



**HAL**  
open science

# Qualité protéique des laits à la production : facteurs de variation et recherche d'indicateurs de protéolyse

Yves Le Roux

## ► To cite this version:

Yves Le Roux. Qualité protéique des laits à la production : facteurs de variation et recherche d'indicateurs de protéolyse. Sciences agricoles. Institut National Polytechnique de Lorraine, 1994. Français. NNT : 1994INPL130N . tel-01776567

**HAL Id: tel-01776567**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01776567v1>**

Submitted on 24 Apr 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 Nationale supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires  
Laboratoire de Sciences Animales

**THESE**  
présentée à  
l'Institut National Polytechnique de Lorraine

en vue de l'obtention du  
**Doctorat de l'INPL**  
par

**Yves Le Roux**

Service Commun de la Documentation  
INPL  
Nancy-Brabois

**QUALITE PROTEIQUE DES LAITS A LA PRODUCTION :**  
**FACTEURS DE VARIATION ET**  
**RECHERCHE D'INDICATEURS DE PROTEOLYSE**

Soutenue publiquement le 28 Octobre 1994 devant la commission d'examen

**Membres du jury**

Gérard BRUIE (Rapporteur)

Hubert DEBIEVE (Examinateur)

Gérard HUBERT (Examinateur)

François LAURENT (Examinateur de Thèse)

Martin VERDENAL (Examinateur)

Bernard VIGNON (Président)



D 136 001368 0





INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE  
Ecole Nationale supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires  
Laboratoire de Sciences Animales

[M] 1994 LE ROUX, Y.

**THESE**

présentée à  
l'Institut National Polytechnique de Lorraine

en vue de l'obtention du  
**Doctorat de l'INPL**  
par

**Yves Le Roux**

**QUALITE PROTEIQUE DES LAITS A LA PRODUCTION :**  
**FACTEURS DE VARIATION ET**  
**RECHERCHE D'INDICATEURS DE PROTEOLYSE**

Soutenue publiquement le 28 Octobre 1994 devant la commission d'examen

Membres du jury

Gérard BRULE (Rapporteur)  
Hubert DELUYKER (Rapporteur)  
Gérard HUMBERT (Examineur)  
François LAURENT (Directeur de Thèse)  
Martin VERDENAL (Examineur)  
Bernard VIGNON (Président)

# **AVANT PROPOS**

## Avant-Propos

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Sciences Animales de l'ENSAIA en collaboration avec l'ULPL (Union Lorraine des Producteurs de Lait).

Je tiens à remercier tout particulièrement M. Bernard Vignon, Professeur de Sciences Animales à l'ENSAIA et président de ce jury. Il a su, durant ces quatre dernières années, aider, guider et comprendre mes choix. Ses conseils m'ont permis de franchir les obstacles que rencontre tout apprenti-chercheur. Qu'il trouve dans ces quelques mots l'assurance de ma réelle reconnaissance.

De même, je veux remercier M. François Laurent, Professeur de Génie des Systèmes Biologiques à l'INPL-ENSAIA, qui par sa justesse d'analyse, sa rigueur scientifique et la qualité du dialogue qui s'est instaurée, a permis l'aboutissement de ce travail.

Que M. Martin Verdenal, directeur de l'ULPL, et M. François Jacquemin, responsable du service développement-qualité à l'ULPL, soient remerciés pour le cofinancement de ce travail ainsi que pour leur implication quant aux objectifs de cette étude. Qu'à travers eux, soient remerciés tous les producteurs et tout le personnel de l'ULPL pour l'aide et l'accueil qu'ils m'ont réservés.

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

- M. Gérard Brûlé, Professeur de Technologie Alimentaire à l'ENSAR;
- M. Hubert Deluyker, Professeur d'Epidémiologie à la Faculté Vétérinaire de l'Université de Ghent;
- M. Gérard Humbert, Ingénieur de Recherche au Laboratoire de Biochimie Appliquée de l'Université Henri Poincaré à Nancy I. Je tiens à le remercier tout particulièrement pour les idées que nous avons pu échanger durant ce travail;

Merci à Odile Colin-Schoellen, Maître de Conférences au Laboratoire de Sciences Animales de l'ENSAIA, qui depuis mon DEA participe aux travaux relatifs à la protéolyse. Pas à pas, elle a su m'apporter son expérience et sa volonté d'aboutir. Je lui en suis très reconnaissant.

Merci aussi à Patricia Guinot-Thomas, Maître de Conférences à l'IUT de Biologie Appliquée de l'Université Henri Poincaré, Nancy I, pour avoir initié ce travail sur la protéolyse et pour son apport scientifique quant aux travaux portant sur la protéolyse d'origine microbienne.

Une partie de ce travail a été réalisée en collaboration avec le Laboratoire de Biochimie Appliquée de l'Université Henri Poincaré, Nancy I.

Je remercie M. le Professeur Guy Linden pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour les conseils qu'il m'a donnés. Que M. Jean-Michel Girardet, Ingénieur

d'Etude, trouve ici ma réelle gratitude, son savoir scientifique et technique associé à une grande volonté ont permis de faire aboutir les travaux portant sur la fraction protéose peptones.

Je voudrais remercier M. Yves Gillet, responsable de la halle de technologie à l'ENSAIA et M. Stefan Jurjanz, Ingénieur d'Etude au Laboratoire de Sciences Animales de l'ENSAIA, pour leur collaboration scientifique et technique.

Je remercie aussi chaleureusement l'ensemble des enseignants, chercheurs et techniciens ayant participé à ce travail. Que Mme Laurent, secrétaire du Laboratoire trouve ici ma reconnaissance.

Le dernier, mais pas le moindre de mes remerciements, est pour Laure qui par sa présence et son aide a contribué à l'avancement de ce travail mais aussi à rendre moins difficiles certaines périodes laborieuses. Merci à toi.

## ABREVIATIONS

ANP : Azote Non Protéique  
ATP : Adénosine Triphosphate  
C : Rapport du pourcentage de la masse de bisacrylamide sur la masse d'acrylamide + bisacrylamide  
DDL : Degrés de Libertés  
ETR : Ecart-type résiduel  
FIL : Fédération Internationale de Laiterie  
FPLC : Fast Protein Liquid Chromatography  
GLM : General Linear Model  
HPLC : High Performance Liquid Chromatography  
kDa : KiloDalton  
K20 : Temps d'obtention de la fermeté standard mesuré par Formagraph  
MS : Matière Sèche  
Ncas : Azote Caséique  
Nsol : Azote Soluble  
NT : Azote Total  
PAGE : Polyacrylamide Gel Electrophorese  
PAGE-SDS : PAGE-Sodium Dodecyl Sulfate  
PAGE-2D : PAGE bidimensionnelle  
r : Coefficient de corrélation  
 $r^2$  : Coefficient de détermination  
R : Temps de coagulation mesuré par Formagraph  
SAS : Statistical Analysis System  
T : Rapport en % de la masse d'acrylamide + bisacrylamide sur le volume du gel  
TNBS : Acide 2.4.6. Trinitrobenzène Sulfonique  
TPP : Teneur en protéose peptones  
TP : Taux Protéique  
TB : Taux Butyreux

## RESUME

Une meilleure connaissance des réelles incidences des types de protéolyse dans le lait, associée à la recherche d'indicateurs pourrait permettre de diminuer le risque de dégradation des protéines et d'effectuer un tri du lait pour les fabrications sensibles.

Les objectifs du travail sont :

- Mesurer l'incidence de la protéolyse microbienne en fonction de différents niveaux de contamