sur les micelles de caséines. Un accroissement de l'activité de la plasmine est noté en milieu légèrement salin (2 à 4%), au-delà, l'enzyme est progressivement inhibée.

La plasmine est une enzyme thermostable, elle résiste à la pasteurisation (83% de l'activité initiale est retrouvée après un traitement thermique de 72°C pendant 15 secondes). Une augmentation de l'activité de la plasmine pendant le stockage du lait peut être observée après une pasteurisation ou une stérilisation de type U.H.T.

La plasmine comporte un pont disulfure et des résidus cystéines libres (comme la  $\beta$ -lactoglobuline), la formation de complexe avec la  $\beta$ -lactoglobuline (pont S-S), après chauffage, inactive partiellement l'activité de la plasmine.

Le système plasmine fait intervenir, outre la plasmine et son précurseur le plasminogène, une multitude d'autres composés, généralement des enzymes, agissant comme activateurs ou inhibiteurs à diverses étapes de la chaîne (Bastian et Brown, 1995).

**Tableau 7.** Produits de la protéolyse des caséines par la plasmine.

Substrat	Produits de la protéolyse par la plasmine	Références
Caséine- $\beta$	<p><b>Peptides insolubles à pH 4,6</b>            Caséine-<math>\gamma</math>1 (f29-209)            Caséine-<math>\gamma</math>2 (f106-209)            Caséine-<math>\gamma</math>3 (f108-209)</p> <p><b>Protéoses-peptones</b>            B-CN-5P ou PP5 (f1-105/107)            B-CN-4P ou PP8F (f1-28)            B-CN-1P PP5 (f29-105/107)*</p>	<p>Eigel (1977)</p> <p>Andrews et Alichanidis (1983)            (plasmine porcine)</p>
Caséine- $\alpha_{s1}$	<p><b>Peptides solubles à pH 4,6</b>            Peptide A : f80-90            Peptide B : f106-124            Peptide C : f1-22            Peptide D1/D2 : f103/104-124            Peptide E : f35-90            Peptide F : f194-199            Peptide G : f91-103            Peptide H : f91-100            Peptide I : f80-103</p> <p><b>Peptides insolubles à pH 4,6</b>            Peptide U: f152-199            Peptide W: f1-34            Peptide X: f104-199            Peptide Y: f106-199            Peptide Z: f125-199</p>	<p>Le Bars et Grippon (1993)            (plasmine bovine)</p> <p>Le Bars et Grippon (1993)            (plasmine bovine)</p>
Caséine- $\alpha_{s2}$	<p><b>Peptides solubles à pH 4,6</b>            Peptide A: f182-188            Peptide B1/B2: f1-21/24            Peptide F: f114-150            Peptide G: f114-149            Peptide H: f198-207            Peptide I: f182-207            Peptide J: f189-207            Peptide O: f150-207            Peptide P: f151-207</p>	<p>Le Bars et Grippon (1993)            (plasmine bovine)</p>

\* association des fragments 29-105 et 29-107



Il existe deux types d'activateurs du plasminogène : l'un est de type urokinase (u-PA) qui se lie à un récepteur spécifique à la surface des leucocytes du lait (u-PAR), et l'autre de type tissulaire (t-PA) se lie spécifiquement à la caséine  $\alpha_{s2}$  dimérique et à la caséine  $\kappa$  (Heegaard et al., 1994a, 1994b ; Moir et al., 2001).

Les activateurs du plasminogène du lait bovin possèdent six types d'inhibiteurs, classés en deux groupes les inhibiteurs naturels et les inhibiteurs de synthèses (Precetti et al., 1997).

### **III. 4. 1. 2. Sensibilité des caséines au système plasmine plasminogène**

La plasmine est reconnue comme étant responsable de l'essentiel de la protéolyse des caséines dans les laits à faible dénombrement cellulaire (Andrews, 1983). Elle coupe les liaisons peptidiques du côté C-terminal des résidus lys-X et Arg-X (Tableau 7) (Humbert, 1986). L'hydrolyse de la caséine  $\beta$  a été la plus étudiée (Andrews, 1983 ; Eigel, 1977 ; Grufferty et Fox, 1988). Les produits de protéolyse de la caséine  $\beta$  sont les caséines  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$ ,  $\gamma_3$  insolubles à pH 4,6 (Eigel, 1977), ainsi que des peptides de la fraction protéose-peptones, solubles à pH 4,6, dont le composant PP5 qui correspond à un mélange de fragments N-terminaux 1-105 et 1-107 de la caséine  $\beta$  et le composant  $\beta$ -CN 4P (f1-28) et le composant  $\beta$ -CN 1P qui comprend f29-105 et f29-107 (Andrews, 1983 ; Ribadeau-Dumas & Grappin, 1989).

La CN  $\alpha_{s1}$  est faiblement hydrolysée par la plasmine lorsqu'elle est intégrée à la structure micellaire. Il semblerait que la CN  $\alpha_{s1}$  ne soit pas accessible à la plasmine car elle aurait une position centrale au niveau de la micelle (Farrell et al., 1993).

La plasmine hydrolyse facilement la caséine  $\alpha_{s2}$  lorsqu'elle est en solution (Le Bars et Gripon, 1989 ; Pilhanto-Lappäälä et al., 1993). En revanche, dans le lait, les peptides issus de l'hydrolyse par la plasmine de la caséine  $\alpha_{s2}$  sont négligeables par rapport à ceux issus de l'hydrolyse de la caséine  $\beta$ . Cela indique que la caséine  $\alpha_{s2}$  reste très peu accessible à l'enzyme au sein de la micelle.

La caséine  $\kappa$  est considérée comme la caséine la plus résistante à la plasmine (Grufferty & Fox, 1988). Dans le cas de la plasmine l'ordre préférentiel d'hydrolyse des caséines est CN- $\beta$  > CN-  $\alpha_{s2}$  > CN-  $\alpha_{s1}$  >> CN-  $\kappa$  (Grieve & Kitchen, 1985).

Une augmentation de la teneur en protéose-peptones du lait est expliquée par l'augmentation de la protéolyse de la caséine- $\beta$  et des autres caséines (Andrews & Alichanidis, 1983 ; Pâquet, 1989). En effet, les peptides libérés par la caséine- $\alpha_{s2}$  sous l'action de la plasmine sont pour la plupart soluble à pH 4,6, de même pour la caséine- $\alpha_{s1}$  (le Bars et Gripon, 1989). Ainsi, d'autres peptides que les caséines- $\gamma$  peuvent être libérés à partir des caséines- $\beta$ , - $\alpha_s$  mais aussi

**Tableau 8.** Caractéristiques des protéases d'origine endogène.

Classe	Protéases et poids moléculaire (kDa)	Conditions optimales		Spécificité de clivage	Inhibiteurs naturels	Localisation
		pH	Température (°C)			
Protéase à sérine	Plasmine (88)	8,0	37	Lys-X, Arg-X	PAI-1, PAI-2, $\alpha_2$ -AP, $\alpha_2$ -Mg	Lait, sang
	Elastase (30)	8,0 – 8,5	37	Val-X, Ala-X	$\alpha_2$ -Mg	PMN (1°) monocyte, éosinophiles et basophiles
	Cathepsine G (28,5)	8,0	37	AA aromatiques en position P1	$\alpha_2$ -AC, $\alpha_2$ -AT, SLPI	PMN (1°) monocyte
	Protéinase 3 (29)	7,5	37	Val-X, Ala-X, AA basiques en position P1	$\alpha_2$ -Mg, $\alpha_2$ -AT, élafine	PMN (1°) monocyte
Métalloprotéase	MMP-9 (90)	7 – 9	37	X-Hpro, X-Ala, X-Arg	EDTA, $\alpha_2$ -Mg, TIMPs, MMP-5	PMN (3°), monocyte
Protéases aspartiques	Cathepsine D (44)	2 - 5	37	Phe-Val, Gln-His, Glu-Ala, Ala-Leu, Leu-Tyr, Tyr-Leu, Gly-Phe, Phe-Phe, Phe-Tyr	$\alpha_2$ -Mg, pepstatine	Lysosomes de la plupart des cellules
Protéases à cystéine	Cathepsine C (23-27)	6,2 – 6,4	37	Gly-Arg	ND	Lysosomes de la plupart des cellules
	Cathepsine L (23-27)	3 - 6	37	ND	Cystatines, quinogènes, $\alpha_2$ -Mg	
	Cathepsine B (21-28)	6	37	Phe-Phe	Pepstatine A	

X : acide aminé quelconque, ND: non déterminé. 1° : granules primaires, 2° : granules secondaires, 3° : granules tertiaires.

D'après Grufferty et Fox, 1988 ; Bank et Ansorge, 2001 ; Considine et al ; 2004 ; Kalnitsky *et al.*, 1983 ; Owen et Campbell, 1999.

-κ et précipiter à pH 4,6 avec les caséines. La plasmine n'est cependant pas la seule protéase du lait susceptible d'hydrolyser les caséines, les cellules somatiques et les bactéries constituent une source potentielle de protéases non négligeable.

### **III. 4. 1. 3. Les protéases des cellules somatiques**

Les leucocytes contiennent des protéases qui ont la capacité de dégrader tous les constituants de la matrice extracellulaire. Elles peuvent aussi dégrader d'autres protéines extracellulaires comme les fractions du complément, les facteurs de coagulation et les médiateurs pro-inflammatoires. Tous ces mécanismes ont des conséquences locales ou systémiques. Ils permettent aux leucocytes de sortir de la circulation et de traverser les barrières tissulaires (Owen et Campbell, 1999).

Il existe quatre classes de protéases pouvant être identifiées par les mécanismes biochimiques responsables de leur activité catalytique. Les protéases à sérine, les métalloprotéases, les protéases à cystéine et les protéases aspartiques (Tableau 8).

#### **III. 4. 1. 3. 1. Les protéases à sérine**

Il s'agit, chez les mammifères, de la classe la plus importante de protéases, caractérisée par un résidu sérine au niveau du site catalytique. Leur activité enzymatique est fonction d'un groupe de trois résidus formant la triade catalytique : His, Asp et Ser (Owen et Campbell, 1999).

Les lymphocytes sécrètent plusieurs protéases à sérine dont la majorité est synthétisée sous forme de précurseur inactif ou zymogène (Carrell, 1986).

**A. L'élastase** (EC 3.4.21.37) est une protéase neutre de 30 kDa dont les conditions optimales d'activité sont à un pH 8 à 37°C. Elle est retrouvée au niveau des granules azurophiles des neutrophiles, des phagocytes mononucléés, des monocytes, des éosinophiles, des basophiles et des mastocytes. L'élastase est constituée de 218 résidus d'acides aminés, elle peut agir à l'intérieur des phagosomes des granulocytes, comme elle peut agir à l'extérieur des cellules lors des processus inflammatoires (Suter et al., 1984). Il s'agit de la protéase majoritairement responsable de la protéolyse extracellulaire médiée par les PMN, elle peut contribuer aux dommages tissulaires en catalysant l'hydrolyse de plusieurs macromolécules de la matrice. Cette enzyme clive préférentiellement les liaisons carboxy-terminales et les résidus hydrophobes en particulier les Val-X et Ala-X (Owen et Campbell, 1999 ; Considine et al., 2000).

**Tableau 9.** Classification des métalloprotéases (MMP). Les MMP sont groupées en plusieurs classes en fonction de leurs structures.

Classe	Nomenclatures	Substrat	Activité biologique	références
Matrilysines	MMP-7 (matrilysine-1) MMP-26 (matrilysine-2)	Elastine, collagène IV, fibronectine, protéoglycane.	Inactivation $\alpha_2$ protéase inhibiteur	Murphy et al., 1992
Collagénases interstitielles	MMP-1 (collagénase interstitielle) MMP-8 (collagénase neutrophile) MMP-13 (collagénase-3)	Collagènes I-III, VII, X, gélatine, protéoglycane, fibronectine	Inactivation $\alpha_2$ protéase inhibiteur	Murphy et al., 1992 Diekmann et al., 1994
Stromélysines	MMP-3 (stromélysine-1) MMP-10 (stromélysine-2) MMP-11 (stromélysine-3)	Collagènes IV, V, IX, X, XI, fibronectine, laminine, gélatine	Activation pro-MMP-1, pro-MMP-8, pro-MMP-9, Inactivation $\alpha_2$ protéase inhibiteur	Murphy et al., 1992 Knauper et al., 1996
Gélatinase	MMP-2 (gélatinase-A) MMP-9 (gélatinase-B)	Gélatine, collagène IV, V, VII, X, XI, élastine, fibronectine, laminine.		Murphy et al., 1992
Autres	MMP-12 (métallo-élastase) MMP-18, MMP-19, MMP-20 (énamélysine),	Elastine, fibronectine, laminine, collagène IV	Inactivation $\alpha_2$ protéase inhibiteur	Gronski et al., 1997.

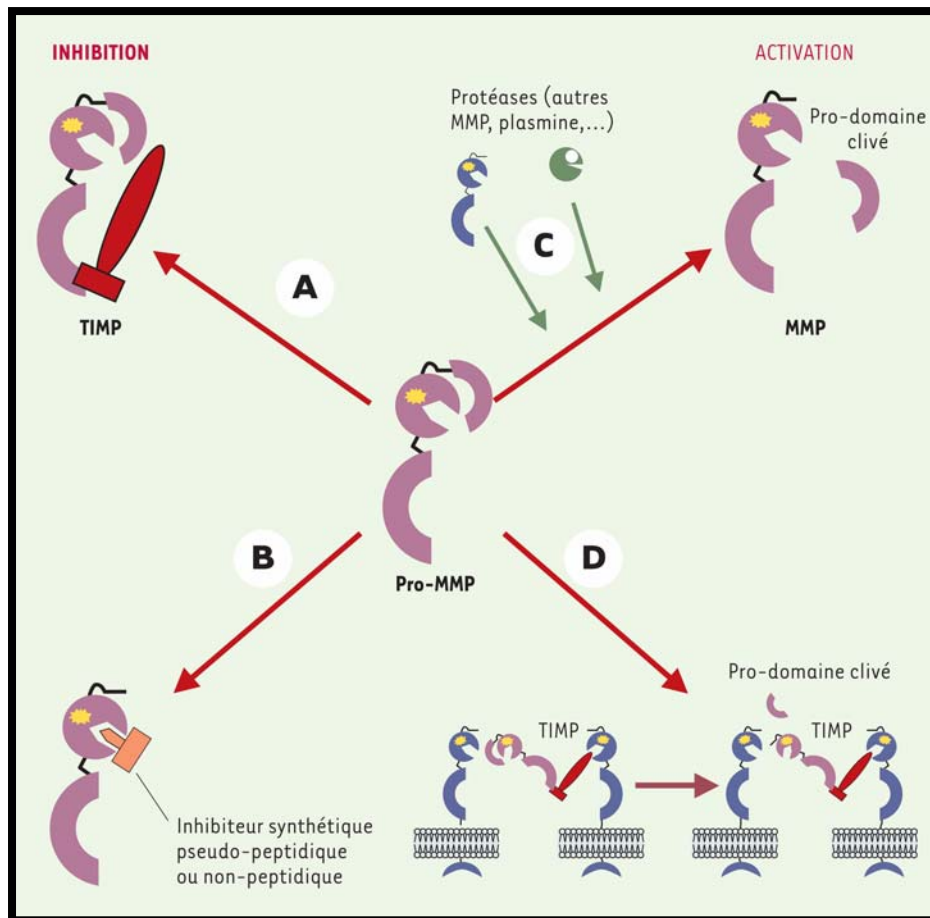
**B. La cathepsine G** (EC 3.4.21.20) est une protéase neutre de 28,5 kDa dont le pH optimum est de 8. Cette protéase est retrouvée dans les granulations azurophiles des PMN (Bank et Ansorge, 2001). Elle présente 37% d'homologie avec l'élastase, elle est constituée de 235 résidus avec une seule chaîne de sucres liée à Asn<sub>64</sub> (Owen et Campbell, 1999). Elle clive préférentiellement les liaisons peptidiques du côté carboxy-terminal, et en particulier les résidus aromatiques (Considine et al., 2002).

**C. La protéinase 3** (EC 3.4.21.76) est une protéase de poids moléculaire 29 kDa et de pH optimum 7,5, cette protéase est retrouvée dans les granulations azurophiles des PMN (Bank et Ansorge, 2001). Elle est constituée de 222 résidus et possède deux sites de glycosylation amino-terminaux. Elle possède une affinité préférentielle pour les acides aminés à courte chaîne aliphatique (Ala, Ser et Val) en position P1 (Owen et Campbell, 1999 ; Pezzato et al., 2003).

### **III. 4. 1. 3. 2. Les métalloprotéases**

Leur activité dépend directement des ions Zn<sup>2+</sup> intrinsèques et Ca<sup>2+</sup> extrinsèques. Les métalloprotéases matricielles (MMP) peuvent être subdivisées en plusieurs groupes en fonction de l'organisation de leur site catalytique et de la spécificité de substrat (Chantrain et DeClerck, 2002) (Tableau 9):

- Les collagénases interstitielles (MMP-1, MMP-8, MMP-13) forment un groupe de MMP qui interviennent dans la dégradation du collagène fibrillaire entraînant la formation de collagène dénaturé (gélatine).
- Les stromélysines (MMP-3, MMP-10) principalement produites par les cellules épithéliales.
- Les gélatinases (MMP-2 de MM 72 kDa appelée gélatinase A, MMP-9 de MM 92 kDa, appelée collagénase IV ou gélatinase B) dont l'activité protéolytique est dirigée contre le collagène interstitiel dénaturé (gélatine) et les collagènes de type IV et V de la membrane basale (DeClerck, 2000, Raulo et al., 2002). Dans certains cas la MMP-9 peut avoir une MM de 125 kDa qui peut correspondre à la formation de complexes de MMP-9/NGAL (neutrophil gelatinase associated lipocalin) (Yan et al., 2001).



**Figure 10.** Mécanismes de régulation de l'activité des MMP. Les MMP sont inhibées par la formation d'un complexe équimolaire avec le TIMP (A) ou par des inhibiteurs synthétiques pseudo-peptidiques qui entrent en compétition au niveau du site catalytique avec le substrat naturel (B). Les MMP sont aussi secrétées sous forme de pro-enzyme et doivent être activées par clivage protéolytique du pro-domaine. Ce clivage se produit soit dans le milieu extracellulaire par l'action des protéases (C), soit à la surface cellulaire en formant un complexe avec les TIMP (D). (Chantrain & DeClerck, 2002).

Chez les bovins il a été mis en évidence la sécrétion d'une gélatinase (MMP-9) par les neutrophiles du lait, lors du phénomène de dégranulation rencontré au cours des mammites (Li et al., 1999, Raulo et al., 2002). Par ailleurs, pour être douées d'activité protéolytique, les MMP doivent être activées par clivage du pro-domaine. Cette activation peut se faire soit dans le milieu extra-cellulaire, soit à la surface cellulaire ou encore dans le cytoplasme. L'activité des MMP dans l'espace extracellulaire dépend de l'équilibre entre leur inhibition et leur activation (Figure 10).

### **III. 4. 1. 3. 3. Les protéases à cystéine**

Les protéases à cystéine possèdent un mécanisme de catalyse commun, une structure globulaire double, ainsi qu'une masse moléculaire identique 23 à 27 kDa (Turk *et al.*, 1997). Les principales protéases à cystéine comprennent des cathepsines B, H, L, S (Owen et Campbell, 1999).

Ces protéases sont synthétisées sous forme de proenzymes qui sont activés en enzyme dans les lysosomes. La cathepsine B a un pH optimum neutre à 37 °C, et joue un rôle important dans la protéolyse intracellulaire (Considine et al., 2004). La cathepsine B sécrétée sous forme de précurseur, activée par la cathepsine D ou le tPA, agit sur la conversion du pro-uPA en uPA mais aussi sur l'activation des pro-MMP (Magboul et al., 2001).

### **III. 4. 1. 3. 4. Les protéases aspartiques**

**A. La cathepsine D** (EC. 3.4.23.5) est une protéase aspartique lysosomale qui a une activité optimale à pH acide avec un pH optimum de 3,5 (Larsen & Petersen., 1995); sa masse moléculaire est 44 kD. Quatre formes de la cathepsine D ont été retrouvées dans le lait. La procathepsine D dont la masse moléculaire est de 53 kDa, la pseudocathepsine D (forme intermédiaire résultant de l'autoprotéolyse) et les chaînes simples et doubles, ont toutes été mises en évidence dans le lait de vache ; elles sont essentiellement présentes dans le lactosérum (Larsen et al., 1996). Lors de la réponse inflammatoire, la cathepsine D peut être sécrétée par les macrophages dans l'espace intracellulaire. Bien que cette protéase ne soit que peu active à pH 7, il est possible au niveau des sites d'inflammation que le pH péricellulaire soit suffisamment bas pour lui permettre de dégrader certaines protéines membranaires (Owen et Campbell, 1999). Si la procathepsine D du lait humain est capable d'activer les granulocytes neutrophiles et lymphocytes par régulation de certains récepteurs de surface, le rôle de la procathepsine D du lait de vache n'a pas encore été élucidé (Hayes et al., 2001).

**Tableau 10.** Produits de la protéolyse des caséines par les protéases des cellules somatiques.

Substrat	Protéase	Produits de protéolyse	Références
Caséine- $\alpha_{s1}$	Elastase	f1-15; f1-24; f16-24; f25-30; f25-37; f105-113; f144-150; f144-148; f144-154; f151-161; f155-169; f164-172; f166-171; f166-176; f170-196; f172-187; f174-179; f174-197; f174-199; f187-199; 195-199.	Considine <i>et al.</i> (2000) (élastase porcine)
	Cathepsine G	f1-16; f1-21; f1-23; f34-X; f151-165; f174-199.	Considine <i>et al.</i> (2002) cathepsine G de leucocytes humains
	Cathepsine D	Peptide f1-23 Peptide f24-199 Peptide $\alpha_{s1}$ -I f24/25-199 Peptide f165-199	McSweeney <i>et al.</i> (1995) (cathepsine D de lait bovin)
	Cathepsine B	f1-98; f1-149; f24/25-98; 24/25-149; f99-149; f99-199; f150-199.	Larsen <i>et al.</i> (1996) (cathepsine D de lait bovin)
	Cathepsine B	f24-X; f126-X; f10-X, f71-X; f111-X	Considine <i>et al.</i> (2004) (cathepsine B de lait bovin)
Caséine- $\alpha_{s2}$	Cathepsine D	f1-99; f1-123; f1-180; f1-182; f100-123; f124-180; f100-180; f100-182; f124-182; f181-207; f183-207	Larsen <i>et al.</i> (1996) (cathepsine D de lait bovin)
Caséine- $\beta$	Elastase	f27-40; f27-49; f53-82; f53-95; f57-95; f57-96; f59-97; f59-101; f96-108; f102-119; f102-131; f164-189; f164-190; f191-204	Considine <i>et al.</i> (1999) (élastase porcine)
	Collagénase	f1-6; f58-63; f64-69; f103-108; f125-130; f199-204	Gilles et Keil (1976) Collagénases bactériennes **
	Cathepsine G	f53-X; f55-X; f57-X; f59-X; f69-X; f84-X; f88-X; f97-X; f103-108; f120-X; f128-X; f130-X; f170-X; f185-190.	Considine <i>et al.</i> (2002) (Cathepsine G de leucocytes humains)
	Cathepsine B	f94-X ; f58-X ; f169-X ; f1-X ; f183-X ; f8-X	Considine <i>et al.</i> (2004) (cathepsine B de lait bovin)
	Cathepsine D	Peptide $\beta$ -I f1-189/192 Peptide $\beta$ -II f1-165/167 Peptide $\beta$ -III f1-143/144	McSweeney <i>et al.</i> (1995) (cathepsine D de lait bovin)
		f1-52 ; f1-58 ; f1-81 ; f1-96 ;f1-125 ; f1-127 ; f1-143 ; f1-157; f1-161 ; f1-165 ; f1-191 ; f1-192 ; f1-205 ; f53-58 ; f53-81 ; f53-96 ; f53-125 ; f53-127 ; f53-143 ; f53-157 ; f53-161 ; f53-165 ; f53-191 ; f53-192 ; f53-205 ; f53-209 ; f59-81 ; f59-96 ; f59-125 ; f59-127 ; f59-143 ; f59-157 ; f59-161 ; f59-165 ; f59-191 ; f59-192 ; f59-205 ; f59-209 ; f82-96 ; f82-125 ; f82-127 ; f82-143 ; f82-157 ; f82-161 ; f82-165 ; f82-191 ; f82-192 ; f82-205 ; f82-209 ; f97-125 ; f97-127 ; f97-143 ; f97-157 ; f97-161 ; f97-165 ; f97-191 ; f97-192 ; f97-205 ; f97-209 ; f126-127 ; f126-143 ; f126-157 ; f126-161 ; f126-165 ; f126-191 ; f126-192 ; f126-205 ; f126-209 ;	Larsen <i>et al.</i> (1996) (cathepsine D de lait bovin)



Substrat	Protéase	Produits de protéolyse	Références
Caséine- $\beta$	Cathepsine D (suite)	f128-143 ; f128-157 ; f128-161 ; f128-165 ; f128-191 ; f128-192 ; f128-205 ; f128-209 ; f144-157 ; f144-161 ; f144-165 ; f144-191 ; f144-192 ; f144-205 ; f144-209 ; f158-161 ; f158-165 ; f158-191 ; f158-192 ; f158-205 ; f158-209 ; f162-165 ; f162-191 ; f162-192 ; f162-205 ; f162-209 ; f166-191 ; f166-192 ; f166-205 ; f166-209 ; f192-205 ; f192-209 ; f193-205 ; f193-209 ; f206-209	Larsen <i>et al.</i> (1996) (cathepsine D de lait bovin)
Caséine- $\kappa$	Cathepsine D	Paracaséine- $\kappa$ f1-105 CMP f106-169  f1-32 ; f1-79 ; f33-79 ; f33-105 ; f80-105 ; f33- 169 ; f80-169	McSweeney <i>et al.</i> (1995) (cathepsine D de lait bovin) Larsen <i>et al.</i> (1996) (cathepsine D de lait bovin)

CMP : caséinomacropéptides

**Tableau 11.** Localisation et propriétés des différentes protéases d'*Escherichia coli* (Chung, 1993, Maurizi, 1992).

PROTEASE	SUBSTRAT	LOCALISATION	TYPE	DEGRADE LES CASEINES	PM
La (Iongène)	SulA, grosses protéines anormales Régulateurs protéiques de courte durée de vie	Cytoplasme	Sérine	OUI	450 kDa
ClpAP (Ti, Clp)	Grosses protéines anormales	Cytoplasme	Sérine	OUI	ClpA=140 kDa ClpP=240 kDa
ClpXP	Protéines anormales	Cytoplasme	Sérine	OUI	ND
ClpYQ (HSLUV)	Protéines anormales	Cytoplasme	Sérine	OUI	ND
Do (htrA)	Protéines anormales	Périplasme	Sérine	OUI	500 kDa
tsp (RE)	Protéines endommagées par l'oxydation.	Périplasme	Sérine	OUI	tsp=82 kDa
Mi	ND	Périplasme	Sérine	OUI	Mi=110 kDa
ProtéaseVII (ompt)	ND	Périplasme	Sérine	OUI	ND
Fa	Grosses protéines. Protéines endommagées par l'oxydation.	Périplasme	Sérine	OUI	Fa=110 kDa
So		Cytoplasme	Sérine	OUI	So=140 kDa
Ci	insuline	Cytoplasme	métalloprotéase	NON	Ci=54 kDa
ProtéaseIII (Pi)	Insuline, petites protéines PM<7 DA à forte séquence spécifique entre Tyr-Leu, Phe-Tyr	Périplasme	métalloprotéase	NON	Pi=110 kDa

### **III. 4. 1. 4. Sensibilité des caséines aux enzymes des cellules somatiques**

Des études *in vitro* ont montré que l'ordre de protéolyse était préférentiellement  $CN-\alpha_{s1} > CN-\beta \gg CN-\kappa$  pour les enzymes des cellules somatiques (Grieve & Kitchen, 1985). L'action des enzymes des cellules somatiques n'est possible que si les enzymes entrent au contact du substrat, soit dans le cas où les enzymes sont libérées dans le milieu extracellulaire (dégranulation des granulocytes), soit dans le cas où les caséines sont phagocytées par les cellules et hydrolysées puis libérées. Les spécificités de coupure des différentes protéases leucocytaires sont présentées dans le tableau 10.

### **III. 4. 1. 5. Les sources exogènes de la protéolyse**

Beaucoup d'études ont abordé le potentiel protéolytique des bactéries responsables des contaminations microbiennes post-traitée (notamment les bactéries psychrotrophes). Par contre, très peu d'études ont concerné les capacités protéolytiques vis-à-vis des caséines *in vivo* des bactéries pathogènes induisant une dégradation de l'état sanitaire. Outre la caséine- $\beta$ , *E. coli* (souche K-12) est capable de dégrader la caséine- $\alpha_{s1}$  et sérum albumine bovine grâce à la protéase La (gène *Lon*) (Charrette & al., 1981). Depuis, plusieurs peptidases ont été isolées (tableau 11) dont sept capables d'utiliser les caséines comme substrat. Si les protéases Ci et Pi ne sont pas capables d'hydrolyser la caséine, elles dégradent des petits peptides comme l'insuline et des fragments amino-terminaux de la  $\beta$ -galactosidase. Les protéases cytoplasmiques sont susceptibles de dégrader les protéines intracellulaires anormales (les caséines ne sont pas un substrat normal pour *E. coli*) alors que les protéases périplasmiques Mi et Pi peuvent, de par leur localisation, dégrader des protéines extracellulaires. Cependant, il reste encore beaucoup d'interrogations quant aux rôles physiologiques de ces protéases (Chung, 1993).

*E. coli* possède trois types de protéases localisées au niveau du cytoplasme, de la membrane cytoplasmique et du périplasma:

- La protéine majeure de cette classe est la longène (EC 3.4.21.53), appelé aussi Lon protéase, elle est responsable de la reconnaissance et de la dégradation sélective des protéines anormales et instables (Goldberg, 1992). Ces protéines résultent d'une dénaturation et d'une modification de leur structure due à une perturbation du fonctionnement des cellules épithéliales sécrétrices suite à

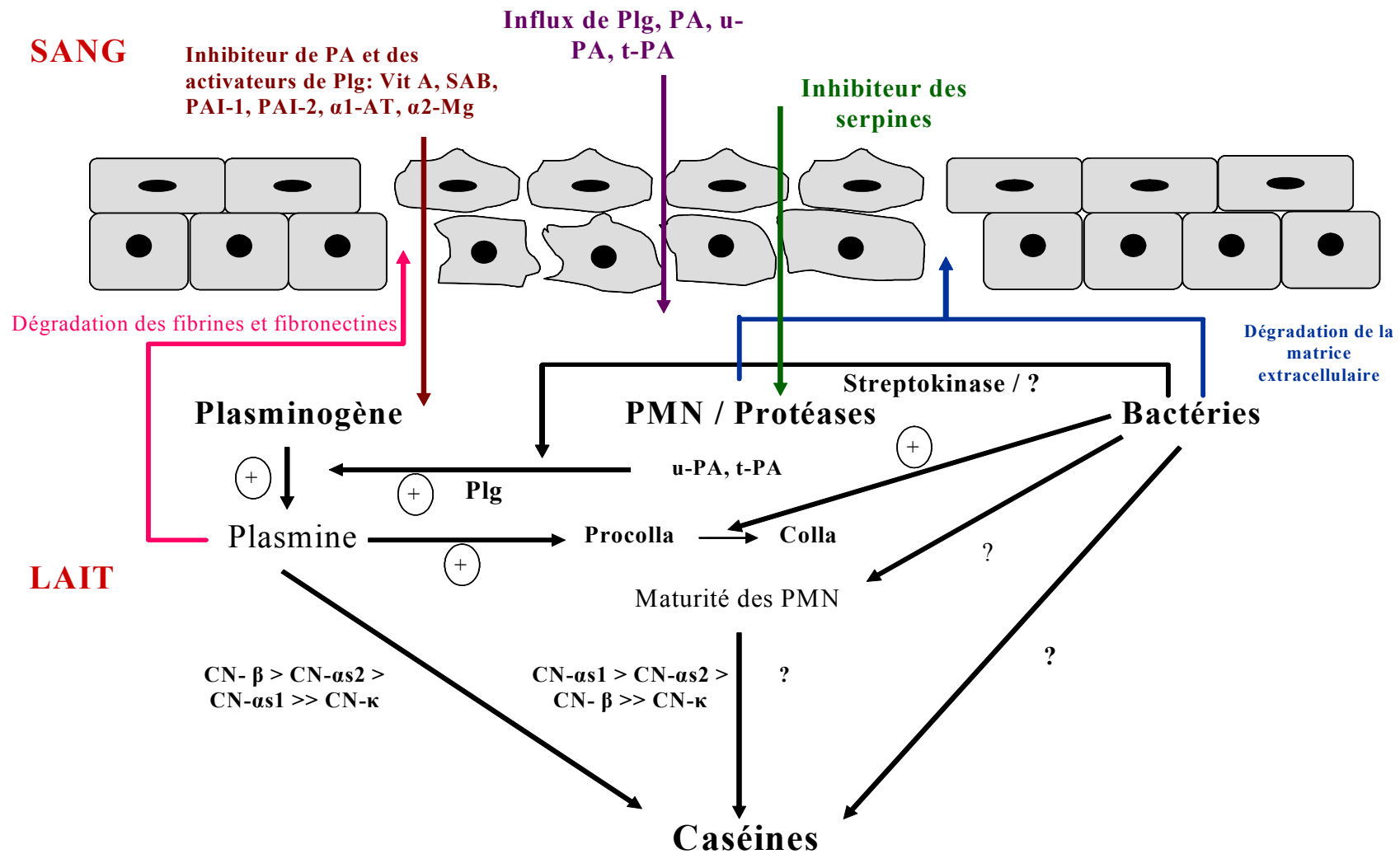


l'inflammation provoquée par *E. coli*. Cette protéase est sous forme de tétramère *in vivo*, avec un poids moléculaire de 36 kDa (Gottesman & al., 1992). Tous les monomères sont essentiels pour l'activité et le fonctionnement de la protéase car chaque molécule de monomère contient deux sites, un site ATPase et l'autre protéolytique. Bien que de petits peptides puissent être dégradés sans ATP, l'intérêt du site ATPase concerne la dégradation des protéines larges.

- La ClpAP (protéase caséinolytique) est une sérine protéase, souvent appelée Ti (Katayama et al., 1988). L'enzyme est constituée d'une sous unité de ClpA qui est un hexamère avec un poids moléculaire de 83 kDa et d'une sous unité dodécamère ClpP d'un poids moléculaire de 21 kDa. La ClpA possède une activité ATPase intrinsèque dont l'intensité de dégradation des substrats augmente en présence de ClpP, cette dernière possède une activité protéolytique et peut agir indépendamment de la ClpA pour dégrader les petits peptides hydrophobes (Woo & al., 1989).
- L'Aminobenzoyl-glutamate (abgA) et la leucine aminopeptidase (LAP) sont des metalloprotéases avec différentes localisations cellulaires cytoplasmique, périplasmique et membranaire. Ces protéases sont cependant peu étudiées dans la littérature.

#### **III. 4. 1. 6. Sensibilité des protéines du lait aux bactéries pathogènes**

Très peu d'études ont abordé la dégradation des protéines laitières par les protéases de bactéries pathogènes. Les extraits d'enzymes extracellulaires de *S. aureus* et *E. coli* sont capables de dégrader 9,6% et 6,7% de la caséine  $\beta$  respectivement (Verdi et Barbano, 1991). Cependant dans cette étude, la concentration des extraits enzymatiques n'est pas connue, les conditions de réalisation sont très éloignées des conditions existante *in vivo* et la virulence des souches n'est pas prise en compte.



**Figure 11.** Schéma récapitulatif de la régulation de la caséinolyse endogène et exogène dans le lait.

$\oplus$  = activation ; Plg = plasminogène ; PA = plasmine ; u-PA = urokinase plasmin activator ; t-PA = tissular plasmin activator ; SAB = sérum albumine bovine ; PAI-1 = inhibiteur de type 1 de t-PA ; PAI-2 = inhibiteur de type 2 de t-PA ;  $\alpha_1$ -AT =  $\alpha_1$ -antitrypsine ;  $\alpha_2$ -Mg =  $\alpha_2$ -macroglobuline ; colla = collagénase ; procolla = procollagénase.

## CONCLUSION

La protéolyse dans le lait lors des infections de la glande mammaire est un phénomène complexe. Son intensité peut dépendre de la souche bactérienne mise en jeu, du nombre, du type, de la maturité des cellules somatiques, de la régulation du système plasmine-plasminogène et des interactions entre ces différents facteurs (Figure 11). Si dans un lait sain, le système plasmine-plasminogène est le facteur principal de la caséinolyse, lors de l'inflammation de la mamelle, un rôle majeur est attribué à la fois à ce système mais aussi aux cellules somatiques et aux leucocytes en particulier; toutefois, peu d'études se sont intéressées à l'impact des bactéries sur ce mécanisme, d'où l'intérêt de mieux préciser le rôle direct et indirect des bactéries et de leurs protéases sur la caséinolyse et de caractériser les interactions entre le système bactéries/protéases bactériennes et le système plasmine/plasminogène.

Les connaissances sur le rôle des cellules somatiques restent très imparfaites. Si il est montré que le dénombrement cellulaire et le type cellulaire impliqué joue un rôle sur la caséinolyse (notamment les leucocytes), l'étude de la maturité cellulaire est sans doute une piste pour mieux comprendre ce phénomène. En effet, au cours de l'inflammation, pour un nombre de leucocytes élevé mais relativement constant, les activités protéolytiques se montrent particulièrement variables; cette expression variable des protéases leucocytaires pourrait avoir pour origine une maturité différentielle des PMN.

Notre étude aura pour objectif de mieux appréhender la caséinolyse dans le lait et de mieux comprendre le rôle des différents facteurs intervenant, pour cela nous nous proposons de mesurer :

- La protéolyse dans un système complexe en faisant intervenir l'ensemble des facteurs endogènes (système plasmine/plasminogène, cellules somatiques) et exogènes (bactéries).
- Le potentiel protéolytique spécifique au facteur bactérien.
- L'influence de la maturité cellulaire sur l'activité protéolytique dans le lait.





*Matériel et  
Méthodes*





**Tableau 12.** Récapitulatif des principales analyses effectuées lors des trois essais.

	Essai <i>E. coli</i>	Essai <i>in vitro</i> ( <i>E. coli</i> )	Essai LPS
Nombre de vaches	8	4	3
Durée de l'essai	216 h	24 h	76 h
Dénombrement cellulaire du lait	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>
Identification des cellules somatiques	<b>X</b>		<b>X</b>
Numération bactérienne	<b>X</b>	<b>X</b>	
Activité protéolytique intracellulaire	<b>X</b>		
Activité protéolytique par zymographie	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>
Activité de la plasmine	<b>X</b>	<b>X</b>	
Teneur en protéose peptones (PP)	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>
Proportions en Peptides insolubles à pH 4,6		<b>X</b>	
pH		<b>X</b>	

## MATERIEL ET METHODES

### I. RECAPITULATIF DES ESSAIS

Un premier essai impliquant huit vaches laitières effectué en collaboration avec le Laboratoire de Physiologie, Biochimie et Biométrie du Professeur Burvenich à l'Université de Gand (Belgique) a permis de suivre la cinétique des variations de la composition du lait et de la caséinolyse en relation avec les activités protéolytiques des PMN lors d'une mammite expérimentale à *E. coli*.

Les mécanismes déterminant les modifications de la composition du lait, et notamment le rôle d'*E. coli* dans la protéolyse des caséines, ont pu être approchés lors d'un essai *in vitro* par inoculation directe de la bactérie dans un lait de mélange des quatre quartiers de 4 vaches.

Enfin la caractérisation des activités protéolytiques des PMN en relation avec la maturité dans le lait a été suivie pendant une mammite expérimentale à LPS réalisée sur les vaches du domaine expérimental de l'ENSAIA.

Pour les trois essais (tableau 12), les animaux ont été choisis au cours d'une période de présélection variant de 3 à 10 jours avant l'épreuve, le principal critère retenu étant l'absence de pathogènes majeurs dans la mamelle.

L'épreuve correspondant à T0 désigne l'infusion dans un quartier d'une solution susceptible de déclencher une réaction inflammatoire se traduisant par une élévation du dénombrement cellulaire dans le lait.

L'épreuve pour le premier et le troisième essai a été réalisée immédiatement après une vidange complète des 4 quartiers, et sur un seul quartier par vache. Elle a consisté en une infusion d'une solution par le canal du trayon à l'aide d'une aiguille métallique rodée à son extrémité. La solution d'eau physiologique utilisée, dans les conditions maximales d'asepsie, contenait soit des bactéries vivantes, soit une endotoxine comme telle dans les quartiers témoin. Après l'injection, un massage du trayon du bas vers le haut avait pour but de favoriser la diffusion de la solution à l'intérieur de la mamelle.

Dans chaque essai, la composition du lait du quartier infusé a été suivie en parallèle pour chaque traite avec la composition du lait d'un quartier choisi comme témoin, afin de s'affranchir des variations dépendant du facteur individu vache (numéro de la lactation, stade de la lactation, alimentation, etc.).



## **II. MESURES EFFECTUEES DIRECTEMENT SUR L'ANIMAL**

### **II. 1. Prélèvement des premiers jets en conditions aseptiques**

Pour le diagnostic bactériologique et les numérations bactériennes, un volume de lait de 20 à 40 mL est prélevé en conditions aseptiques. Le lait est collecté rapidement dans un flacon et est immédiatement refroidi à 4°C dans un bac isolé et conservé à cette température jusqu'à analyses.

### **II. 2. Mesure de la production et prélèvement de lait**

Au cours des essais, les animaux expérimentaux ont été isolés et ont été traités selon la cinétique de prélèvement. Pour la traite, ils sont amenés en dernier moment. La traite est effectuée à l'aide d'une machine à traire séparant le lait des quatre quartiers et mesurant les volumes quartier par quartier.

## **III. ANALYSES**

### **III. 1. Préparation des échantillons de lait**

Un volume de 30 mL de lait de chaque quartier (infecté ou non infecté) est mélangé à une pastille de conservateur (Bronopol). Les échantillons de lait sont conservés à 4°C avant d'être envoyés au laboratoire Interprofessionnel départemental de Meurthe-et-Moselle pour analyse de dénombrement cellulaire (DC) (Fossomatic 5000, Foss Electric, Hillerød, DK), des taux butyreux et protéique. Des dilutions adaptées de certains laits de forte concentration cellulaire ont été effectuées en utilisant comme diluant le lait de quartier sain.

Le lait destiné à l'isolement des cellules somatiques (250 mL) a été maintenu à température ambiante, l'isolement et l'identification des cellules ont été effectués dans les 2 h suivant la traite.

### **III. 2. Isolement des cellules somatiques du lait**

Les cellules somatiques du lait de quartier ont été isolées d'après la méthode de Dulin et al. (1982). Un volume de 120 mL de lait frais est dilué au demi dans une solution de PBS pH 7,2 ; le mélange est homogénéisé et centrifugé à 350 g, 10 min 20°C. Le culot obtenu est rincé dans le PBS et recentrifugé à 250 g, 10 min à 20°C. Le culot cellulaire est repris dans un milieu DMEM complet (sigma, St. Louis, MO, USA) contenant du glucose (1 g/L) et complété en L-glutamine 4 mM (m/v), sérum de veau fœtal 10% (v/v), insuline 5 µg/mL, hydrocortisone 5 µg/mL, pénicilline 100 U/mL et streptomycine 100 U/mL





### **III. 3. Prélèvement de sang**

Les prélèvements de sang ont été effectués soit dans la veine jugulaire à l'aide d'un cathéter lorsque la fréquence des prélèvements l'exigeait soit par ponction dans la veine caudale. Les échantillons de sang sont collectés dans des tubes Vacutainer de 10 mL contenant de la lithium-héparine (Becton Dickinson, San Jose, CA), ils sont transportés à température ambiante et sont analysés dans les 6 heures suivant le prélèvement.

### **III. 4. Préparation des échantillons de sang**

Pour chaque échantillon, 25 µL de sang ou de suspension cellulaire sont dilués dans 20 mL d'une solution isotonique (Isoton<sup>®</sup> II, Coulter Electronics, D-47705 Krefeld, Germany) à laquelle sont ajoutés 200 µL de la solution lysante (Zap-Oglobin<sup>®</sup>; Coulter Electronics).

Un volume de 10 mL de sang a été prélevé dans des tubes Vacutainer contenant de l'EDTA (Becton Dickinson, San Jose, CA). Les dénombrements des globules blancs ont été déterminés par un automate (Coulter counter Z2, Coulter Electronics Ltd., Luton., UK). Les pourcentages des PMN matures et juvéniles sont déterminés en microscopie optique (Axioscop 2 MOT) après une coloration eosin-Giemsa (Hemacolor<sup>®</sup> Merk Diagnostics, Darmstadt, Germany).

Pour chaque échantillon, un volume de 10 mL de sang a été centrifugé (2300 g, 15 min, 4°C). A l'aide d'une pompe à vide le plasma a été aspiré pour laisser 2 mL de sang dans le tube, puis les cellules sont lavées selon le protocole d'isolement des cellules somatiques de sang.

### **III. 5. Préparation des fractions protéiques**

#### ***III. 5. 1. Les caséines***

L'extraction des caséines a été effectuée à partir de lait écrémé, une acidification à l'aide d'acide acétique 1 M à pH 4,6 a permis la précipitation des caséines. Après centrifugation (6000 g, 15 min, 20°C), le culot est repris dans une solution NaOH 1 M. Les échantillons sont ensuite dialysés à 10 000 Da, 48 h sous agitation et à 4°C, puis lyophilisés.

#### ***III. 5. 2. Les protéines du lactosérum***

Le lactosérum a été obtenu par précipitation des caséines d'un lait écrémé avec de l'acide acétique pH 4,6. Le surnageant est centrifugé (6 000 g, 15 min à 20°C) puis filtré. Le lactosérum ainsi obtenu est dialysé à 10 000 Da, sous agitation à 4°C pendant 48 h. Les échantillons sont ensuite lyophilisés.



### **III. 5. 3. Les protéose-peptones**

Les protéose-peptones sont préparées selon la méthode d'Aschaffenburg (1946). Le lait est écrémé (3 000 g, 45 min, 4°C) puis chauffé à 95°C pendant 30 min. Après refroidissement à 30°C, le lait est acidifié à pH 4,6 avec de l'acide acétique 5 N et filtré pour récupérer le surnageant S1. Une partie du surnageant S1 est gardée pour le dosage d'azote par la méthode Kjeldhal. Le reste de S1 est précipité avec de l'acide trichloroacétique (TCA) 20 % (concentration finale de 12 %) et l'ensemble est centrifugé à 6 000 g, 10 min, 4°C. Le surnageant S2 sert pour le dosage d'azote (fraction PP2) et le culot des protéose-peptone après lavage à l'éthanol-éther (v/v) est récupéré par filtration et séché. Ainsi, à partir d'un litre de lait frais entier, on obtient entre 0,7 et 1,2 g de PP pour un lait normal.

### **III. 6. Electrophorèse en gel polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium**

La méthode en tampon discontinu de Laemmli et Favre (1973) est utilisée. Le gel est formé d'un gel de séparation (T : 15,4% ; 2,7%) en tampon Tris HCl 0,38 M, pH 8,8 contenant 0,1% (m/v) de SDS et d'un gel de concentration (T : 4,9% ; C : 2,7%) en tampon Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8 contenant 0,1 (m/v) de SDS. L'épaisseur des gels est de 1,5 mm. Les échantillons lyophilisés sont dissous à 2 mg/mL dans un tampon Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8 contenant 2% (m/v) de SDS, 5% (v/v) de 2-mercaptoéthanol, 10% (v/v) de glycérol et 0,01% (m/v) de bleu de bromophénol. Les échantillons subissent un traitement thermique à 100 °C pendant 3 min. Le tampon d'électrode (pH 8,3) se compose de 50 mM de Tris, 384 mM de glycine et de 0,1% (m/v) de SDS. Des dépôts de 10 µL (20 µg) de CN, 12 µL (24 µg) d'hydrolysate de CN, 30 µL (60 µg) de PP sont effectués dans les puits du gel. La migration électrophorétique est effectuée sous les conditions électriques de 60 mA, 30 W et 500 V (par gel) pendant 2 h 30 environ, à 4 °C.

Pour la détection de la cathepsine B dans le lait, le lactosérum et le lysat des cellules somatiques, un gel tris-tricine est réalisé. Le gel est formé d'un gel de séparation à 10% et d'un gel de concentration à 4%. Avant de déposer les échantillons, les puits du gel sont remplis avec le tampon à cathode contenant 0,1 M tris base, 0,1 M de tricine et 0,1% de SDS. La migration électrophorétique est effectuée sous les conditions électriques de 100 V par gel, dans un tampon anode contenant 0,2 M tris-Cl, pH 8,9.

Deux lots de marqueurs de masse moléculaire (Biorad, Hercules, CA, USA), ont été utilisés. Le premier est constitué d'un mélange de myosine (200,0 kDa),  $\beta$ -galactosidase (116,2 kDa), phosphorylase b (97,4 kDa), sérum albumine bovine (66,0 kDa), ovalbumine (45,0 kDa),



anhydrase carbonique (31,0 kDa), inhibiteur trypsique (21,5 kDa), lysosyme (14,4 kDa) et aprotinine (6,5 kDa). Le second lot est constitué d'un mélange pré-marqué (protéines associées de manière covalente à une molécule colorée, expliquant l'écart des MM avec le lot précédent) de myosine (204,0 kDa),  $\beta$ -galactosidase (121,0 kDa), sérum albumine bovine (82,0 kDa), ovalbumine (50,2 kDa), anhydrase carbonique (34,2 kDa), inhibiteur de la trypsine (28,1 kDa), lysosyme (19,4 kDa) et aprotinine (7,3 kDa).

### **III. 7. Mesure des activités protéolytiques**

#### ***III. 7. 1. Activité protéolytique des leucocytes du sang et du lait***

Les mesures des activités protéolytiques intracellulaires ont été réalisées à la Faculté de Médecine (Nancy) en collaboration avec le Laboratoire d'Immunologie du Professeur Faure. Trois réactifs CellProbe™, GPLGP collagénase, TP cathepsine et AAPV élastase (Beckman Coulter), sont utilisés dans cette étude. Ces réactifs sont constitués de substrats synthétiques, non fluorescents, de faible MM et de forte polarité, leur permettant de traverser activement la barrière cytoplasmique sans perméabilisation préalable. Une fois dans le cytoplasme ou dans les granules, ces substrats peuvent être dégradés par les protéases spécifiques correspondantes, entraînant la libération d'une molécule fluorescente (la rhodamine 110) détectable en cytométrie de flux, et d'un groupe protéique non fluorescent. L'intensité de la fluorescence émise est alors proportionnelle à l'activité protéolytique mesurée. Les réactifs CellProbe™ élastase, collagénase et cathepsines sont constitués de trois substrats spécifiques de séquence respective (Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-**Rho 110**, Thr-Pro-**Rho 110** et Ala-Ala-Pro-Val-**Rho 110**).

Pour chaque échantillon, deux aliquots de 50  $\mu$ L de cellules ( $3 \pm 0,5 \cdot 10^6$  Cell/mL) lavées sont préchauffés au bain-marie à 37 °C pendant 10 min. Juste avant l'emploi, les réactifs CellProbe™ sont reconstitués à l'aide de 250  $\mu$ L d'eau distillée et 25  $\mu$ L de chaque réactif sont ajoutés aux cellules préchauffées. Les mélanges sont alors délicatement homogénéisés. Un témoin (Blanc) a été réalisé en remplaçant le réactif CellProbe™ par du PBS et ceci pour chaque échantillon. Après 10 min d'incubation à 37 °C, la réaction est stoppée par un choc thermique en plaçant les tubes dans de la glace pendant 10 min afin d'arrêter toute activité enzymatique. A cette étape, les globules rouges sont lysés à l'aide d'un système Multi-Q-Prep (Beckman Coulter). Pour les cellules somatiques du lait, 1 mL de PBS froid est ajouté. Les activités enzymatiques sont alors mesurées en cytométrie de flux (Epics, XL, Beckman Coulter, Hialeah, FL, USA) dans les 15 min suivant l'arrêt de la réaction dans le but d'éviter toute libération de fluorescence et marquage non spécifique. Un histogramme biparamétrique



permet la discrimination entre lymphocytes, monocytes et PMN. Un histogramme de contrôle permet la représentation de l'intensité de fluorescence des trois types cellulaires. Le pourcentage et la fluorescence moyenne des cellules marquées sont enregistrés par l'appareil sous forme d'histogrammes monoparamétriques. Les résultats sont exprimés sous forme de ratio de fluorescence pour chaque point rapporté à son blanc et pour un nombre identique de cellules tout au long de la cinétique (Prin Mathieu et al., 2002).

### ***III. 7. 2. Dosage de l'activité de la plasmine***

L'activité de la plasmine est quantifiée par l'hydrolyse d'un substrat dont la dégradation libère un composé coloré jaune en quantité proportionnelle à l'activité protéolytique. Le substrat synthétique utilisé est le D-Val-Leu-Lys 4-p-nitroanilide dihydrochloride (Sigma) dilué dans un tampon à pH 8 contenant du thimérosal 0,1 % (m/v) et de l'imidazole 0,1 % (m/v) à la concentration finale de 1 mM. Un volume de 0,5 mL de lait est ajouté à 1,5 mL de solution de substrat et le mélange est porté à incubation à 37 °C pendant 3 h. Après addition de transparentant (2 mL), le mélange est agité et l'absorbance est lue à 405 nm dans les 15 min qui suivent. Une gamme étalon est réalisée parallèlement. Les résultats sont exprimés en micromoles de 4-p-nitroanilide libérées par unité de temps et de volume de la solution à doser ( $\times 10^{-6}$  mol/L/h) (Humbert, 1986).

### ***III. 7. 3. Mesure des activités protéolytiques dans le lait par zymographie***

Les activités protéolytiques contenues dans le lait, le lysat des cellules somatiques du sang ainsi qu'un échantillon de la plasmine commerciale (sigma) ont été analysés par zymographie. Le principe de cette analyse consiste en une migration électrophorétique des protéines dans un gel de polyacrylamide – SDS imprégné de caséine ou de gélatine. Les protéases sont mises en évidence par leur capacité à dégrader leur substrat, ce qui se traduit, après coloration du substrat, par des bandes blanches sur un fond bleu.

Les échantillons lyophilisés sont dilués dans du tampon échantillons [Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8 contenant 0,1% (m/v) de SDS, 10% (v/v) de glycérol et 0,01% (m/v) de bleu de bromophénol], puis soumis à une électrophorèse en gel de polyacrylamide 10%, SDS 0,1 %, contenant 0,1 % de substrat (caséinate de sodium ou gélatine). La migration électrophorétique est effectuée sous les conditions électriques de 100 V pendant 60 min environ, à 4 °C. La même quantité de protéines est déposée pour chaque échantillon, soit 15 mg/mL. Après l'électrophorèse le gel est soumis à une agitation lente, dans une solution de Triton X-100 à 2,5 % (m/v) pendant une heure à température ambiante. Cette opération permet de renaturer





les protéines en éliminant le SDS. Le gel est alors incubé pendant 24 h à 37 °C pour les gels à gélatine dans un tampon d'incubation [50 mM Tris-HCl (m/v), 10 mM CaCl<sub>2</sub> (m/v), 150 mM NaCl (m/v), 2,5% Tween 80 et 0,02% NaN<sub>3</sub>, pH 7,6] et pendant 3 jours d'incubation pour les gels à caséine. Les gels sont ensuite colorés dans une solution de bleu de Coomassie G-250 0,5 % (m/v) (Raulo et al., 2002).

Les mesures des différentes activités protéolytiques ont été effectuées par densitométrie (par analyseur GS-800 ; calibrated densitometer, BioRad, Hercules, CA), en déterminant l'intensité des plages de lyse mesurées sur les zymogrammes.

### **III. 8. Fractionnement azoté du lait**

Le fractionnement azoté est réalisé selon la méthode de Rowland (1938).

L'azote total (Nt) est extrait à partir de lait frais. Après homogénéisation, le lait est dilué au 1/10 dans de l'eau distillée.

L'azote soluble (Ns) est extrait à partir de lait écrémé. Après précipitation à pH 4,6 par de l'acide acétique 1 M, les échantillons sont centrifugés (6 000 g, 15 min, 20 °C). Le surnageant est récupéré, dilué au demi et filtré.

L'azote non protéique (ANP) est extrait à partir de lait entier. Les protéines sont précipitées à l'aide d'acide trichloroacétique (de concentration finale 12% (v/v)), le surnageant est récupéré et filtré.

Pour chaque fraction, les échantillons sont dans un premier temps minéralisés par addition d'acide sulfurique concentré et d'un catalyseur (Kjeldaltherm, Gerhardt, Allemagne). Pour Nt, Ns et ANP, le dosage a été effectué en double sur un automate selon la méthode de Kjeldhal (Vadoplast 6, Gerhardt, Allemagne). Les teneurs en protéines totales (PT), caséines (CNt) et en protéines solubles (PS) sont exprimées en g/L et sont issues des valeurs en azote protéique, en azote caséique et en azote des protéines solubles corrigées par les facteurs de conversion 6,38 et 6,30 et 6,34 respectivement (Ribadeau-Dumas et Grappin, 1989).

Teneur en protéines totales :  $PT = 6,38 \times (NT - ANP)$

Teneur en caséines :  $CN = 6,30 \times (NT - Nsol)$

Teneur en protéines solubles :  $PS = 6,34 \times (NS - ANP)$



### **III. 9. Immunoblotting**

L'immunoblot a été réalisé afin de caractériser la présence d'enzymes. Tous les échantillons sont préparés selon la méthode pour EGPA-SDS. Les protéines contenues dans le gel sont ensuite transférées sur une membrane de polyvinylidene fluorure (Millipore, France). Pour cela le gel et la membrane sont mis entre deux feuilles de papier Whatman, puis l'ensemble est traversé par un courant électrique de 300 mA appliqué afin que les protéines se fixent sur la membrane. Ces membranes sont incubées avec l'anticorps primaire pendant 12 h à 4°C, puis avec l'anticorps secondaire pendant 2 h à température ambiante. Les conjugaisons anticorps-antigènes sont marquées spécifiquement et peuvent être révélées par une réaction à la streptavidin alkalin phosphatase (Biovalley, France) pendant 30 min. La coloration enzymatique est réalisée avec du 4-nitroblue tetrazolium chloride et 5-bromo 4-chloro- 3-indolylphosphate (kit commercial, Sigma, France).

### **III. 10. Electrotransfert des protéines (milieu liquide)**

Pour réaliser le transfert à des fins de séquençage, la membrane de polyvinylidene fluorure (PVDF ; Immobilon-P, Millipore, Milford, MA) est préalablement trempée 2 s dans le méthanol puis lavée 2 min dans l'eau ultra-pure et équilibrée 10 min dans du tampon de transfert composé de 10 mM d'acide 3-(cyclohexylamino)-1-propanesulfonique (CAPS), pH 11 contenant 10% (v/v) de méthanol. Après migration électrophorétique, le gel polyacrylamide est équilibré 15 min dans le tampon de transfert puis disposé sur la membrane Immobilon-P en veillant à ce qu'il n'y ait pas de bulle d'air entre le gel et la membrane. L'ensemble est comprimé légèrement entre deux blocs de Scotch-Brite® et le tout est placé dans une cuve verticale (modèle TE-50 Transphor Cell ; Hoeffer Scientific Instrument, San Francisco, CA, USA) contenant le tampon de transfert. L'orientation du système est telle que le gel est disposé côté cathode et la membrane côté anode. La migration des bandes du gel vers la membrane est réalisée à 4 °C avec un voltage constant de 100 V et un courant de 0,5 A pendant 5 h. La membrane est ensuite colorée à l'aide d'une solution de 0,2 % (m/v) de rouge Ponceau S, 1% (v/v) d'acide acétique puis décolorée avec de l'eau ultra-pure. Les bandes d'intérêt ainsi visualisées sont découpées et stockées à -20 °C en attendant d'être séquencées.



### **III. 11. Révélation des protéines par bleu de Coomassie**

Après migration électrophorétique, les protéines sont fixées dans le gel par de l'acide trichloroacétique (TCA) à 12 % (m/v) pendant 1 h, puis révélées pendant 2 h par une suspension colloïdale de bleu de Coomassie R 250 à 0,1 % (m/v) dans un mélange d'éthanol 50% (v/v) et de TCA à 2% (m/v) pendant une durée minimum de 2 h. La décoloration des gels est effectuée par plusieurs lavages dans une solution d'éthanol à 30% (v/v) et d'acide acétique 7,5% (v/v). Le gel est ensuite séché entre deux feuilles de cellophane. L'analyse densitométrique (GS-800 ; calibrated densitometer, BioRad, Hercules, CA) des bandes électrophorétiques a été réalisée à 633 nm après coloration au bleu de Coomassie R 250. Les concentrations relatives de certaines protéines correspondent au produit de l'aire relative par la concentration correspondante en protéines dans le lait.

### **III. 12. Séparation des caséines par FPLC (colonne Mono Q)**

Les différentes caséines :  $-\alpha_s$ ,  $-\beta$ ,  $-\kappa$  ainsi que les peptides insolubles à pH 4,6 (comprenant les CN- $\gamma$ ) sont séparées par chromatographie FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography* ; Amersham Pharmacia, Uppsala, Suède) échangeuse d'anions sur la colonne Mono Q HR 5/5 (50 x 5 mm de diamètre interne ; taille de particules 10  $\mu$ m ; Amersham Pharmacia) d'après la méthode de Collin et al. (1991) modifié par Le Roux et al. (1995). Un volume de 200  $\mu$ L d'échantillon (16 mg/mL dans du tampon Tris-HCl 5 mM, pH 8 contenant 6 M d'urée et 10,2 mM de dithiothréitol et 0,02% (m/v) de  $\text{NaN}_3$  est injecté dans la colonne équilibrée dans du tampon d'élution Tris-HCl 5 mM, pH 8 contenant 4,5 M d'urée, 64 mM de dithiothréitol et 0,02% (m/v) de  $\text{NaN}_3$ . Un gradient 0-320 mM de NaCl est réalisé en 34,5 min et comporte plusieurs segments linéaires de pentes différentes. Le débit est de 2 mL/min et la détection est réalisée à 280 nm.



# *Résultats et Discussion*





# *Chapitre 1*

*« La protéolyse dans le lait et caractérisation des peptides issus de la fraction protéose-peptones dans le cas d'une mammite expérimentale à E. coli »*



**CHAPITRE I : La protéolyse dans le lait et caractérisation des peptides issus de la fraction protéose-peptones dans le cas d'une mammite expérimentale à *E. coli***

Si le modèle d'inflammation expérimentale à LPS utilisé *in vivo* a permis de mieux comprendre les différents mécanismes participant à la caséinolyse endogène (Moussaoui et al., 2002), le modèle d'infection expérimentale à *E. coli* n'a que très peu été utilisé dans ce contexte. Il en découle particulièrement que le rôle des polymorphonucléaires (PMN), très impliqués dans la réponse immunitaire lors de l'inflammation de la glande mammaire, ainsi que le rôle d'*E. coli* et de ses protéases reste peu étudié.

Le modèle de mammite expérimentale à *E. coli* a pour objectif de reproduire une infection de la glande mammaire faisant intervenir l'ensemble des facteurs de la protéolyse (endogène et exogène) ainsi que leurs potentielles interactions. L'objectif de ce chapitre est la mesure dans le lait de la cinétique de cette protéolyse via la caractérisation des produits de dégradation de la caséinolyse (plus particulièrement de la fraction PP), afin d'en mieux comprendre les mécanismes et les éventuelles interactions.

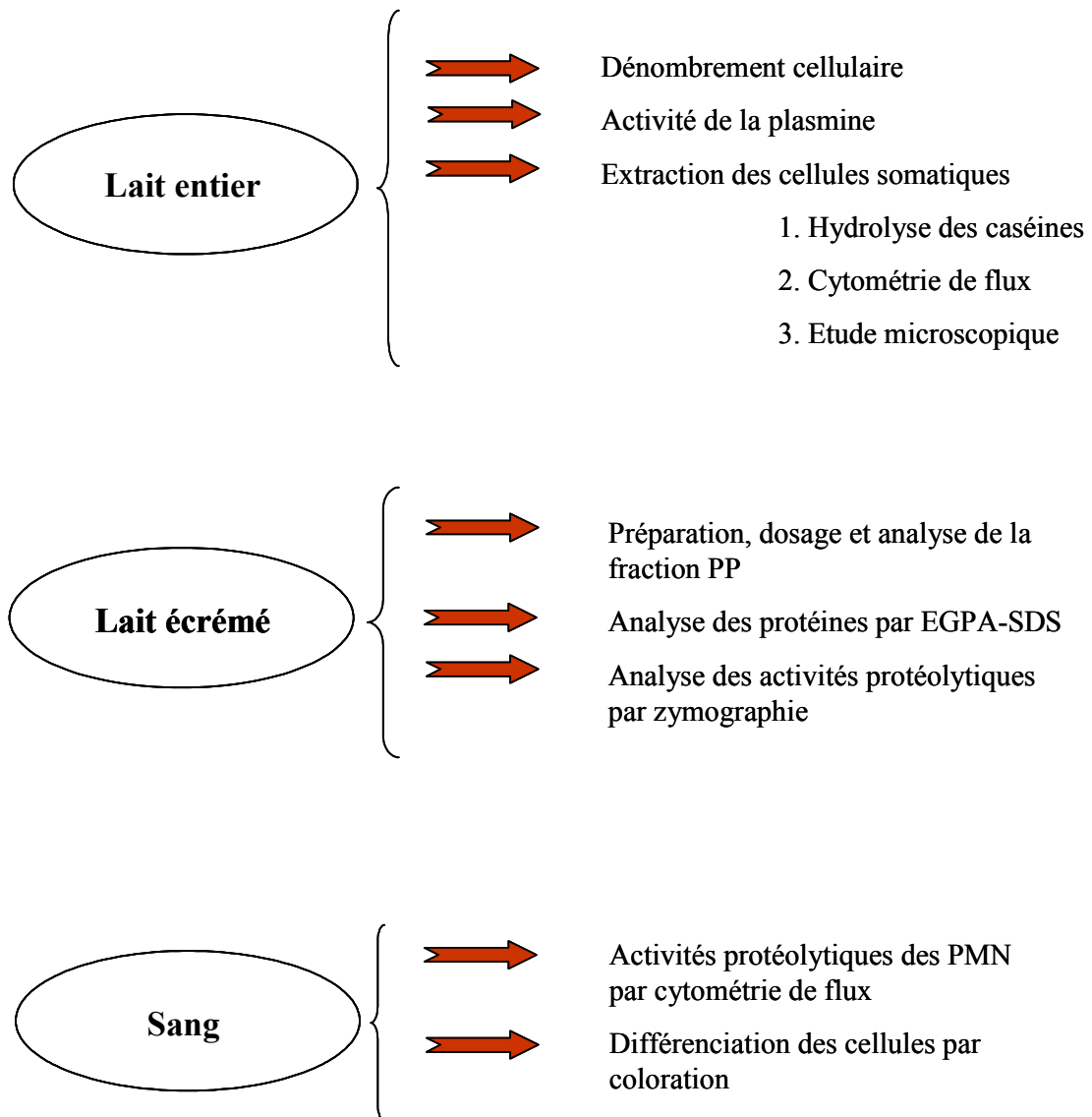
## **I. PROTOCOLE EXPERIMENTAL**

### **I. 1. Sélection des animaux**

Huit vaches de race Prim'Holstein ont été sélectionnées dans le troupeau laitier de la ferme expérimentale de l'Université de Gand en Belgique. Plusieurs critères sont considérés : un dénombrement cellulaire dans le lait des quatre quartiers < 100 000 cell/mL, une production de lait journalière globale supérieure à 28 L/j, enfin une absence de germes pathogènes majeurs (*Streptococcus uberis* ; *Streptococcus agalactiae* ; *Streptococcus dysgalactiae* ; *Staphylococcus aureus* ; *Escherichia coli*) dans les quatre quartiers.

Les vaches sont logées et nourries dans les mêmes conditions. Pendant l'expérimentation, la ration complète est composée d'ensilage de maïs, de paille de blé broyée, de concentré (Sandilac ; Dumoulin Voeders Sanders, Moorslede, Belgium) et de compléments minéraux.

**Figure 12:** Analyses effectuées sur le lait et le sang



## **I. 2. Inoculation**

La souche utilisée pour cet essai est la souche *Escherichia coli* P4 de sérotype 032, dépourvue de capsule. Elle provient d'un isolement obtenu à partir d'un cas spontané de mammite bovine au National Institute for Research in Dairying (UK).

Les quartiers sont préalablement désinfectés avec une solution à 70% d'éthanol contenant 0,5% de chlorhexidine. Juste avant l'inoculation, une suspension d'*E. coli* est diluée pour obtenir une concentration finale de  $1 \times 10^4$  ufc/mL (n = 4 vaches) et  $1 \times 10^6$  ufc/mL (n = 4 vaches). Le quartier avant gauche de chaque vache est infusé par le canal du trayon avec une solution contenant  $1 \times 10^4$  ufc ou  $10^6$  ufc d'*E. coli* dans un volume total de 10 mL d'une solution commerciale d'eau physiologique stérile apyrogène (NaCl à 0,9% m/v), juste après la traite correspondant au temps 0 h.

Aucune différence significative et aucune interaction entre la dose administrée et le temps n'a été observée dans les analyses effectuées sur les échantillons de lait et de sang, pour l'ensemble des variables mesurées. Les données issues des deux doses utilisées pour l'infection ont été cumulées pour l'ensemble des variables étudiées.

## **I. 3. Prélèvement de lait**

Pour le diagnostic bactériologique et les numérations bactériennes, des échantillons de lait ont été prélevés de manière aseptique sur les premiers jets. Le lait est collecté rapidement dans un flacon et est immédiatement refroidi à 4°C dans un bac isolé et conservé à cette température jusqu'à analyses (Figure 12).

Pour les analyses physico-chimiques, le lait a été collecté quartier par quartier à différents temps : -24 h, 0 (juste avant l'infection), 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 33, 48, 57, 72, 144 et 216 h après l'infection (PI).

## **I. 4. Hydrolyse enzymatique des caséines par un lysat des cellules somatiques**

L'extraction des cellules somatiques du lait a été réalisée 12 h PI de la cinétique inflammatoire, la concentration cellulaire est déterminée en microscopie optique par comptage par un automate (Coulter counter Z2, Coulter Electronics Ltd., Luton., UK) ; des dilutions sont effectuées dans du tampon acétate de sodium 0,2 M,  $\text{NaN}_3$  0,04% (m/v) pH 7,2 pour avoir une concentration finale de  $10^7$  c/mL.

La solution est soumise aux ultrasons pendant 30 min permettant la rupture des membranes et la mise en suspension des enzymes cellulaires afin de tester son activité caséinolytique. L'homogénat de cellules est ajouté à une solution de caséinate de sodium (CNt ; Sigma, St.

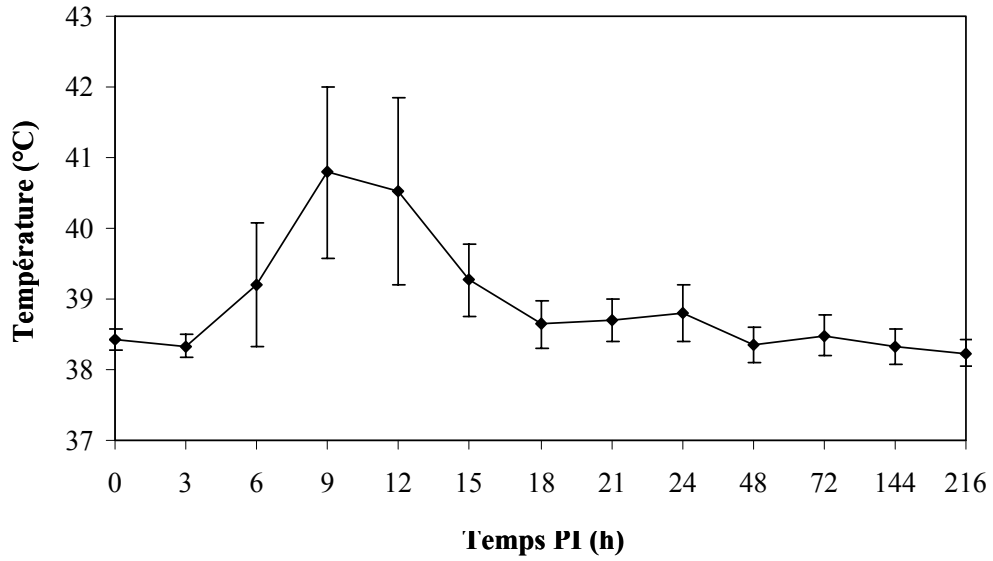


Louis, MO, USA) à 10 mg/mL dans un tampon acétate de sodium ; le rapport en volumes cellules/CN est de 5. Le mélange cellules/CN est incubé à 37°C. Les temps de prélèvement sont 0 et 12 h. Un standard CNT (sans cellule) est incubé et prélevé aux deux mêmes temps dans le but de détecter des dégradations des CN lors de l'incubation. Une mise au point des conditions optimales en terme de concentration cellulaire, de ratio des volumes cellule/CN, de pH et de temps d'incubation a été effectuée.

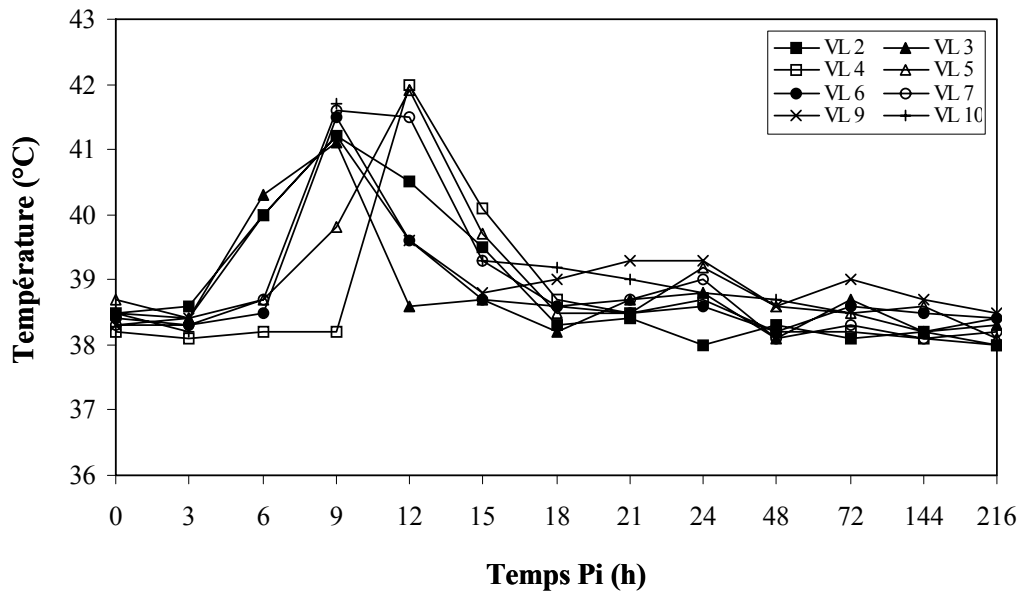
### **I. 5. Analyse des données**

Les effets de l'infection expérimentale à *E. coli* sur différents paramètres ont été déterminés par une analyse de variance en mesures répétées de la procédure MIXED (Logiciel SAS 6.12). Les paramètres étudiés sont les PP, l'activité de la plasmine, la SAB, le ratio de protéases cellulaires, la concentration en leucocytes.

A.

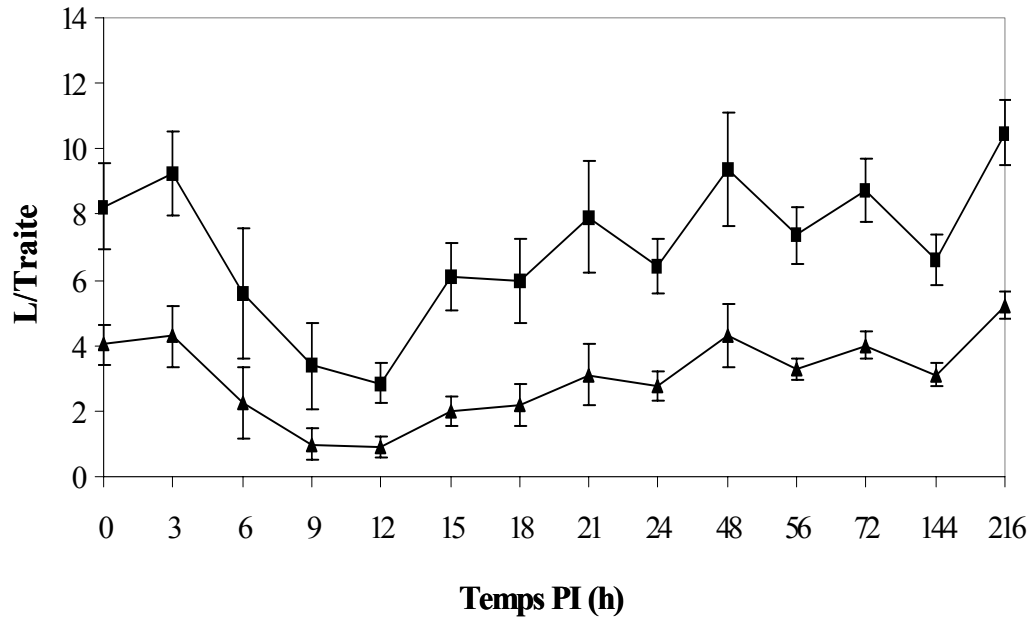


B.



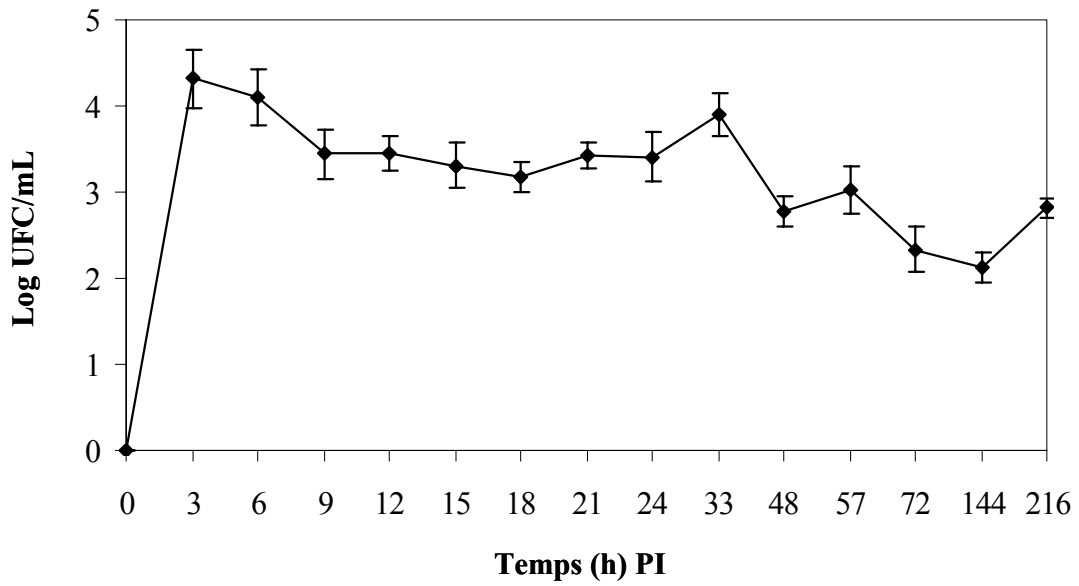
**Figure 13.** Evolution de la température rectale moyenne après inoculation intramammaire d'*Escherichia coli*. Les valeurs moyenne (A) et individuelles (B) ont été représentées. Les analyses ont été effectuées à 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 48, 72, 144 et 216 h. Le prélèvement à 0 h effectué avant inoculation est considéré comme témoin. PI : post inoculation.



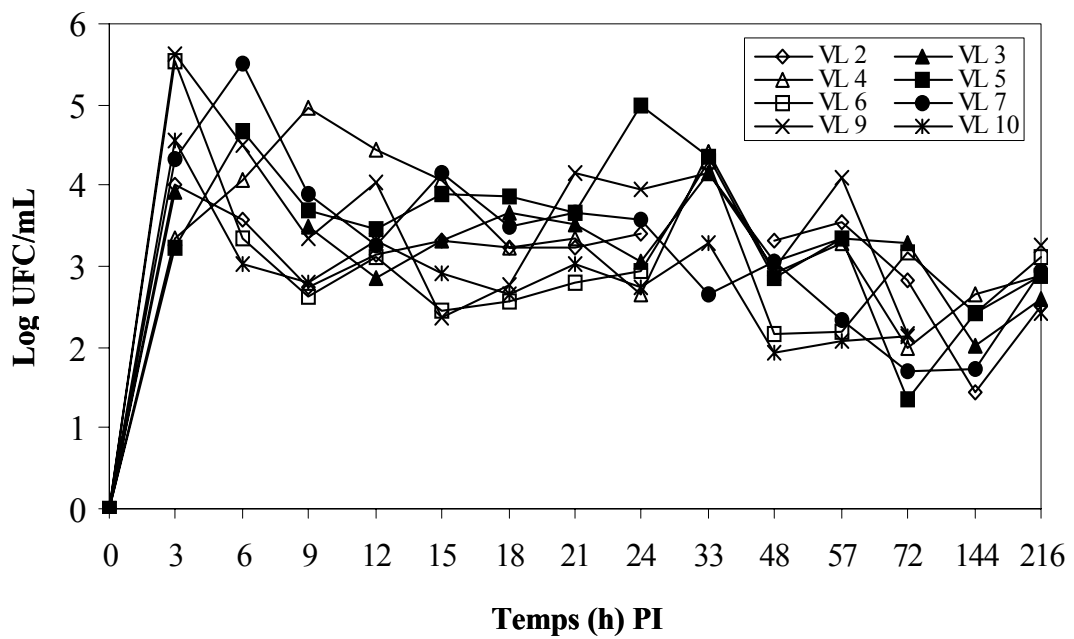


**Figure 14.** Evolution de la production de lait après inoculation intramammaire d'*Escherichia coli*. Les productions totales par traite de la moyenne des quatre quartiers (■) et du quartier infusé seul (▲) ont été représentées. PI : post infection.

A.

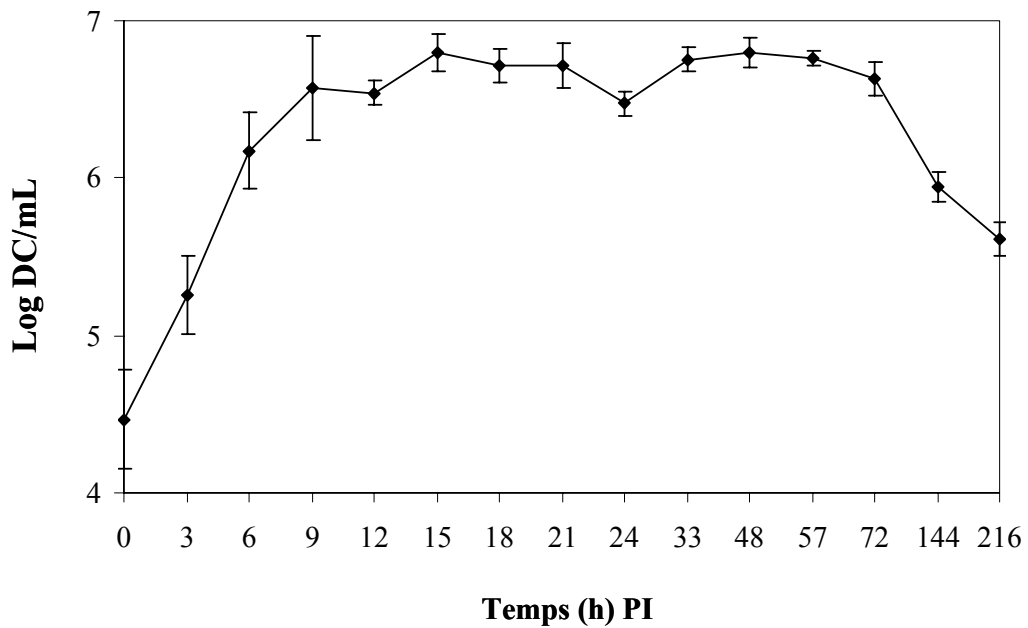


B.

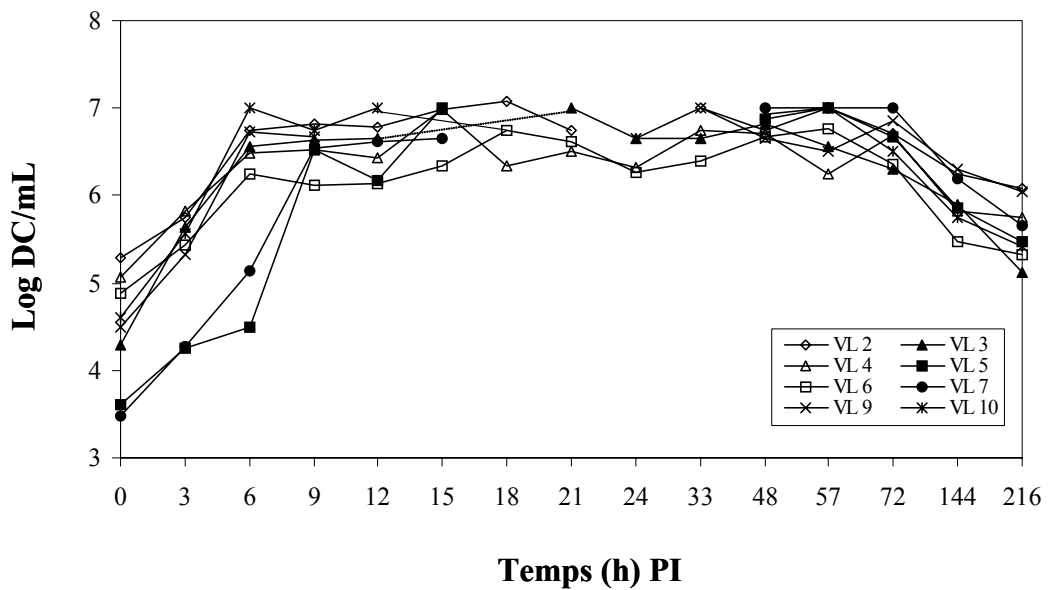


**Figure 15.** Evolution de la numération bactérienne (UFC) du lait du quartier infecté après inoculation intramammaire d'*Escherichia coli*. Les valeurs moyenne (A) et individuelles (B) ont été représentées. Les analyses ont été effectuées à 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 33, 48, 57, 72, 144 et 216 h. Le prélèvement à 0 h effectué avant inoculation est considéré comme témoin. Les barres d'erreurs non visibles sont comprises dans les symboles. PI : post inoculation.

A.

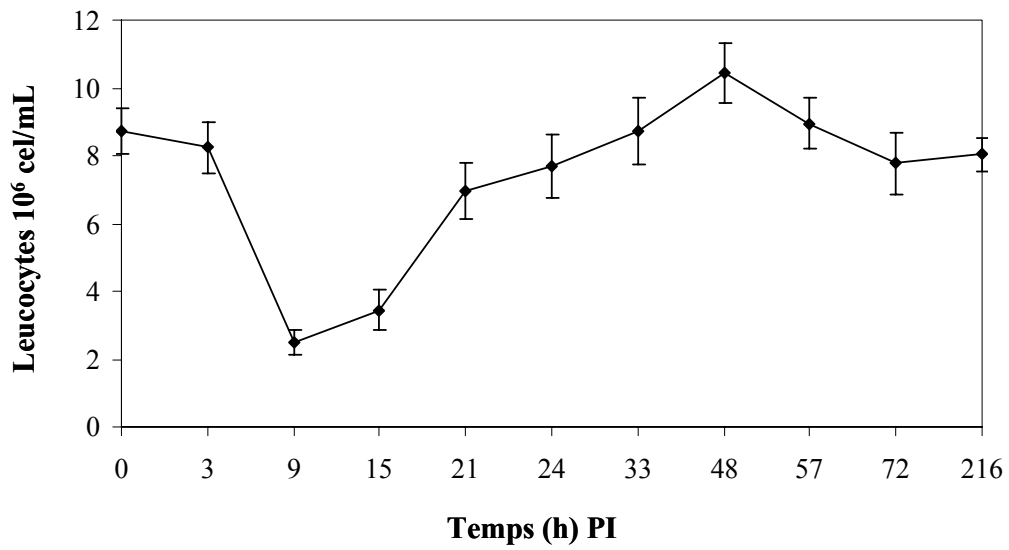


B.

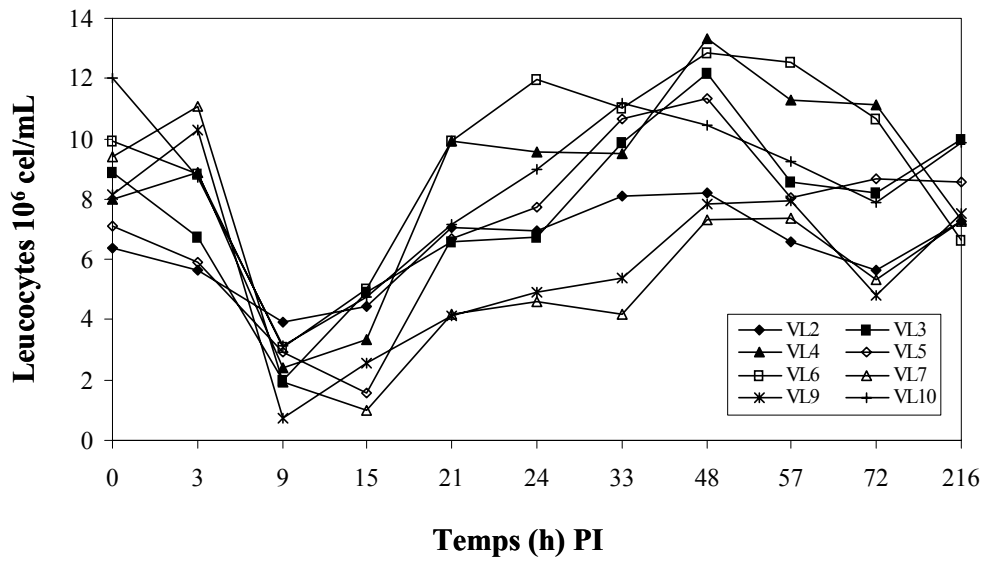


**Figure 16.** Evolution du dénombrement cellulaire (DC) des laits des quartiers après inoculation intramammaire d'*Escherichia coli*. Les valeurs moyennes (A) et individuelles (B) ont été représentées. La concentration cellulaire dans le lait a été déterminée après des dilutions préalables pour certains points, la limite de l'appareil étant de  $10^6$  cel/mL. Les analyses ont été effectuées à 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 48, 72, 144 et 216 h. Le prélèvement à 0 h effectué avant inoculation est considéré comme témoin. Les barres d'erreurs non visibles sont comprises dans les symboles. PI : post inoculation.

A.



B.



**Figure 17.** Evolution de la concentration en leucocytes du sang après inoculation intramammaire d'*Escherichia coli*. Les valeurs moyennes (A) et individuelles (B) ont été représentées. Les analyses ont été effectuées à 0, 3, 9, 15, 21, 24, 48, 57, 72 et 216 h. Le prélèvement à 0 h effectué avant inoculation est considéré comme témoin. Les barres d'erreurs non visibles sont comprises dans les symboles. PI : post inoculation.

## II. RESULTATS

### II. 1. Réponse clinique à *E. coli*

Tous les quartiers sont indemnes de pathogènes majeurs avant l'expérimentation, et aucune infection sauf celle provoquée par *E. coli* n'a été relevée durant toute la période expérimentale. La mamelle est congestionnée, douloureuse, chaude et volumineuse à 9 h PI. La sécrétion lactée est modifiée et présente alors un aspect séreux et aqueux. En moyenne la température rectale augmente à 6 h PI (post infection), avec un pic de fièvre à 9 h PI pour atteindre une température de 40,8 °C (Figure 13A), le retour à la normale est observé à partir de 21 h PI. Les valeurs individuelles montrent un pic de fièvre à 9 h PI pour six vaches, et à 12 h PI pour deux vaches, avec une valeur maximale de 42 °C (Figure 13B). Un retour aux valeurs initiales est observé à partir de 18 h PI.

Une baisse significative de la production moyenne de lait est constatée à 12 h avec – 65% pour les quartiers infectés, et – 35% pour les quartiers non infectés (Figure 14). Un retour aux valeurs initiales est observé deux jours après l'infection.

### II. 2. Numération bactérienne et dénombrement cellulaire du lait et du sang

Les valeurs moyennes des numérations bactériennes du lait des quartiers infectés dépassent  $10^4$  ufc/mL à 3 h PI pour tous les animaux, aucun retour à la normale n'est observé à 216 h PI (Figure 15A).

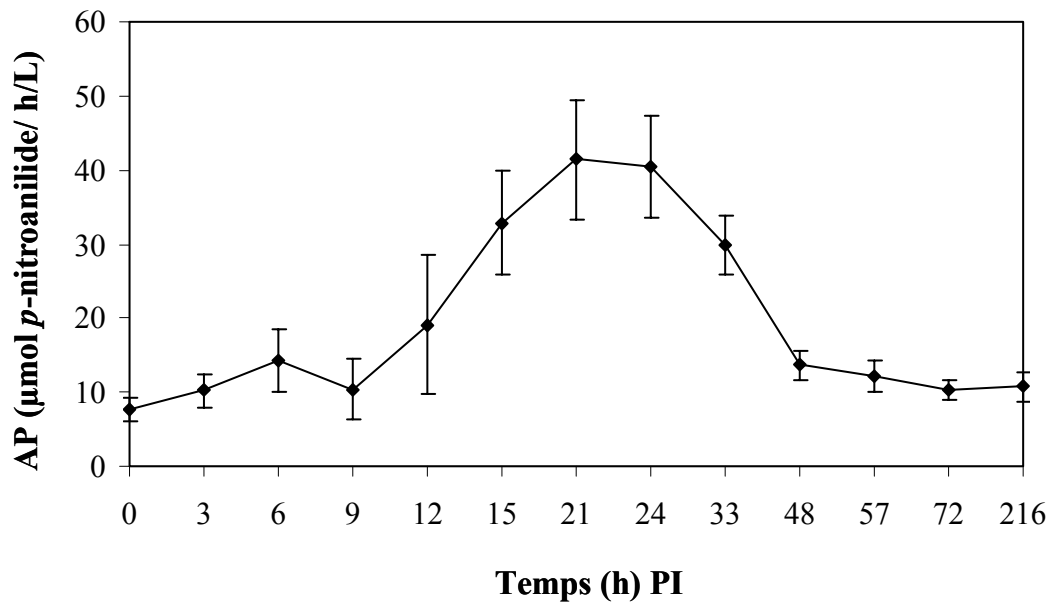
Les valeurs individuelles montrent un pic pour toutes les vaches entre 3 h et 6 h PI, avec un maximum de  $10^{5,6}$  ufc/mL (Figure 15B)

Le dénombrement cellulaire (DC) du lait avant l'infection est en moyenne de 59.000 cellules/mL, cette valeur augmente significativement à 3 h PI, un plateau est noté entre 9 h et 72 h PI avec des valeurs comprises entre  $10^{6,5}$  et  $10^{6,8}$ , puis une baisse est observée à 216 h PI, mais sans retour à la valeur initiale (Figure 16A).

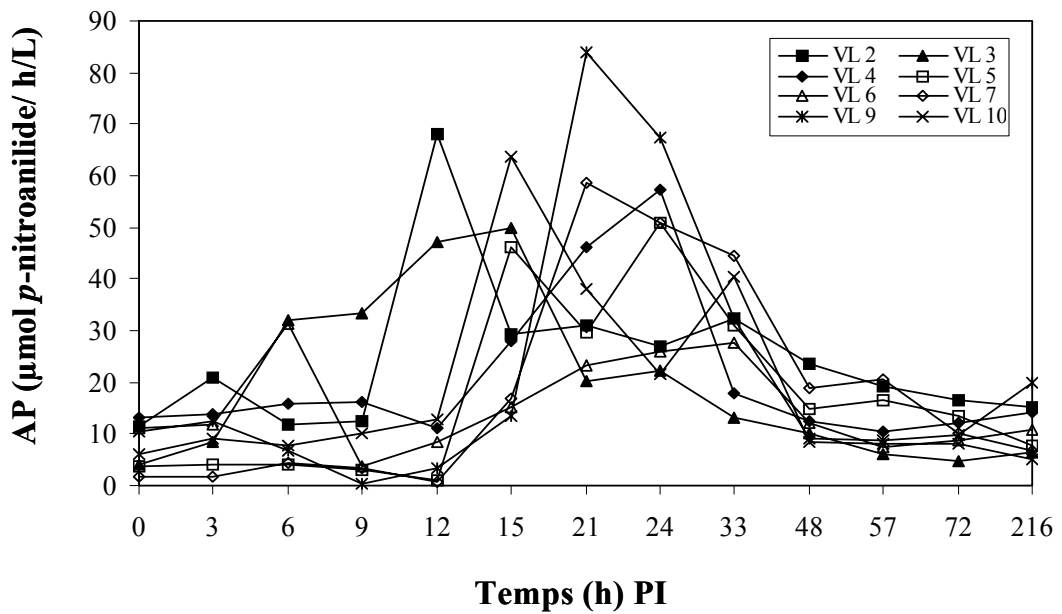
Les courbes individuelles apparaissent très répétables et montrent un pic pour toutes les vaches entre 6 h et 9 h PI, avec un maximum de  $10^{6,8}$  cel/mL, et un plateau pour tous les animaux entre 9 h et 72 h PI (Figure 16B).

Avant infection, le dénombrement en leucocytes sanguins est en moyenne de  $8,72 \cdot 10^6$  cel/mL. Une leucopénie importante est observée avec une diminution significative relevée entre 9 et 15 h PI avec une valeur de  $2,50 \cdot 10^6$  c/mL (Figure 17A). Une augmentation est ensuite observée à 21 h PI. Le retour aux valeurs initiales s'établit après 33 h PI.

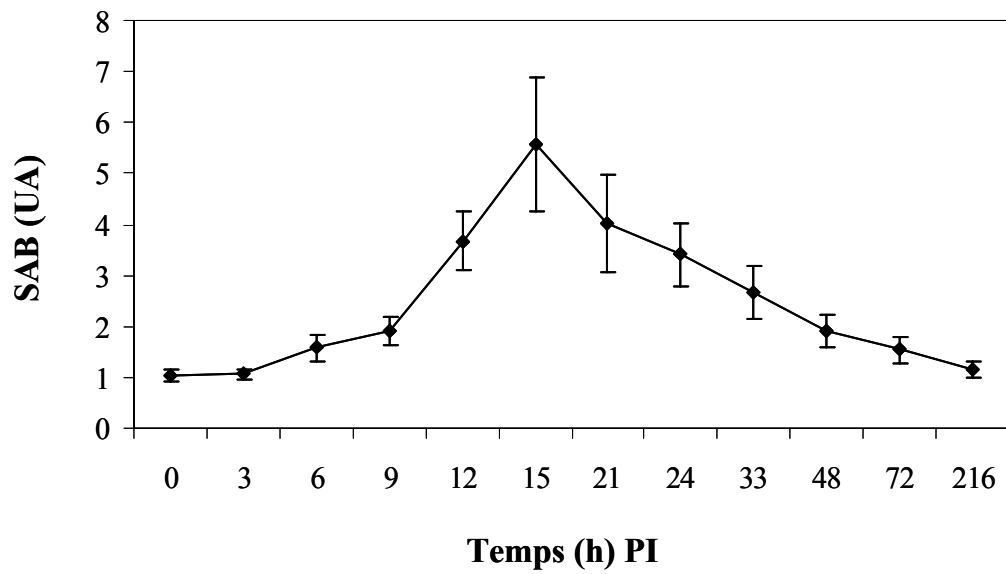
A.



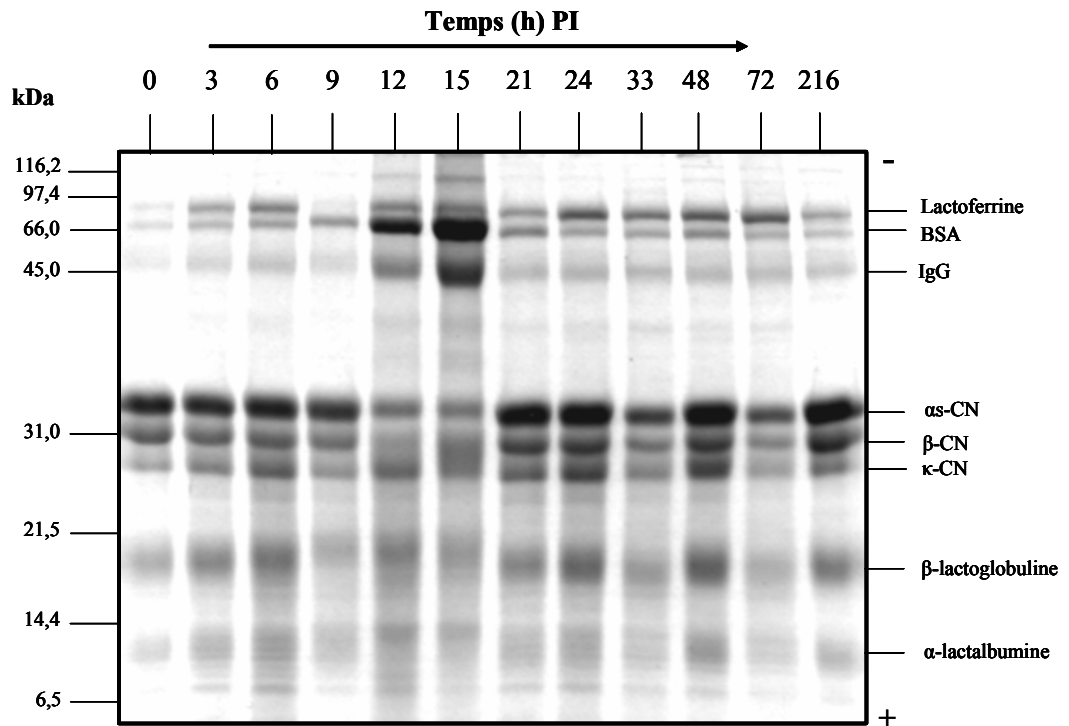
B.



**Figure 18.** Evolution de l'activité de type plasmine dans les laits de quartiers infectés après inoculation intramammaire d'*Escherichia coli*. Les valeurs moyennes (A) et individuelles (B) ont été représentées. Les analyses ont été effectuées à 0, 3, 6, 9, 12, 15, 21, 24, 33, 48, 57, 72 et 216 h. Le prélèvement à 0 h effectué avant inoculation est considéré comme témoin. Les barres d'erreurs non visibles sont comprises dans les symboles. AP : Activité de la plasmine, PI : post inoculation.



**Figure 19.** Valeur de la sérum albumine bovine (SAB) en unité arbitraire (UA) en prenant la base 1 pour T0, dans le lait infecté après inoculation intramammaire d'*Escherichia coli*. Ces valeurs ont été mesurées par densitométrie sur un gel EGPA-SDS de lait écrémé. PI : post inoculation.



**Figure 20.** Evolution de la composition des protéines dans le lait après inoculation intramammaire d'*Escherichia coli* (vache n° 2 montrée pour exemple). Les protéines ont été visualisées en électrophorèse EGPA-SDS. Des quantités de 20  $\mu$ g de protéines ont été déposées dans le gel. Les protéines ont été révélées au bleu de Coomassie. IgG : immunoglobulines. PI : post inoculation.



L'étude des courbes individuelles montre un dénombrement en leucocytes avant infusion compris entre 6 350 et 12 000 cel/mL (Figure 17B) ; il diminue dès 9 h PI pour les 8 vaches. Une augmentation est ensuite observée pour six vaches après 15 h PI et le retour aux valeurs initiales est noté entre 24 h et 48 h PI.

### **II. 3. Activité de la plasmine**

L'activité moyenne de la plasmine avant l'épreuve est de 7,7  $\mu\text{mol p-nitroanilide/h/L}$ . Elle augmente de manière significative à 15 h PI pour atteindre un maximum de 5,5 fois la valeur initiale à 21 h PI (Figure 18A).

Les courbes individuelles ne sont pas homogènes, une vache sur six présente un maximum d'activité à 12 h PI, trois vaches à 15 h PI et deux à 21 h PI (Figure 18B). Les valeurs maximales dépassent pour une vache les 80  $\mu\text{mol p-nitroanilide/h/L}$ .

### **II. 4. Composition protéique du lait**

#### **II. 4. 1. Les protéines du lactosérum**

La SAB augmente significativement entre 0 et 6 h PI avec une valeur maximale de 5,3 fois la valeur initiale à 15 h PI. Un retour à la valeur initiale est observé à 72 h PI (Figure 19).

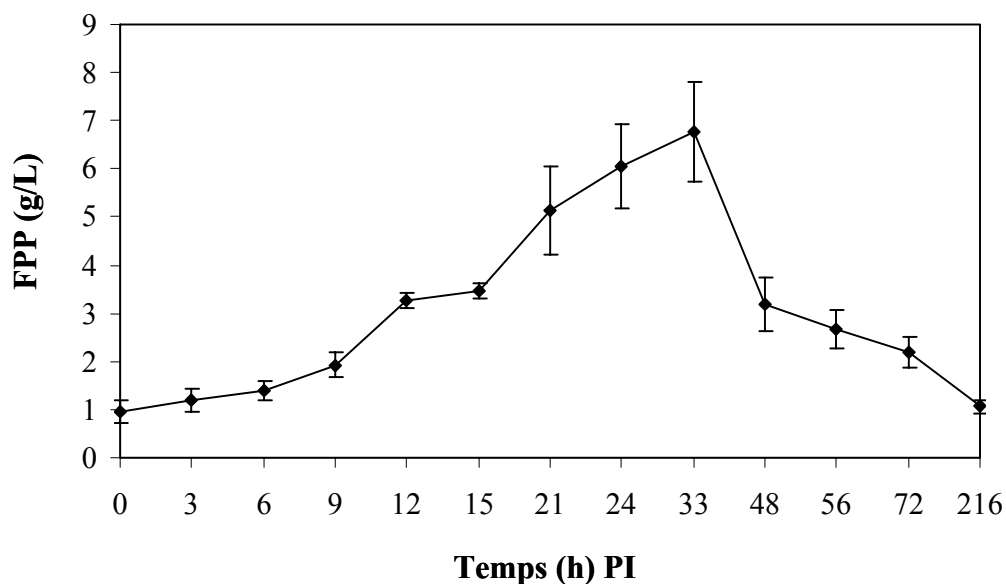
L'électrophorèse en conditions dénaturantes du lait montre un changement de la composition au cours du temps. La lactoferrine, la SAB et les IgG sont peu visibles dans le lait avant l'infection (Figure 20). La lactoferrine (Lf) dont la MM apparente 85 kDa, est nettement visible entre 24 et 72 h. La SAB et les Ig G de MM apparentes respectives de 66 kDa et 55 kDa, apparaissent de manière beaucoup plus intense entre 12 et 15 h, cette intensité diminue progressivement jusqu'à 72 h PI.

La  $\beta$ -lactoglobuline et l' $\alpha$ -lactalbumine de MM apparentes respectives 19,5 et 12,5 kDa, sont présentes durant toute la cinétique.

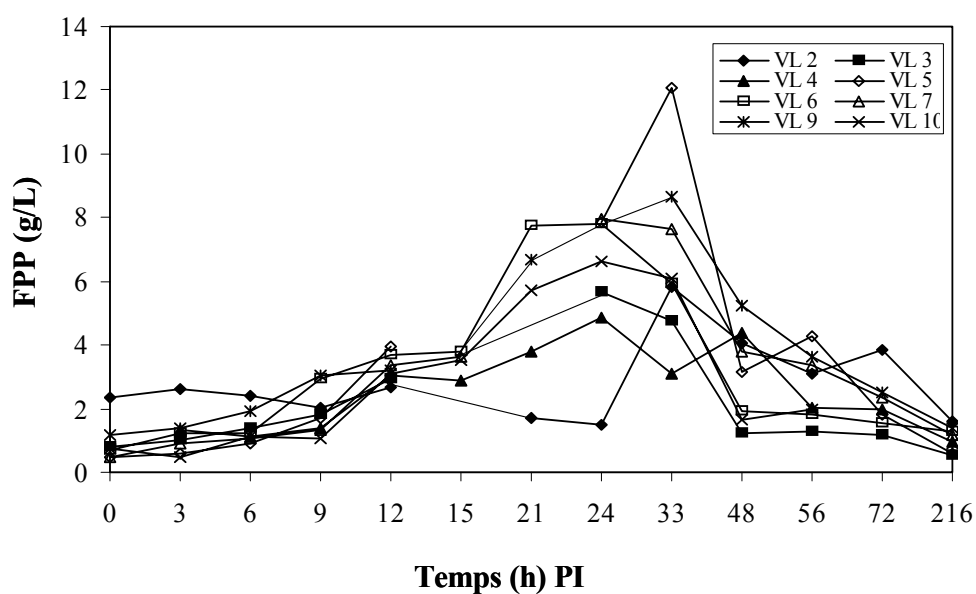
#### **II. 4. 2. Les caséines**

Pour les fractions caséiques, l'intensité des bandes varie peu au cours du temps, toutefois une faible baisse de l'intensité des bandes CN- $\alpha_s$  et  $-\beta$  est notée entre 12 et 15 h. De nombreuses bandes apparaissent au cours du temps, en particulier entre 12 et 33 h (Figure 20).

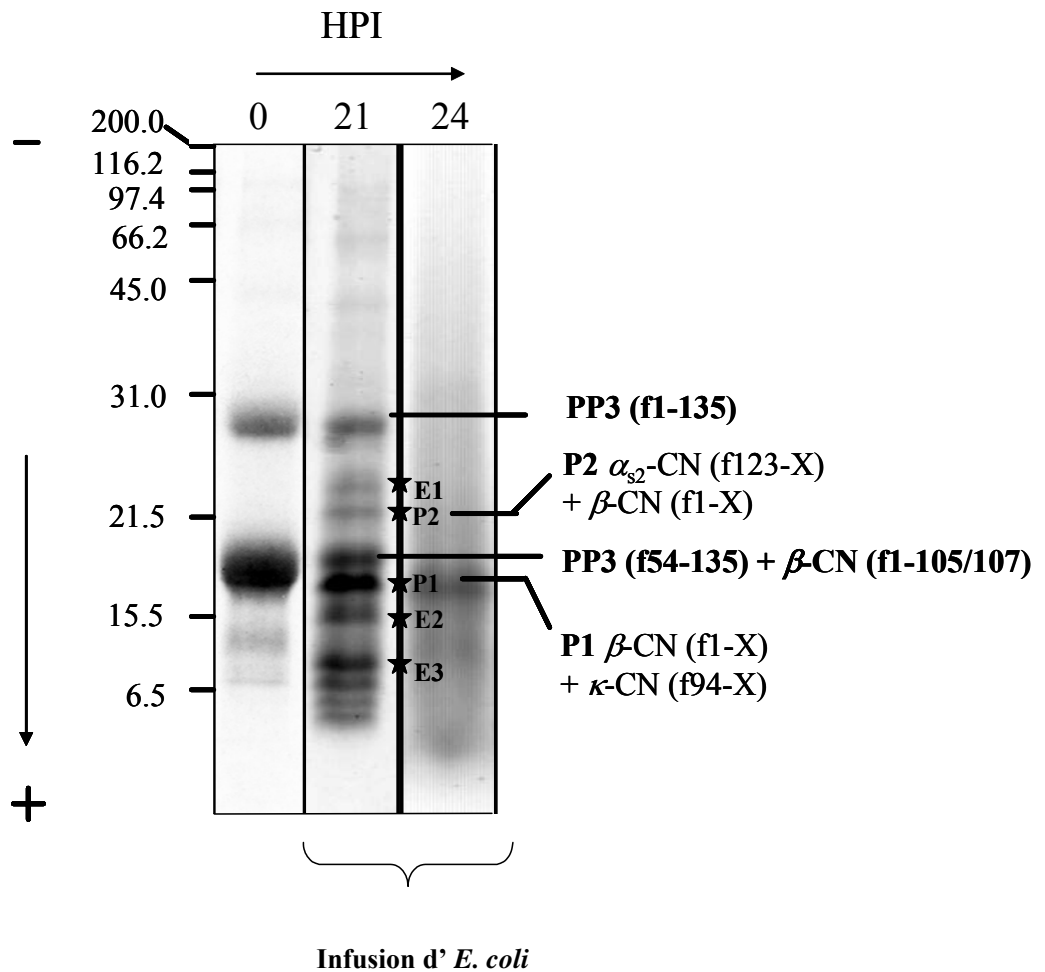
A.



B.



**Figure 21.** Evolution de la teneur en protéose-peptones (PP) du lait de quartier infecté après inoculation intramammaire d'*Escherichia coli*. Les valeurs moyenne (A) et individuelles (B) ont été représentées. Les analyses ont été effectuées à 0, 3, 9, 12, 15, 21, 24, 33, 48, 57, 72 et 216 h. Le prélèvement à 0 h effectué avant inoculation est considéré comme témoin. Les barres d'erreurs non visibles sont comprises dans les symboles. FPP : fraction protéose peptones. PI : post inoculation.



**Figure 22.** Profil électrophorétique par EGPA-SDS des fractions représentatives de protéose-peptones isolées du lait à 0 h, 21 h et 24 h et mise en évidence de l'apparition des bandes électrophorétiques E1, E2, E3, P1 et P2 après inoculation intramammaire par *E. coli*. Des quantités de 60  $\mu$ g de protéines ont été déposées dans les puits. Les protéines ont été révélées au bleu de Coomassie R 250. HPI : heure post inoculation.

**Tableau 13.** Séquençage amino-terminal des fragments P1, P2, E1, E2 et E3 trouvés dans la fraction PP et mis en évidence par EGPA-SDS.

Peptides	Masse moléculaire apparente (kDa)	Séquence amino-terminale	Identité	Proportion (%)
P1	17.5	NH <sub>2</sub> <b>R-E-L-E-E-</b>	$\beta$ -CN (f1-X)	90
		NH <sub>2</sub> <b>T-M-A-R-H-</b>	$\kappa$ -CN (f94-X)	10
P2	21.0	NH <sub>2</sub> <b>L-N-R-E-Q-L-S-T-</b>	$\alpha_{s2}$ -CN (f123-X)	70
		NH <sub>2</sub> <b>R-E-L-E-E-L-N-</b>	$\beta$ -CN (f1-X)	30
E1	27.0	NH <sub>2</sub> <b>R-E-L-E-E-L-N-V-P-</b>	$\beta$ -CN (f1-X)	55
		NH <sub>2</sub> <b>T-M-A-R-H-P-H-P-H-</b>	$\kappa$ -CN (f94-X)	45
E2	15.5	NH <sub>2</sub> <b>A-Q-(T)-Q-S-L-V-Y-P-F-P-</b>	$\beta$ -CN (f53-X)	39
		NH <sub>2</sub> <b>E-I-V-E-S-L-S-S-E-E-</b>	$\beta$ -CN (f11-X)	25
		NH <sub>2</sub> <b>N-L-L-R-F-F-V-A-P-F-P-</b>	$\alpha_{s1}$ -CN (f19-X)	20
		NH <sub>2</sub> <b>Y-Y-A-K-P-A-A-V-R-S-P-</b>	$\kappa$ -CN (f60-X)	16
E3	9.0	NH <sub>2</sub> <b>A-Q-T-Q-S-L-V-Y-P-F-P-</b>	$\beta$ -CN (f53-X)	50
		NH <sub>2</sub> <b>E-Y-G-F-Q-N-A-L-I-V-</b>	SAB (f405-X)	50

### II. 4. 3. La fraction protéose-peptones

#### II. 4. 3. 1. Variations quantitatives

La teneur en PP avant l'épreuve est en moyenne de 0,97 g/L ( $\pm 0,2$ ), elle augmente significativement après 9 h PI pour atteindre un maximum à 33 h soit une valeur de 6,52 g/L avec une hausse de 7,2 fois la valeur initiale (Figure 21A). Une baisse significative est observée à 48 h PI et le retour à la normale est noté à 216 h PI.

Les courbes individuelles montrent une première augmentation pour toutes les vaches à 12 h PI puis une autre à 21 h PI pour trois vaches et à 33 h PI pour cinq vaches (Figure 21B). Le retour à la normale est observé à 216 h pour l'ensemble des animaux.

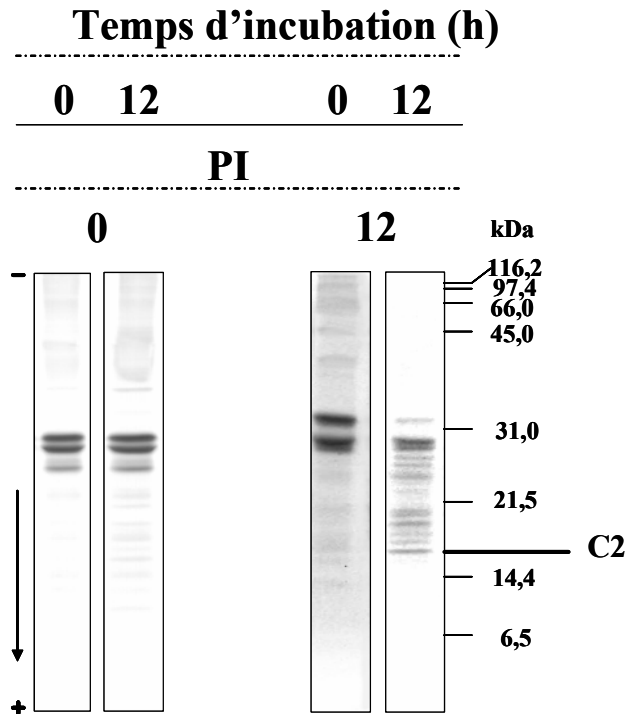
#### II. 4. 3. 2. Variations qualitatives

L'électrophorèse EGPA-SDS de la fraction PP (Figure 22), avant l'inflammation présente un profil classique avec deux bandes correspondant au PP3 (f1 – 135) pour la bande supérieure et PP3 (f54 – 135) +  $\beta$ -CN (f1- 105/107) pour la bande inférieure. Au cours de la cinétique inflammatoire, deux types de profil électrophorétique apparaissent. Le premier à 21 h PI révèle un changement qualitatif de la fraction PP notamment par l'apparition de cinq bandes appelées E1, P1, P2, E2 et E3 absentes dans le lait avant infection, avec des masses moléculaires apparentes de 27,0 ; 17,5 ; 21,0 ; 15,5 et 9,0 kDa respectivement. Le profil à 24 h PI est beaucoup plus flou et diffus et révèle une seule bande appelée P2 avec une disparition des autres bandes.

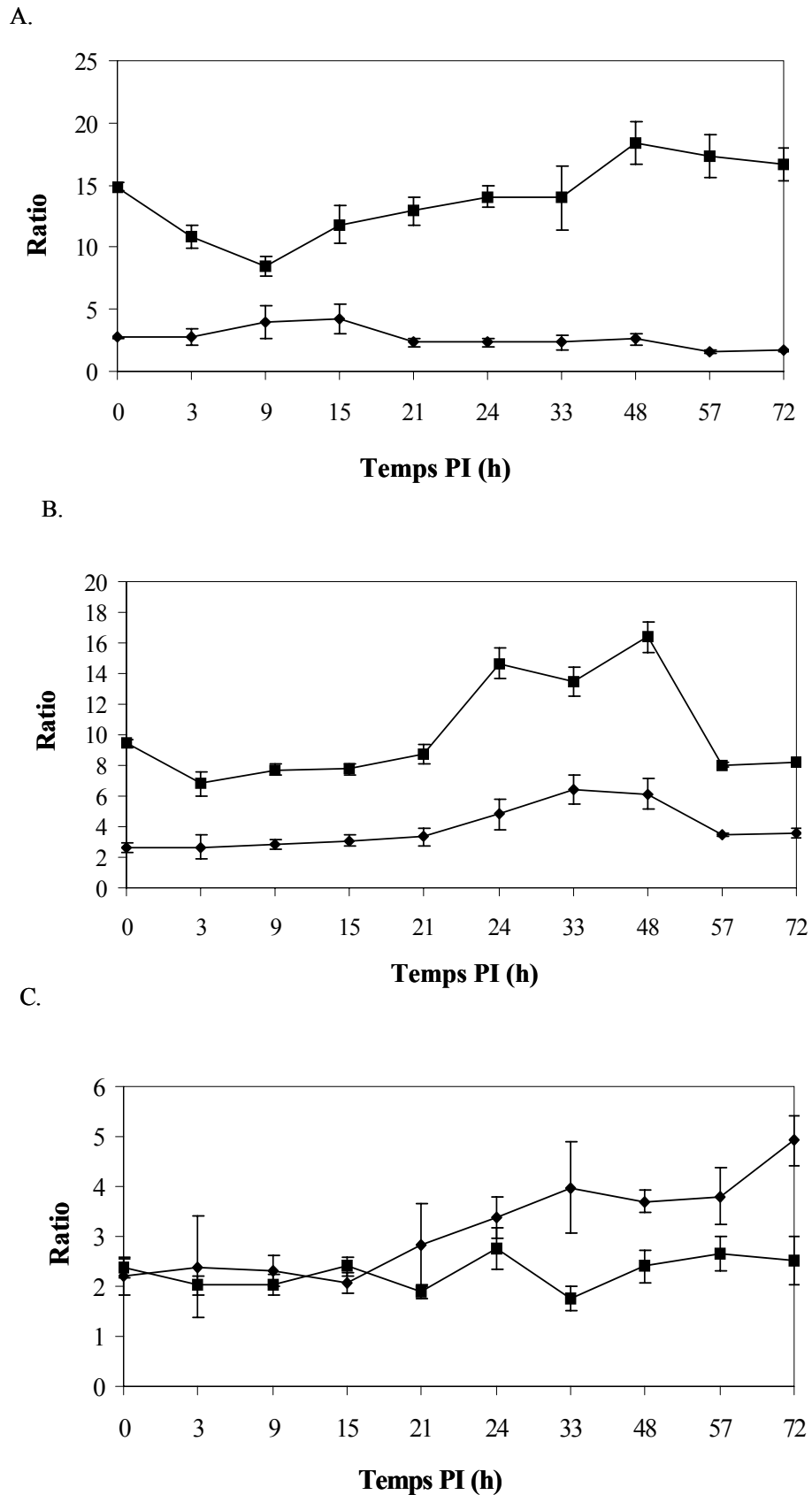
Le séquençage amino-terminal a permis de déterminer l'origine caséinique de ces bandes (Tableau 13). P1 correspond majoritairement à un fragment amino-terminal de CN- $\beta$  (f1-X), la bande P2 contient le fragment de CN- $\alpha_{s2}$  (f123-X), la bande E1 contient un mélange des fragments de CN- $\beta$  (f1-X) et de CN- $\kappa$  (f94-X), la bande E2 contient un mélange des fragments de CN- $\beta$  (f53-X), CN- $\beta$  (f11-X), CN- $\alpha_{s1}$  (f19-X) et de CN- $\kappa$  (f60-X), quant à la bande E3, elle contient un mélange des fragments CN- $\beta$  (f53-X) et de la SAB (f405-X).

### II. 5. Potentiel caséinolytique des cellules somatiques

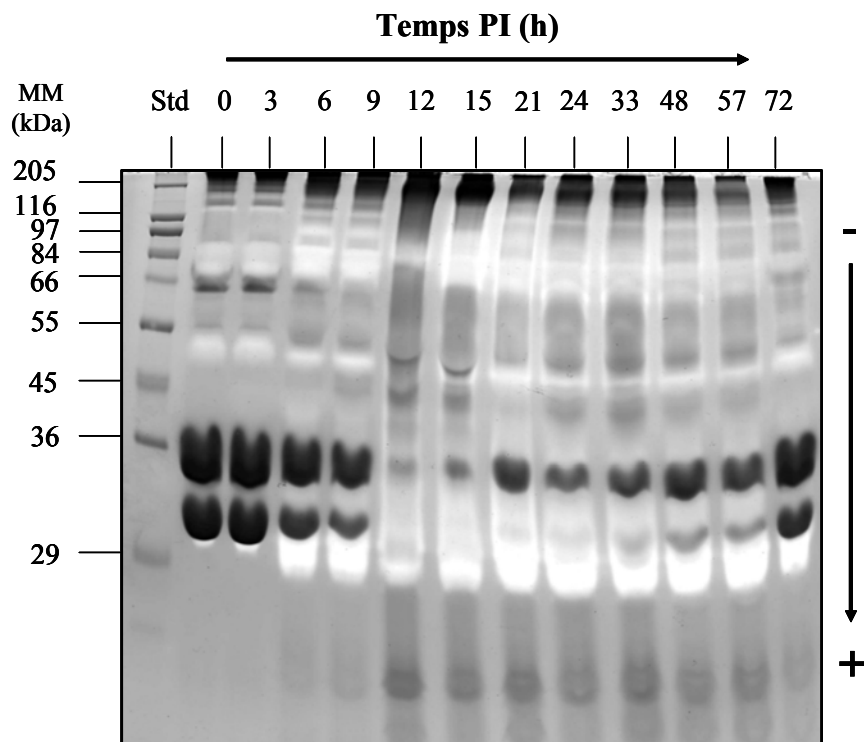
Le lysat de cellules somatiques prélevées durant la cinétique d'infection à 12 h PI incubé avec des CN à pH 7,2 pendant 12 h à 37°C, révèle une forte diminution de l'intensité des bandes des CN- $\alpha_s$ , - $\beta$  et - $\kappa$  au temps 12 h PI (Figure 23). Le profil électrophorétique (EGPA-SDS) montre plusieurs bandes résultant de la caséinolyse. Une bande de masse molaire proche de P2 est nommée C2.



**Figure 23.** Profil électrophorétique de caséinate de sodium mis en contact avec le lysat de cellules somatiques isolées dans le lait 12 h après infection intramammaire d'*E. coli* et incubé à 37 °C pendant 12 h. La bande C2 possède la MM du fragment P2 de la fraction PP retrouvée dans le profil de dégradation. PI : post inoculation.



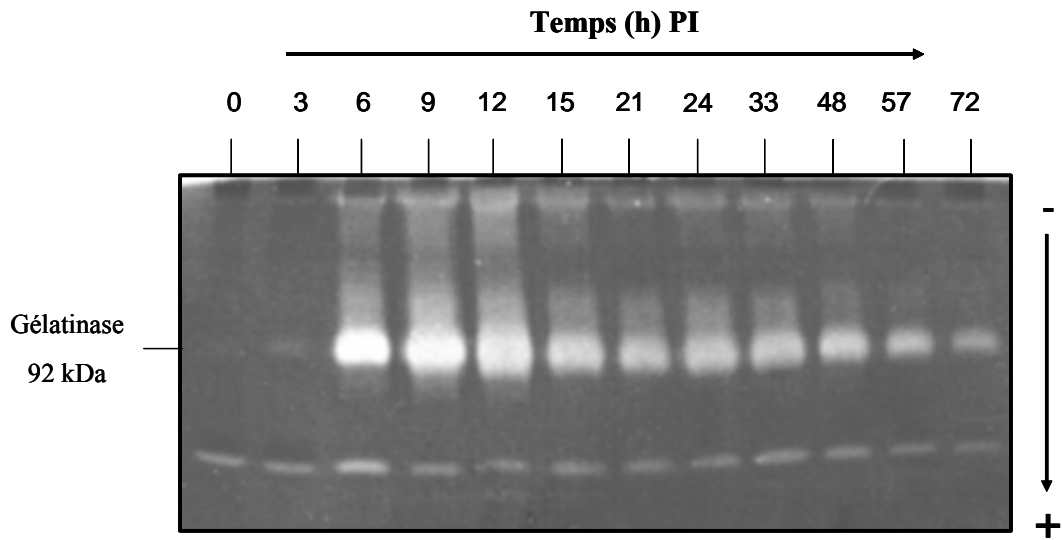
**Figure 24.** Evolution des activités protéolytiques des PMN du sang (■) et lait (◆) après infection intramammaire. Les activités moyennes des cathepsines (A), de la collagénase (B) et de l'élastase (C) ont été déterminées par cytométrie de flux. Les barres d'erreurs non visibles sont comprises dans les symboles. PI : post inoculation.



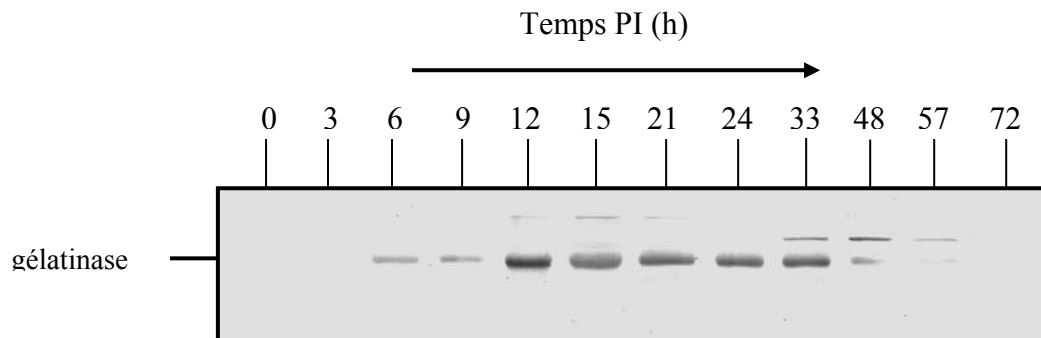
**Figure 25.** Cinétique de l'activité protéolytique du lait après infection intramammaire d'*E. coli* en zymographie caséine. PI : post inoculation.



A.



B.



**Figure 26.** Cinétique de l'activité gélatinolytique du lait après infection intramammaire d'*E. coli* en zymographie gélatine (A). Identification de la gélatinase par Western blot dans le lait après infection intramammaire par *E. coli* (B). PI : post inoculation.



## II. 6. Activités protéolytiques des PMN

### II. 6. 1. Cytométrie de flux

L'activité cathepsine (C et G) moyenne dans le sang avant infection est de 14,7 ( $\pm$  0,36) (unité arbitraire) ; cette activité diminue significativement à 9 h PI, puis augmente pour atteindre une valeur de 18,38 ( $\pm$  1,69) à 48 h PI. Le retour à la normale est observé à 72 h PI (Figure 24A). Dans le lait l'activité de la cathepsine varie très peu.

L'activité collagénase moyenne avant infection dans le sang est de 9,43 ( $\pm$  0,29) (unité arbitraire) ; une augmentation significative de cette activité est notée entre 24 h et 48 h PI avec une hausse de deux fois la valeur initiale. Un retour à la normale est observé à 57 h PI (Figure 24B). Dans le lait l'activité de la collagénase augmente significativement entre 21 h et 48 h PI.

L'activité élastase moyenne avant infection dans le sang est de 2,36 ( $\pm$  0,17) (unité arbitraire) et varie peu au cours de la cinétique (Figure 24C). Dans le lait cette activité de l'élastase qui est de 2,19 ( $\pm$  0,37) avant infection, augmente significativement entre 15 h et 72 h PI sans retour à la normale (Figure 24C).

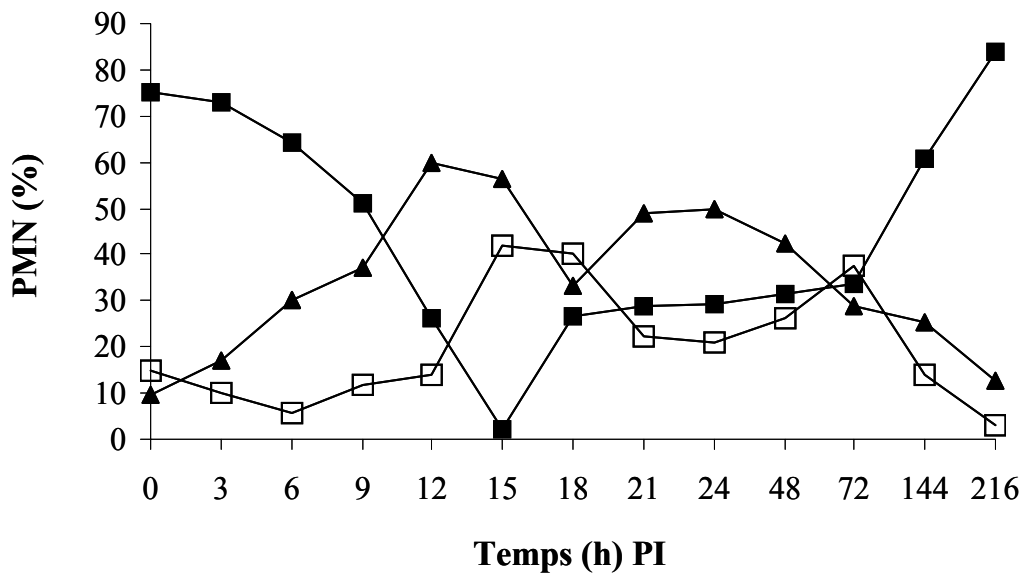
### II. 6. 2. Zymographie

#### II. 6. 2. 1. *Activité protéolytique totale dans le lait.*

Le profil électrophorétique déterminé par zymographie caséine montre de profondes modifications des activités protéolytiques et plusieurs bandes de lyse sont détectées après 6 h PI avec notamment des bandes à 90 kDa, 50 kDa et 29 kDa. Un maximum d'activité est atteint à 15 h PI, à 216 h PI l'activité protéolytique totale ne reprend pas son profil original, la bande de lyse à 29 kDa reste très marquée (Figure 25). Par ailleurs le profil de la plasmine commerciale par zymographie caséine, révèle trois bandes de lyses communes aux bandes de protéolyses révélées dans le lait durant la cinétique inflammatoire.

#### II. 6. 2. 2. *Activité de la gélatinase dans le lait.*

À partir de 6 h PI des bandes de lyses sont révélées (Figure 26A). Elles atteignent un maximum d'intensité entre 9 h et 12 h PI, une baisse est constatée à 15 h PI. La présence de la gélatinase est confirmée par Western-Blot (Figure 26B).



**Figure 27.** Evolution de la maturité des PMN du sang après infection intramammaire par *E. coli*. Les trois classes des PMN se distinguent en microscopie après coloration May-Grünwald et Giesma. PMN immatures (□), PMN à bandes (▲) et PMN matures (■).

## **II. 7. Maturité cellulaire**

Avant infection intramammaire par *E. coli*, les types de PMN rencontrés dans le sang sont essentiellement 80 % de PMN matures (Figure 27). Après infection à 15 h PI, le nombre de PMN mature chute considérablement pour atteindre 5 % dans le sang alors que les PMN immatures augmentent pour atteindre plus de 60 %. La situation initiale n'est retrouvée qu'à 216 h PI.

## **III. DISCUSSION**

### **III. 1. Réponse clinique à l'inoculation d'*E. coli***

Les mammites causées par une infection de la glande mammaire par *E. coli* impliquent une réponse intense du système immunitaire ; elles entraînent l'augmentation de la concentration cellulaire sur le site de l'inoculation, la baisse de la production de lait et une fièvre importante. Ces effets sont en adéquation avec les données de Michelutti et al. (1999), Blum et al. (2000) et Hoeben et al. (2000).

L'augmentation de la perméabilité de la barrière épithéliale mammaire est associée à des indicateurs de l'inflammation (les protéines sériques notamment). Ainsi, les concentrations de la lactoferrine, de la SAB et des IgG augmentent avec un maximum atteint à 24 h PI pour la lactoferrine et à 12 h PI pour la SAB et les IgG, confirmant les résultats antérieurs établis lors de mammites cliniques et subcliniques (Hamann et Krömker, 1997).

La baisse de la sécrétion de lait est en partie due à une baisse de la synthèse protéique et de l' $\alpha$ -lactalbumine en particulier, qui est un des composants de la lactose-synthétase (Brodbeck et al., 1967). Le lactose, renfermé dans des vésicules sécrétoires, induit des différences de pressions osmotiques entre l'intérieur des vésicules et le cytoplasme des cellules épithéliales mammaires. Ainsi, la quantité d'eau contenue dans les vésicules contrôlerait la quantité de lait produite (Deluyker, 1991). Cette baisse de synthèse peut aussi s'expliquer par la génération, lors de l'inflammation, de fragments de caséines (1-28 de la CN- $\beta$ ) provenant de la glande mammaire qui sont capables de perturber les jonctions entre les cellules (Shamay et al., 2003) ou de bloquer les canaux potassium (Silanikove et al., 2000) limitant la synthèse des constituants du lait par les cellules épithéliales.



### **III. 2. Hypothèse sur la séquentialité de la protéolyse du lait**

#### ***III. 2. 1. Les cellules Somatiques.***

Le dénombrement cellulaire (DC) augmente dès 3 h PI et atteint un plateau entre 6 et 216 h PI. Les valeurs de DC évoluent assez peu entre  $10^6$  et  $10^7$  cel/mL durant cette période. Ces valeurs sont conformes à celles observées par Rainard (1983) avec des valeurs maximales de 7 à 35.  $10^6$  cel/mL entre 0 et 32 h PI. Cette augmentation de cellules somatiques est principalement le fait des PMN qui représentent plus 90% des cellules (Jain, 1993). La mesure des leucocytes dans le lait montre une forte leucopénie à 9 h PI, ce qui traduit la stimulation du système immunitaire (inflammation aiguë) en réponse à l'infection par *E. coli*. Chez la vache, la réponse cellulaire se manifeste par une forte leucopénie suivie par une phase dégénérative. Cette leucopénie correspond à la fois à une perte de lymphocytes et à la migration de neutrophiles sur le site de l'inflammation par margination des neutrophiles matures par la moelle osseuse (Jain, 1993). L'inflammation entraîne une activation des PMN, cette activation cellulaire résulte de l'interaction entre un complexe LPS-LBP (lipopolysaccharide – protéine de liaison ou LBP pour LPS binding protein) et la molécule CD14 exprimée à la surface des monocytes. Cette activation aboutit à la synthèse de médiateurs essentiellement le TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, qui par chimiotactisme vont acheminer les PMN recrutés vers le site de l'inflammation (Shuster et al., 1997).

#### ***III. 2. 2. Numération bactérienne.***

Le dénombrement bactérien du lait augmente et atteint sa valeur maximale à 3 h PI avec un plateau jusqu'à 216h PI. L'effet bactériostatique dure entre 3 et 6 h, il est causé par l'effet inhibiteur de certaines protéines du lait telles que la lactoferrine, les lysozymes et certains fragments de caséines résultant de la protéolyse (Lahov et Regelson, 1996 ; Smithers et al., 1996), combiné au temps de latence des bactéries. Cette phase de latence peut s'expliquer comme étant la conséquence du temps nécessaire à la mise en place des mécanismes de migration des neutrophiles du sang vers le lait. Le dénombrement bactérien ne dépasse pas les  $10^6$  ufc/mL pendant l'infection. Cette faible numération des bactéries résulte d'un équilibre entre la multiplication microbienne et l'activité des cellules phagocytaires qui proviennent du sang à travers la barrière épithéliale endommagée, ainsi qu'aux nombreux facteurs antibactériens (lactoferrine, immunoglobulines,...) qui participent à la régulation de l'inflammation (Van Hooijdonk et al., 2000).

**Tableau 14.** Séquençage amino-terminal des peptides P1, P2, E1, E2 et E3 trouvés dans la fraction PP et les sites de clivage des caséines.

Peptides	Identité	Site de clivage N-terminal	Protéase(s) probablement impliquées
P1 (17,5 kDa)	$\beta$ -CN (f1-X)	-	EL <sup>(1)</sup>
	$\kappa$ -CN (f94-X)	Thr <sub>93</sub> -Thr <sub>94</sub>	nd
P2 (21 kDa)	$\alpha$ <sub>s2</sub> -CN (f123-X)	Thr <sub>122</sub> -Leu <sub>123</sub>	nd
	$\beta$ -CN (f1-X)	-	nd
E1 (27 kDa)	$\beta$ -CN (f1-X)	-	EL <sup>(1)</sup>
	$\kappa$ -CN (f94-X)	Thr <sub>93</sub> -Thr <sub>94</sub>	nd
E2 (15,5 kDa)	$\beta$ -CN (f53-X)	Phe <sub>52</sub> -Ala <sub>53</sub>	CD, CG, EL <sup>(2)</sup>
	$\beta$ -CN (f11-X)	Gly <sub>10</sub> -Glu <sub>11</sub>	nd
	$\alpha$ <sub>s1</sub> -CN (f19-X)	Glu <sub>18</sub> -Asn <sub>19</sub>	nd
	$\kappa$ -CN (f60-X)	Pro <sub>59</sub> -Tyr <sub>60</sub>	nd
E3 (9 kDa)	$\beta$ -CN (f53-X)	Phe <sub>52</sub> -Ala <sub>53</sub>	CD, CG, EL <sup>(2)</sup>
	SAB (f405-X)	Ala <sub>404</sub> -Leu <sub>405</sub>	nd

BSA= bovine serum albumin, CD=cathepsine D, CG=cathepsine G, CN=caséine, EL=élastase de leucocytes, nd=non-déterminé

<sup>(1)</sup> Selon Moussaoui et al., 2003

<sup>(2)</sup> Selon Larsen et al., 1996 pour CD, Considine et al., 2002 pour CG et Considine et al., 1999 pour EL.



**III. 2. 3. L'activité de la plasmine.**

Une augmentation significative de l'activité de la plasmine est notée entre 15 et 24 h PI. Cette augmentation est liée à une évolution de la perméabilité de la barrière épithéliale pendant l'inflammation, qui induit un passage important de plasminogène du sang vers le lait (Nickerson et Pankey, 1984). Associés à ce passage, de nombreux activateurs de plasmine proviennent du sang, des PMN et des bactéries. Selon Yamagata et al. (2001), la concentration des activateurs des sérines protéases augmente considérablement pendant les mammites. Ainsi, les PMN contiennent à la fois des activateurs de type urokinase (u-PA) et à un degré moindre de type tissulaire (t-PA) (Moir et al., 2001). D'après Lähteenmäki et al. (2001), *E. coli* présente à sa surface des récepteurs de plasmine et de plasminogène qui augmentent l'activation de la plasmine en exprimant les activateurs du plasminogène. Au contact des bactéries (*E. coli*) avec les cellules épithéliales, ces cellules sécrètent les IL-1 qui vont à leur tour stimuler les PMN pour sécréter les t-PA activateurs de la plasmine. Associés à une augmentation de l'expression des activateurs, de nombreux inhibiteurs du système plasmine-plasminogène voient leur expression varier. La baisse de l'activité de la plasmine après 24 h PI peut s'expliquer par des variations de concentrations de certains composés à action inhibitrice du système plasmine-plasminogène comme l' $\alpha_1$ -AT ou encore  $\alpha_2$ -Mg (Grufferty et Fox, 1988 ; Heegaard et al., 1994). L'activité de la plasmine dépendrait alors d'un équilibre entre les activateurs et les inhibiteurs du système plasmine-plasminogène.

**III. 2. 4. La fraction PP.**

L'augmentation de la teneur en PP est maximum entre 12 et 33 h PI avec une concentration allant de 0,97 g/L à 0 h PI jusqu'à 6,52 g/L à 33 h PI. Ces valeurs moyennes cachent une variabilité individuelle. Si tous les animaux présentent un maximum de concentration entre 21 h et 33 h PI, ces valeurs varient de moins de 4 g/L à plus de 12 g/L.

L'origine endogène de la FPP a été montrée dans de nombreux travaux et ces derniers mettent en évidence l'implication du système plasmine-plasminogène, du DC et des enzymes des neutrophiles. Au cours de l'inflammation, une variation qualitative de la FPP est observée, avec une apparition de cinq bandes électrophorétiques dont P1 et P2 qui ont déjà été rapportées par Moussaoui et al. (2002) lors d'une inflammation expérimentale à LPS. Les trois bandes restantes E1, E2, E3 sont caractéristiques d'une infection induite par la présence d'*E. coli* (Tableau 14).



La fraction E1 comporte deux fragments : CN- $\beta$  (f1-X) et CN- $\kappa$  (f94-X) le premier est situé dans la région amino-terminale de la caséine  $\beta$  (Banque de données SwissProt ; Ribadeau-Dumas et al., 1972). L'extrémité carboxy-terminale de ce fragment n'a pu être déterminée. Ce site de clivage commun à P1 correspondrait à l'élastase (Moussaoui et al., 2002). Ce fragment ne correspond pas à la  $\beta$ -CN-5P (f1 105/107) qui est le composant majeur de la fraction PP. Le second fragment de E1 est généré par l'hydrolyse de la liaison peptidique Thr<sub>93</sub>-Thr<sub>94</sub> de la CN- $\kappa$ , alors que la majorité des auteurs considèrent la CN- $\kappa$  résistante à la protéolyse endogène (Grieve et Kitchen, 1985). Même si des études *in vitro* de l'hydrolyse de la CN- $\kappa$  par la cathepsine D ont mis en évidence les sites de clivage suivant : Leu<sub>32</sub>-Ser<sub>33</sub>, Leu<sub>79</sub>-Ser<sub>80</sub> et Phe<sub>105</sub>-Met<sub>106</sub> (Larsen et al., 1996).

La fraction E2 comporte quatre fragments CN- $\beta$  (f53-X), CN- $\beta$  (f11-X), CN- $\alpha_{s1}$  (f19-X) et CN- $\kappa$  (f60-X). Le premier fragment est généré par l'hydrolyse de la liaison peptidique Phe<sub>52</sub>-Ala<sub>53</sub> de la CN- $\beta$  (Banque de donnée SwissProt, Mercier et al., 1971). Ce fragment de la CN- $\beta$  pourrait provenir d'une hydrolyse par la cathepsine D, cathepsine G ou bien par l'élastase en fonction des spécificités de coupure rapportées par de nombreux auteurs (Larsen et al., 1996 ; Considine et al., 1999 ; Considine et al., 2002).

La fraction E3, comporte deux fragments : CN- $\beta$  (f53-X) et SAB (f405-X). Le premier fragment est généré par l'hydrolyse de la liaison peptidique Phe<sub>52</sub>-Ala<sub>53</sub> de la CN- $\beta$  qui pourrait provenir d'une hydrolyse par la cathepsine D, cathepsine G ou par l'élastase. Le second fragment est généré par l'hydrolyse de la SAB à la liaison peptidique (f405-X).

Les différents fragments non identifiés d'E1, d'E2 et d'E3 pourraient être générés par de nombreuses protéases leucocytaires non caractérisées du point de vue caséinolytique (la protéinase 3), mais aussi elles peuvent avoir pour origine les protéases issues d'*E. coli*.

### III. 2. 5. Séquentialité

L'augmentation du DC, des bactéries et de l'activité de la plasmine tout au long de l'inflammation, suggèrent leurs implications dans le mécanisme global responsable de l'augmentation de la protéolyse du lait pendant l'infection à *E. coli*. Le DC et les bactéries pourraient être directement responsable de la protéolyse sur toute la phase de l'inflammation de 3 h à 216 h PI. Associée à ces deux éléments, au pic de l'inflammation entre 15 h et 24 h PI, l'activité de la plasmine pourrait être fortement impliquée dans la protéolyse durant cette phase. Ceci suggère que la teneur élevée en PP au pic de l'inflammation atteint en moyenne



6,52 g/L à 33 h PI, et résulte des différentes interactions entre *E. coli*, le système plasmin-plasminogène et les neutrophiles. Cependant, différents mécanismes de régulation interviennent dans la baisse de l'activité protéolytique. La troisième phase de l'inflammation entre 33 h et 216 h PI, correspond au retour au niveau initial de la protéolyse, malgré un DC et un dénombrement bactérien encore élevés.

### **III. 3. Caséinolyse par les protéases leucocytaires.**

La dégradation des caséines par les protéases de PMN pendant 12 h à 37°C *in vitro* produit de nombreux peptides dont un peptide appelé C2 ayant la même MM de P2 retrouvé dans la fraction PP pour les deux modèles d'inflammations *in vivo* expérimentale à LPS (Moussaoui et al., 2003) et à *E. coli* (notre étude). La dégradation des CN par les protéases des PMN réalisée *in vitro* recréent celles *in situ*, avec un pH neutre (7,2) proche d'un lait de mammite, le peptide C2 retrouvé dans le profil électrophorétique pourrait contenir les fragments constituant P2 [ $\alpha_{s2}$ -CN (f123-X) +  $\beta$ -CN (f1-X)], cette hypothèse est à confirmer par séquençage amino-terminal (Munro et Kitchen, 1985).

### **III. 4. Activités protéolytiques des PMN**

#### ***III. 4. 1. Dans le sang.***

Dans le sang, une augmentation des activités des cathepsines et de la collagénase, est observée à 48 h PI et à 24 h PI respectivement, alors que l'activité de l'élastase reste constante. Cette augmentation d'activité protéolytique dans le sang correspondrait à la dégradation de la matrice extracellulaire permettant le passage des PMN du sang vers le lait (Jain, 1993 ; Faurischou et Borregaard, 2003).

Une baisse non significative de l'activité de la collagénase dans le sang a été observée à 3 h PI. Cette légère décroissance pourrait s'expliquer par une régulation de la collagénase par les cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-4, L'IL-6, L'IL-10. Entre 24 et 57 h PI alors que l'inflammation est à son maximum d'intensité, une forte augmentation de l'activité de la collagénase est observée, ce phénomène pourrait s'expliquer par l'activation des cytokines pro-inflammatoires telles que les IL-1, IL-2, IL-8 et TNF- $\alpha$  qui favorisent l'expression et l'activation de la collagénase (Opdenakker et al., 2001). La collagénase qui se trouve, sous forme de zymogène dans les granules tertiaires des PMN, nécessite l'action d'une autre protéase pour être activée (Owen et Campbell, 1999). Ceci suggère que l'activité de la



collagénase est fonction de l'expression d'autres enzymes telles que la plasmine ou la cathepsine G (contenue dans les granules primaires des PMN).

#### **III. 4. 2. Dans le lait.**

Dans le lait, les activités des collagénase et de l'élastase montrent une augmentation entre 24 h et 57 h PI pour la collagénase et entre 21 h et 72 h PI pour l'élastase.

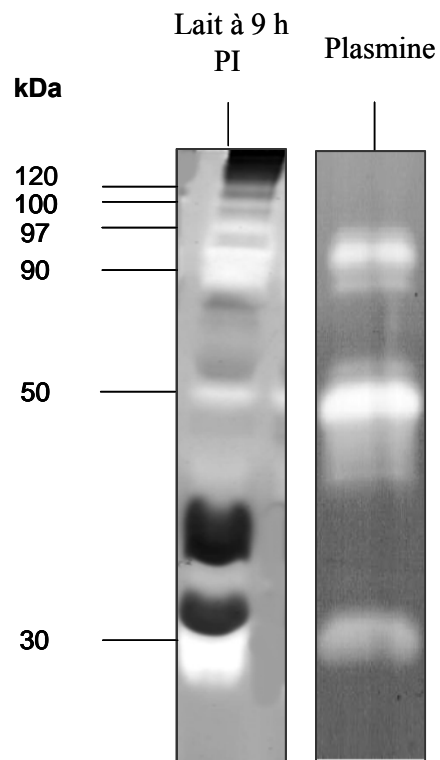
La faible activité de l'élastase entre 0 h et 15 h PI peut s'expliquer par l'augmentation de l'activité de certains marqueurs de mammite, telle que l' $\alpha$ 1-AT qui est un inhibiteur sérique de l'élastase (Reboud-Ravaux, 2001) et qui atténuerait son activité dans le lait. A partir de 21 h PI l'augmentation de l'activité de l'élastase pourrait être liée à des propriétés régulatrices de certaines sérines protéases des PMN sur l'activité de certaines cytokines. En effet, l'élastase possède des propriétés modulatrices de la réaction inflammatoire notamment en clivant certaines cytokines (IL-1, TNF- $\alpha$  et l'IL-6 en particulier), afin de maintenir un équilibre sur le site de l'inflammation, entre les cytokines pro- et anti-inflammatoires (Bank et Ansorge, 2001).

L'augmentation de l'activité de la collagénase entre 24 h et 57 h PI correspondrait à la phase aiguë de l'inflammation. Récemment, Mehrzad et al. (2004), ont rapporté une activité totale de la collagénase fortement augmentée après l'infusion intra-mammaire de LPS d'*E. coli*. Un pouvoir stimulant du LPS a déjà été rapporté sur la synthèse de la collagénase par les monocytes et les PMN (Opdenakker et al., 2001).

#### **III. 5. Activité totale des protéases dans le lait**

Le profil électrophorétique du lait issu de la cinétique inflammatoire par zymographie caséine, révèle plusieurs bandes de lyse entre 6 et 33 h PI vers de 90 kDa, 50 kDa et 30 kDa. Pendant l'inflammation, une augmentation de l'activité de la plasmine est observée ainsi qu'un recrutement massif des cellules du sang vers le lait. Durant ce phénomène, les cellules somatiques dégradent la matrice extracellulaire (Mignatti et Rifkin, 1993). Plusieurs enzymes protéolytiques (élastase, les cathepsines et les métalloprotéases notamment) sont impliquées dans cette action. Les enzymes d'*E. coli* peuvent aussi contribuer à la dégradation de la matrice extracellulaire en synthétisant également des collagénases (Rozkov, 2001).

La zymographie caséine de la plasmine commerciale produit trois bandes de MM de 90, 50 et 30 kDa. Ces bandes sont retrouvées dans le lait durant une cinétique inflammatoire. La bande à 90 kDa pourrait correspondre au plasminogène, alors que les bandes détectées à 50 et à 30



**Figure 28.** Comparaison des profils de zymographie caséine de lait à 9 h après infection intramammaire par *E. coli* et de la plasmine commerciale. PI: post inoculation.



sont probablement des activateurs de plasminogène u-PA (Figure 28) (White et al., 1993 ; Mehrzad et al., 2005). En effet, pendant l'inflammation, plusieurs activateurs de plasmine et de plasminogène proviennent du sang, des bactéries et des PMN qui possèdent un grand nombre d'activateurs de plasminogène (t-PA et u-PA) (Moir et al., 2001). Cependant l'activité de la plasmine mesurée ultérieurement présente un retour à la valeur initiale à 72 h PI (Figure 18), alors que le profil par zymographie montre une bande importante de lyse à 30 kDa. Ceci suggère, que des hypothèses complémentaires peuvent être émises sur la provenance de ces activités protéolytiques dans le lait. En effet, les protéases leucocytaires telles que l'élastase, la protéinase 3 ou la cathepsine G qui ont des MM molaires très proches de 30 kDa peuvent intervenir dans la protéolyse du lait, et être à l'origine de ces bandes.

La zymographie gélatine des laits issus de la cinétique inflammatoire, révèle une bande à partir de 6 h PI, cette bande pourrait correspondre à l'ensemble des enzymes gélatinolytiques provenant des PMN et des bactéries (*E. coli*). La stimulation des granules de neutrophiles se fait par différents stimulants chimiques et microbiens comme l'IL-8 et TNF- $\alpha$ , induit une dégranulation des neutrophiles et une sécrétion de la gélatinase (Aaku et al., 1990).

Le modèle *E. coli* ne permet pas de préciser si la collagénase mesurée est principalement d'origine cellulaire ou bactérienne.

### III. 6. La maturité cellulaire

Dans le lait, le DC montre un niveau élevé et assez stable entre 6 h et 72 h PI ce qui suggère que les variations d'activités protéolytiques observées en zymographie pourraient être plus liées à la maturité des cellules qu'à la variation de leur concentration au cours du temps. Avant l'infection, les cellules prédominantes dans le sang sont les macrophages et quelques PMN matures qui représentent 3 à 25 % des cellules somatiques. Suite à l'infection, la stimulation de la moelle osseuse va induire une production de PMN immatures qui deviennent majoritaires, donc leur nombre va augmenter dans le sang alors que la concentration en PMN matures baisse (Sordillo et al., 1997 ; Paape et al., 2003).

L'endotoxine d'*E. coli* a été récemment rapportée par Van Oostveldt et al. (2002), comme étant capable d'induire le phénomène d'apoptose des PMN, et ceci après 6 h d'incubation à 37 °C. Ce phénomène conduit au recrutement de PMN immatures au stade promyélocyte qui contiennent de l'élastase et de la cathepsine G, ce qui expliquerait une relation entre les PMN immatures et l'activité de ces protéases à partir de 15 h PI. Au cours de l'inflammation les cellules matures quant à elles, expriment ces protéases mais à des niveaux beaucoup plus bas (Takeuchi et al., 1987). Ces dernières contiendraient des granules tertiaires avec de la



gélatinase, l'activation de ces enzymes nécessite l'activité de la cathepsine G faiblement exprimée au début de l'infection, ce qui expliquerait que l'activité de la gélatinase de 0 à 21 h PI reste faible.



## CONCLUSION

Les variations de la composition du lait suite à une infection intramammaire par *E. coli* ont permis de mieux appréhender la séquentialité de la protéolyse endogène et exogène dans le lait, ainsi que l'impact des cellules somatiques et le rôle des bactéries sur la caséinolyse.

L'augmentation de la protéolyse dans le lait pendant la cinétique inflammatoire suite à l'infection par *E. coli*, est due à l'ensemble des facteurs cellulaire, bactérien et plasminique. Les cellules et les bactéries semblent intervenir durant toute la cinétique inflammatoire (entre 3 h et 216 h PI). Par contre, la plasmine interviendrait particulièrement entre 15 et 33 h PI ce qui correspond à l'intensité maximale de la protéolyse.

Durant cette période de protéolyse maximale, une modification de la composition de la fraction PP est observée avec l'apparition en particulier de cinq bandes P1, P2, E1, E2 et E3, présentes seulement pendant la phase aiguë de la réponse inflammatoire. Deux bandes P1 et P2 sont retrouvées à la fois dans le modèle *E. coli*, mais aussi lors de l'inflammation expérimentale à LPS rapportée par Moussaoui et al. (2002).

Pour certains peptides contenus dans les fragments E1, E2 et E3, les origines ont été potentiellement identifiées (cathepsine D, cathepsine G, élastase), pour d'autres les sites de coupures ne sont pas reliables avec les protéases déjà identifiées, pour cela le rôle des protéases bactériennes n'est pas à exclure.

Les activités protéolytiques cellulaires des cathepsines C et G et de la collagénase sont plus élevées dans le sang que dans le lait. En effet, le passage des PMN du sang vers le lait nécessite l'altération de la barrière épithéliale ; ainsi, l'action combinée des protéases cellulaires libérées dans le milieu lors de la dégranulation des PMN et de la plasmine présente dans le sang, perméabilise la barrière épithéliale. Cette perméabilisation permet le passage de PMN dans le lait et de la plasmine ainsi que de nombreux activateurs et inhibiteurs qui interviennent dans la régulation entre les enzymes.



Les activités protéolytiques analysées par zymographie caséine révèlent six bandes de dégradation à 6 h PI, dont trois bandes en commun avec le profil de la plasmine. Ces activités sont variables dans le temps, et peuvent être attribuées aux différents stades de différenciation cellulaire impliqués, mais aussi à l'action directe d'enzymes bactériennes.





# *Chapitre 2*

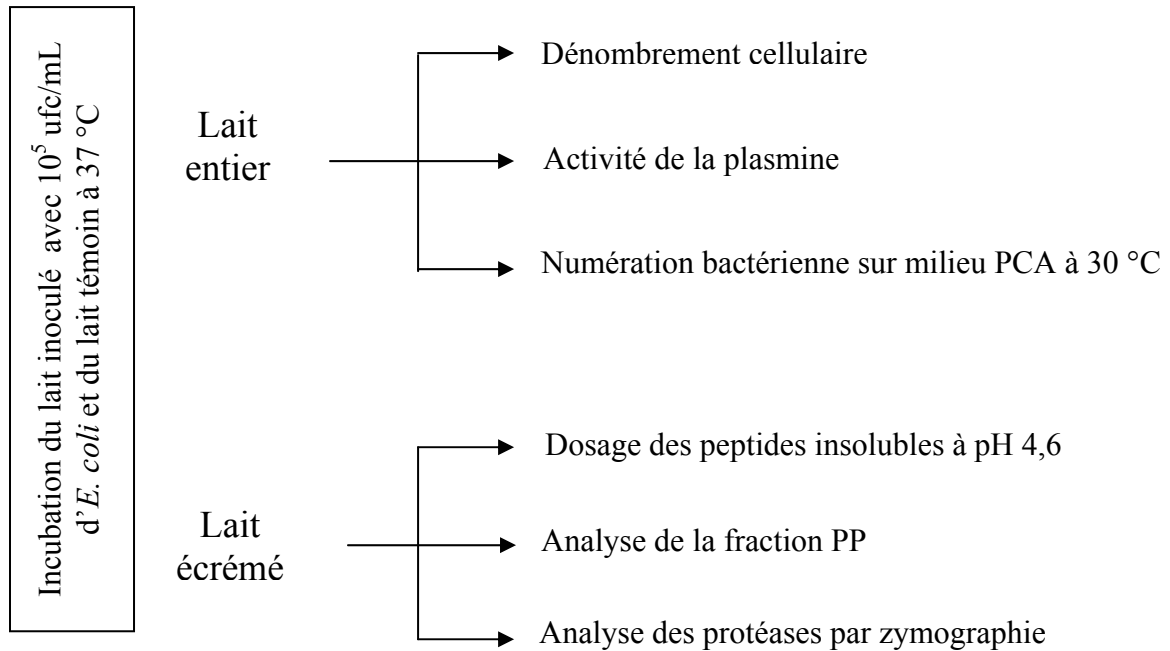
*« Influence d'une inoculation d'E. coli in vitro dans un lait cru sur l'évolution de la composition du lait »*

*Mise en évidence du rôle des bactéries dans la protéolyse des caséines*





## Expérimentation



Temps de prélèvement pour les analyses biochimiques : 0, 4, 8, 12 et 24 h PI

Temps de prélèvement pour les analyses microbiologiques : 0 ; 0,5 ; 1 ; 1,5 ;

2 ; 3 ; 4 ; 5 ; 6 ; 7 ; 8 ; 9 ; 10 ; 11 ; 12 et 24 h PI

Nombre de répétition n = 3

**Figure 29.** Echantillonnage et analyses effectuées à chaque prélèvement des différents laits.

**CHAPITRE 2 : Influence d'une inoculation d'*E. coli in vitro* dans un lait cru sur  
l'évolution de la composition du lait**

**Mise en évidence du rôle des bactéries dans la protéolyse des caséines**

L'utilisation du modèle d'infection expérimentale à *E. coli* dans le chapitre précédent, a permis de reproduire une mammite faisant intervenir la protéolyse endogène et exogène et leurs interactions sans permettre de dissocier la part de chaque source à partir de la caractérisation des produits d'hydrolyse plus particulièrement de la fraction PP. Dans ce chapitre l'utilisation du modèle d'inoculation du lait *in vitro* à *E. coli* aura pour objectif d'étudier l'action des bactéries et de leurs protéases en s'affranchissant de toute interaction d'origine endogène le système plasmine/plasminogène d'une part et les cellules somatiques d'autre part. Dans ces conditions, seule la protéolyse exogène, faisant intervenir les protéases bactériennes, est étudiée. L'étude de la protéolyse exogène provoquée par *E. coli* dans le lait s'appuie:

- sur la caractérisation du changement de composition du lait au cours de la cinétique de croissance d'*E. coli*.
- sur la mesure de l'action directe du lysat bactérien sur les caséines

**I. PROTOCOLE EXPERIMENTAL**

**I. 1. Cinétique de croissance d'*E. coli* dans du lait cru**

Quatre vaches ont été sélectionnées dans le troupeau laitier de la ferme expérimentale de l'ENSAIA (domaine de la Bouzule). Plusieurs critères sont considérés : un dénombrement cellulaire dans le lait des quatre quartiers < 100 000 cell/mL, une absence de germes pathogènes majeurs dans les quatre quartiers. Le lait est prélevé d'une façon aseptique afin d'éviter toute contamination extérieure. Les laits des quatre quartiers sont mélangés et homogénéisés. Deux modalités ont été étudiées : un lait témoin contenant 0,01% (m/v) d'azide de sodium et un lait inoculé avec  $10^4$  ufc/mL d'*E. coli*.

Un volume de 3,4 L de lait est inoculé par 340 mL d'une suspension bactérienne de  $10^5$  ufc/mL d'*E. coli* de la souche P4 :O32 pour obtenir un inoculum à  $10^4$  ufc/mL. Après homogénéisation, 120 mL de lait sont distribués dans des flacons stériles et incubés à 37 °C sous agitation. Des prélèvements sont effectués à 0, 4, 8, 12 et 24 h post inoculation (PI) pour les analyses biochimiques (Figure 29).



Pour le suivi de la cinétique de croissance, 14 tubes stériles contenant 9 mL de lait, sont inoculés par 1 mL d'une suspension de  $10^5$  ufc/mL d'*E. coli*, afin d'obtenir une concentration finale de  $10^4$  ufc/mL. Tous les tubes sont incubés à 37 °C sous agitation, des prélèvements sont effectués à 0 ; 0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2 ; 3 ; 4 ; 5 ; 6 ; 7 ; 8 ; 9 ; 10 ; 11 ; 12 et 24 h (PI) pour les analyses bactériologiques ainsi que pour la mesure du pH.

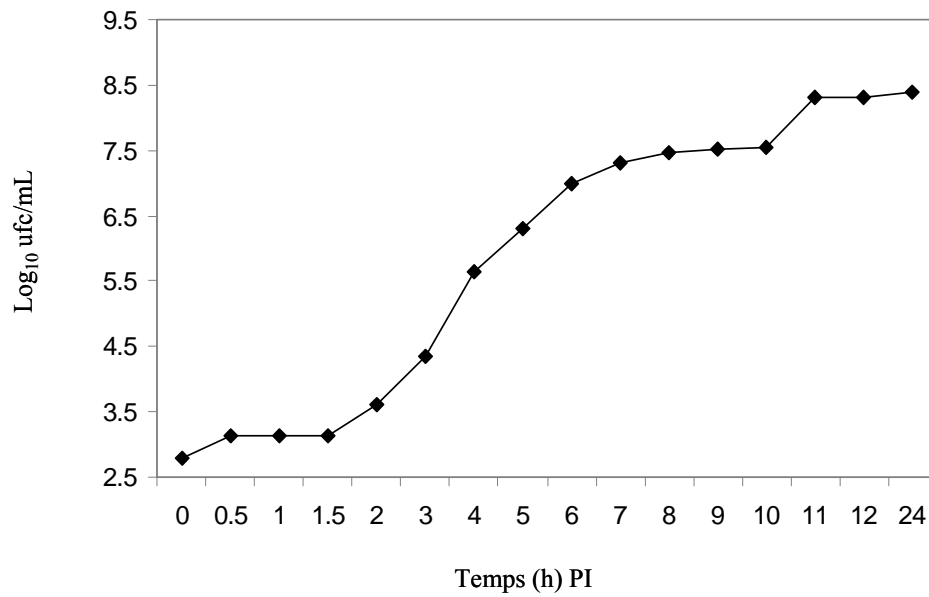
### **I. 2. Cinétique de dégradation des caséines par les protéases d'*E. coli***

#### **I. 2. 1. Préparation de l'extrait bactérien**

Une culture de 4 litre de la souche P4 :O32 d'*E. coli* a été effectuée sous agitation à 37 °C pendant 24 h. Les bactéries sont récupérées par centrifugation du milieu de culture (4000 x g, 30 min, 4 °C). Les culots bactériens sont ensuite lavés avec un tampon d'acétate de sodium 2 M (m/v), pH 7,2, contenant 0,04% (m/v) de  $\text{NaN}_3$ . Finalement les bactéries sont remises en suspension dans 80 mL du tampon d'acétate de sodium et lysées par sonication pendant 3 min à 100 W. Afin d'éviter tout réchauffement, les cellules sont maintenues au froid tout au long de l'épreuve. Pour récupérer le surnageant contenant les enzymes, les suspensions bactériennes sont centrifugées 12.000 g, 50 min à 4 °C. Le surnageant renfermant les enzymes est ensuite congelé à -20 °C puis lyophilisé.

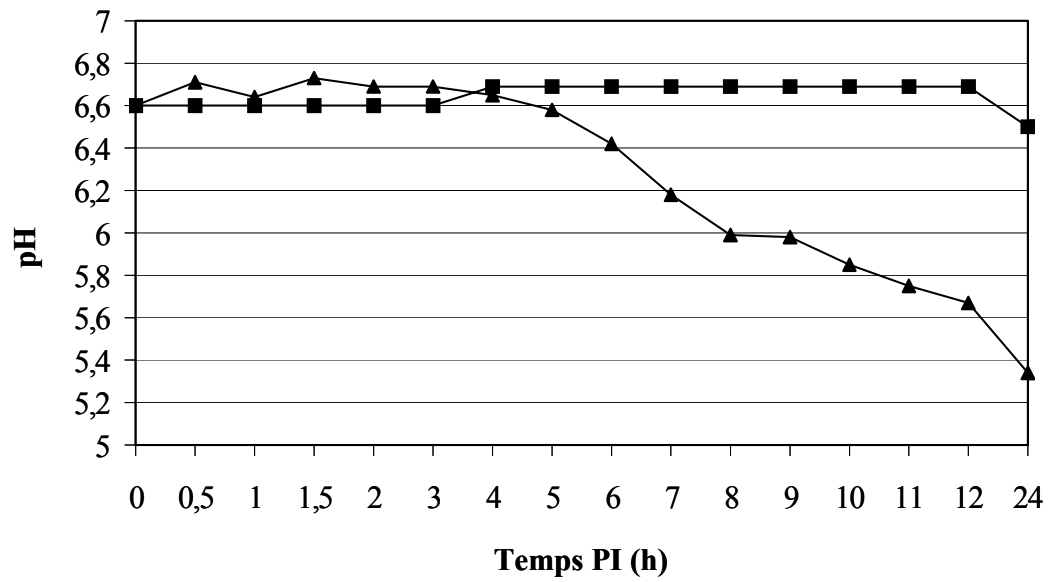
#### **I. 2. 2. Dégradation des caséines en solution par le surnageant bactérien**

Pour déterminer la quantité optimale de protéines de surnageant pour laquelle l'activité enzymatique dosée est significative, une mise au point des conditions optimales en terme de ratio des volumes de lysat d'*E. coli*/CN est réalisée. Les rapports testés pour obtenir une dégradation optimale des CN sont: 1/1, 1/5 et 1/10. Le rapport 1/1 a été choisi pour cette expérience. Le surnageant lyophilisé est repris dans tampon acétate de sodium 0,2 M (m/v), pH 7,2, 0,04% (m/v) de  $\text{NaN}_3$  contenant de la caséine CN- $\alpha_s$ , - $\beta$  ou - $\kappa$  (Sigma ; St. Louis, MO, USA), afin d'avoir une concentration finale de 5 mg /mL. Les mélanges surnageant d'*E. coli*/CN sont placés au bain marie à 37 °C et une cinétique de prélèvement est alors suivie. Des aliquots de 100  $\mu\text{L}$  du mélange sont prélevés périodiquement à 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 et 24 h pour l'analyse par EGPA-SDS.

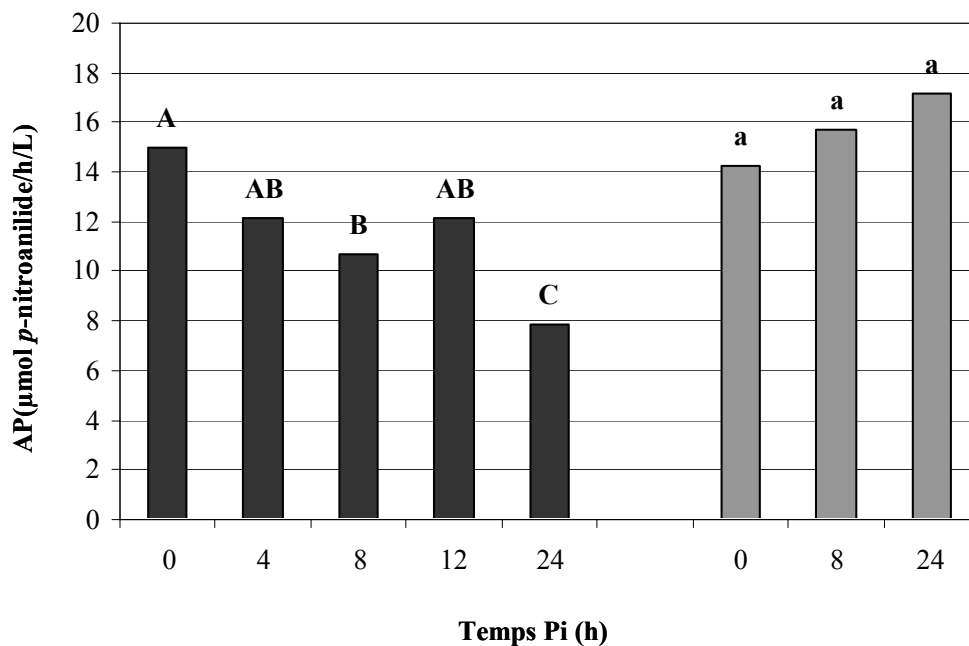


**Figure 30.** Evolution de la croissance bactérienne de lait inoculé avec  $10^4$  ufc/mL après 24 h d'incubation à 37 °C. Les analyses ont été effectuées à 0 ; 0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2 ; 3 ; 4 ; 5 ; 6 ; 7 ; 8 ; 9 ; 10 ; 11 ; 12 et 24 h PI. PI : post inoculation.





**Figure 31.** Evolution du pH du lait témoin (■) et du lait inoculé (▲) avec  $10^4$  ufc/mL d'*E. coli*, au cours de 24 h d'incubation à 37 °C.



**Figure 32.** Evolution de l'activité de type plasmine dans le lait inoculé avec  $10^4$  ufc/mL d'*E. coli* au cours de 24 h d'incubation à 37 °C (barre noire) et dans le lait témoin contenant 0,04 % de  $\text{NaN}_3$  (barre grise). Les analyses ont été effectuées à 0, 4, 8, 12 et 24h pour le traitement lait inoculé et à 0, 8 et 24 h pour le traitement témoin contenant  $\text{NaN}_3$ . Deux points portant au moins une lettre identique ne diffèrent pas significativement. AP : Activité de la plasmine, PI : post inoculation.

### I. 3. Analyse des données

Au cours du temps (0, 4, 8, 12 et 24 h) post inoculation l'activité de la plasmine, les variations de la concentration en PP et les pourcentages des peptides insolubles à pH 4,6 (comprenant les CN- $\gamma$ ) ont été déterminés par analyse de variance en mesures répétées par la procédure MIXED du logiciel SAS (SAS Inst., Inc., Cary, NC). Trois répétitions ont été réalisées à chaque temps, une différence significative est considérée pour  $P < 0,01$  en utilisant la somme des carrés des erreurs de type III. Les valeurs des variables analysées sont sous forme de moyennes ajustées (test de Tukey).

## II. RESULTATS

### II. 1. Origine de la protéolyse

#### II. 1. 1. Croissance bactérienne et valeur du pH

Après inoculation du lait, la concentration des bactéries augmente progressivement et dépasse les  $10^5$  ufc/mL après 5 h post inoculation (PI). Le plateau de croissance est atteint à 8 h PI avec une valeur de  $10^8$  ufc/mL (Figure 30). Le pH avant inoculation était de 6,6 ; cette valeur diminue progressivement après inoculation pour atteindre un minimum de 5,34 à 24 h PI. Pour le lait témoin le pH reste stable (Figure 31).

#### II. 1. 2. Activité de la plasmine

Dans le lait inoculé avec  $10^4$  ufc/mL d'*E. coli*, l'activité de la plasmine avant inoculation est de 15  $\mu$ mol p-nitroanilide/h/L. Cette valeur diminue significativement à 8 h PI pour atteindre son minimum à 24 h PI avec une valeur de 8  $\mu$ mol p-nitroanilide/h/L (Figure 32).

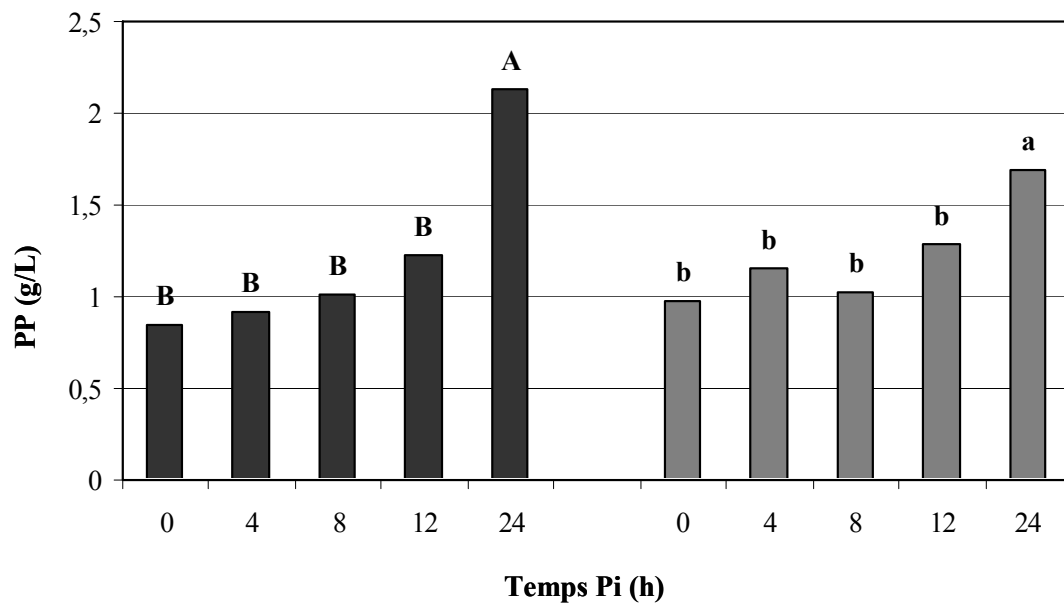
Pour le lait témoin contenant 0,04 % de  $\text{NaN}_3$ , l'activité de la plasmine augmente d'une façon non significative de 8 h PI à 24 h PI.

#### II. 1. 3. La fraction protéose-peptones

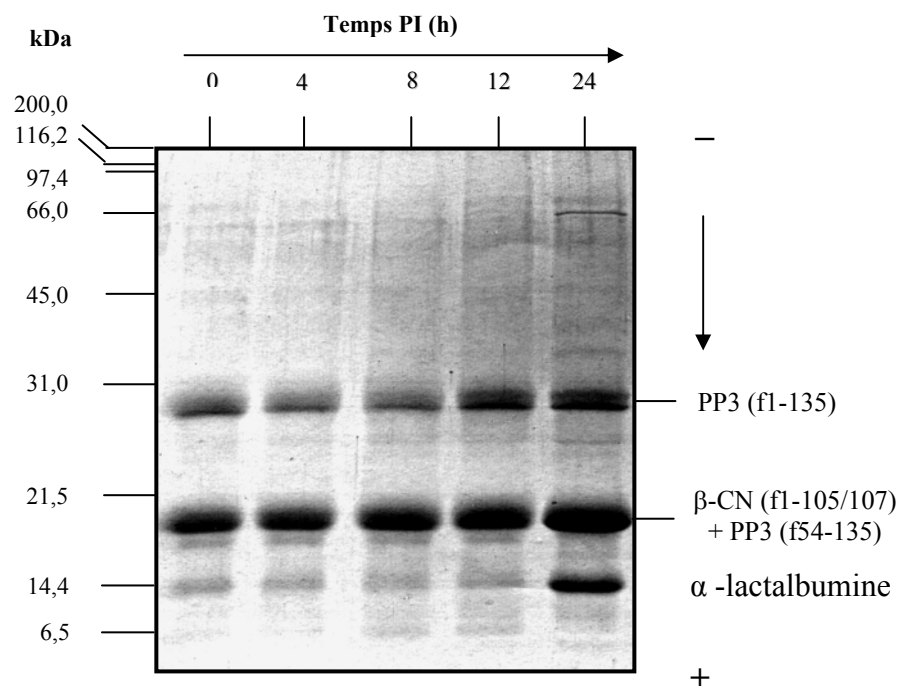
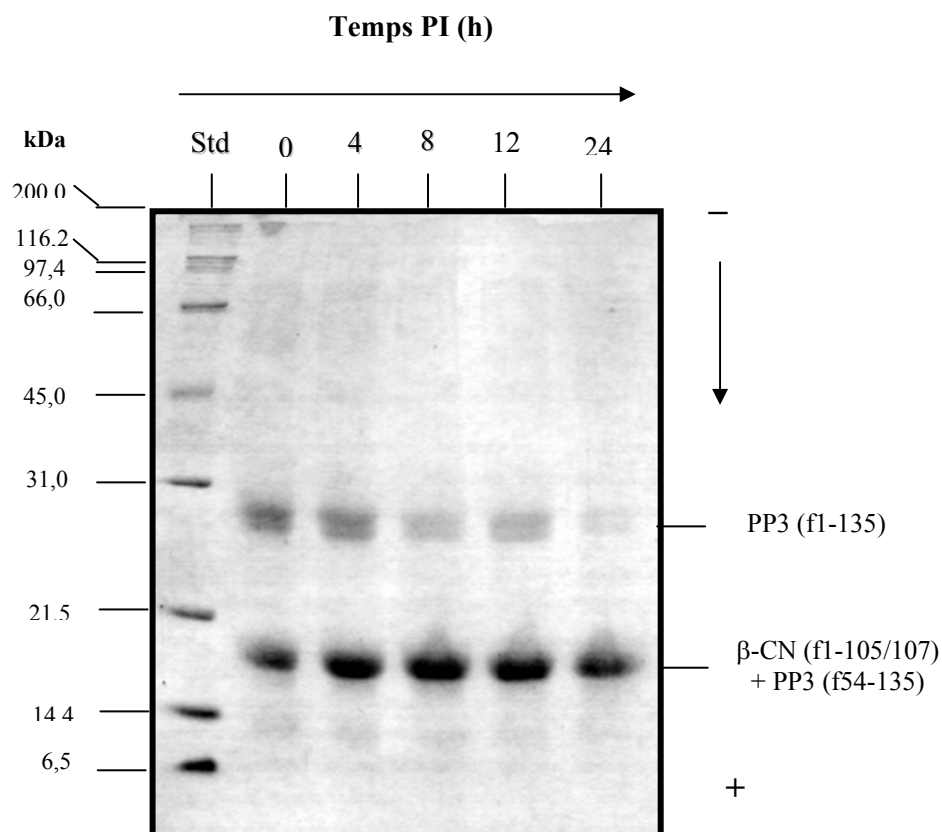
##### II. 1. 3. 1. Variation quantitative de la fraction PP

Dans le lait inoculé avec  $10^4$  ufc/mL d'*E. coli*, la teneur en PP est de 0,8 g/L. Cette valeur augmente significativement pour atteindre un maximum à 24 h PI avec une teneur en PP de 2,3 g/L (Figure 33).

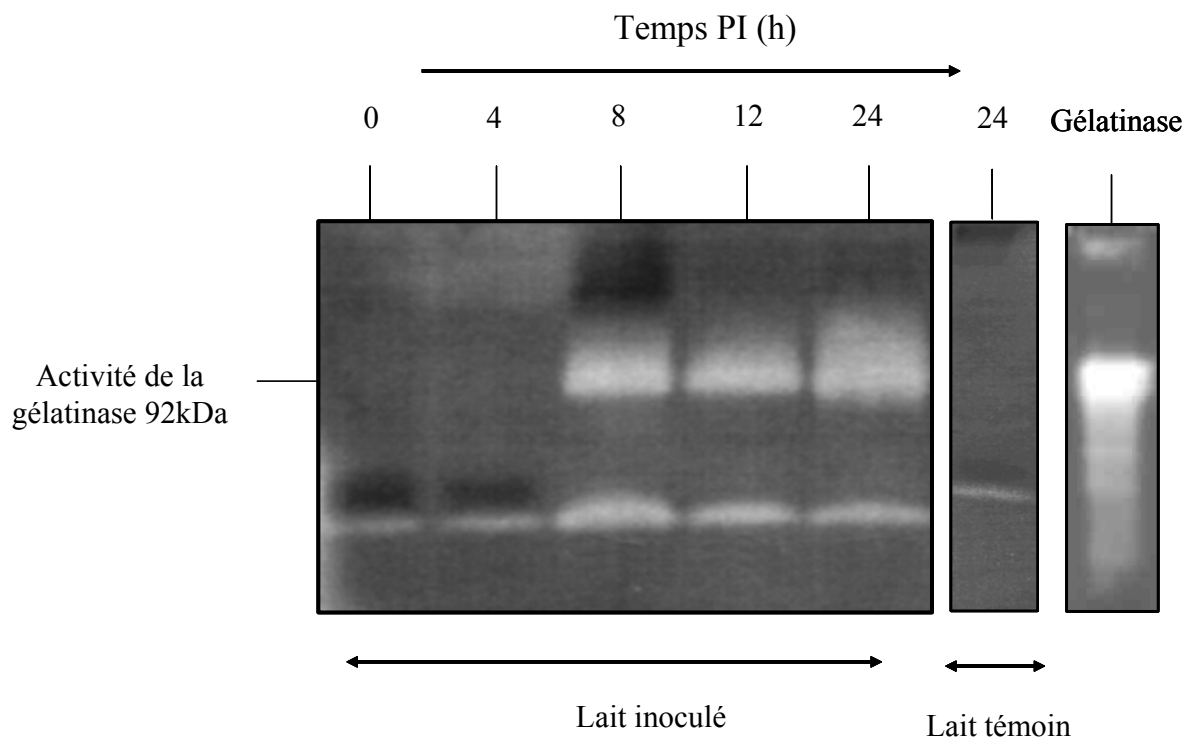
Pour le lait témoin contenant 0,04 % de  $\text{NaN}_3$ , la teneur en PP est de 0,9 g/L à 0h PI, elle augmente de façon significative pour atteindre un maximum à 24 h PI avec une teneur en PP de 1,7 g/L.



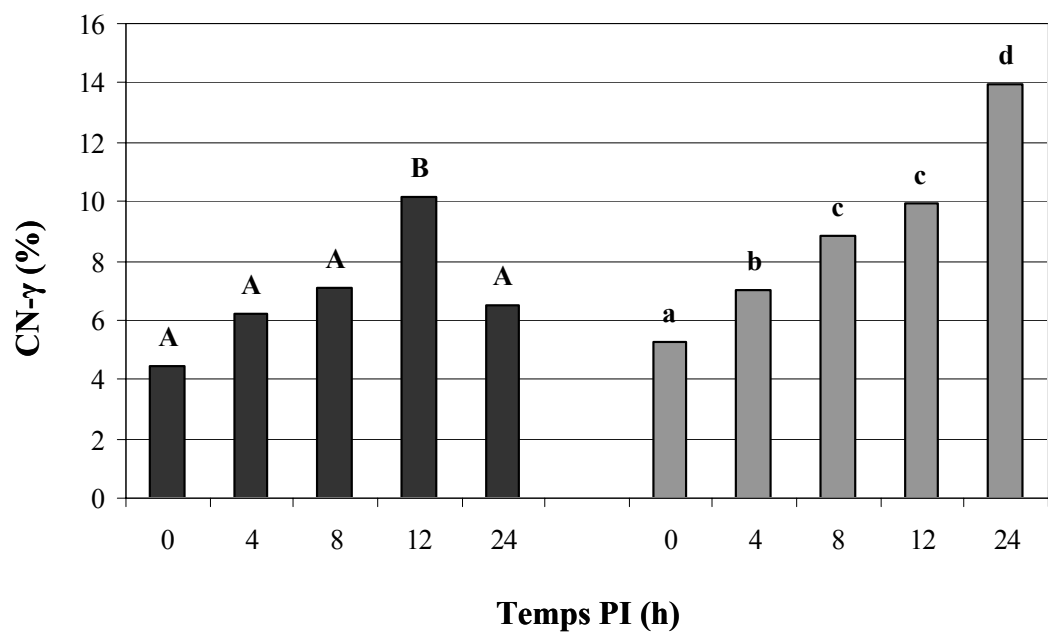
**Figure 33.** Evolution de la teneur en protéose-peptones (PP) du lait inoculé avec  $10^4$  ufc/mL d'*E. coli* au cours de 24 h d'incubation à 37 °C (noire) et dans le lait témoin contenant 0,04 % de  $\text{NaN}_3$  (grise). Les analyses ont été effectuées à 0, 4, 8, 12 et 24 h pour chaque traitement. Deux points portant au moins une lettre identique ne diffèrent pas significativement. PP : protéose-peptones. PI : post inoculation.

**A.****B.**

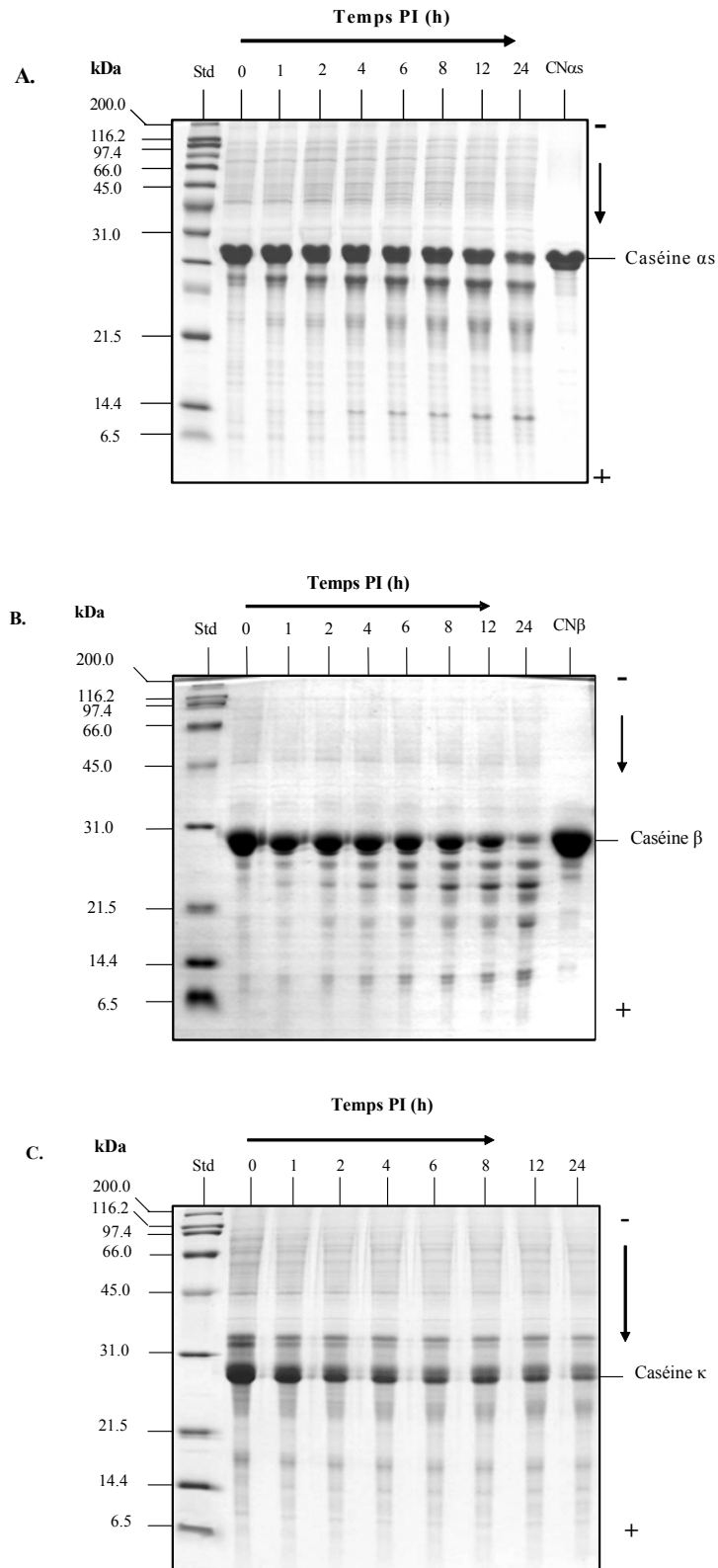
**Figure 34.** Electrophorèse EGPA-SDS de la fraction protéose-peptones issue de lait inoculé par  $10^4$  ufc/ml d'*E. coli* (A) et du lait contenant 0,01% d'azide de sodium (B) au cours d'une cinétique de 24 h à 37 °C. Les protéines ont été révélées au bleu de Coomassie R 250 avec un dépôt par puits de 60  $\mu$ g de protéine. PI : post-inoculation.



**Figure 35.** Cinétique de l'activité de la gélatinase du lait inoculé par  $10^4$  ufc/mL d'*E. coli* en zymographie gélatine. PI : post inoculation.



**Figure 36.** Evolution du pourcentage des CN- $\gamma$  du lait inoculé par  $10^4$  ufc/mL d'*E. coli* (barre noire) et du lait témoin contenant 0,04 % de  $\text{NaN}_3$  (barre grise). Les analyses ont été effectuées à 0, 4, 8, 12 et 24 h pour chaque traitement. Deux points portant une lettre identique ne diffèrent pas significativement.



**Figure 37.** Suivi par EGPA-SDS de la cinétique d'hydrolyse des CN- $\alpha_s$  (A), - $\beta$  (B) et - $\kappa$  (C), par le lysat d'*E. coli*. 5 mg/mL des CN- $\alpha_s$ , - $\beta$  et - $\kappa$  sont incubées séparément avec 5 mg/mL de lysat d'*E. coli* dans un tampon d'acétate de sodium 0,2 M (m/v) à pH 7,2 contenant 0,04 % de NaN<sub>3</sub> à 37°C pendant 24 h. 25  $\mu$ g de protéines ont été déposées dans le gel. La révélation a été réalisée au bleu de Coomassie. Std : standard de masse moléculaire.



### **II. 1. 3. 2. Variation qualitative de la fraction PP**

L'électrophorèse EGPA-SDS de la fraction PP (Figure 34A), avant inoculation révèle un profil contenant deux bandes correspondant à PP3 (f1 – 135) pour la bande supérieure et PP3 (f54 – 135) +  $\beta$ -CN (f1- 105/107) pour la bande inférieure. Au cours de la cinétique à 24 h PI le profil électrophorétique révèle un changement qualitatif de la fraction PP notamment par l'apparition d'une bande de masse molaire apparente de 14,4 kDa. Le séquençage aminoterminal de cette bande a révélé de l' $\alpha$ -lactalbumine.

La fraction PP du lait témoin contenant 0,04 % de  $\text{NaN}_3$ , ne contient pas d' $\alpha$ -lactalbumine (Figure 34B). L'intensité de la bande PP3 diminue au cours de l'incubation pour presque disparaître à 24 h PI.

### **II. 1. 4. Activité de la gélatinase**

La zymographie gélatine montre une activité de la gélatinase à partir de 8 h PI, qui n'apparaît que dans le lait inoculé (Figure 35). Ces résultats ont été confirmés par un western blot utilisant des anticorps anti-MMP-9 (gélatinase).

## **II. 2. Protéolyse et dégradation des caséines par le lysat bactérien**

### **II. 2. 1. Evolution de la proportion en peptides insolubles à pH 4,6 (comprenant les CN- $\gamma$ )**

Avant inoculation du lait, la part des peptides insolubles à pH 4,6 représente 4,2 %. Après inoculation, la part des peptides insolubles atteint un maximum à 12 h PI avec une valeur de 10 %, puis diminue à 24 h PI (Figure 36).

Pour le lait témoin contenant 0,04 % de  $\text{NaN}_3$ , la teneur en peptides insolubles à pH 4,6 augmente significativement de façon inattendue pour atteindre une valeur de 14 % à 24 h PI.

### **II. 2. 2. Dégradation des caséines par les protéases d'*E. coli***

Le profil électrophorétique des CN- $\alpha_s$  lors de l'incubation avec le surnageant du lysat bactérien, présente une faible diminution d'intensité entre 0 et 12 h PI avec une apparition marquée de peptides, cette diminution étant plus marquée après 24 h PI. Les CN- $\beta$  et - $\kappa$  présentent un profil de dégradation intense avec une diminution progressive et une apparition de plusieurs peptides issus de l'hydrolyse de ces mêmes caséines (figure 37).



### III. DISCUSSION

#### III. 1. Origine de la protéolyse

##### III. 1. 1. Croissance bactérienne et activité de la gélatinase

Après inoculation du lait avec  $10^4$  ufc/mL, la croissance bactérienne atteint  $10^8$  ufc/mL après 8 h d'incubation. Ce temps peut correspondre à une phase de pré-adaptation des bactéries dans le lait et le début de l'activité protéolytique d'*E. coli* (Fang et al., 1993). Le profil de croissance d'*E. coli* dans le lait est en adéquation avec les données de Kornalijnslijper et al. (2004), qui démontrent que la concentration finale d'*E. coli* est deux cents fois plus importante *in vitro* dans le lait cru que *in vivo* dans la mamelle. La balance hôte/bactéries est déterminée principalement par les besoins en nutriments des bactéries. En effet, dans des conditions difficiles en présence des facteurs antibactériens, les besoins nutritifs de croissance deviennent importants. Aussi, il a été démontré que les germes pathogènes avaient une croissance meilleure dans le lait et le lactosérum "mammiteux" que dans le lait et le lactosérum "normaux" (Kaartinen et al., 1989). Cette multiplication accrue des germes pathogènes, malgré l'augmentation des facteurs antibactériens, pourrait être due aux changements dans la composition du lait qu'entraîne la réaction inflammatoire causée par la présence des bactéries, et notamment par une mise à disposition pour les bactéries de peptides issus de cette protéolyse.

Dans la mamelle, il existe différents processus d'interaction entre les cellules somatiques, les bactéries et les cellules épithéliales, ces interactions sont limitées dans le modèle choisi, car le nombre des cellules somatiques est très faible. Lors des infections expérimentales, la numération bactérienne du lait de quartiers infectés ne dépasse pas  $10^6$  ufc/mL. Cette faible concentration de bactéries *in vivo* par rapport à l'expérimentation *in vitro* est due notamment à la présence de cellules phagocytaires, ainsi qu'aux nombreux facteurs antibactériens telles que les immunoglobulines, la lactopéroxydase et la lactoferrine (Van Hoojdonk et al., 2000). Ces facteurs permettent d'une part l'entretien de la réaction inflammatoire et d'autre part de diminuer partiellement la croissance et ils jouent un rôle important dans la protection de la glande mammaire contre les infections bactériennes. Si ces facteurs proviennent du sang lors des infections, ils sont absents ou à des concentrations très basses dans un lait cru provenant d'une mamelle saine. En revanche, les bactéries possèdent des armes telles que les enzymes protéolytiques, les facteurs d'adhésion et les composants antiphagocytaires pour contrecarrer les activités antibactériennes existant dans le lait (Sutra et Poutrel, 1994).



Le profil électrophorétique du gel zymographie gélatine révèle une présence d'une bande à 92 kDa à partir de 8 h PI. Cette bande correspondrait à la gélatinase après analyse par western blot utilisant des anticorps anti MMP-9 humain. *E. coli* produit de nombreuses protéases, parmi elles les enzymes collagénolytiques (Maeda et al., 1998). Les protéases cytoplasmiques d'*E. coli* sont susceptibles de dégrader les protéines anormales telles que les caséines. Alors que les protéases périplasmiques Mi et Pi peuvent, de par leur localisation, dégrader des protéines extracellulaires (Chung, 1993).

La présence d'une bande de dégradation en zymographie gélatine est détectée en parallèle dans le lait témoin et dans le lait inoculé à un niveau basal. Ceci suggère que le sérum est la principale source de cette enzyme dans le lait.

### **III. 1. 2. Activité de la plasmine**

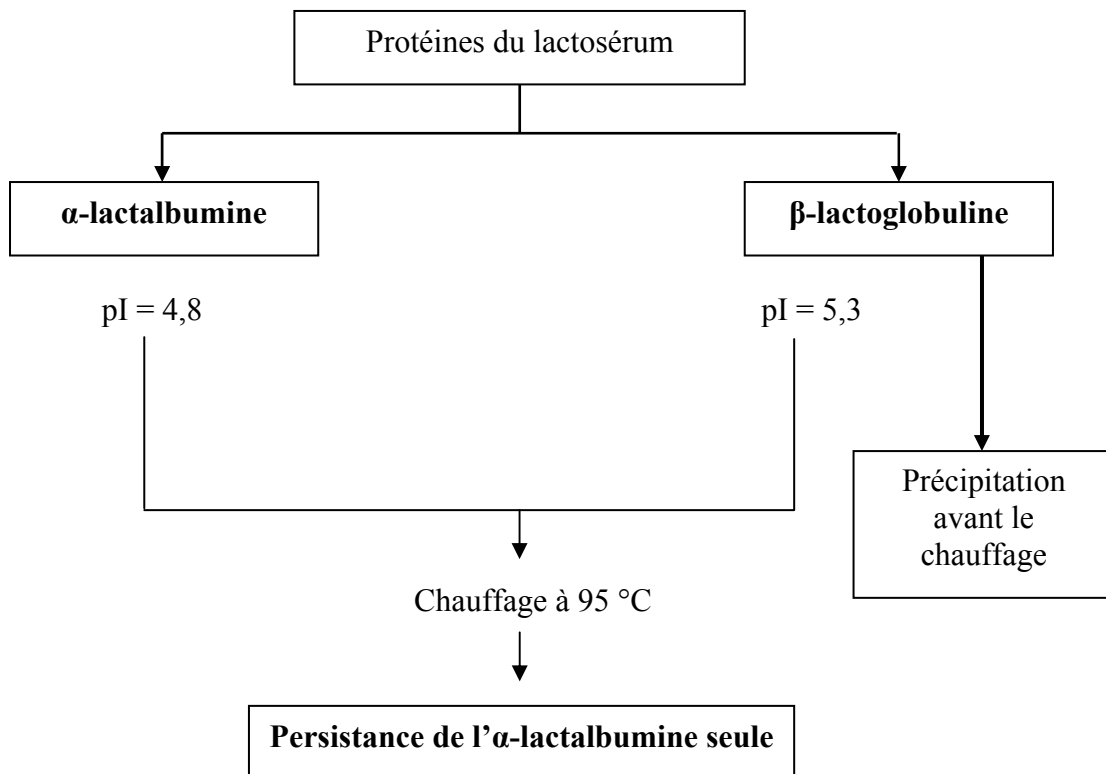
Avant inoculation du lait avec  $10^4$  ufc/mL d'*E. coli* la valeur initiale de l'activité de la plasmine dans le lait correspond à un niveau basal faible avec une valeur de 15  $\mu$ mol p-nitroanilide/h/L. Une baisse significative de l'activité de la plasmine est notée tout au long de la cinétique d'incubation pour le lait inoculé à  $10^4$  ufc/mL. Cette baisse d'activité pourrait être due principalement à la production d'inhibiteurs de protéases à sérine par *E. coli* (Gugi et al., 1991). Dans le lait témoin contenant 0,04% de  $\text{NaN}_3$ , l'activité de la plasmine reste plus au moins stable, elle augmente légèrement d'une façon non significative entre 8 et 24 h PI. Cette augmentation pourrait être due aux activateurs de plasminogène de type tissulaire (t-PA) et de type urokinase (u-PA) qui peuvent être présents dans le lait (Bastian et Brown, 1995).

### **III. 1. 3. Teneur en fraction PP (FPP)**

Avant l'inoculation du lait, la teneur en PP est inférieure à 1 g/L ; cette valeur indique un niveau protéolytique basal faible, confirmé à la fois par une activité plasminique peu élevée et par un DC très bas. Au cours de la croissance bactérienne, la teneur en PP augmente pour dépasser 2,3 g/L après 24 h d'incubation. En parallèle, la concentration en PP dans le lait témoin contenant 0,04% de  $\text{NaN}_3$ , atteint 1,8 g/L après 24 h d'incubation. L'augmentation de la teneur en PP dans le lait témoin, ne peut pas être imputée aux protéases bactériennes, mais principalement à l'activité de la plasmine qui génère en 24 h environ 0,8 g/L de PP. La part des protéases leucocytaires dans cette augmentation ne doit pas être conséquente, du fait de la très faible concentration cellulaire du lait avec lequel est réalisée l'étude ( $<30\ 000$  cel/mL).

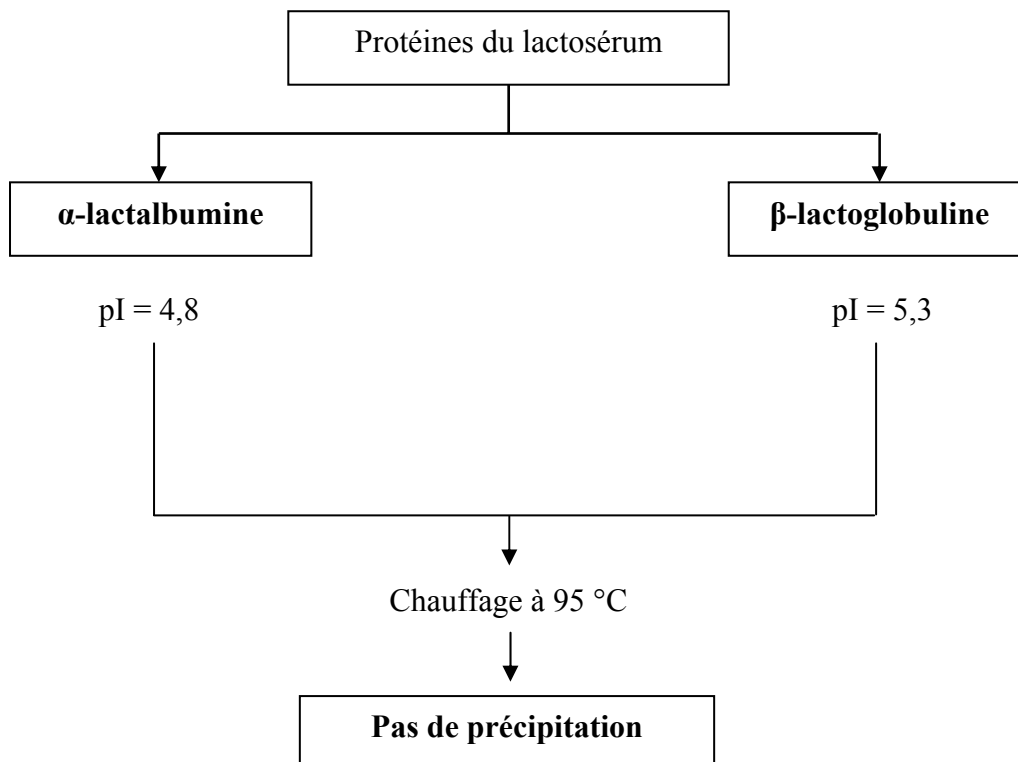
### Lait à pH acide 5,3

A.



### Lait à pH neutre 7

B.



**Figure 38.** Effet du pH sur la précipitation thermique des protéines sériques dans un lait à pH acide (Cayot et Lorient, 1998). pI : pH isoélectrique.

La différence de concentration en PP après 24 h d'incubation entre le lait témoin et celui inoculé avec  $10^4$  ufc/mL d'*E. coli* peut être évaluée entre 0,6 et 0,7 g/L. Dans une première analyse il semblerait naturel d'attribuer ce différentiel de concentration en PP à la présence d'*E. coli*. Cependant, la bibliographie n'indique pas clairement qu'*E. coli* secrète des protéases extracellulaires. L'augmentation de la concentration en PP entre le lait inoculé et le lait témoin n'est sans doute pas liée directement aux protéases d'*E. coli*, car des travaux en cours au laboratoire montrent qu'en phase de croissance bactérienne *E. coli* est peu protéolytique.

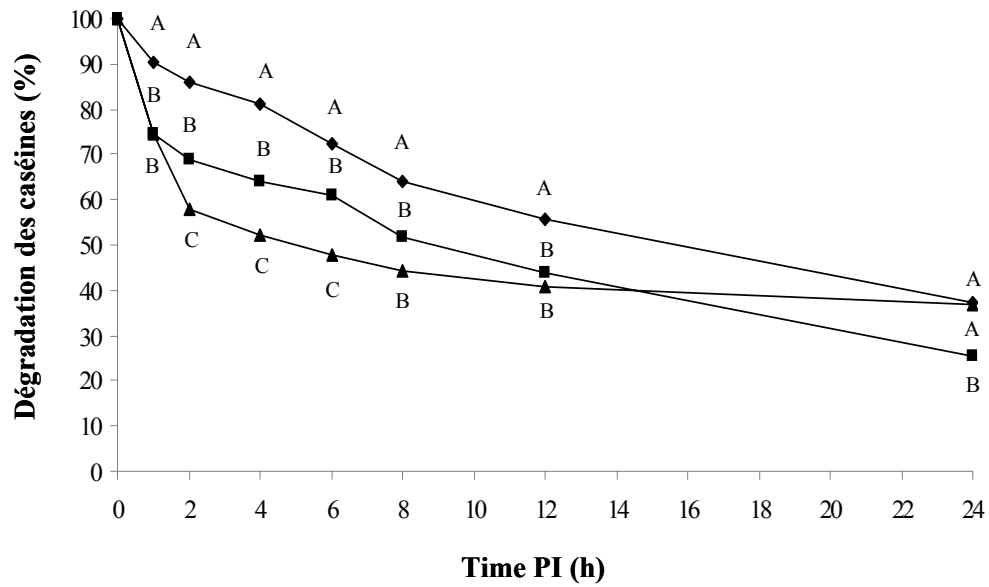
L'analyse qualitative de la FPP, montre clairement que l'élément qui différencie les deux laits à la fin de l'inoculation est une présence atypique et très significative de l' $\alpha$ -lactalbumine dans le lait inoculé. La présence de l' $\alpha$ -lactalbumine dans la FPP doit être abordée sans considérée la protéolyse comme l'élément responsable. Un élément complémentaire lié à la présence d'*E. coli* différencie les deux laits à la fin de l'incubation ; en effet, un pH différentiel important est noté entre les deux laits, 6,3 contre 5,3 pour le lait inoculé.

La présence de l' $\alpha$ -lactalbumine dans la phase soluble du lait après traitement thermique et abaissement du pH à 4,6 est a priori anormale si le lait initial n'a pas subi de modifications. La persistance de l' $\alpha$ -lactalbumine dans la FPP pourrait être due à l'abaissement du pH du lait au cours de l'incubation d'*E. coli*.

Lors de nos expériences, le pH du lait inoculé diminue pour atteindre 5,3 à 24 h, ce qui pourrait provoquer une précipitation de la  $\beta$ -lactoglobuline avant le chauffage. Pendant le chauffage du lait, l' $\alpha$ -lactalbumine reste seule, et en absence de la  $\beta$ -lactoglobuline, ne précipite pas et reste donc dans le surnageant de thermocoagulation (Figure 38A).

Les pH isoélectriques (PI) pour lesquels on observe une précipitation de l' $\alpha$ -lactalbumine et de la  $\beta$ -lactoglobuline sont respectivement de 4,8 et 5,3. Plus le pH se rapproche des PI des protéines lors du chauffage, plus elles précipitent, cette précipitation provient de l'association de ces deux protéines. Entre pH 4,5 et 7,0, l' $\alpha$ -lactalbumine chauffée seule en solution ne précipite pas (Figure 38B) (Cayot et Lorient, 1998).

L'utilisation de la FPP comme indicateur quantitatif de la protéolyse microbienne dans un modèle *in vitro* d'inoculation du lait avec *E. coli* passe par un contrôle de pH à la valeur initiale du lait durant toute la cinétique d'étude.



**Figure 39.** Dégradation totale des caséines  $\alpha_s$  ( $\blacklozenge$ ),  $\beta$  ( $\blacksquare$ ) et  $\kappa$  ( $\blacktriangle$ ) incubées séparément avec (5 g/mL) de lysat d'*E. Coli* dans un tampon d'acétate de sodium 0,2 M (m/v), pH 7,2 contenant 0,04 %  $\text{NaN}_3$  à 37 °C pendant 24 h. Deux points portant une lettre identique ne diffèrent pas significativement. PI : post inoculation.



### III. 2. Evolution de la proportion en peptides insolubles à pH 4,6 (comprenant les CN- $\gamma$ )

L'augmentation significative des peptides insolubles à pH 4,6 (contenant notamment les CN- $\gamma$ ), qui se fait pendant les 12 premières heures d'incubation en parallèle avec l'augmentation des PP, pourrait être due principalement à la dégradation de la caséine  $\beta$  par la plasmine. Le rôle des protéases bactériennes notamment des collagénases bactériennes durant cette phase pourrait être significatif. En effet, la dégradation de la caséine  $\beta$  par les collagénases de *Clostridium histolyticum* a été rapportée par les travaux de Gilles et Keil (1976). De même Andrews et Alichanidis (1983) ont souligné la production des CN- $\gamma$  après incubation *in vitro* de CN avec des bactéries psychrotrophes. Dans le lait inoculé, après 12 h PI la baisse de la concentration des peptides insolubles à pH 4,6 pourrait avoir pour origine les protéases caséinolytiques d'*E. coli*. En effet, les produits de l'hydrolyse de la caséine sont probablement des nutriments clés pour les bactéries (Mattila-Sandholm, 1990).

Pour le lait contrôle contenant 0,04 % de NaN<sub>3</sub>, le taux des CN- $\gamma$  augmente significativement, cette hausse peut être due principalement à l'activité de la plasmine qui hydrolyse les CN- $\beta$  pour générer les CN- $\gamma$ .

### III. 3. Dégradation des caséines en solution par le surnageant du lysat bactérien

Dans notre étude l'utilisation de l'extrait enzymatique d'*E. coli* intègre l'ensemble des protéases bactériennes qu'elles soient intracellulaires ou extracellulaires et permet des approches des protéases relarguées par les bactéries lors de la phagocytose des bactéries par les macrophages *in vivo*. La dégradation des caséines ( $-\alpha$ ,  $-\beta$ ,  $-\kappa$ ) par le lysat d'*E. coli* révèle un grand nombre de bandes de produits d'hydrolyse durant la cinétique. En effet, les travaux de Verdi et Barbano (1991), ont démontré que les extraits d'enzymes extracellulaires de *S. aureus* et *E. coli* sont capables de dégrader 9,6% et 6,7% de la caséine  $\beta$  respectivement. L'action des protéases d'*E. coli* donne lieu à un ordre préférentiel variable d'hydrolyse des caséines (Figure 39) et trois phases peuvent être distinguées. Durant la première phase de 0 à 2 h PI le taux de dégradation des caséines par le lysat bactérien présente un ordre d'hydrolyse qui est CN- $\kappa$  >  $-\beta$  >  $-\alpha_s$  (Tableau 15). La sensibilité de dégradation des CN- $\kappa$  est supérieure à celle des CN- $\beta$  et  $-\alpha_s$  et atteint un pourcentage de disparition globale de 45% à 2 h PI, alors que ce pourcentage est de 30 et 10 % respectivement pour les CN- $\beta$  et  $-\alpha_s$ . Ces résultats sont en adéquation avec les travaux de Grieve et Kitchen (1985), sur les bactéries psychrotrophes (*Serratia marcescens*) qui dégradent plus facilement les CN- $\beta$  et  $-\kappa$  que la CN- $\alpha_s$ .

**Tableau 15.** Sensibilité de dégradation des caséines exprimée en (%/h) par le lysat d'*E. coli*. Deux points portant une lettre identique dans chaque ligne ne diffèrent pas significativement. PI: post inoculation.

Sensibilité de dégradation Période PI (h)	CN $\alpha$	CN $\beta$	CN $\kappa$
0 - 2	<sup>c</sup> 7.02	<sup>b</sup> 15.52	<sup>a</sup> 21.04
2 - 8	<sup>a</sup> 3.68	<sup>ab</sup> 2.84	<sup>b</sup> 2.27
8 - 24	<sup>a</sup> 1.67	<sup>a</sup> 1.64	<sup>b</sup> 0.47

Durant la seconde phase entre 2 h et 8 h PI, l'ordre préférentiel d'hydrolyse est de  $CN-\alpha_s \geq -\beta > -\kappa$ . La troisième phase voit après 8 h PI, le taux de dégradation des  $CN-\kappa$  qui atteint un taux de 0,47%/h contre 1,6%/h pour les  $CN-\alpha_s$  et  $-\beta$ . Les résultats obtenus dans la première phase (0 – 2 h PI) sont cohérents avec la bibliographie. A partir de 2 h PI, la  $CN-\kappa$  voit son pourcentage de dégradation horaire diminuer très fortement et à partir de 8 h PI devenir très faible voire nul. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées. Les peptides générés par la dégradation des  $CN-\kappa$  peuvent participer à l'inhibition des enzymes d'*E. coli*. Une dénaturation par dégradation des enzymes bactériennes qui voit leurs activités diminuer au cours de la cinétique associée à ce mécanisme, un ratio enzyme/substrat peut être défavorable. Actuellement aucune de ces hypothèses n'est privilégiée.



## CONCLUSION

Les modèles "*E. coli*/lait" et protéases d'*E. coli*/caséines utilisés dans cette étude ont permis une caractérisation de la protéolyse d'origine bactérienne.

Le premier modèle utilisé *E. coli*/lait cru a permis d'aborder les interactions entre les bactéries et le système plasmine-plasminogène. La baisse de l'activité de la plasmine et l'augmentation de la teneur en peptides insolubles à pH 4,6 (CN- $\gamma$ ), suggèrent une action directe des protéases d'*E. coli* sur les caséines et sur l'inhibition de la plasmine. Ce même modèle permet de décrire l'incidence de la baisse du pH sur les variations qualitatives et quantitatives de la fraction PP. Un maintien du pH initial au cours de la cinétique d'étude permettrait d'éviter la présence atypique de l' $\alpha$ -lactalbumine dans la fraction PP.

Le second modèle "Protéases d'*E. coli*/caséines" a permis de caractériser les activités protéolytiques des protéases bactériennes sur les caséines. Ces protéases dégradent *in vitro* les caséines selon un ordre préférentiel  $\text{CN-}\kappa \geq -\beta > -\alpha_s$  durant les deux premières heures d'incubation. Cet ordre classique souligné dans la bibliographie, évolue durant la cinétique d'incubation traduisant des modifications de spécificité ou d'inhibition non élucidées dans ce travail.



# *Chapitre 3*

*Caractérisation des activités protéolytiques des cellules somatiques après l'infusion intramammaire du lipopolysaccharide (LPS) d'E. coli*





**CHAPITRE 3 : Caractérisation des activités protéolytiques des cellules somatiques  
après l'infusion intramammaire du lipopolysaccharide (LPS) d'*E. coli*.**

Le modèle de mammite expérimentale à LPS a pour objectif d'obtenir au pic de l'inflammation un recrutement de PMN en s'affranchissant des activités potentielles des bactéries pathogènes. De nombreuses études ont été consacrées à ce modèle notamment dans le cadre de la mise au point de vaccin, par contre à notre connaissance peu de travaux abordent dans le lait la relation entre la protéolyse et la maturité des PMN.

L'impact significatif des PMN et des bactéries dans la protéolyse a été validé dans les chapitres précédents utilisant en premier lieu un modèle d'infection expérimentale à *E. coli* pour la protéolyse dans un système complexe, et dans un second temps un modèle *in vitro* d'inoculation bactérienne dans un lait cru pour l'étude de la protéolyse d'origine bactérienne. Ce chapitre s'intéresse donc plus particulièrement aux activités protéolytiques des PMN en relation avec leur maturité

## **I. PROTOCOLE EXPERIMENTAL**

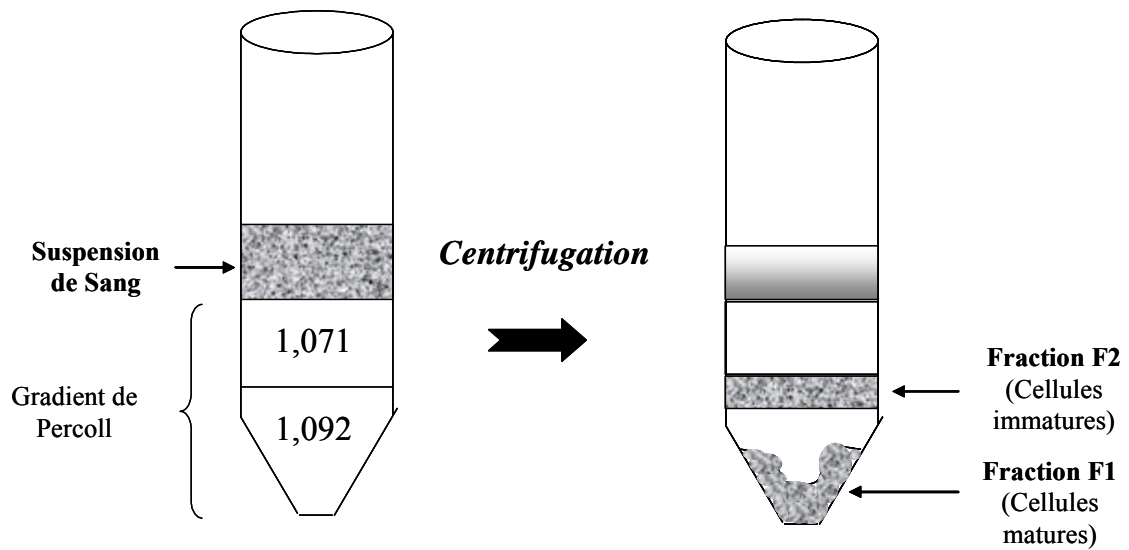
### **I. 1. Sélection des animaux**

Trois vaches de race Prim'Holstein ont été sélectionnées dans le troupeau laitier de la ferme expérimentale de l'ENSAIA. Plusieurs critères sont considérés : un dénombrement cellulaire dans le lait inférieur à 100 000 cel/mL, une production de lait journalière supérieure à 22 L, enfin une absence de germes pathogènes majeurs dans les quatre quartiers.

### **I. 2. Inoculation**

Le quartier arrière droit de chaque vache est infusé via le canal du trayon juste après la traite correspondant au temps 0 h, avec 10 µg de lipopolysaccharide d'*E. coli* (LPS 026 :B6, Sigma, St Louis, USA), dilué dans 10 mL d'une solution commerciale d'eau physiologique stérile apyrogène (NaCl à 0,9% m/v), le quartier étant préalablement désinfecté à l'alcool et la seringue passée à la flamme juste avant l'injection.

A.



B.

Fractions	Stade de maturation des myéloïdes		
	Immatures	Moyennement matures	Matures
Fraction 1	0	6	94
Fraction 2	5	86	9

**Figure 40.** Schéma du gradient utilisé pour la séparation des cellules myéloïdes du sang (A). Les cellules sont suspendues au dessus de deux couches de gradient discontinues de densité 1,092 et 1,071 g/mL. Après centrifugation, deux fractions sont distinguées : fraction F1 contient les cellules myéloïdes matures (cellules à bandes segmentées) et la fraction F2 contient les cellules myéloïdes immatures (myélocytes primaires et des métamyélocytes). Le tableau (B) correspond à la distribution des cellules myéloïdes en pourcent dans les deux fractions du gradient de Percoll selon Van Merris et al. (2001).

### **I. 3. Prélèvement de lait et du sang**

Pour les analyses physico-chimiques, le lait a été collecté quartier par quartier aux temps suivants: 0 (juste avant l'infusion), 4, 8, 12, 24, 34, 50, 58 et 76 h après infusion.

Les prélèvements de sang ont été effectués, par ponction dans la veine caudale. Les échantillons de sang sont collectés dans des tubes Vacutainer de 10 mL contenant de la lithium-héparine (Becton Dickinson, San Jose, CA), ils sont transportés à température ambiante et sont analysés dans les 6 heures suivant le prélèvement.

### **I. 4. Echantillon de cellules somatiques**

Les cellules somatiques du sang ont été isolées d'après la méthode de Carlson et Kaneko. (1973). Un volume de 10 mL de sang frais est homogénéisé et centrifugé à 2300 rpm, 15 min à 4 °C. Le plasma est aspiré à l'aide de la pompe à vide et 4 mL et 2 mL d'H<sub>2</sub>O mili-Q et NaCl à 2,7 % (m/v) sont ajoutés respectivement, le mélange est homogénéisé pendant 45 s puis centrifugé à 2300 rpm, 5 min à 4 °C. Le culot obtenu est centrifugé une seconde fois dans les mêmes conditions. Le culot cellulaire est repris dans du PBS pH 7,2 (Gibco BRL, Paisley, Ecosse).

### **I. 5. Séparation des neutrophiles selon le stade de maturité**

La séparation des neutrophiles a été réalisée selon la méthode de Van Merris et al. (2001). Un volume de 20 mL a été prélevé par ponction dans la veine caudale. Les solutions de Percoll (Sigma Chemical, Missouri, USA) de densité 1,071 et 1,092 sont préparées et coulées en gradient dans des tubes coniques. 4 mL de sang sont versés délicatement à l'aide d'une pompe péristaltique dans les tubes, et centrifugés à 2500 rpm, 25 min à 4 °C. Les deux fractions visibles de cellules sont récupérées à l'aide d'une pipette pasteur. Les fractions F1 sont constituées de PMN matures et les fractions F2 de cellules immatures (Figure 40). Les fractions F1 et F2 sont poolées séparément et du PBS (Gibco BRL, Paisley, Ecosse) est ajouté afin d'ajuster le volume à 15 mL. Les tubes sont ensuite centrifugés à 1350 rpm à 4 °C pendant 10 min, les surnageants sont éliminés. 5 mL et 3,2 mL de solution de Hanks (eurobio, France) sont ajoutés pour F1 et F2 respectivement. La numération des cellules est effectuée par une coloration au bleu trypan à 0,4 % et comptage dans une chambre de Malassez au microscope optique. Les culots cellulaires sont ensuite dilués dans une solution de Hanks afin d'obtenir une concentration finale de  $2 \cdot 10^6$  cel/mL. Les cellules sont incubées avec 0,1 ng de PMA /mL (phorbol myristate acetate) (Sigma Chemical, St. Louis, MO) dans une étuve ventilée (5% CO<sub>2</sub>), 12 h à 27 °C, afin de stimuler les cellules pour déverser leurs contenus

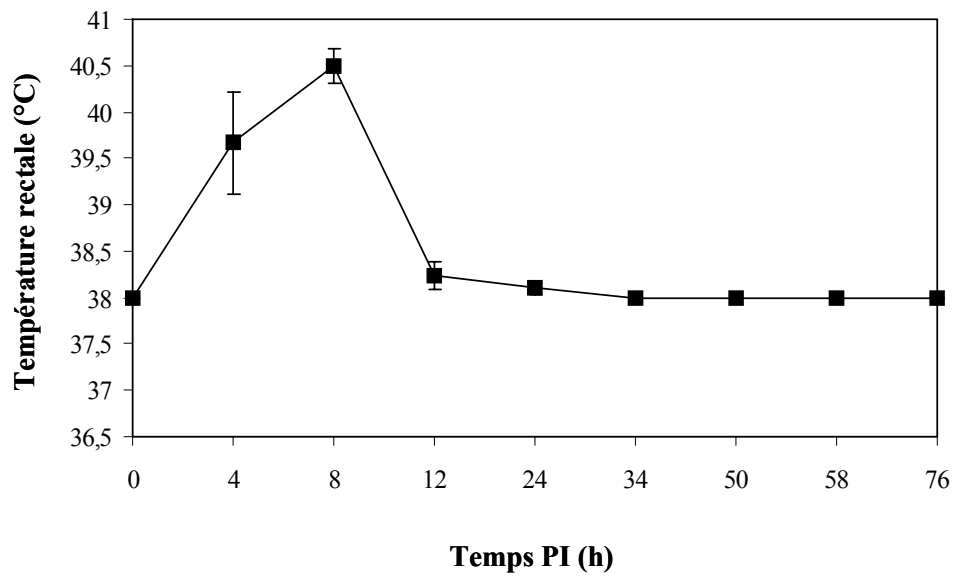


enzymatiques dans le milieu extérieur. Les cellules sont ensuite centrifugées à 1600 rpm à 20 °C pendant 20 min. Les surnageants sont récupérés et stockés à -20 °C en attendant les analyses biochimiques.

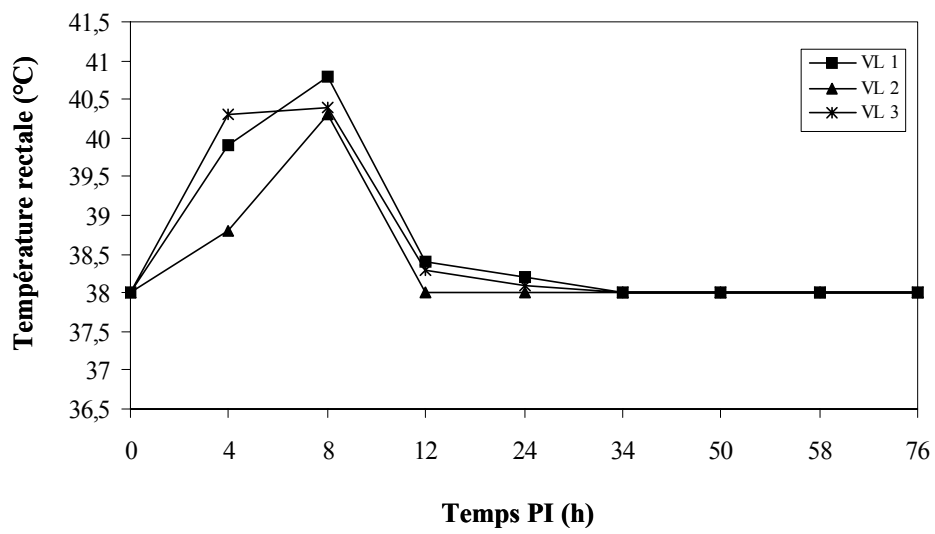
### **I. 6. Immunoblotting**

Les immunoblots ont été réalisés au Département de Sciences Alimentaires du Professeur Larsen (Danemark), après séparation des protéines par EGPA-SDS pour la cathepsine D et par électrophorèse tris-tricine pour la cathepsine B. Des anticorps primaires anti-bovine-cathepsine D (1 µg/mL) (Larsen et al., 1996) et anti-bovine-cathepsine B (5µg/mL) ont été utilisées (Magboul et al., 2001).

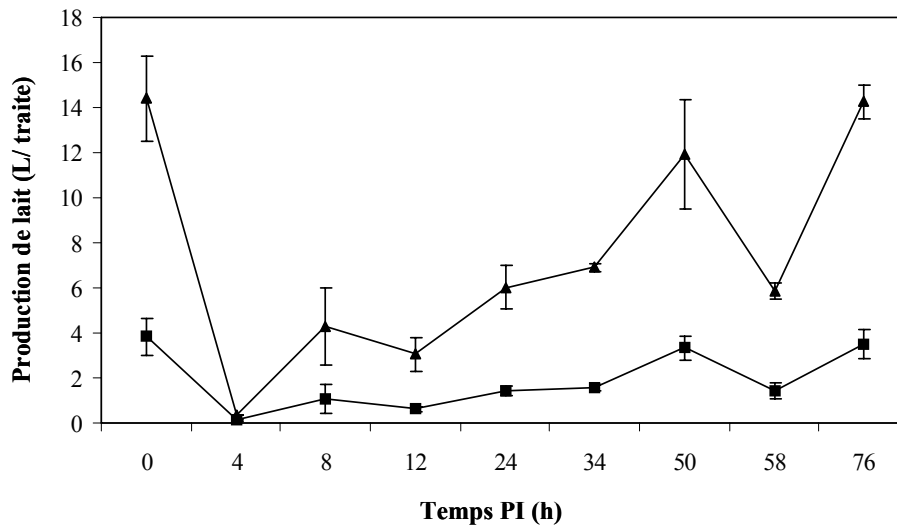
A.



B.

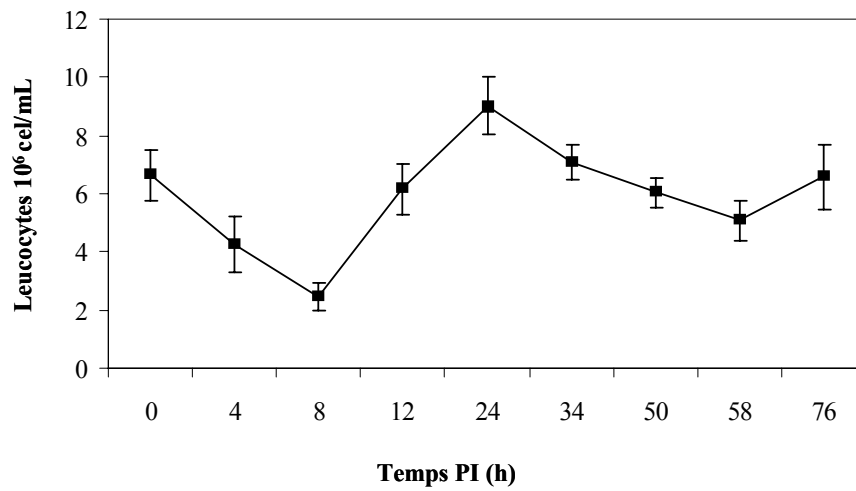


**Figure 41.** Evolution de la température rectale moyenne (A) et individuelle (B) après l'infusion intramammaire de 10 µg de LPS d'*E. coli*. PI : post-infusion, n = 3.

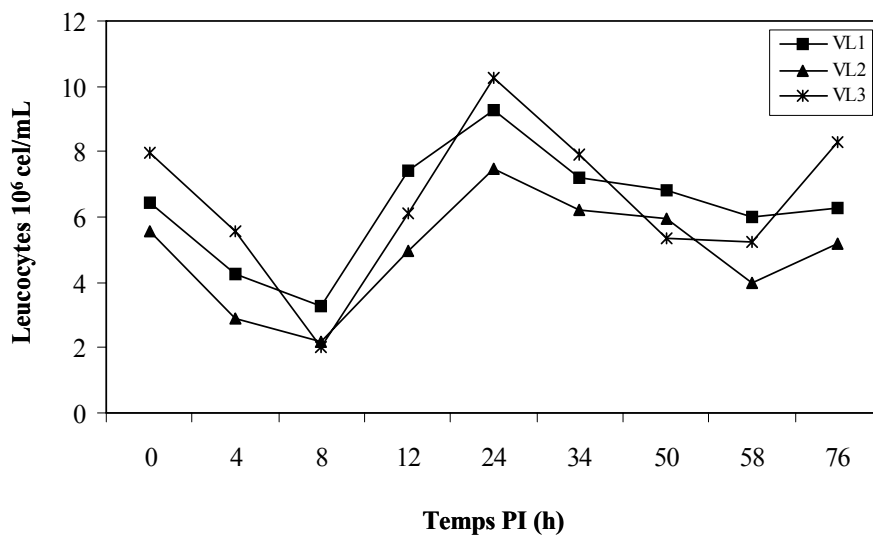


**Figure 42.** Evolution de la production de lait après l'infusion intramammaire de 10 µg de LPS d'*E. coli*. Les productions totales par traite des quatre quartiers (▲) et du quartier infusé seul (■) ont été représentées. PI : post infusion. n=3. Les barres d'erreurs non visibles sont comprises dans les symboles.

A.



B.



**Figure 43.** Evolution de la concentration en leucocytes du sang après l'infusion intramammaire de  $10 \mu\text{g}$  de LPS d'*E. coli*. Les valeurs moyenne (A) et individuelles (B) ont été représentées. Le prélèvement 0 h effectué avant inoculation est considéré comme témoin. Les barres d'erreurs non visibles sont comprises dans les symboles. PI : post infusion.



## **II. RESULTATS**

### **II. 1. Signes cliniques de l'inflammation associée à l'infusion de LPS**

Une induration de la mamelle est notée entre 1 et 4 h après l'infusion. Le lait prend une apparence séreuse et des grumeaux sont observés entre 4 et 24 h post infusion (PI). La température rectale augmente dès 4 h PI et atteint un maximum de 40,5 °C à 8 h PI, le retour à la normale étant observé à partir de 12 h PI (Figure 41).

Pour le rythme de production de lait par traite, la valeur minimale est constatée à 4 h PI, puis la production reste très basse jusqu'à 16 h PI, puis augmente pour retrouver les valeurs initiales après 50 h PI (Figure 42). La production de lait du quartier infusé connaît elle aussi une baisse maximale à 4 h PI, le retour à la normale est noté à partir de 50 h PI.

### **II. 2. Dénombrement cellulaire**

#### **II. 2. 1. Dénombrement des leucocytes sanguins**

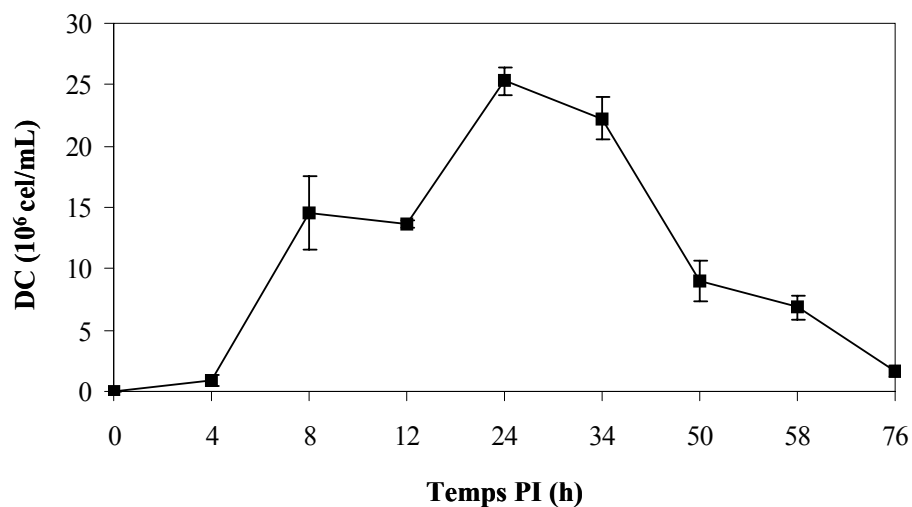
La concentration des leucocytes avant infusion est en moyenne de  $6,64 \cdot 10^6$  cel/mL, cette concentration diminue (leucopénie) dans un premier temps avec un minimum relevé à 8 h PI avec une valeur de  $2,48 \cdot 10^6$  cel/mL. Une augmentation est ensuite observée après 8 h jusqu'à un maximum à 24 h PI avec une valeur de  $9,01 \cdot 10^6$  cel/mL. Le retour à la normale est noté à partir de 34 h PI (Figure 43).

#### **II. 2. 2. Dénombrement en cellules somatiques du lait**

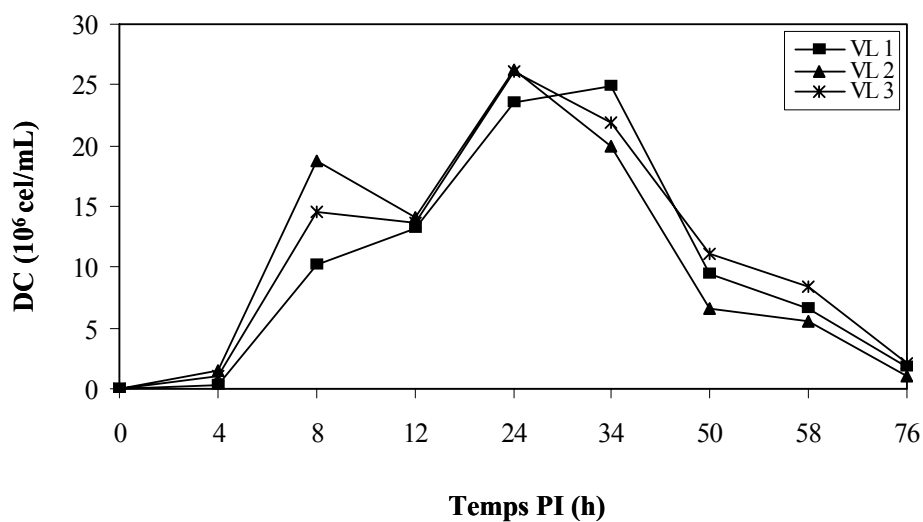
L'évolution moyenne du DC (Figure 44A) montre une valeur initiale de  $2 \cdot 10^4$  cel/mL, deux pics sont notés à 8 h et à 24 h PI avec des valeurs respectives de  $15 \cdot 10^6$  cel/mL et de  $25 \cdot 10^6$  cel/mL. Le DC reste supérieur à  $10^6$  cel/mL jusqu'à 76 h PI.

Les courbes individuelles sont très similaires et montrent un DC avant infusion compris entre  $15 \cdot 10^3$  et  $36 \cdot 10^4$  cel/mL, il augmente après 4 h avec une concentration supérieure à  $10^6$  cel/mL (Figure 44B). Au cours de la cinétique et pour toutes les vaches, un pic est noté à 8 h et un second à 24 h PI

A.

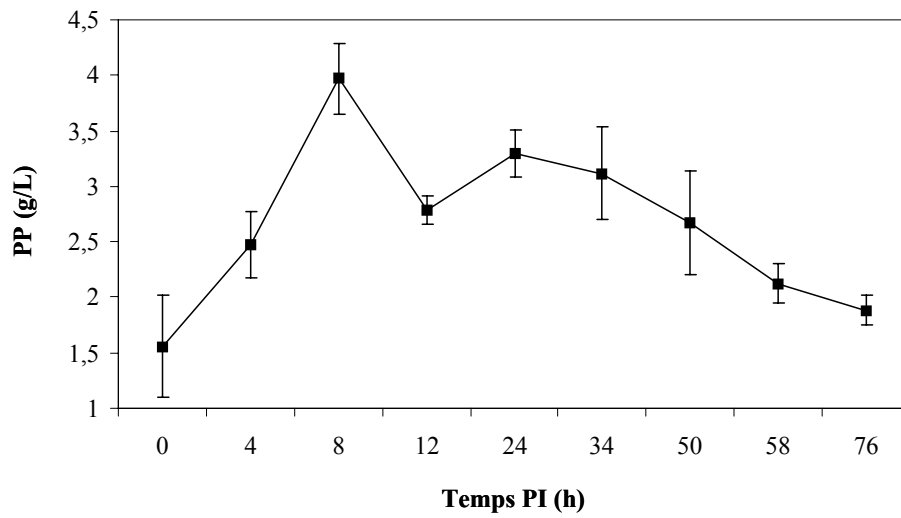


B.

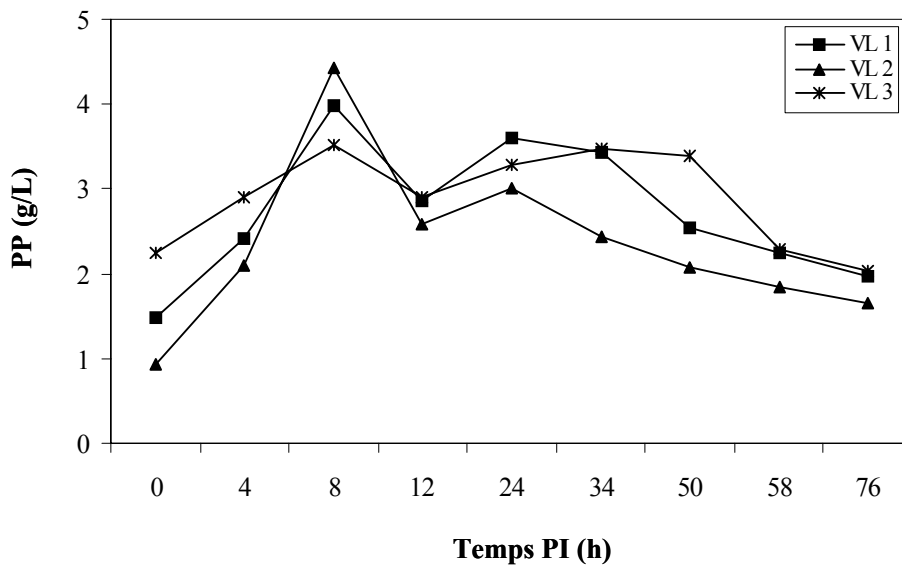


**Figure 44.** Evolution du dénombrement cellulaire (DC) du lait de quartier éprouvé après l'infusion intramammaire de 10 µg de LPS d'*E. coli*. Les valeurs moyenne (A) et individuelles (B) ont été représentées. La concentration cellulaire dans le lait a été déterminée après des dilutions préalables pour certains points, la limite de détection de l'appareil (Fossomatic) étant de 10<sup>6</sup> cel/mL. PI : post-infusion, n=3.

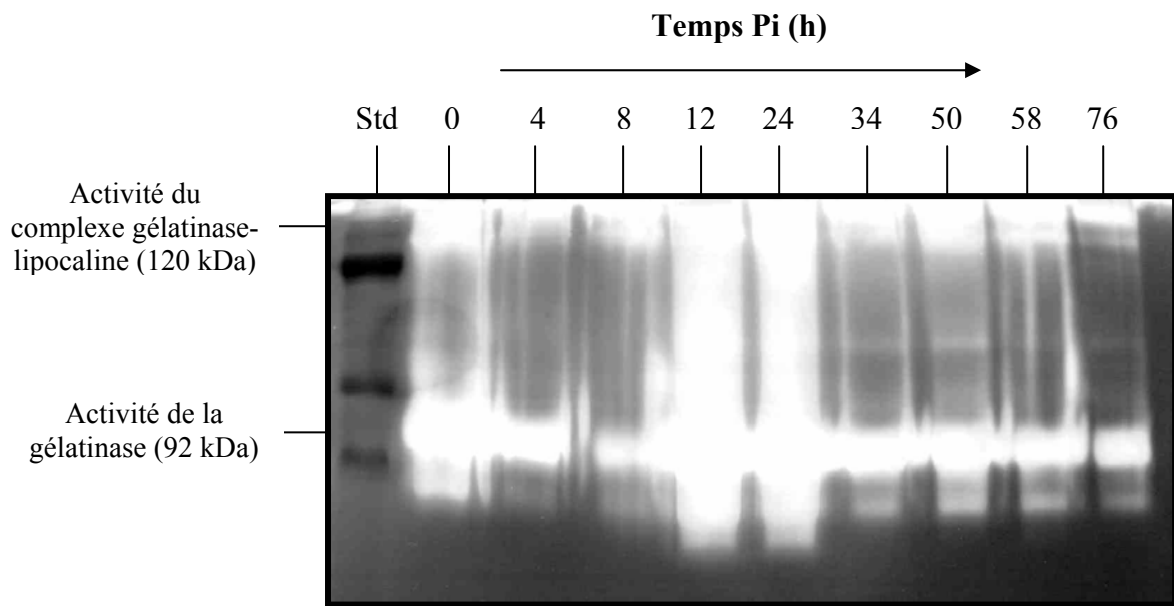
A.



B.



**Figure 45.** Evolution de la teneur en protéose-peptones (PP) du lait du quartier infusé après l'infusion intramammaire de 10  $\mu\text{g}$  de LPS d'*E. coli*. Les valeurs moyennes (A) et individuelles (B) ont été représentées. PI : post infusion.  $n = 3$ . Le prélèvement à 0 h effectué avant infusion est considéré comme témoin. Les barres d'erreurs non visibles sont comprises dans les symboles.



**Figure 46.** Cinétique de l'activité de la gélatinase des cellules somatiques du sang lysées, après l'infusion intramammaire de 10 µg de LPS d'*E. coli*. Les activités ont été visualisées en zymographie gélatine. Des quantités de  $10^6$  cel/mL ont été déposées dans le gel.

### **II. 3. La fraction protéose-peptones**

La teneur moyenne en PP avant l'infusion est de 1,5 g/L ( $\pm 0,6$ ), elle augmente dès 4 h PI pour atteindre un maximum à 8 h avec une valeur moyenne d'environ 4 g/L (figure 45A). Une baisse est notée à 12 h. Le retour à la normale est observé à 76 h PI.

Les courbes individuelles montrent un premier pic à 8 h pour toutes les vaches, un second pic est observé à 24 h pour une vache et à 34 h pour les autres (Figure 45B). Le retour à la normale est observé à 76 h PI pour l'ensemble des animaux.

### **II. 4. Activité protéolytique des PMN**

#### **II. 4. 1. Activité protéolytique des cellules somatiques du sang.**

Le profil électrophorétique des cellules somatiques prélevées du sang et lysées déterminé par zymographie gélatine, montre un changement de l'intensité des activités protéolytiques des cellules au cours du temps (Figure 46). La gélatinase à 92 kDa et la gélatinase liée à la lipocaline à 120 kDa visibles à 0 h, apparaissent de manière beaucoup plus intense à 12 h et à 24 h PI. Cette intensité diminue progressivement à partir de 34 h.

#### **II. 4. 2. Activité protéolytique des surnageants des fractions cellulaires F1 et F2.**

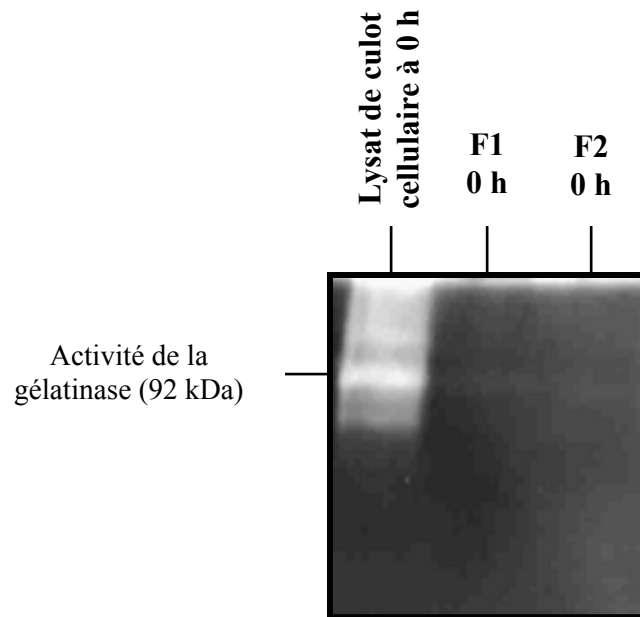
Le profil électrophorétique des surnageants cellulaires des fractions F1 et F2 des cellules somatiques séparées par gradient de Ficoll déterminé par zymographie gélatine, montre à 0 h une absence d'activité protéolytique mesurable par zymographie (Figure 47A). Après 12 h PI, une activité de la gélatinase est mesurée dans les surnageants des fractions cellulaires F1 et F2 avec une intensité plus marquée dans F1 que dans F2 (Figure 47B).

#### **II. 4. 3. Immunoblotting.**

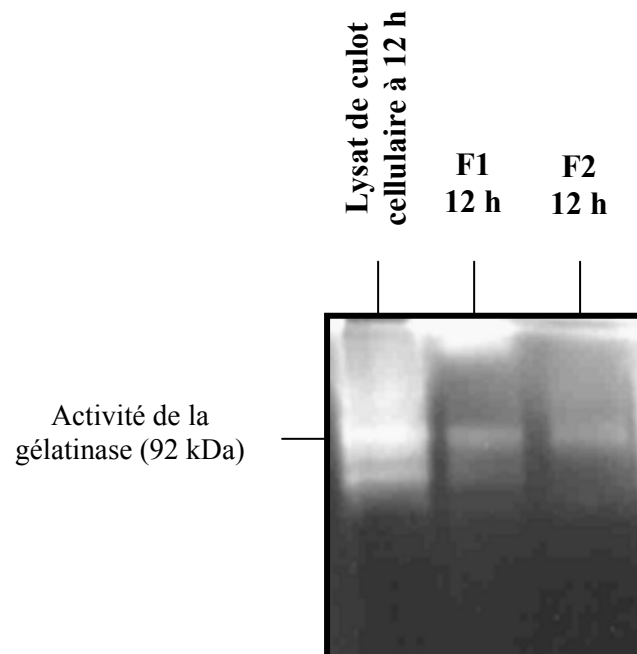
Le profil des blots issus des gels Tris-HCl révèle l'absence de procathepsine D dans le lait et le lactosérum à 0 h. Après infusion de LPS la présence de la procathepsine D (MM 45 kDa) et de la cathepsine D sous sa forme active (MM de 39, 24 et 15 kDa) dans le lactosérum n'est révélée à 12 h Pi que dans le lactosérum et pas dans le lait écrémé (Figure 48A).

Le profil des blots issus du gel Tris-tricine révèle la présence de la procathepsine B (MM 45 kDa) et de la cathepsine B (MM 25 kDa) dans le lait écrémé et dans le lactosérum à 12 h PI (Figure 48B). Ces deux éléments étaient absents à 0 h.

A.

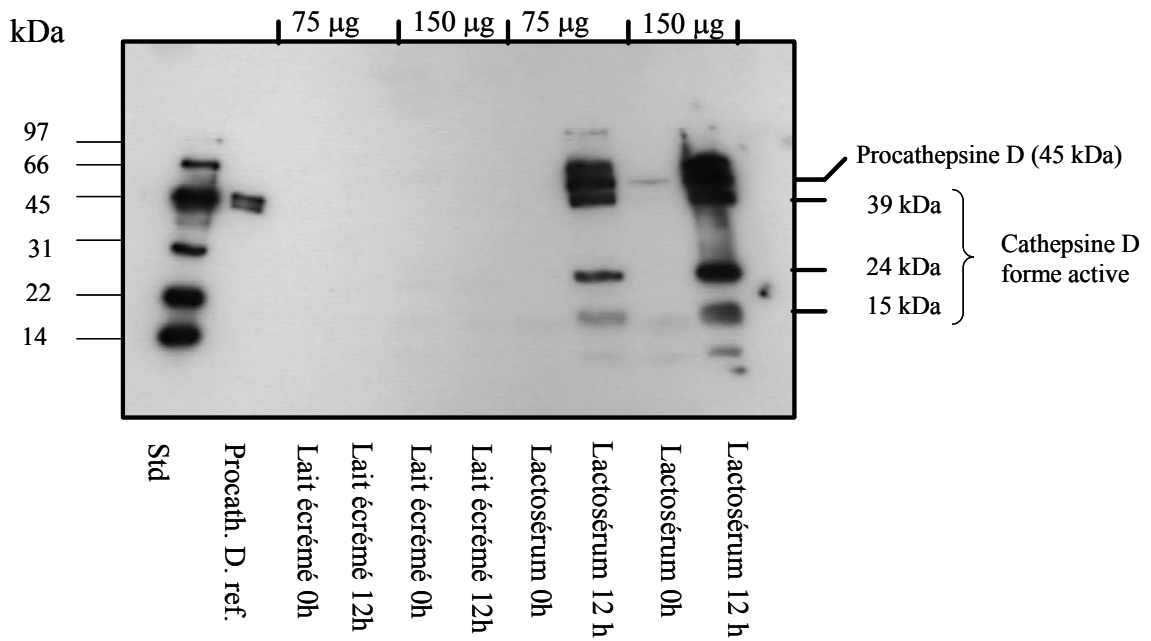


B.

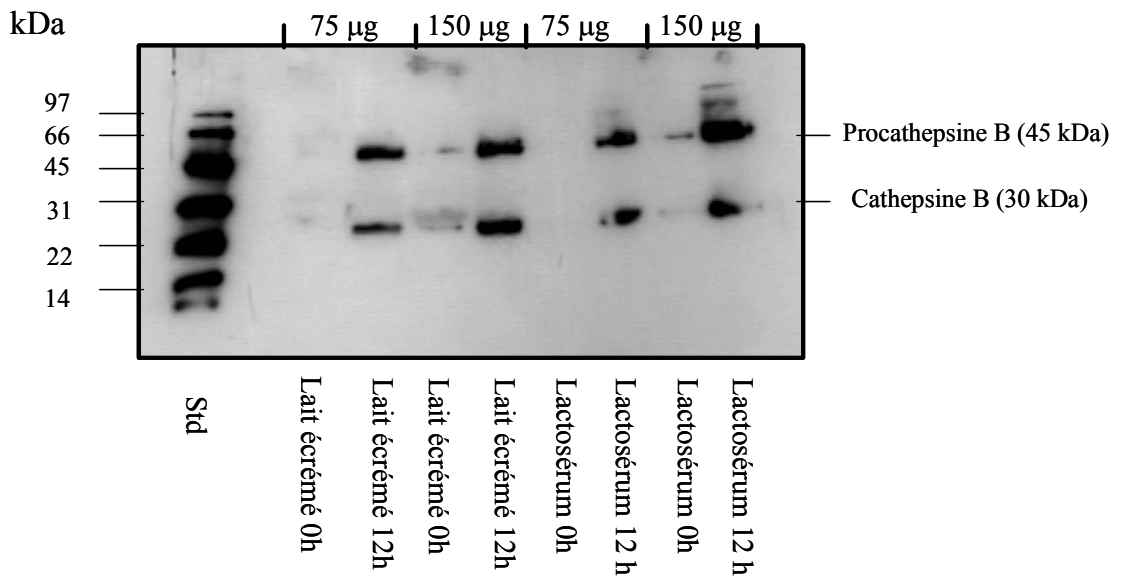


**Figure 47.** Activité de la gélatinase dans le lysat cellulaire et dans les fractions F1 et F2 prélevés du sang à T 0 (A) et à T 12 (B) après infusion intramammaire de 10  $\mu$ g de LPS d'*E. coli*. Les activités protéolytiques ont été visualisées par zymographie gélatine. Les protéines ont été révélées au bleu de Coomassie.

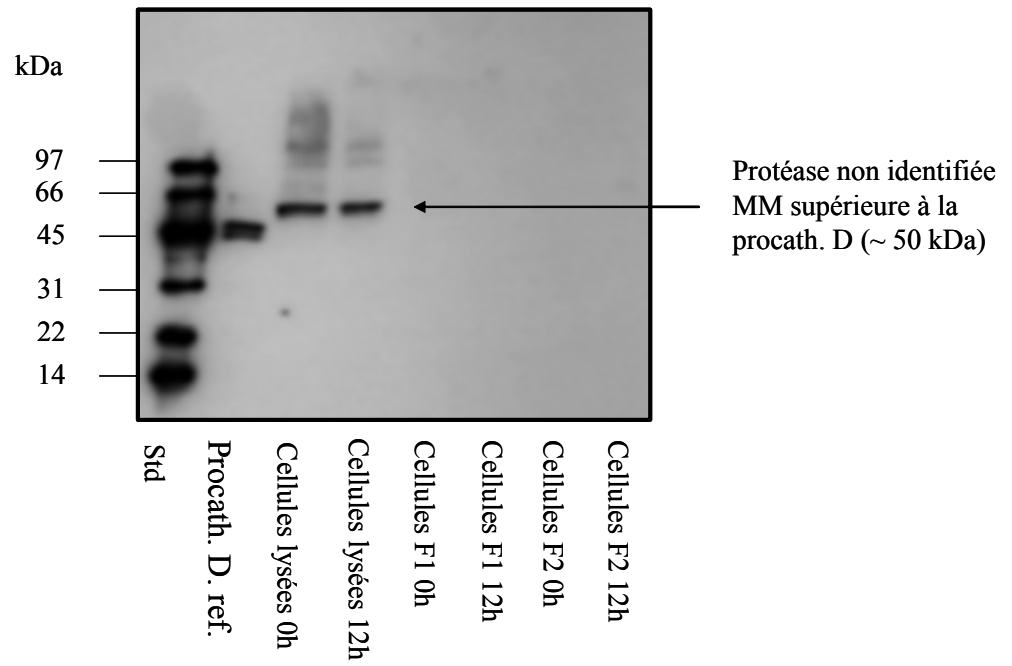
A.



B.



**Figure 48.** Suivi par immunodétection de la présence de la cathepsine D et B dans le lactosérum et lait en utilisant des anticorps spécifiques pour la cathepsine D bovine (A) et des anticorps spécifiques pour la cathepsine B bovine (B). Les échantillons de lait et de lactosérum proviennent d'un seul animal. Std : standard de masse molaire.



**Figure 49.** Suivi par immunodétection de la présence de la cathepsine D dans les cellules lysées et les surnageants des fractions F1 et F2 utilisant des anticorps spécifiques de la cathepsine D bovine. Des quantités de 300  $\mu$ g de protéines ont été déposées dans les puits. Std : standard de masse moléculaire.



Aucune activité des procathepsine D et B n'a été détectée dans les lysats cellulaires et dans les surnageants des fractions cellulaires F1 et F2 (Figure 49). Une protéase non identifiée de MM 50 kDa a été détectée dans les cellules lysées à la fois à 0 h et 12 h PI.

### **III. DISCUSSION**

#### **III. 1. Recrutement des cellules immunitaires et teneur en PP**

Les effets de l'infusion de LPS observés lors de la réaction inflammatoire (fièvre, baisse de la production de lait, augmentation du pH) sont similaires à ceux rapportés par Moussaoui et al. (2002), lors de l'infusion de LPS.

Dans le lait, le DC augmente de manière très importante puisque les concentrations initiales avant infusion sont multipliées par 1200 au cours de la cinétique. Par ailleurs lors de l'infusion intramammaire de 10 µg de LPS d'*E. coli*, d'importantes augmentations des concentrations en IL1 et IL6 dans le lait ont été rapportées (Shuster *et al.*, 1997), renforçant le recrutement des leucocytes dans le lait.

Dans le sang, la baisse de la concentration en leucocytes sanguins à 8 h est suivie d'une augmentation avec un maximum à 24 h PI, démontrant la stimulation du système immunitaire en réponse à l'infusion de LPS. Chez la vache la réponse à l'infusion se manifeste par une forte leucopénie.

L'augmentation de la teneur en PP est notée à 8 h PI avec une valeur de 3,97 g/L. Cette teneur est similaire aux valeurs rapportées par Moussaoui et al. (2002). L'origine endogène des PP a été illustrée par de nombreux travaux, ces derniers mettent en évidence l'implication du DC, et des enzymes de neutrophiles, ainsi que le rôle de la plasmine ainsi que l'interaction entre ces différents facteurs (Le Roux et al., 2003).

#### **III. 2. Activité protéolytique des PMN**

La zymographie gélatine des lysats cellulaires issus de la cinétique inflammatoire, révèle deux bandes à 120 kDa et à 92 kDa. La bande à 92 kDa correspond à la gélatinase et celle à 120 kDa correspond à la gélatinase liée à la lipocaline qui est une glycoprotéine de 25 kDa, appelée aussi NGAL (neutrophil gelatinase associated lipocalin) (Delclaux et al., 1996).



Au cours de la cinétique, à 12 h PI, avec la même quantité de cellules déposée, l'activité de la gélatinase s'intensifie pour former une traînée tout au long du puit de dépôt. L'augmentation de l'activité de la gélatinase peut s'expliquer par une augmentation de la concentration des cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-2, IL-8 et TNF- $\alpha$ ) qui favorisent la synthèse de cette protéase. Associé à cette stimulation, le clivage de certaines cytokines par la gélatinase est nécessaire à leur activation : L'IL-1 tronquée est la forme active de l'IL-1 et induit l'expression du pro-enzyme de la gélatinase par différents types cellulaires (Opdenakker et al., 2001). Ces cytokines secrétées lors de l'inflammation induite par l'endotoxine sont responsables de la dégranulation des PMN mais aussi de la rupture des lysosomes dans une moindre mesure, l'ensemble de ces phénomènes amenant une activité protéolytique plus importante (Jain, 1993 ; Owen et Campbell, 1999).

Les protéases leucocytaires sont surtout impliquées dans la phase d'initiation de la réaction inflammatoire. Elles interagissent au sein du système d'activation du complément (activateurs du plasminogène). Des sérines protéases telles que la plasmine et surtout des métalloprotéases participent à la protéolyse matricielle, en favorisant la migration des cellules au travers de la matrice extracellulaire.

La décroissance de l'activité de la gélatinase observée à partir de 34 h PI, pourrait s'expliquer par un équilibre entre les inhibiteurs et les activateurs des MMP. L'activité des MMP est contrôlée par des inhibiteurs endogènes ; ces inhibiteurs connus sous la forme des TIMP (tissue inhibitors of matrix metalloproteases) forment un complexe équimoléculaire avec les formes actives des MMP. Dans ces complexes, le domaine amino-terminal des TIMP se lie au domaine catalytique des MMP et, de ce fait, bloque l'accès à la poche contenant l'atome de zinc (Bode et al., 1999). Ces complexes sont stables et irréversibles. D'autre part, il existe une régulation négative de la synthèse de la gélatinase par des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-4, l'IL-6 et l'IL-10 (Opdenakker et al., 2001).

La zymographie gélatine des fractions F1 et F2 séparées par gradient de ficoll et activées par le PMA qui sert à stimuler les PMN pour déverser leur contenu enzymatique dans le milieu extracellulaire, révèle un profil identique des fractions F1 et F2 à 12 h PI comprenant plusieurs bandes avec des intensités d'activité différentes. Avant l'infusion, aucune bande n'est visible dans les fraction F1 et F2. L'absence d'activité à 0 h pourrait s'expliquer par une



faible concentration de PMN avant l'inflammation. En effet, à 0 h, les cellules prédominantes sont les macrophages, et c'est la stimulation de la moelle osseuse qui va induire la production de nombreux neutrophiles jeunes (Jain, 1993). Dans les deux compartiments sang et lait vont coexister les deux populations de PMN matures et immatures.

Dans fraction cellulaire F1 correspondant aux cellules matures à 12 h PI, l'intensité de l'activité enzymatique est importante et peut s'expliquer par une présence majoritaire dans cette fraction de cellules matures à bandes possédant des granules tertiaires, ces granules fusionnent d'une manière préférentielle avec la membrane plasmique libérant ainsi leur contenu dans le milieu extracellulaire. Dans la deuxième fraction, l'intensité apparaît mais elle est moins importante, les cellules contenues dans cette fraction sont constituées de PMN au stade de métamyélocytes et myélocytes qui possèdent des granulations primaires et secondaires. Ces granules fusionnent d'une manière prédominante avec la membrane de la vacuole phagocytaire (Lew et al., 1986).

Les immunoblots réalisés sur le lait écrémé et le lactosérum révèlent une activité de la cathepsine D dans le lactosérum et une activité de la cathepsine B dans le lait et le lactosérum après 12 h PI. L'activité de ces enzymes est effective après la stimulation des PMN, le rôle principal de la cathepsine D est la dégradation intra cellulaire des protéines qui a lieu dans l'environnement acide des lysosomes (Owen et Campbell, 1999). L'absence de la cathepsine D dans le lait est surprenant et pourrait être due à la présence de plusieurs bandes de caséine à la position potentielle de la cathepsine D dans le gel de migration, cette hypothèse est à vérifier. En effet, une corrélation positive entre le DC et l'activité de la cathepsine D et les protéases à cystéine a été rapportée par Somers et al. (2003). L'activité des protéases à cystéine augmente dans un lait dont la concentration cellulaire dépasse les 800 000 cel/mL. Même si la cathepsine D est principalement présente sous forme inactive (procathepsine D), la forme active est peu présente dans le lait (Larsen et Petersen, 1995).

Dans le lactosérum, la cathepsine D est présente en quantité équimolaire de deux formes actives : une chaîne simple avec une MM approximative de 39 kDa et une forme à deux chaînes avec des MM de 24 et 15 kDa pour la chaîne lourde et légère respectivement (Larsen et Petersen, 1995). L'immunoréactivité de la cathepsine B dans le lactosérum et dans le lait augmente à 12 h PI, ces observations sont déjà rapportées par les travaux de Magboul et al. (2001) sur des laits de quartiers infectés, cette protéase pourrait aussi contribuer à la dégradation des caséines du lait.



Les cathepsines peuvent potentiellement provenir de cellules épithéliales mammaires ou des cellules immunitaires présentes dans le lait (Larsen et al., 2006). Contrairement à la cathepsine D peu présente dans le lait, la forme active de la cathepsine B y est prédominante. Cette différence d'activité peut avoir comme cause la localisation de la cathepsine D qui est différente de la localisation de la cathepsine B, la première provient des lysosomes et la seconde des granules primaires des neutrophiles, ceci suggère que la régulation de la sécrétion de la procathepsine D dans le lait est différente des protéases à cystéine qui, sont présentes en partie sous forme active (Larsen et al., 2004 ; Larsen et al., 2006).

Les immunoblots réalisés sur les lysats cellulaires et sur les fractions F1 et F2 provenant de la séparation des cellules somatiques, avec des anticorps anti-cathepsine D bovine et anti-cathepsine B bovine, ne révèlent aucune présence des cathepsines. Ce résultat surprenant peut avoir comme cause la faible quantité d'échantillon déposée dans les puits. Des travaux complémentaires sont en cours pour confirmer ces résultats.





## CONCLUSION

En réponse à l'infusion intramammaire de 10 µg de LPS d'*E. coli*, une leucopénie à 8 h PI est suivie d'un afflux massif de cellules somatiques et plus particulièrement de PMN. Les activités protéolytiques cellulaires (gélatinase, cathepsine D et cathepsine B) sont plus élevées au pic de l'inflammation à 12 h PI.

Pour un nombre de cellules élevé et plus au moins constant entre 8 h et 50 h PI, les activités protéolytiques correspondantes sont variables dans le temps, ces variations peuvent être en partie dues à la maturité différentielle des PMN circulants. L'intensité de l'activité de la gélatinase est plus importante dans la fraction F1 que dans la fraction F2, la fraction F1 étant constituée par des cellules matures riches en gélatinase et la fraction F2 par des cellules plus au moins matures pauvres en gélatinase.

Des travaux complémentaires sont à envisager pour expliquer l'absence de la cathepsine D dans le lait.



*Discussion  
Générale*



## **DISCUSSION GENERALE**

La protéolyse dans le lait au cours de l'inflammation, par la multiplicité des acteurs mis en jeu leurs nombreuses interactions, par l'influence des paramètres de l'environnement et individuels, s'apparente à un système complexe. L'objectif principal de notre travail est l'étude de la protéolyse endogène (système plasmine-plasminogène, protéases leucocytaires) et exogène (bactéries) dans le lait au cours d'une inflammation de la glande mammaire. La pertinence de nos apports dans la compréhension de ce système, c'est à dire, notre capacité à expliquer de manière dynamique les mécanismes de cette protéolyse, passe par une réflexion sur les méthodes d'études mises en œuvre. Une analyse des différents modèles d'études utilisés dans ce travail semble nécessaire à la fois pour mieux appréhender leurs intérêts et leurs limites dans la construction de notre problématique.

### **APPORTS DES MODELES *IN VIVO* D'INFECTION EXPERIMENTALE A *E. COLI* ET D'INFLAMMATION EXPERIMENTALE A LPS, ET DU MODELE *IN VITRO* D'INOCULATION EXPERIMENTALE DU LAIT DANS LA COMPREHENSION DE LA PROTEOLYSE.**

La plupart des essais traitant de la dégradation de l'état sanitaire de la mamelle chez le bovin utilise principalement deux modèles : le modèle d'inflammation expérimentale à LPS et le modèle d'infection expérimentale à *E. coli*. Si pour les études centrées sur les mécanismes relatifs à la réaction inflammatoire (recrutement cellulaire, phagocytose, tests vaccinaux), ces deux modèles apparaissent adaptés (Bannerman et al., 2003 ; Paape et al., 2003), une démarche critique ou tout au moins comparative entre ces deux modèles nous semble nécessaire quand ils sont utilisés pour appréhender les mécanismes de la protéolyse/caséinolyse. En effet, le modèle d'inflammation expérimentale à LPS, très simple à mettre en œuvre, très répétable entre individus et respectant le mieux la notion de « bien-être » animal pourrait correspondre à la référence standard ; cependant en s'affranchissant de l'acteur microbien, ce modèle est dans notre raisonnement intrinsèquement discutable.

Dans ce premier temps nous comparerons ces deux modèles à la fois sur la réponse clinique, le recrutement cellulaire et le potentiel protéolytique.

**Tableau 16.** Comparaison des réponses cliniques intervenant dans le phénomène d'inflammation de la glande mammaire dans les deux modèles de mammite *in vivo*.

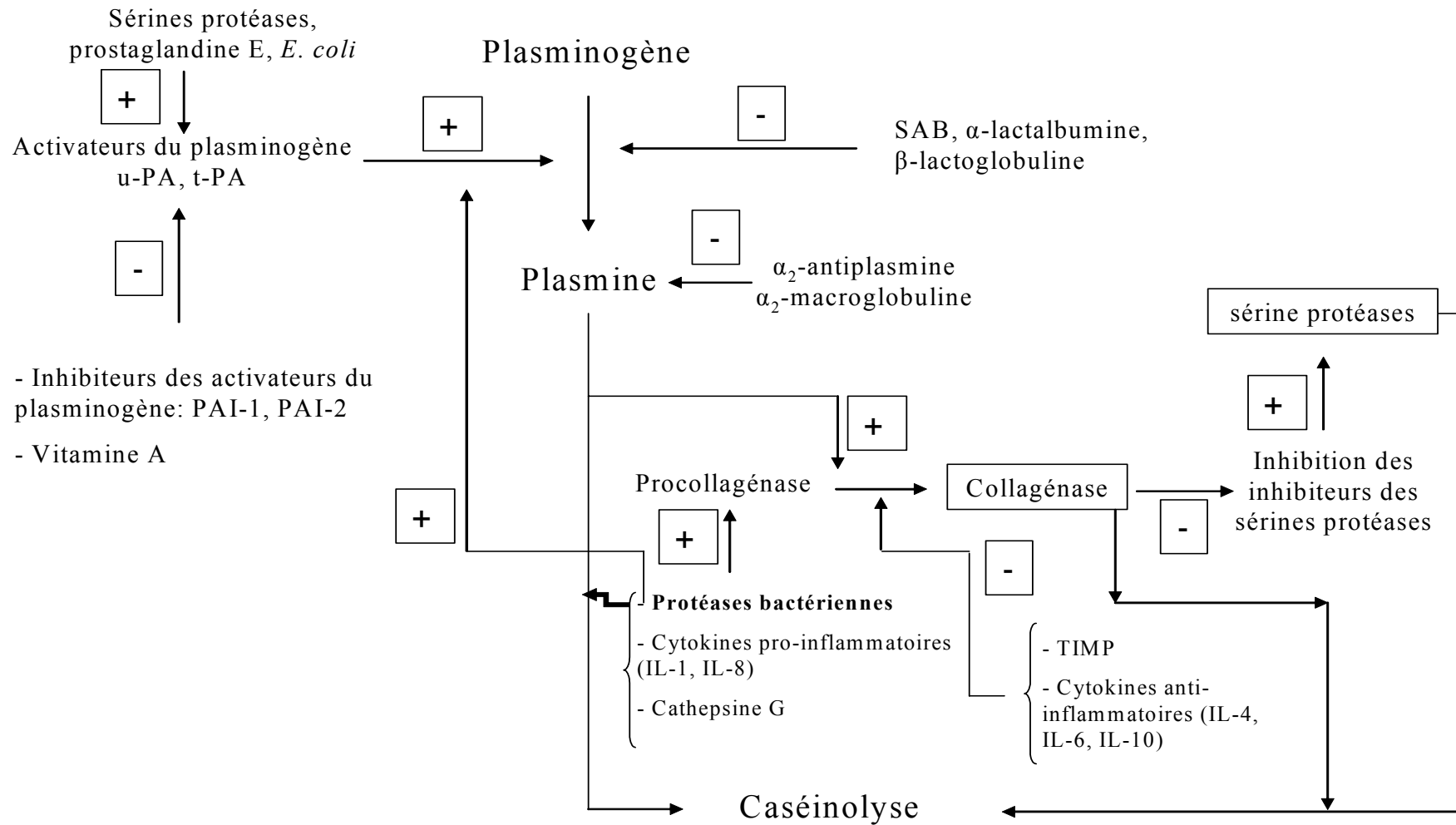
Paramètres au pic de l'inflammation	Infection expérimentale à <i>E. coli</i>	Inflammation expérimentale à LPS
Température (°C)	40,8 (Notre étude, n = 8) 41 (Vangroenweghe et al., 2004, n = 8)	40,5 (Notre étude, n = 3) 41,5 (Bannerman et al., 2003, n = 5) 40,6 (Moussaoui et al., 2002, n = 6)
SCC (cellules/mL)	$10^6 - 10^7$ (Notre étude, n = 8) $10^{6,5}$ (Vangroenweghe et al., 2004, n = 8)	$2,5 \cdot 10^7$ (Notre étude, n = 3) $8 \cdot 10^7$ (Bannerman et al., 2003, n = 5) $1,6 \cdot 10^7$ (Moussaoui et al., 2002, n = 6)
Dénombrement bactérien (ufc/mL)	$10^{4,3}$ (Notre étude, n = 8) $10^{3,2}$ (Vangroenweghe et al., 2004, n = 8)	-

**1. Réponse clinique, stimulation du système immunitaire et recrutement cellulaire lors de l'infection intramammaire à *E. coli* ou après infusion de LPS**

En terme clinique, le pic de température rectale en réponse à l'infection à *E. coli* est observé à 9h PI contre 4h PI après infusion de LPS. L'intensité de la fièvre est similaire dans les deux modèles (en moyenne 40,5°C pour le LPS contre 40,8°C pour *E. coli*) (Tableau 16). Dans le modèle *in vivo* à *E. coli*, les quantités de LPS libérées sont en cinétique beaucoup plus faibles en comparaison à une infusion directe de LPS dans la mamelle, cet écart induisant un décalage dans le temps de la réponse inflammatoire. De plus, cette réponse décalée pourrait également avoir pour origine l'effet bactériostatique causé par l'effet inhibiteur de certaines protéines du lait telles que la lactoferrine, les lysozymes qui limitent partiellement la multiplication bactérienne dans la mamelle (Lahov & Regelson, 1996 ; Smithers et al., 1996). Par contre dans les deux modèles, le LPS va s'associer à la LBP (LPS binding protein) qui possède une forte affinité avec le CD14 (cluster of differentiation 14) qui est une lectine présente à la surface membranaire des PMN bovins, monocytes et macrophages (Tobias et al., 1994). Cette fixation va entraîner une production de cytokines qui sont à l'origine d'un chimiotactisme permettant le recrutement des neutrophiles (Dentener et al., 1994 ; Revillard, 1998). La moelle osseuse ainsi stimulée produit de nombreux leucocytes et en particulier des PMN qui, acheminés dans le sang jusqu'au site de l'inflammation par des facteurs chimioattractants, se retrouvent dans le lait.

Il apparaît donc que si en terme de cinétique inflammatoire, des différences significatives sont observées entre les deux modèles, la cascade « chimiotactique » à l'origine du recrutement cellulaire est très similaire car dépendant en grande partie du LPS, présent dans les deux modèles.

Dans le modèle *in vivo* à *E. coli*, le dénombrement cellulaire augmente pour atteindre un plateau entre 6 h et 216 h PI avec des valeurs maxima individuelles variant entre  $10^6$  et  $10^7$  cel/mL. Le modèle à LPS induit une augmentation qui paraît plus importante avec des valeurs individuelles maxima qui dépassent  $10^7$  cel/mL. Cette différence dans le recrutement cellulaire pourrait traduire une réponse plus intense et plus brutale dans le modèle LPS que dans le modèle à *E. coli*. En effet l'importante concentration de l'endotoxine, dans le modèle LPS pourrait induire une augmentation accrue de la margination des cellules de la circulation sanguine vers le lait, via la paroi endothéliale et provoquerait une lésion plus importante des tissus sécréteurs, favorisant ainsi la diffusion passive des composés et l'afflux de composés sériques vers le lait.



**Figure 50.** Proposition de schéma des différents intervenants dans le mécanisme de la régulation de la plasmine pendant l'inflammation.



Cette différence de concentration cellulaire mesurée au pic de l'inflammation dans les deux modèles *in vivo* via l'action des protéases cellulaires et de la plasmine pourrait avoir une influence quantitative sur la protéolyse des caséines dans lait.

## **2. Activités Protéolytiques**

### **2.1. Activité de la plasmine**

Dans le modèle *in vivo* à *E. coli*, l'activité de la plasmine atteint au pic inflammatoire environ 40 ( $\mu\text{mol } p\text{-nitroanilide/h/L}$ ) contre plus de 75 ( $\mu\text{mol } p\text{-nitroanilide/h/L}$ ) pour le modèle à LPS. Cette enzyme, acteur majeur dans la caséinolyse dérive d'un précurseur inactif circulant, le plasminogène activé par des activateurs spécifiques appartenant à la famille des sérines protéases (t-PA et u-PA). Bien qu'il existe des inhibiteurs circulants de la plasmine telles que l' $\alpha_2$ -antiplasmine, le principal facteur limitant la quantité de plasmine produite est la quantité de t-PA et u-PA présents sous forme active (Matilla-Sandholm, 1985 ; Munro et al., 1984). L'augmentation au cours de l'inflammation des activateurs du plasminogène de type u-PA et t-PA est bien renseignée (Danø et al., 1985). L'activité de ces deux activateurs est étroitement contrôlée par des inhibiteurs spécifiques tels que le PAI-1 (inhibiteur de type 1 de l'activateur tissulaire du plasminogène) (Figure 50) (Rerolle et al., 2001). La régulation de ces inhibiteurs est mal connue lors de l'inflammation de la glande mammaire, et à notre connaissance, peu d'information sont disponibles pour comparer les deux types de modèles *in vivo*.

Dans les deux modèles *in vivo*, l'afflux des composés sériques vers le lait entraîne des effets d'inhibition ou d'activation sur l'activité de la plasmine. La SAB, dont la concentration est fortement augmentée en cas de mammite, la  $\beta$ -lactoglobuline et l' $\alpha$ -lactalbumine ont un effet inhibiteur sur les activités de la plasmine et du plasminogène (Politis et al., 1993). La vitamine A (acide rétinoïque) dont la concentration augmente lors des mammites, a un effet suppresseur sur l'activité des activateurs du plasminogène à la fois de type u-PA et t-PA (tableau 17) (Munro et al., 1984 ; Danø et al., 1985). A l'opposé, la prostaglandine  $E_2$  possède un effet stimulant sur u-PA et t-PA, et l'augmentation de sa concentration a été mise en évidence lors d'une inflammation induite par LPS (Danø et al., 1985 ; Yamagata et al., 2001). Enfin les PMN expriment aussi différentes protéases en fonction de leur stade de maturité, ces protéases pouvant intervenir dans le clivage du plasminogène en plasmine. De plus ces neutrophiles possèdent un potentiel en activateurs du plasminogène du type u-PA et de façon moins importante de type t-PA (Moir et al., 2001).

**Tableau 17.** Variation pendant les mammites des concentrations des composants avec un effet activateur ou inhibiteur sur l'activité plasmine.

Composants	Effet	Variation dans le lait à haut SCC	
		quantification	Références
IGF1	Activation u-PA	+ 82 à 150% (lait de quartier, 500 µg de LPS)	Bruckmaier et al., 1993
Sérines protéases	Activation u-PA et t-PA	+570% pour plasmine (lait de quartier, 10 µg de LPS) + 19% pour plasmine (lait de tank, mammite subclinique) + 542% pour cathepsine G (PMN de lait de quartier, 10 µg de LPS) + 164% pour l'élastase (PMN de lait de quartier, 10 µg de LPS)	Moussaoui et al., 2002 Urech et al., 1999 Prin-Mathieu et al., 2002 Prin-Mathieu et al., 2002
PGE <sub>2</sub>	Activation u-PA et t-PA	NQ	Yagamata et al., 2001
Vitamine A	Inhibition u-PA et t-PA	NQ	Munro et al., 1984
Glucocorticoïde	Inhibition u-PA et t-PA	+ 108% (lait de quartier, 500 µg de LPS)	Fox et al., 1981
BSA	Inhibition plasmine et plasminigène	+1427% (lait de quartier, 500 µg de LPS)	
α <sub>1</sub> -AT	Inhibition u-PA et t-PA	+2500 à 5700% (lait de quartier, 10 µg de LPS)	Raulo et al., 2002
α <sub>1</sub> -Mg	Inhibition u-PA et t-PA	NQ	Munro et al., 1984
Staphylokinase	Activation u-PA et t-PA	NQ	Lähteenmäki et al., 2001
streptokinase	Activation u-PA et t-PA	NQ	Lähteenmäki et al., 2001
PAI 1	Inhibition u-PA et t-PA	NQ	Rijken, 1995

α<sub>1</sub>-AT = α<sub>1</sub>-antitrypsine,  
α<sub>1</sub>-Mg = α<sub>1</sub>-macroglobuline  
NQ = non quantifié  
PGE<sub>2</sub> = prostaglandine E<sub>2</sub>  
PAI = plasmine inhibiteur

En plus de ces régulateurs endogènes, il a été montré qu'*Escherichia coli* présente à sa surface des récepteurs de plasmine et de plasminogène qui augmentent l'activation de la plasmine en exprimant les activateurs du plasminogène (Lähteenmäki et al., 2001). De plus, cette bactérie active indirectement la plasmine par contact avec les cellules épithéliales, celles-ci sécrétant alors des cytokines (IL-1) qui vont stimuler la production des t-PA par les PMN. (Lähteenmäki et al., 2001).

L'ensemble de ces éléments montre que pour ce qui est de l'activité de la plasmine et de la régulation du système plasmine-plasminogène, les deux modèles *in vivo* semblent différer considérablement, l'acteur bactérien en modifiant la cinétique inflammatoire et en intervenant directement sur le système plasmine-plasminogène modifie et interagit sur la régulation de ce système protéolytique.

En plus de ces différences mesurées *in vivo*, l'impact de l'acteur bactérien sur la régulation du système plasmine-plasminogène est confirmé dans le modèle d'inoculation *in vitro* d'*E. coli* dans le lait cru où l'activité de la plasmine diminue après les 12 premières heures d'incubation, cette baisse pouvant être très probablement due à la production d'inhibiteurs de protéases à sérine par *E. coli* pendant la phase stationnaire de croissance (Gugi et al., 1991).

## **2. 2. Activité des protéases des cellules somatiques**

Si des différences très significatives ont pu être montrées dans l'intensité, la cinétique de la réponse inflammatoire et dans la régulation du système plasmine-plasminogène, les mécanismes fondamentaux du recrutement cellulaire et des types cellulaires identifiés dans le lait ne semblent pas avoir été profondément modifiés entre les deux modèles. Une leucopénie significative est rencontrée dans les deux modèles (décalée dans le temps du fait d'un déclenchement plus tardif de l'inflammation dans le modèle *E. coli*) induisant une stimulation et un recrutement de PMN. Ces PMN représentent alors au pic inflammatoire plus de 90% des cellules somatiques du lait dans les deux modèles *in vivo* (Paape et al., 1991). Au cours de la migration des cellules somatiques sur le site de l'infection, les PMN libèrent leur contenu enzymatique : élastase, cathepsine (B, D et G) et métalloprotéases (MMPs), qui sont capables de dégrader la matrice extracellulaire qui sépare le compartiment lait du compartiment sanguin (Owen et Campbell., 1999). Dans les deux modèles *in vivo* les PMN recrutés présentent des maturités différentes au cours de la cinétique inflammatoire suite à la leucopénie et à la stimulation de la moelle osseuse.

**Tableau 18.** Comparaison des valeurs d'IL-8, SAB et de LBP lié à l'accroissement de la perméabilité de la barrière épithéliale au cours de mammites expérimentales à *E. coli* et à LPS.

Paramètres	<i>E. coli</i> (Bannerman et al., 2003, n = 5)	LPS (Vangroenweghe et al., 2004 a, 2004 b, n = 8)
IL-8 (pg/mL)	200	400
SAB (mg/mL)	2	3,2
LBP (pg/mL)		
Dans le lait	80	32
Dans le plasma	70	130

IL-8: interleukine-8

SAB: Sérum albumine bovine

LBP: LPS binding protéine

Cette modification dans la maturité des PMN influencerait sur l'expression des protéases en fonction de leur localisation dans les différents granules (Faurischou et Borregaard, 2003). Les mesures d'activités protéolytiques intracellulaires mesurées par cytométrie de flux dans les deux modèles *in vivo*, sont difficilement comparables, de par une cinétique et une intensité d'expression différentes. Cependant, au cours de l'inflammation les activités collagénase et cathepsine des PMN du sang augmentent dans les deux modèles et l'activité élastase augmente dans le lait pour les deux modèles. Les granulations primaires ou azurophiles (peroxydase positive) constituent le tiers des granulations d'un neutrophile, et expriment des sérines protéases (élastase et cathepsine G). Les granulations secondaires ou spécifiques (peroxydase négative) particulièrement riches en gélatinase, sont exprimées par les PMN à partir de stades tardifs notamment par les métamyélocytes et les cellules à bandes (Owen et Campbell, 1999). Sous l'effet des différents stimuli tels que les cytokines, survient une mobilisation des granulations avec déversement de certains composants dans le milieu extracellulaire ou dans les phagosomes (Bank et Ansorge, 2001). Cette dégranulation permet une décompartimentalisation rapide des molécules stockées dans les granulations des neutrophiles et leur permet d'intervenir dans différents sites de la cellule (Gougerot-Pocidallo, 2002). Dans l'ordre, les granulations les plus facilement mobilisables sont les vésicules sécrétoires puis les spécifiques et enfin les azurophiles.

Des mesures d'IL-8 ayant été réalisées par Vangroenweghe et al. (2004) sur du lait provenant d'une infection expérimentale à *E. coli*, montrent une augmentation parallèle des IL-8 et du dénombrement cellulaire après 12 h de cinétique. Les mêmes mesures ont été effectuées par Bannerman et al. (2003) sur du lait provenant d'inflammation expérimentale à LPS avec une concentration en IL-8 deux fois plus importante dans le modèle LPS après 4 h de cinétique inflammatoire (tableau 18).

L'interleukine-8 est considérée comme jouant un rôle important dans le recrutement des PMN dans les quartiers infectés (Bagniolini et Clark-Lewis, 1992 ; Barber et Yang, 1998). Les PMN sont soumis à la régulation des cytokines pro-inflammatoires, qui vont promouvoir les activités des protéases cellulaires au niveau transcriptionnel : tel est le cas de l'IL-1 et de l'IL-8 pour la gélatinase (Opdenakker et al., 2001) et de l'IL-6, de l'IL-2 et de TNF- $\alpha$  pour les protéases à sérine (élastase, cathepsine G) (Bank et Ansorge, 2001). D'autre part, pour limiter la réaction inflammatoire, les cytokines anti-inflammatoires répriment l'expression de ces mêmes protéases : l'IL-4, l'IL-6 et l'IL-10 pour la gélatinase, le TNF- $\alpha$  et l'IL-8 pour les protéases à sérine (Opdenakker et al., 2001 ; Bank et Ansorge, 2001).

**Tableau 19.** Comparaison des activités protéolytiques cellulaires au cours de modèles de mammites expérimentales *in vivo* à *E. coli* et à LPS et du modèle *in vitro* d'inoculation expérimentale de lait.

Paramètres	<i>E. coli (in vivo)</i>	LPS ( <i>in vivo</i> )	<i>E. coli (in vitro)</i>
Activité protéolytique intracellulaire des PMN par cytométrie de flux:			ND
PMN sang :			
Cathepsines (ratio)	18 (Notre étude, n = 4)	25 (Prin-Mathieu et al., 2002, n = 6)	
Collagénase (ratio)	17 (Notre étude, n = 4)	8 (Prin-Mathieu et al., 2002, n = 6)	
Elastase (ratio)	2,8 (Notre étude, n = 4)	85 (Prin-Mathieu et al., 2002, n = 6)	
PMN lait			
Cathepsines (ratio)	4,2 (Notre étude, n = 4)	8 (Prin-Mathieu et al., 2002, n = 6)	
Collagénase (ratio)	6,5 (Notre étude, n = 4)	8,1 (Prin-Mathieu et al., 2002, n = 6)	
Elastase (ratio)	4,9 (Notre étude, n = 4)	3 (Prin-Mathieu et al., 2002, n = 6)	
Activité de la collagénase par zymographie :			
Dans le lait	présence (Notre étude, n = 8)	présence (Notre étude, n = 3)	Présence (Notre étude)
Dans les PMN	ND	présence (Notre étude, n = 3)	ND
Dans les bactéries	ND	-	Présence

Ration : intensité de fluorescence de l'échantillon par rapport au blanc (sans substrat).

ND : non déterminé

La mesure de la gélatinase dans le lait par les techniques de zymographie gélatine a été réalisée à la fois dans les deux modèles *in vivo* et dans le modèle *in vitro* (tableau 19). Ces zymographies révèlent une bande de dégradation à partir de 6 h PI et 8 h PI respectivement pour les modèles *in vivo* *E. coli* et LPS. Une bande de lyse de même poids moléculaire est observée dans le modèle *in vitro* d'inoculation du lait par *E. coli*. Ces résultats ne nous permettent pas de différencier dans le modèle *in vivo* à *E. coli* l'origine de l'activité gélatinase. Les modèles *in vivo* à LPS et *in vitro* d'inoculation du lait par *E. coli* trouvent ici tout leur sens. Ils montrent que l'activité gélatinase a pour origine à la fois les bactéries mais aussi les PMN. En effet, la mesure de l'activité de la gélatinase dans le modèle *in vivo* LPS sur des PMN isolés du sang montre bien cette même bande de lyse qui est présente tout au long de la cinétique inflammatoire mais qui s'intensifie au pic de l'inflammation. Ce résultat nous permet de suggérer que l'activité de la gélatinase dans le lait issu du modèle *in vivo* à *E. coli* proviendrait bien de l'action conjuguée des PMN, des bactéries mais aussi des gélatinases qui peuvent diffuser à partir du système sanguin via la barrière épithéliale endommagée.

Après analyse des activités protéolytiques des deux modèles *in vivo*, il apparaît que les cellules somatiques ne diffèrent pas considérablement du point de vue maturité et équipement enzymatique (Tableau 19). Cependant les systèmes de régulation dans ces deux modèles *in vivo*, les intensités d'expression enzymatique et la cinétique sont différentes. En effet, la présence bactérienne dans le système d'infection *in vivo* est importante et aurait un effet stimulant sur l'activité de la plasmine et de ses activateurs (Zavizion et al., 1996 ; 1997). De plus, les bactéries interagiraient avec l'activité protéolytique des PMN, la stimulation du système immunitaire induisant la synthèse de plusieurs protéases comme les sérines protéases et les métalloprotéases (Jain, 1993 ; Owen et Campbell, 1999).

### 3. La fraction PP

La fraction protéose-peptone peut-être considérée *in vivo* comme un indicateur « intégratif » qualitatif et quantitatif de la protéolyse/caséinolyse dans le lait (Le Roux et al., 1995 ; Moussaoui et al., 2002, 2003). En effet, la plupart des protéases retrouvées dans le lait, qu'elles soient endogènes ou exogènes, sont caséinolytiques et génèrent des peptides qui peuvent être retrouvés dans la FPP de par ses caractéristiques d'extraction (surnageant acide de thermocoagulation). Dans les modèles *in vivo*, l'augmentation de la teneur en PP est beaucoup plus marquée dans le modèle à *E. coli* (6,52 g/L de moyenne avec des valeurs maxima individuelles supérieures à 10 g/L) que dans le modèle LPS (4 g/L de moyenne avec





des valeurs maxima individuelles inférieures à 5 g/L). Le modèle *in vitro* à inoculation du lait par *E. coli* a permis de mettre en évidence la limite de la fraction PP utilisée comme indicateur de protéolyse quantitatif quand des variations de pH de lait sont enregistrées.

Les variations qualitatives de la fraction PP ont été mesurées tant sur les deux modèles *in vivo* que sur le modèle *in vitro* d'inoculation du lait cru avec *E. coli*. Le modèle *in vivo* *E. coli* montre cinq bandes électrophorétiques dont deux sont retrouvées dans le modèle LPS.

L'origine cellulaire de la dégradation des caséines a été illustrée par de nombreux auteurs, qui montrent que dans le modèle à LPS l'augmentation du DC et de l'activité des enzymes leucocytaires jouent un rôle clé dans la caséinolyse, avec une formation de peptides spécifiques issus des CN (Moussaoui et al., 2003). Ces peptides dénommés P1 et P2 sont générés par la dégradation des CN par les protéases leucocytaires, notamment P1 par l'élastase (Moussaoui et al., 2003). La dégradation des CN par les protéases leucocytaires dans le compartiment extracellulaire lors de la dégranulation a été rapportée par Owen et Campbell, (1999). Paape et Guidry, (1977) rapportent aussi la présence de fragments de CN dans les compartiments intracellulaires des PMN. L'activité des protéases leucocytaires neutres est effective par dégranulation, alors que pour les protéases acides, une hypothèse pour expliquer leurs mécanismes résiderait dans l'action des protéases lysosomales sur les fragments de CN, suivie par un déversement du contenu des phagosomes dans le lait (Kelly et al., 2006).

Les peptides identifiés dans le modèle *in vivo* à *E. coli* et non retrouvés dans le modèle LPS pourraient avoir pour origine une dégradation des CN par les *E. coli*. En effet, *E. coli* contient différentes protéases qui peuvent être impliquées. Selon Katayama et al. (1988), cette bactérie possède une protéase caséinolytique ClpAP appelée aussi Ti, composée de deux sous unités ClpA et ClpP qui possèdent une activité protéolytique avec une sérine protéase (Woo & al., 1989). De plus, *E. coli* possède de nombreuses protéases à sérine et des métalloprotéases, dont la majorité est susceptible de dégrader les CN (Rozkov, 2001). Des études sont en cours au laboratoire sur ces aspects.

L'étude de la dégradation des CN par un lysat bactérien d'*E. coli*, donne l'ordre préférentiel de dégradation suivant :  $CN-\kappa \geq -\beta > -\alpha_s$  durant les deux premières heures d'incubation, ces résultats étant en adéquation avec les travaux antérieurs de Grieve et Kitchen (1985), avec des bactéries psychrotrophes (*Serratia marcescens*). Cet ordre classique évolue progressivement et à la fin de la cinétique d'incubation l'ordre est le suivant :  $CN-\alpha_s = -\beta > -\kappa$ .



A la lumière des différences présentées entre les deux modèles *in vivo*, il est très difficile d'appréhender les différences de concentration en protéose-peptone au pic de l'inflammation et l'apparition de peptides spécifiques pour chacun des modèles. Ainsi, le modèle LPS qui induit un recrutement cellulaire plus important et une activité plasminique plus élevée présente une concentration en PP beaucoup plus faible. Le modèle *in vivo* à *E. coli* présente une teneur plus élevée en PP alors que le dénombrement cellulaire et l'activité plasminique sont moins importants. Pour démontrer la complexité du mécanisme protéolytique, il convient aussi de rapporter qu'*in vitro* le potentiel protéolytique d'*E. coli* est particulièrement faible (travaux en cours).

#### **4. La séquentialité de la caséinolyse**

Aborder la séquentialité a pour objet de proposer des hypothèses quant à la succession des événements et donc les relations temporelles entre les principaux acteurs (système plasmine-plasminogène, PMN et bactéries) impliqués dans la protéolyse. Le modèle *in vivo* à *E. coli* pourrait correspondre de fait à la référence car il fait intervenir l'ensemble des acteurs. La séquentialité observée dans le modèle LPS a été décrite récemment dans les travaux de Moussaoui et al. (2003) et peut se résumer ainsi : l'activité de la plasmine augmente très rapidement après infusion du LPS (4 h PI). En parallèle mais avec un léger différé (4-8 h PI) le dénombrement cellulaire augmente lui aussi très significativement. Après 12 h PI, l'activité de la plasmine revient à son niveau initial alors que le DC reste très élevé. A partir de ces différentes évolutions, il a été postulé que les variations de la fraction protéose-peptones dans le modèle LPS ont principalement deux origines qui s'enchaînent séquentiellement. Majoritairement plasminique au début de la cinétique, la protéolyse voit la plasmine et les cellules somatiques contribuer à l'augmentation de la teneur en PP en milieu de réponse inflammatoire. En fin de cinétique, ce sont les actions des protéases des cellules qui semblent être majoritaires. Dans ce modèle, la relation entre pic inflammatoire et intensité maximum de la protéolyse semble assez forte et liée avec une activité plasminique et un dénombrement cellulaire maximum. Cette relation n'est pas retrouvée de manière évidente dans le modèle *in vivo* à *E. coli*.

Dans ce modèle, la séquentialité est beaucoup plus difficile à appréhender car il apparaît que les cellules et les bactéries sont impliquées tout au long de la cinétique inflammatoire, et que l'activité de la plasmine n'aurait pas un rôle majeur au moment où la protéolyse est à son maximum. En effet, pour l'ensemble des animaux utilisés dans le modèle *in vivo* à *E. coli*, le pic d'activité plasminique est situé entre 12-24 h PI, alors que le maximum de protéolyse



mesuré par la concentration en protéose-peptones se situe pour ces mêmes animaux entre 24-33 h PI ; par ailleurs, dans cet intervalle les dénombrements cellulaire et bactérien restent très élevés.

Si l'approche analytique de simplification des modèles a permis de mieux caractériser les acteurs de la protéolyse/caséinolyse, il semblerait que la compréhension fine de ces mécanismes passe par l'identification d'interactions complexes difficilement appréhendables avec les moyens mobilisés. L'utilisation du modèle *in vivo* d'*E. coli* a permis d'avoir des observations de phénomènes dans des conditions contrôlées (date de l'infection, identité de la souche bactérienne, suivie de cinétique inflammatoire, etc.) avec un grand nombre d'interactions (bactérie-plasmine, bactérie-PMN, PMN-plasmine) qui ne permettent pas d'appréhender correctement le mécanisme de la protéolyse. Le modèle LPS quant à lui se situe à l'interface entre la réalité complexe *in vivo* et une simplification exagérée des phénomènes, tel était le cas du modèle *in vitro* d'inoculation d'*E. coli* dans le lait. L'utilisation de ces modèles nous a permis la description de mécanismes partiels amenant à une meilleure compréhension d'un mécanisme global plus complexe.



*Conclusion  
Générale*





## CONCLUSION GENERALE

Le mécanisme de la protéolyse dans le lait au cours de l'inflammation de la glande mammaire est un phénomène complexe. L'utilisation des modèles expérimentaux *in vivo* à *E. coli* et à LPS ainsi que le modèle *in vitro* d'inoculation d'*E. coli* dans le lait cru, nous a permis de proposer des hypothèses concernant le rôle des différents facteurs impliqués dans la protéolyse.

L'étude de la protéolyse *in vivo*, au travers d'une cinétique d'infection expérimentale à *E. coli*, a permis d'établir la succession des différents acteurs intervenant dans la protéolyse. Les cellules et les bactéries semblent intervenir durant toute la cinétique inflammatoire entre 3 et 216 h PI, quant à la plasmine, elle interviendrait particulièrement entre 15 et 33 h PI. Pendant cette phase aigue de l'inflammation, des modifications de la fraction PP sont observées, avec une apparition de plusieurs peptides caractéristiques d'une infection à *E. coli*. La mesure des activités protéolytiques intracellulaires des PMN montre des valeurs plus élevées dans le sang que dans le lait pour les cathepsines et la gélatinase, cette différence d'activité pourrait être attribuée à l'action des protéases leucocytaire dans la dégradation de la barrière épithéliale. Ce modèle d'infection expérimentale rend compte de la complexité du phénomène de la caséinolyse, car il intègre un grand nombre d'interactions (bactérie-plasmine, bactérie-PMN, PMN-plasmine, etc.), dont un certain nombre ont été abordées dans la suite de notre travail.

L'utilisation du modèle simplifié *in vitro* "*E. coli*/lait cru" pour l'étude de l'action des bactéries et de leurs protéases sur les caséines, a permis de démontrer l'inhibition de l'activité de la plasmine par les bactéries ou les protéases bactériennes. L'incidence de la baisse du pH a rendue inopérante la FPP comme indicateur de protéolyse. Des études similaires avec contrôle du pH permettraient de mieux renseigner la protéolyse microbienne.

Le modèle *in vitro* "protéases d'*E. coli*/CN", permettant d'approcher les protéases bactériennes retrouvées *in vivo* dans le lait lors de la phagocytose des bactéries, a permis de mettre en évidence un ordre préférentiel de dégradation des caséines par ces protéases durant les premières heures d'incubation:  $CN-\kappa \geq -\beta > -\alpha_s$ . Des études complémentaires pourraient être effectuées pour étudier l'impact des peptides générés par la dégradation des CN- $\kappa$ , ainsi que sur le ratio enzyme/substrat à la suite du changement d'ordre préférentiel de dégradation mesuré après les deux premières heures d'incubation.



Le modèle expérimentale *in vivo* à LPS, a permis d'étudier les activités protéolytiques des PMN à différents stades de maturité. Une activité maximale pour la gélatinase et les cathepsines D et B est mesurée à 12 h PI. Une activité plus importante de la gélatinase dans la fraction cellulaire constituée de cellules matures a été mesurée en comparaison à la fraction constituée de cellules immatures. La maturité des PMN a été montrée comme étant un des éléments majeurs des variations des activités protéolytiques cellulaires. La séparation des cellules souches issues directement de la moelle osseuse en gradient de Ficoll, apparaîtrait comme une méthode appropriée pour compléter les études faites sur le lait et le sang. Plusieurs paramètres pourraient être suivis en fonction du stade de maturité et de l'activation de ces cellules: le potentiel caséinolytique et la caractérisation des activités protéolytiques par zymographie.

Une piste d'étude sur les facteurs susceptibles d'agir sur la protéolyse dans le lait n'a pas été abordée dans ce travail et concerne l'impact du stress oxydant sur les protéines/protéases. Des travaux récents ont montré l'impact significatif de l'oxydation dans des laits à concentration cellulaires élevées sur l'activité de la plasmine, la protéolyse et la peroxydation des lipides. Les protéines ayant été exposées à divers réactifs oxydants sont, d'une façon générale, plus sensibles à la dégradation par les protéases. Ce phénomène de dégradation des protéines oxydées est accentué lors du phénomène de « burst oxidation » ou d'explosion respiratoire des PMN qui produisent alors des radicaux hydroxyles et oxygénés pendant le processus inflammatoire, ce qui peut augmenter la dégradation des caséines. Ce potentiel oxydatif des PMN pourrait être exploré au travers d'une étude *in vitro* ou *in vivo* pour évaluer l'impact du stress oxydatif notamment sur la formation de réticulations intermoléculaires par création des ponts disulfures entre les protéines du lait, ainsi que les modifications de l'activité de certaines protéases par modification partielle de certains acides aminés.



*Références  
Bibliographiques*



**A.**

**Aaku E.**, Sorsa T., & Wilkstrom M. 1990. Human immunoglobulin G potentiates superoxide production induced by chemotactic peptides and causes degranulation in isolated human neutrophils. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1052:243-247.

**Andrews A.T.** 1983. Breakdown of caseins by proteinases in bovine milks with high somatic cell counts arising from mastitis or infusion with bacterial endotoxin. *J. Dairy Res.* 50:57-66.

**Andrews A.T.**, & Alichanidis. 1983. Proteolysis of caseins and the protéose-peptone fraction of bovine milk. *J. Dairy Res.*, 50:275-290.

**Archarya R.K.**, Stuart D.I., Walker C.N.P., Lewis M., & Philipps D.C. 1989. Refined structure of baboon  $\alpha$ -lactalbumine at 1,7 resolution. Comparison of the C-type lysozyme. *J. Mol. Biol.*, 208 : 99-127.

**Aschaffenburg R.** 1946. Surface activity and proteins in milk. *J. Dairy Res.*, 14:136-329.

**Asselineau J.**, & Laneelle G. 1998. Mycobacterial lipids: a historical perspective. *Front. Biosci.*, 3:164-74.

**B.**

**Baggiolini M.**, & Clark-Lewis I. 1992. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Lett.*,307:97-101.

**Baggiolini M.**, Boulay F., Badwey J.A., Curnutte J.T. 1993. Activation of neutrophil leukocytes: chemoattractant receptors and respiratory burst. *FASEB J.*, 7:1004-10.

**Bainton D.F.**, Ullyot J.L., & Farquhar M.G. 1971. The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow. *J. Exp. Med.*, 134: 907-934.

**Bank U.**, & Ansorge S. 2001. More than destructive: neutrophil-derived serine proteases in cytokine bioactivity control. *J. Leukoc. Biol.*, 69:197-206.

**Bannerman D.D.**, Paape M.J., Hare W.R., Sohn E.J. 2003. Increased levels of LPS-binding protein in bovine blood and milk following bacterial lipopolysaccharide challenge. *J. Dairy Sci.*,86:3128-37.

**Banon S.**, & Hardy J. 1991. Study of acide milk coagulation by an optical method using light reflection. *J. Dairy Res.*, 58: 75-84.

**Barber M.R.**, & Yang T.J. 1998. Chemotactic activities in nonmastitic and mastitic mammary secretions: presence of interleukin-8 in mastitic but not nonmastitic secretions. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 5:82-6.

**Bastian E.D.**, & Brown R.J. 1995. Plasmin in milk and dairy products. *Int. Dairy Journal.* 6:435-457.





**Bayles K.W.**, Wesson C.A., Liou L.E., Fox L.K., Bohach G.A., & Trumble W.R. 1998. Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. *Infect. Immun.*, 66:336-42.

**Blum J.W.**, Dosogne H., Hoeben D., Vangroenweghe F., Hammon H.M., Bruckmaier R.M., & Burvenich C. 2000. Tumor necrosis factor-alpha and nitrite/nitrate responses during acute mastitis induced by *Escherichia coli* infection and endotoxin in dairy cows. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 19:223-235.

**Bode W.**, Fernandez-Catalan C., Tschesche H., Grams F., Nagase H., & Maskos K. 1999. Structural properties of matrix metalloproteinases. *Cell. Mol. Life Sci.*, 55:639-52.

**Brew K.**, Castellino F.J., Vanaman T.C., & Hill R.L. 1970. The complete amino acid sequence of bovine alpha-lactalbumin. *J Biol Chem.* 245:4570-82.

**Brodbeck U.**, Denton W.L., Tanahashi N., & Ebner K.E. 1967. The isolation and identification of the B protein of lactose synthetase as alpha-lactalbumin. *J. Biol. Chem.*, 242:1391-1397.

**Bruckmaier R.M.**, Schallibaum M., & Blum J.W. 1993. *Escherichia coli* endotoxine induced mastitis in dairy cows: changes and importance of insulin-like-growth factor and ocytocin, *Milchwissenschaft*, 48: 374-378.

## **C.**

**Caffin J.P.**, & Poutrel B. 1988. Physiological and pathological factors influencing bovine immunoglobulin G2 concentration in milk. *J. Dairy Sci.*, 71:2035-43.

**Carrell R.W.** 1986. Alpha 1-Antitrypsin: molecular pathology, leukocytes, and tissue damage. *J. Clin. Invest.*, 78:1427-31.

**Cayot F.**, & Lorient D. 1998. Structures et technofonctions des protéines du lait. *Tec & Doc*, Lavoisier, Paris, France.

**Chantrain C.**, & DeClerck Y.A., 2002. Les métalloprotéases matricielles et leurs inhibiteurs synthétiques dans la progression tumorale. *Medecine/Science.*, 18 : 565-75.

**Charette M.F.**, Henderson G.W., & Markovitz A. 1981. ATP hydrolysis-dependent protease activity of the *Ion (capR)* protein of *Escherichia coli* K-12. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 78 :4728-4732.

**Chung C.H.** 1993. Protéases in *Escherichia coli*. *Science*, 262 : 372-374.

**Cheftel J.C.**, Cuq J.L., & Lorient D. 1985. Dénaturation des protéines. In *protéines alimentaires* ; Biochimie - propriétés fonctionnelles – valeurs nutritionnelles – modifications chimiques. Tech & Doc, Lavoisier, Paris, France, 35-43.



**Collin J.C.**, Kokelaar A., Rollet-Repecaud O., & Delacroix-Buchet A. 1991. Dosage des caséines du lait par électrophorèse et par chromatographie liquide rapide d'échange d'ions (FPLC) : comparaison des résultats. *Lait*, 71 :339-350.

**Considine T.**, Healy A., Kelly A.L., & McSweeney P.L.H. 1999. Proteolytic specificity of elastase on bovine  $\beta$ -casein. *Food Chemistry.*, 66: 463-470.

**Considine T.**, Healy A., Kelly A.L., & McSweeney P.L.H. 2000. Proteolytic specificity of elastase on bovine  $\alpha_{s1}$ -casein. *Food Chemistry.*, 69: 19-26.

Considine T., Geary S., Kelly A.L., McSweeney P.L.H. 2002. Proteolytic specificity of cathepsin G on bovine  $\alpha_{s1}$ - and  $\beta$ -caseins. *Food Chemistry.*, 76:59-67.

**Considine T.**, Healy Á., Kelly A.L., & McSweeney P.L.H. 2004. Hydrolysis of bovine caseins by cathepsin B, a cysteine proteinase indigenous to milk. *International Dairy Journal*, 14:117-124.

#### **D.**

**Dano K.**, Andreasen P.A., Grondahl-Hansen J., Kristensen P., Nielsen L.S., & Skriver L. 1985. Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer. *Adv. Cancer Res.*, 44:139-266.

**Davis W.B.**, Fells G.A., Sun X.H., Gadek J.E., Venet A., & Crystal R.G. 1984. Eosinophil-mediated injury to lung parenchymal cells and interstitial matrix. A possible role for eosinophils in chronic inflammatory disorders of the lower respiratory tract. *J. Clin. Invest.*, 74:269-78.

**DeClerck Y.A.** 2000. Interactions between tumour cells and stromal cells and proteolytic modification of the extracellular matrix by metalloproteinases in cancer. *Eur. J. Cancer.*, 36:1258-68.

**Delclaux C.**, Delacourt C., D'Ortho M.P., Boyer V., Lafuma C., & Harf A. 1996. Role of gelatinase B and elastase in human polymorphonuclear neutrophil migration across basement membrane. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 14:288-295.

**Deluyker H.A.** 1991. Milk yield fluctuations associated with mastitis. *Flem. Vet. J.*, 62:207-216.

**Dentener M.A.**, Von Asmuth E. J. U., Francot G. J. M., & Buurman W. A. 1994. Interaction between CD14, lipopolysaccharide binding protein and bactericidal/permeability-increasing protein during lipopolysaccharide-induced cell activation. *Bacterial endotoxins: Basic science to anti-sepsis strategies*, Wiley-Liss, Inc., pp 50-70.



**Diekmann O.**, Tschesche H. 1994. Degradation of kinins, angiotensins and substance P by polymorphonuclear matrix metalloproteinases MMP-8 and MMP-9. *Braz J. Med. Biol. Res.* 27: 1865-1876.

**Diez-Fraile A.**, Meyer E., & Burvenich C. 2002. Regulation of adhesion molecules on circulating neutrophils during coliform mastitis and their possible immunomodulation with drugs. *Veterinary Immunology Immunopathology.* 86:1-10.

**Dosogne H.**, Vangroenweghe F., Barrio B., Rainard P., & Burvenich C. 2001. Decreased number and bactericidal activity against *Staphylococcus aureus* of the resident cells in milk of dairy cows during early lactation. *J. Dairy. Res.*, 68:539-49.

**Dulin A.M.**, Paape M.J., & Weinland B.T. 1982. Cytospin centrifuge in differential counts of milk somatic cells. *J. Dairy Sci.*,65:1247-51.

**Dulin A.M.**, Paape M.J., Nickerson S.C. 1988. Comparison of phagocytosis and chemiluminescence by blood and mammary gland neutrophils from multiparous and nulliparous cows. *Am. J. Vet. Res.*, 49:172-7.

## **E.**

**Eigel W.N.** 1977. Effect of bovine plasmin on  $\alpha_{s1}$ -,  $\beta$ - and  $\kappa$ -caseins. *J. Dairy Sci.*, 60:1399-403.

**Eigel W.N.**, Hofmann C.J., Chibber B.A., Tomich J.M., Keenan T.W., & Mertz E.T. 1979. Plasmin-mediated proteolysis of casein in bovine milk. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76:2244-2248.

**Eigle W.N.**, Ernstrom C.A., Farrell H.M., Harwalker V.R., Jenness R., & Whitney R. 1984. Nomenclature of proteins of cow' milk : Fifth Revision. *J. Dairy Sci.*, 67 :1599-1631.

**Elsbach P.** 1998. The bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) in antibacterial host defense. *J. Leukoc. Biol.*, 1998. 64:14-18.

**Estreicher A.**, Muhlhauser J., Carpentier J.L., Orci L., & Vassalli J.D. 1990. The receptor for urokinase type plasminogen activator polarizes expression of the protease to the leading edge of migrating monocytes and promotes degradation of enzyme inhibitor complexes. *J. Cell. Biol.*, 111:783-792.

## **F.**

**Fairbairn D.J.**, & Law B.A. 1986. Proteinases of psychrotrophic bacteria: their production, properties, effects and control. *J. Dairy Res.*, 53:139-177.



**Fang W.**, Shi M., Huang L., Shao Q., & Chen J. 1993. Growth of lactobacilli, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in normal and mastitic milk and whey. *Vet. Microbiol.*, 37:115-125.

**Farrell H.M.**, Jr., Brown E.M. and Kumosinski T.F. 1993. Three dimensional molecular modelling of bovine caseins. *Food Struct.*, 12:235-250.

**Farrell H.M.**, Jr., Jimenez-Flores R., Bleck J.T., Brown E.M., Butler J.E., Creamer L.K., Hicks C.L., Hollar C.M., Ng-Kwai-Hang K.F., & Swaisgood H.E. 2004. Nomenclature of the proteins of cows' Milk – Sixth revision. *J. Dairy Sci.*, 87 :1641-1674.

**Faurschou M.**, & Borregaard N. 2003. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect.*, 5:1317-1327.

## **G.**

**Ghazarossian F.** 1996. Etude de l'effet des hautes pressions sur la structure de la micelle de caséines bovines. Mémoire d'Ingénieur Ensbana. Université de Bourgogne.

**Gilles A.M.**, & Keil B. 1976. Cleavage of beta-casein by collagenases from *Achromobacter iophagus* and *Clostridium histolyticum*. *FEBS Lett.*, 65:369-372.

**Goldberg A.L.** 1992. The mechanism and functions of ATP-dependent proteases in bacterial and animal cells. *Eur. J. Biochem.*, 203:9-23.

**Gordon W.G.** 1971.  $\alpha$ -lactalbumine. In *Milk Proteins*: McKenzie H.A., ed. Academic Press, New York, NY. p 331-361.

**Gottesman S.**, & Maurizi M.R. 1992. Regulation by proteolysis: energy-dependent proteases and their targets. *Microbiol. Rev.*, 56:592-621.

**Gougerot-Pocidallo M.A.** Polynucléaires neutrophiles. In *Immunologie* (4<sup>e</sup> édition) Lavoisier 2002.

**Grieve A.P.**, & Kitchen J.B., 1985. Proteolysis in milk: The significance of proteinase originating from milk leukocyte and a comparison of the action leukocyte, bacterial and milk proteinases on casein. *J. Dairy Sci.*, 52:101-112.

**Gronski T.J.** Jr., Martin R.L., Kobayashi D.K., Walsh B.C., Holman M.C., Huber M., Van Wart H.E., & Shapiro S.D. 1997. Hydrolysis of a broad spectrum of extracellular matrix proteins by human macrophage elastase. *J. Biol. Chem.*, 272:12189-94.

**Groves M.L.**, Dower H.J., & Farrell H.M.Jr. 1992. Reexamination of the polymeric distributions of  $\kappa$  casein isolated from bovine milk. *J. Prot. Chem.* 11 :21-28.

**Grufferty M.B.**, & Fox P.F. 1988. Milk alkaline proteinase. *J. Dairy Res.*, 55:609-30.





**Gugi B.**, Orange N., Hellio F., Burini J.F., Guillou C., Leriche F., Guespin-Michel J.F. 1991. Effect of growth temperature on several exported enzyme activities in the psychrotrophic bacterium *Pseudomonas fluorescens*. *J. Bacteriol.*, 173:3814-3820.

**Guidry A.J.**, Ost M., Mather I.H., Shainline W.E., & Weinland B.T. 1983. Sequential response of milk leukocytes, albumin, immunoglobulins, monovalent ions, citrate, and lactose in cows given infusions of *Escherichia coli* endotoxin into the mammary gland. *AM. J. Vet. Res.*, 44:2262-2267.

**Guinot-Thomas P.**, Al Ammoury M., Le Roux Y., & Laurent F. 1995. Study of proteolysis during storage of raw milk at 4°C: effect of plasmin and microbial proteinases. *Int. Dairy J.* 47:685-697.

## **H.**

**Hamann J.**, & Krömker V. 1997. Potential of specific milk composition variables for cow health management. *Livestock Prod. Sci.*, 48:201-208.

**Hayes M.G.**, Hurley M.J., Larsen L.B., Heegaard C.W., Magboul A.A., Oliveira J.C., McSweeney P.L., & Kelly A.L. 2001. Thermal inactivation kinetics of bovine cathepsin D. *J. Dairy Res.*, 68:267-276.

**Heegaard C.W.**, Christenen T., Rasmussen M.D., Benfeld C., Jensen N.E., Sejrsen K., Petersen T.E., & Andreasen P.A. 1994a. Plasminogen activators in bovine milk during mastitis, an inflammatory disease. *Fibrinolysis*, 8: 22-30.

**Heegaard C.W.**, Rasmussen L.K., & Andreasen P.A. 1994b. 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.*, 1222:45-55.

**Hoagland P.H.**, Unruh J.J., Wickham E.D., & Farrell H.M.Jr. 2001. Secondary structure of bovine  $\alpha_{s2}$ -casein: Theoretical and experimental approaches. *J. Dairy Sci.* 84: 1944-1949.

**Hoeben, D.**, Monfardini E., Burvenich C., & Hamann J. 2000. Treatment of acute *Escherichia coli* mastitis in cows with enrofloxacin: effect on clinical signs and chemiluminescence of circulating neutrophils. *J. Dairy Res.*, 67:485-502.

**Humbert G.** 1986. La protease alcaline (plasmine) du lait: dosage, purification et implications en technologie laitière. Thèse, Univ. Nancy 1.

**Humbert G.**, Berbar A., Godbillon G., Le Deaut J.Y., & Linden G. 1990. Purification of bovine milk alkaline proteinase and comparison with purified bovine blood plasminogen or plasmin. *Le lait*, 70, 191-203.



**Hurlbert R.E.** 1999. Food Microbiology.

**Hurley M.J.**, Larsen L.B., Kelly A.L., & McSweeney P.L.H. 2000. The milk acid proteinase cathepsin D: a review. *Int. Dairy J.*, 10:673-681.

**J.**

**Jain N.C.** 1993. Essential of veterinary hematology. Ed. Lea & Febiger, Philadelphia. 417 p.

**Jolles J.**, Schoentgen F., Alais C., Fiat A.M., & Jolles P. 1972. Studies on the primary structure of cow kappa-casein. Structural features of para-kappa-casein; N-terminal sequence of kappa-caseinoglycopeptide studied with a sequencer. *Helv. Chim. Acta.* 55:2872-83.

**K.**

**Kalnitsky G.**, Chatterjee R., Singh H., Lones M., & Paszkowski A. 1983. Bifunctional activities and possible modes of regulation of some lysosomal cysteinyl proteases. Protease Inhibitors: Medical and Biological Aspects, eds. N. Katunuma et al., pp 263-273. Japan. Sci. Soc. Press, Tokyo/Springer-Verlag, Berlin.

**Kaartinen L.**, Ali-Vehmas T., Mattila T., & Sandholm M. 1989. Bacterial growth in mastitic whey in relation to bacterial association with mastitis. *Vet. Microbiol.*, 21:155-163.

**Katayama Y.**, Gottesman S., Pumphrey J., Rudikoff S., Clark W.P., & Maurizi M.R. 1988. The two-component, ATP-dependent Clp protease of *Escherichia coli*. Purification, cloning, and mutational analysis of the ATP-binding component. *J. Biol. Chem.*, 263:15226-36.

**Kelly A.L.**, O'Flaherty F., & Fox P.F. 2006. Indigenous proteolytic enzymes in milk: A brief overview of the present state of knowledge. *International Dairy Journal*. sous presse.

**Knauper V.**, Murphy G., & Tschesche H. 1996. Activation of human neutrophil procollagenase by stromelysin 2. *Eur. J. Biochem.* 235, 187-191.

**Kornalijnslijper J.E.**, Daemen A.J., van Werven T., Niewold T.A., Rutten V.P., & Noordhuizen-Stassen E.N. 2004. Bacterial growth during the early phase of infection determines the severity of experimental *Escherichia coli* mastitis in dairy cows. *Vet. Microbiol.*, 101:177-186.

**Kumosinski T.F.**, Brown E.M., & Farrell H.M. Jr. 1993. Three-dimensional molecular modeling of bovine caseins: an energy-minimized beta-casein structure. *J. Dairy Sci.* 76: 931-45.



**L.**

**Lagrange P.H.** 1987. Le système phagocytaire mononucléé : les macrophages et l'infection. Ed. par MK pour les labo PHARMUKA, 122p.

**Laemmli U.K.** & Favre M. 1973. Maturation of the head of bacteriophage T4. I. DNA packaging events. *J. Bio. Mol.*, 80:575-599.

**Lahov E.**, & Regelson W.. 1996. Antibacterial and immunostimulating casein-derived substances from milk: casecidin, isracidin peptides. *Food Chem. Toxicol.*, 34:131-145.

**Lähteenmäki K.**, Kuusela P., Korhonen T.M. 2001. Bacterial plasminogen activators and receptors. *FEMS Microbiol. Rev.*, 25:531-552.

**Larsen L.B.**, & Petersen T.E. 1995. Identification of five molecular forms of cathepsin D in bovine milk. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 362:279-83.

**Larsen L.B.**, Benfeldt C., Rasmussen L.K., & Petersen T.E. 1996. Bovine milk procathepsin D and cathepsin D: coagulation and milk protein degradation. *J. Dairy Res.*, 63:119-30.

**Larsen L.B.**, Rasmussen M.D., Bjerring M., & Nielsen J.H. 2004. Proteases and protein degradation in milk from cows infected with *Streptococcus uberis*. *International dairy Res.*, 14:899-907.

**Larsen L.B.**, McSweeney P.L.H., Hayes M.G., Andersen J.B., Ingvarsten K.L., & Kelly A.L. 2006. Variation in activity and heterogeneity of bovine milk proteases with stage of lactation and somatic cell count. *International Dairy Journal*, 16:1-8.

**Le Bars D.**, & Grippon J.C. 1989. Specificity of plasmin towards bovine  $\alpha_{s2}$  casein. *J. Dairy Res.* 56: 817-821.

**Le Bars D.**, & Grippon J.C. 1993. Hydrolysis of  $\alpha_{s1}$  casein by bovine plasmin. *Lait*, 73:337-344.

**Lee C.S.**, Wooding F.B., & Kemp P. 1980. Identification, properties, and differential counts of cell populations using electron microscopy of dry cows secretions, colostrum and milk from normal cows. *J. Dairy. Res.*, 47:39-50.

**Léonil J.**, Mollé D., Gaucheron F., Arpin P., Guenot P., & Maubois J.L. 1995. Analysis of major bovine milk proteins by on line high-performance liquid chromatography and electro spray ionisation mass spectrometry. *Lait*. 75:193-210.

**Le Roux Y.**, Colin O., & Laurent F. 1995a. Proteolysis in samples of quarter milk with varying somatic cell counts. 1. Comparison of some indicators of endogenous proteolysis in milk. *J. Dairy Sci.*, 78:1289-97.

**Le Roux Y.**, Laurent F., & Moussaoui F. 2003. Polymorphonuclear proteolytic activity and milk composition change. *Vet. Res.*, 34: 626-645.



**Levy O.**, & Elsbach P. 2001. Bactericidal/Permeability-increasing Protein in Host Defense and Its Efficacy in the Treatment of Bacterial Sepsis. *Curr. Infect. Dis. Rep.*, 3:407-412.

**Levy O.**, 2004. Antimicrobial proteins and peptides: anti-infective molecules of mammalian leukocytes. *J. Leukoc. Biol.*, 76:909-925.

**Lew P.D.**, Monod A., Waldvogel F.A., Dewald B., Baggiolini M., & Pozzan T. 1986. Quantitative analysis of the cytosolic free calcium dependency of exocytosis from three subcellular compartments in intact human neutrophils. *J. Cell Biol.*, 102:2197-204.

**Li X.**, Zhao X., Ma S. 1999. Secretion of 92 kDa gelatinase (MMP-9) by bovine neutrophils. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 67:247-58.

## **M.**

**Maeda H.**, Okamoto T., & Akaike T. 1998. Human matrix metalloprotease activation by insults of bacterial infection involving proteases and free radicals. *Biol. Chem.*, 379:193-200.

**Magboul A.A.**, Larsen L.B., McSweeney P.L.H. & Kelly A.L. 2001. Cysteine protease activity in bovine milk. *International Dairy Journal*, 11:865-872.

**Martinet J.**, & Houdebine L. M. 1993. Protection de la glande mammaire. Biologie de la lactation, INRA édition INSERM, pp 415-426.

**Massart Leën A.M.**, Burvenich C., & Massart D.L. 1994. Triacylglycerol fatty acid composition of milk from periparturient cows during acute *Escherichia coli* mastitis. *J. Dairy Res.*, 61:191-9.

**Mattila-Sandholm T.**, Aliviehmas T., Kaartinen L., & Honkanen-Buzalski T. 1990. Growth characteristics of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in whey from sequentially infected milk. *Acta. Vet. Scand.*, 31:169-174.

**Maurizi M.R.** 1992. Proteases and protein degradation in *Escherichia coli*. *Experientia.*, 48:178-201.

**McDermott C.M.**, Cullor J.S., & Fenwick B.W. 1991. Intracellular and extracellular enzymatic deacylation of bacterial endotoxin during localized inflammation induced by *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 59:478-485.

**McDonald J.S.**, & Anderson A.J. 1981. Total and differential somatic cell counts in secretions from noninfected bovine mammary glands: the early nonlactating period. *Am. J. Vet. Res.*, 42:1360-1365.

**McFadden T.B.**, Akers R.M., & Capuco A.V. 1988. Relationship of milk proteins in blood with somatic cell counts in milk of dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 71:826-34.





- Mc Sweeney P.L.H.**, & Fox P.F. 1995. Proteolysis of bovine casein by cathepsin D: preliminary observations and comparison with chymosin. *Int. Dairy J.*, 5:321-336.
- Mehrzaad J.**, Dosogne H., Meyer E., Heyneman R., & Burvenich C. 2001. Respiratory burst activity of blood and milk neutrophils in dairy cows during different stages of lactation. *J. Dairy Res.*, 68:399-415.
- Mehrzaad J.**, Desrosiers C., Lauzon K., Robitaille G., Zhao X., & Lacasse P. 2005. Proteases involved in mammary tissue damage during endotoxin-induced mastitis in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 88:211-222.
- Mercier J.C.**, Grosclaude F., & Ribadeau-Dumas B. 1971. Structure primaire de la caséine  $\alpha_{s1}$  bovine. Séquence complète. *Eur. J. Biochem.* 23:41-51.
- Michelutti I.** 1998. Variation des cellules somatiques et de la composition biochimique du lait en relation avec l'inflammation expérimentale de la glande mammaire. Thèse de Doctorat de l'INPL (Institut National Polytechnique de Lorraine).
- Michelutti I.**, Le Roux Y., Rainard P., Poutrel B., et Laurent F. 1999. Sequential changes in milk protein composition after experimental *Escherichia coli* mastitis. *Le Lait*, 79: 535-549.
- Mignatti P.**, & Rifkin D.B. 1993. Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol. Rev.*, 73:161-195.
- Moir E.**, Booth N.A., Bennett B., Robbie L.A. 2001. Polymorphonuclear leucocytes mediate endogenous thrombus lysis via a u-PA-dependent mechanism. *Br J Haematol.* 113:72-80.
- Moussaoui F.**, Michelutti I., Le Roux Y., & Laurent F. 2002. Mechanisms involved in milk endogenous proteolysis induced by a lipopolysaccharide experimental mastitis. *J. Dairy Sci.* 85:2562-70.
- Moussaoui F.**, Laurent F., Girardet J.M., Humbert G., Gaillard J.L., Le Roux Y. 2003. Characterization and proteolytic origins of specific peptides appearing during lipopolysaccharide experimental mastitis. *J. Dairy Sci.*, 86:1163-1170.
- Munro G.L.**, Grieve P.A., & Kitchen B.J. 1984. Effect of mastitis on milk yield, milk composition, processing properties and yield and quality of milk products. *Austr. J. Dairy Techn.*, 39: 7-16.
- Murphy G.**, & Docherty A.J.P. 1992. The matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 7, 120-125.
- N.**
- Nathan C.F.**, Murray H.J.W., & Cohn Z.A. 1980. The macrophage as an effector cell. *New. Engl. J. Med.*, 303:622-626.



**Neidhardt F.C.** 1987. Part I, Chap. 2: Chemical Composition of *Escherichia coli*. In: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, Cellular and Molecular Biology, Vol 1. Editors: Neidhardt F.C., Ingraham J.L., Brooks Low K., Magasanik B., Schaechter M., Umbarger H.E., Ed by American Society for Microbiology. 3-6p.

**Nickerson S.C.**, & Heald C.W. 1983. Cells in local reaction to experimental *Staphylococcus aureus* infection in bovine mammary gland. *J. Dairy Sci.*, 65:105-116.

**Nickerson S.C.**, & Pankey J.W. 1984. Neutrophil migration through test end tissues of bovine mammary quarters experimentally challenged with *Staphylococcus aureus*. *J. Dairy Sci.*, 67:826-34.

**Nielsen M.**, Schukken Y.H., & Brand A. 1995. Detection of subclinical mastitis from on-line milking parlor data. *J. Dairy Sci.*, 78:1039-1049.

## **O.**

**Opdenakker G.**, Van den Steen P.E., & Van Damme J. 2001. Gelatinase B: a tuner and amplifier of immune functions. *Trends Immunol.*, 22:571-579.

**Opdenakker G.**, Van den Steen P.E., Dubois B., Nelissen I., Van Coillie E., Masure S., Proost P., & Van Damme J. 2001. Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology. *J. Leukoc. Biol.*, 69:851-859.

**Outteridge P.M.**, & Lee C.S. 1981. Cellular immunity in the mammary gland with particular reference to T, B lymphocytes and macrophages. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 137:513-34.

**Owen C.A.**, & Campbell E.J. 1999. The cell biology of leukocyte-mediated proteolysis. *J. Leukoc. Biol.*, 65:137-50.

## **P.**

**Paape M.J.**, Guidry A.J., Kirk S.T., & Bolt D.J. 1975. Measurement of phagocytosis of <sup>32</sup>P-labeled *Staphylococcus aureus* by bovine leukocytes: lysostaphin digestion and inhibitory effect of cream. *Am. J. Vet. Res.*, 36:1737-43.

**Paape M.J.**, & Guidry A.J. 1977. Effect of fat and casein on intracellular killing of *Staphylococcus aureus* by milk leukocytes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 155:588-593.

**Paape M.J.**, Desjardins C., Guidry A.J., Miller R.H., & Smith V.R. 1977. Response of plasma corticosteroids and circulating leukocytes in cattle following intravenous injection of different doses of adrenocorticotropin. *Am. J. Vet. Res.*, 38:1345-8.

Paape M.J., Wergin W.P., Guidry A.J., & Schultze W.D. 1981. Phagocytic defense of the ruminant mammary gland. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 137:555-78.



- Paape M.J.**, Miller R.H., Ziv G. 1991. Pharmacologic enhancement or suppression of phagocytosis by bovine neutrophils. *Am. J. Vet. Res.*, 52:363-6.
- Paape M.J.**, Shafer-Weaver K., Capuco A.V., Van Oostveldt K., & Burvenich C. 2000. Immune surveillance of mammary tissue by phagocytic cells. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 480:259-77.
- Paape M.J.**, Bannerman D.D., Zhao X., & Lee J.W. 2003. The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk. *Vet. Res.*, 34: 597-627.
- Pâquet D.** 1989. Revue bibliographique: la fraction protéose-peptones du lait. *Le lait.*, 69 :1-21.
- Pepper L.**, & Farrell H.M.Jr. 1982. Interactions leading to formation of casein submicelles. *J. Dairy Sci.*, 65: 2259-2266.
- Pezzato E.**, Dona M., Sartor L., Dell'Aica I., Benelli R., Albini A., & Garbisa S. 2003. Proteinase-3 directly activates MMP-2 and degrades gelatin and Matrigel; differential inhibition by (-)epigallocatechin-3-gallate. *J. Leukoc. Biol.*, 74:88-94.
- Pihlanto-Lappäälä A.**, Pahkala E., Kahala M., & Antila V. 1993. Hydrolysis of  $\alpha_{s2}$  casein in solution by chymosin, plasmin, trypsin and lactobacillus proteinases. *Agric. Sci. Finland*, 2 :133-139.
- Politis I.**, Zavizion B., Barbano D.M., & Gorewit R.C. 1993. Enzymatic assay for the combined determination of plasmin plus plasminogen in milk: revisited. *J. Dairy Sci.*, 76:1260-1267.
- Politis I.** 1996. Plasminogen activator system: implications for mammary cell growth and involution. *J. Dairy Sci.*, 79:1097-107.
- Poutrel B.** 1992. III-2. Les staphylocoques et les streptocoques de mammite. In : *Les groupes microbiens d'intérêt laitier*. Coordinateur J. Hermier, J. Lenoir, F. Weber. Paris : CEPIL (Centre de formation Permanente et de perfectionnement des cadres des Industries du Lait), 568p. 415-453.
- Poutrel B.** 1986. L'amélioration de la qualité du lait par la lutte contre les mammites bovines. *Médecine et Nutrition*, 22 : 318-324.
- Precetti A.S.**, Oria M.P., & Nielsen S.S. 1997. Presence in bovine milk of two protease inhibitors of the plasmin system. *J. Dairy Sci.*, 80:1490-1496.
- Prin-Mathieu C.**, Le Roux Y., Faure G.C., Laurent F., Bene M.C., & Moussaoui F. 2002. Enzymatic activities of bovine peripheral blood leukocytes and milk polymorphonuclear neutrophils during intramammary inflammation caused by lipopolysaccharide. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 9:812-817.



**R.**

- Rainard P.**, & Caffin J.P. 1983. 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. Vet.*, 14:271-279.
- Rainard P.** 1985. Les mammites colibacillaires. *Rec. Méd. Vét.*, 161 :529-537.
- Rankin C.A.**, Itoh Y., Tian C., Ziemer D.M., Calvet J.P., & Gattone V.H. 1999. Matrix metalloproteinase-2 in a murine model of infantile-type polycystic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 10:210-217.
- Raulo S.M.**, Sorsa T., Tervahartiala T., Latvanen T., Pirila E., Hirvonen J., & Maisi P. 2002. Increase in milk metalloproteinase activity and vascular permeability in bovine endotoxin-induced and naturally occurring *Escherichia coli* mastitis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 85:137-45.
- Reboud-Ravaux M.** 2001. Elastase inhibitors. *J. Soc. Biol.*, 195:143-150.
- Reeves E.P.**, Lu H., Jacobs H.L., Messina C.G., Bolsover S., Gabella G., Potma E.O., Warley A., Roes J., & Segal A.W. 2002. Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K<sup>+</sup> flux. *Nature.*, 416:291-7.
- Remeuf F.**, Cossin V., Dervin C., Lenoir J., & Tamassone R. 1991. Relation entre les caractères physico-chimiques des laits et leur aptitude fromagère. *Lait.*, 71:397-421.
- Rerolle J.P.**, Vigneau C., Hertig A., Berrou J., & Rondeau E. 2001. Plasminogen activator inhibitor type 1: physiology and role in renal physiopathology. *Nephrologie*, 22:5-13.
- Revillard J.P.**, 1998. Immunologie, ed. DE Boeck Université (3<sup>e</sup> édition) Paris, Bruxelles, 113p.
- Ribadeau-Dumas B.**, & Grappin R. 1989. Milk protein Analysis. *Lait*, 69 :357-416.
- Ribadeau-Dumas B.**, Brignon G., Grosclaude F. & Mercier J.C. 1972. Structure primaire de la caséine  $\beta_{A2}$  bovine. Séquence complète. *Eur.J.Biochem.*, 25 :505-514.
- Rijken D.C.**, 1995. Plasminogen activators and plasminogen activator inhibitors: biochemical aspects. *Baillieres Clin. Haematol.*, 8:291-312.
- Riollet C.**, Rainard P., & Poutrel B. 1999. Cinétiques de recrutement cellulaire et de multiplication bactérienne après infection. Journée Nationale GTV-INRA, Nantes, France. Cellules somatiques du lait. 23-28.
- Roitt**, Brostoff, Male (1994) Immunologie. Ouvrage. 3<sup>e</sup> édition. Traduit de l'anglais par Revillard J.P., & Fridman W.H. éd. De Boeck-Université.
- Rowland S.J.** 1938. The precipitation of protein in milk, I caseins, II total proteins, III globulins, IV albumine and proteose-peptone. *J. Dairy Res.* 9:31-41





**Rozkov A.**, 2001. Control of proteolysis of recombinant proteins in *Escherichia coli*. Ph.D. Diss., Univ. Stockholm, Sweden.

**Russell M.W.**, Brooker B.E., & Reiter B. 1977. Electron microscopic observations of the interaction of casein micelles and milk fat globules with bovine polymorphonuclear leucocytes during the phagocytosis of staphylococci in milk. *J. Comp. Pathol.*, 87:43-52.

## **S.**

**Schaller J.**, Moser P.W., Dannegger-Muller G.A., Rosselet S.J., Kampf U., & Rickli E.E. 1985. Complete amino acid sequence of bovine plasminogen. Comparison with human plasminogen. *Eur. J. Biochem.*, 149:267-78.

**Schepers A.J.**, Lam T.J., Schukken Y.H., Wilmink J.B., & Hanekamp W.J. 1997. Estimation of variance components for somatic cell counts to determine thresholds for uninfected quarters. *J. Dairy Sci.*, 80:1833-1840.

**Semnani M.J.**, Kabbur M.B., & Jain N.C. 1993. Activation of bovine neutrophil functions by interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-1 alpha. *Comp. Haematol. Int.*, 3:81-88.

**Senior R.M.**, & Campbell E.J. 1983. Neutral proteinases from human inflammatory cells. A critical review of their role in extracellular matrix degradation. *Clin. Lab. Med.*, 3:645-66.

**Sethi S.**, Sharma P., & Dikshit M. 2001. Nitric oxide- and oxygen-derived free radical generation from control and lipopolysaccharide-treated rat polymorphonuclear leukocyte. *Nitric Oxide*, 5:482-493.

**Shamay A.**, Shapiro F., Leitner G., & Silanikove N. 2003. Infusion of casein hydrolyzates into the mammary gland disrupts tight junction integrity and induce involution in cows. *J. Dairy Sci.*, 86:1250-1258.

**Shennan D.B.**, & Peaker M. 2000. Transport of milk constituents by the mammary gland. *Physiol. Rev.*, 80:925-51.

**Shofuda K.**, Moriyama K., Nishihashi A., Higashi S., Mizushima H., Yasumitsu H., Miki K., Sato H., Seiki M., Miyazaki K. Role of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) in regulation of pro-gelatinase A activation catalyzed by membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) in human cancer cells. *J. Biochem. (Tokyo)*, 124:462-70.

**Shuster D.E.**, Kehrl M.E. Jr., Rainard P., & Paape M. 1997. Complement fragment C5a and inflammatory cytokines in neutrophil recruitment during intramammary infection with *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 65:3286-3292.



**Silanikove N.**, Shamay A., Shinder D., Moran A. 2000. Stress down regulates milk yield in cows by plasmin induced beta-casein product that blocks K<sup>+</sup> channels on the apical membranes. *Life Sci.*, 67:2201-12.

**Smithers G.W.**, Ballard F.J., Copeland A.D., De Silva K.J., Dionysius D.A., Francis G.L., Goddard C., Grieve P.A., McIntosh G.H., Mitchell I.R., Pearce R.J., & Regester G.O. 1996. New opportunities from the isolation and utilization of whey proteins. *J. Dairy Sci.*, 79:1454-1459.

**Somers J.M.**, O'Brien B., Meaney W.J., & Kelly A.L. 2003. Heterogeneity of proteolytic enzyme activities in milk samples of different somatic cell count. *J. Dairy Res.*, 70:45-50.

**Sordillo L.M.**, Shafer-weaver K., & De Rosa D. 1997. Symposium: bovine immunology. Immunobiology of the mammary gland. *J. Dairy Sci.*, 80:1851-1865.

**Styrt B.**, Walker R.D., & White J.C. 1989. Neutrophil oxidative metabolism after exposure to bacterial phospholipase C. *J. Lab. Clin. Med.*, 114:51-7.

**Suter S.**, Schaad U.B., Roux L., Nydegger U.E., Waldvogel F.A. 1984. Granulocyte neutral proteases and Pseudomonas elastase as possible causes of airway damage in patients with cystic fibrosis. *J. Infect. Dis.*, 149:523-31.

**Sutra L.**, & Poutrel B. 1994. Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.*, 40:79-89.

**Swaisgood H.E.** 1992. Chemistry of the caseins. In *Advanced Dairy Chemistry-I: Proteins*. P. F. Fox, ed. Elsevier Applied Science, New York, NY. 63-110.

**Swaisgood H.E.** 1982. Chemistry of milk proteins. In *developments in Dairy Chemistry -I: Proteins*. P.F. Fox, ed. Applied Science Publishers, New York, NY. P 1-59.

## **T.**

**Takeuchi K.H.**, McGarry M.P., & Swank R.T. 1987. Elastase and cathepsin G activities are present in immature bone marrow neutrophils and absent in late marrow and circulating neutrophils of beige (Chediak-Higashi) mice. *J. Exp. Med.*, 166: 1362-1376.

**Targowski S.P.** 1983. Role of immune factors in protection of mammary gland. *J. Dairy Sci.*, 66:1781-9.

**Tobias P.S.**, Gegner J., Han J., Kirkland T., Kravchenko V., Leturcq D., Lee J.D., Moriarty A., Mathison J.C., Pugin J., Steinemann S., & Ulevitch R.J. 1994. LPS binding protein and CD14 in the LPS dependent activation of cells. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 388:31-9.



**Tokunaga H.**, Waguri S., Sato N., Ohsawa Y., Banya Y., Kominami E., & Uchiyama Y. 1996. Lysosomal cysteine and aspartic proteinases and ubiquitin in rat and human urinary bladder epithelium. *Arch. Histol. Cytol.*, 59:249-260.

**Turk B.**, Turk V., & Turk D. 1997. Structural and functional aspects of papain-like cysteine proteinases and their protein inhibitors. *Biol. Chem.*, 378:141-50.

**U.**

**Urech E.**, Puhan Z., & Schallibaum M. 1999. Changes in milk protein fraction as affected by subclinical mastitis. *J. Dairy Sci.*, 82:2402-11.

**V.**

**Vainchenker W.** Hematopoïèse. In: Breton-Gorius J, Reyes F, Rochart H, Rosa J, Vernant J.P., eds. L'hématologie de B Dreyfus. Paris: Flammarion, 1992: 3-41.

**Vangroenweghe F.**, Duchateau L., & Burvenich C. 2004. Moderate inflammatory reaction during experimental *Escherichia coli* mastitis in primiparous cows. *J. Dairy Sci.*, 87: 886-895.

**Vangroenweghe F.**, Rainard P., Paape M., Duchateau L., & Burvenich C. 2004. Increase of *Escherichia coli* inoculum doses induces faster innate immune response in primiparous cows. *J. Dairy Sci.*, 87:4132-4144.

**Van Hooijdonk A.C.**, Kussendrager K.D., & Steijns J.M. 2000. *In vivo* antimicrobial and antiviral activity of components in bovine milk and colostrum involved in non-specific defence. *Br. J. Nutr.*, 84:127-134.

**Van Merris V.**, Meyer E., Dosogne H., & Burvenich C. 2001. Separation of bovine bone marrow into maturation-related myeloid cell fractions. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 83:11-17.

**Van Oostveldt K.**, Tomita G.M., Paape M.J., Capuco A.V., & Burvenich C. 2002. Apoptosis of bovine neutrophils during mastitis experimentally induced with *Escherichia coli* or endotoxin. *Am. J. Vet. Res.*, 63:448-453.

**Verdi R.J.**, & Barbano D.M. 1991a. Effect of coagulants, somatic cell enzymes, and extracellular bacterial enzymes on plasminogen activation. *J. Dairy Sci.*, 74: 772-782.

**Verdi R.J.**, & Barbano D.M. 1991b. Properties of proteases from milk somatic cells and blood leukocytes. *J. Dairy Sci.*, 74:2077-81.

**Vreeman H.J.**, Brinkhuis J.A., & van der Spek C.A. 1981. Some association properties of bovine SH-kappa-casein. *Biophys. Chem.* 14:185-93.



**W.**

**Wade T.**, Beattie J.K., Rowlands W.N., & Augustin M.A. 1996. Electroacoustic determination of size and zeta potential of casein micelles in skim milk. *J. Dairy Sci.*, 63 : 387-404.

**Walstra P.** 1990. On the stability of the casein micelles. *J. Dairy Sci.*, 73 :1965-1979.

**Walstra P.**, & Jenness R. 1984. Dairy Chemistry and Physics. Johns Wiley, Sons, New York.

**White F.H.** Jr., Balkwill D.L., Meeter D.A., & Merchant K.K. 1993. Further studies on the lysozyme-like activity of alpha-lactalbumin: development of alternative methods of assay. *Anal. Biochem.* 212:263-8.

**Woo K.M.**, Chung W.J., Ha D.B., Goldberg A.L., & Chung C.H. 1989. Protease Ti from *Escherichia coli* requires ATP hydrolysis for protein breakdown but not for hydrolysis of small peptides. *J. Biol. Chem.*, 264:2088-91.

**Yamagata K.**, Matsumura K., Inoue W., Shiraki T., Yasuda S., Sugiura H., Cao C., **Watanabe Y.**, & Kobayashi S. 2001. Coexpression of microsomal-type prostaglandin E synthase with cyclooxygenase-2 in brain endothelial cells of rats during endotoxin-induced fever. *J. Neurosci.*, 21:2669-2677.

**Y.**

**Yamagata K.**, Matsumura K., Inoue W., Shiraki T., Suzuki K., Yasuda S., Sugiura H., Cao C., Watanabe Y., & Kobayashi S. 2001. Coexpression of microsomal-type prostaglandin E synthase with cyclooxygenase-2 in brain endothelial cells of rats during endotoxin-induced fever. *J. Neurosci.*, 21:2669-77

**Yan L.**, Borregaard N., Kjeldsen L., & Moses M.A., 2001. The high molecular weight urinary matrix metalloproteinase (MMP) activity is a complex of gelatinase B/MMP-9 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL). Modulation of MMP-9 activity by NGAL. *J. Biol. Chem.*, 276:37258-37265.

**Z.**

**Zavizion B.**, Heegard C.W., White J., Cheli F., & Politis I. 1996. Synthesis of plasminogen activator inhibitor 1 by bovine mammary epithelial and myoepithelial cell lines. *J. Dairy Res.*, 63:451-8.

**Zavizion B.**, White J.H., & Bramley A.J. 1997. *Staphylococcus aureus* stimulates urokinase-type plasminogen activator expression by bovine mammary cells. *J. Infect. Dis.*, 176:1637-40.





*Communications et  
Publications*



**Ce Travail de recherche à fait l'objet des communications et publications suivantes :**

❖ *Publication avec comité de lecture (référéncé SCI) :*

F. Moussaoui, F. Vangroenweghe, **K. Haddadi**, Y. Le Roux, F. Laurent, L. Duchateau, C. Burvenich. (2004). Proteolysis in milk during experimental *Escherichia coli* mastitis. *Journal of Dairy Science*, 87:2923-2931.

**K. Haddadi**, F. Moussaoui, I. Hebia, F. Laurent, Y. Le Roux. (2005). *E. coli* proteolytic activity in milk and casein breakdown. *Reproduction, Nutrition, Développement*, 45:485-96.

**K. Haddadi**, C. Prin-Mathieu, F. Moussaoui, G. C. Faure, F. Vangroenweghe, C. Burvenich, Y. Le Roux. PMN and *E. coli* proteases involved in caseinolysis during experimental *E. coli* mastitis. *International Dairy Journal* (Acceptée).

❖ *Communications avec actes:*

**K. Haddadi**, F. Moussaoui, Y. Le Roux, C. Burvenich. Activité protéolytique de la MMP-9 durant une mammite expérimentale à *E. coli*. 11<sup>ème</sup> Rencontres Recherches Ruminants. 8-9 décembre 2004. Paris.

**K. Haddadi**, C. Print-Mathieu, F. Moussaoui, C. Burvenich, Y. Le Roux. Proteolytic activities in milk during *E. coli* mastitis. Indigenous Enzymes in Milk. 19-22 Avril 2005. University College Cork, Irlande. (**Poster presentation prize**)

❖ *Congrès avec actes et comité de lecture:*

Y. Le Roux, **K. Haddadi**. Mechanisms of proteolysis of casein in mastitic milk. Indigenous Enzymes in Milk. 19-22 Avril 2005. University College Cork, Irlande.

❖ *Conférences invités :*

**K. Haddadi**, F. Laurent, Y. Le Roux. Impact of reactive oxygen species on milk protein glycosylation and phosphorylation and protein degradability. Animation transversale : Glande mammaire, lait. Novembre 2004. INRA Jouy en josas.

**En projet :**

- Impact du stress oxydant sur la dégradation des caséines dans le lait.



# *Résumé*



**RESUME**

La mammite est la pathologie la plus fréquente chez la vache laitière, affectant toute la filière laitière du producteur jusqu'au transformateur. L'objectif de ce travail est l'étude de l'incidence des facteurs endogènes (cellules somatiques, système plasmine-plasminogène) et des facteurs exogènes (bactéries) sur la caséinolyse. Ceci a été rendu possible grâce à des modèles expérimentaux de mammite *in vivo* à *E. coli* ou à LPS, et au modèle *in vitro* d'inoculation d'*E. coli* dans du lait cru.

La protéolyse dans le modèle *in vivo* à *E. coli* a permis d'établir une séquentialité de protéolyse où les cellules somatiques et les bactéries interviendraient entre 3 et 216 h PI, et une phase entre 15 et 33 h PI où la plasmine serait prédominante. Plusieurs fractions peptidiques appartenant à la fraction protéose peptones, sont présentes pendant la phase aigüe de l'inflammation, dont deux peptides d'origine cellulaire. Dans ce modèle le rôle bactérien dans les mécanismes de la protéolyse est difficilement appréhendable. L'étude *in vitro* de la protéolyse d'origine bactérienne avec le modèle *E. coli*/lait a montré une interaction entre les bactéries, les protéases bactériennes et le système plasmine-plasminogène. Le second modèle *in vitro* protéases d'*E. coli*/caséines a quant à lui permis d'établir un ordre préférentiel de dégradation des caséines. Le modèle *in vivo* à LPS a montré que l'activité de la gélatinase dans la fraction constituée de cellules matures est plus importante que dans la fraction constituée de cellules immatures.

**Mots clés :** activité protéolytique, caséine, *Escherichia coli*, gélatinase, LPS, mammite, maturité cellulaire, plasmine, PMN, protéases.





## SUMMARY

Mastitis is a frequently occurring pathological condition that is widely reported in dairy cow, affecting the whole field. The aim of this work is to investigate the endogenous proteolysis that includes mostly proteases of leukocytes and plasmin-plasminogen system in comparison with exogenous bacterial incidence on proteolysis of casein. The result of this study was possible owing to the feasibility of *in vivo* experimental mastitis using *E. coli* or endotoxin from *E. coli* and *in vitro* inoculation of *E. coli* strain in raw milk.

Proteolysis in *E. coli in vivo* model enabled proteolysis sequentiality to be achieved. Both somatic cell count and bacteria were involved. Between 3 and 216 h PI; from 15 to 33 h PI the plasmin role was preponderant. During inflammation, many peptide fractions including two of cellular origin were present in the proteose-peptones fraction. The role of *E. coli* in milk proteolysis, however remains to be elucidated. *In vitro* study of bacterial proteolysis with *E. coli* / milk model demonstrated an interaction between bacteria, bacterial proteases and the plasmin-plasminogen system. The second model involving *E. coli* proteases/casein highlighted a preferential order of caseinolysis. Furthermore, LPS experimental mastitis showed that the gelatinase activity associated with mature blood PMN is more notable than in the immature blood PMN.

Keywords: casein, cell maturity, *Escherichia coli*, gelatinase, LPS, mastitis, plasmin, proteolytic activity, PMN, proteases.



AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE  
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL  
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

**Monsieur Jean-Baptiste COULON, Directeur de Recherche, INRA, St Genès Champanelle**

**Monsieur Henri SEEGER, Professeur, Ecole Nationale Vétérinaire, Nantes**

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

**Madame HADDADI Kahina**

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,  
une thèse intitulée :

**"Mécanismes de la protéolyse lors de la dégradation de l'état sanitaire de la mamelle.  
Activité des protéases leucocytaires et des protéases bactériennes"**

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « **Sciences agronomiques** »

Fait à Vandoeuvre, le 15 mai 2006

Le Président de l'IN.P.L.,

L. SCHUFFENECKER



NANCY BRABOIS  
2, AVENUE DE LA  
FORET-DE-HAYE  
BOITE POSTALE 3  
F - 54501  
VANDŒUVRE CEDEX





## RESUME

La mammite est la pathologie la plus fréquente chez la vache laitière, affectant toute la filière laitière du producteur jusqu'au transformateur. L'objectif de ce travail est l'étude de l'incidence des facteurs endogènes (cellules somatiques, système plasmine-plasminogène) et des facteurs exogènes (bactéries) sur la caséinolyse. Ceci a été rendu possible grâce à des modèles expérimentaux de mammite *in vivo* à *E. coli* ou à LPS, et au modèle *in vitro* d'inoculation d'*E. coli* dans du lait cru.

La protéolyse dans le modèle *in vivo* à *E. coli* a permis d'établir une séquentialité de protéolyse où les cellules somatiques et les bactéries interviendraient entre 3 et 216 h PI, et une phase entre 15 et 33 h PI où la plasmine serait prédominante. Plusieurs fractions peptidiques appartenant à la fraction protéose peptones, sont présentes pendant la phase aigue de l'inflammation, dont deux peptides d'origine cellulaire. Dans ce modèle le rôle bactérien dans les mécanismes de la protéolyse est difficilement appréhendable. L'étude *in vitro* de la protéolyse d'origine bactérienne avec le modèle *E. coli*/lait a montré une interaction entre les bactéries, les protéases bactériennes et le système plasmine-plasminogène. Le second modèle *in vitro* protéases d'*E. coli*/caséines a quant à lui permis d'établir un ordre préférentiel de dégradation des caséines. Le modèle *in vivo* à LPS a montré que l'activité de la gélatinase dans la fraction constituée de cellules matures est plus importante que dans la fraction constituée de cellules immatures.

Mastitis is a frequently occurring pathological condition that is widely reported in dairy cow, affecting the whole field. The aim of this work is to investigate the endogenous proteolysis that includes mostly proteases of leukocytes and plasmin-plasminogen system in comparison with exogenous bacterial incidence on proteolysis of casein. The result of this study was possible owing to the feasibility of *in vivo* experimental mastitis using *E. coli* or endotoxin from *E. coli* and *in vitro* inoculation of *E. coli* strain in raw milk.

Proteolysis in *E. coli in vivo* model enabled proteolysis sequentiality to be achieved. Both somatic cell count and bacteria were involved. Between 3 and 216 h PI; from 15 to 33 h PI the plasmin role was preponderant. During inflammation, many peptide fractions including two of cellular origin were present in the proteose-peptones fraction. The role of *E. coli* in milk proteolysis, however remains to be elucidated. *In vitro* study of bacterial proteolysis with *E. coli* / milk model demonstrated an interaction between bacteria, bacterial proteases and the plasmin-plasminogen system. The second model involving *E. coli* proteases/casein highlighted a preferential order of caseinolysis. Furthermore, LPS experimental mastitis showed that the gelatinase activity associated with mature blood PMN is more notable than in the immature blood PMN.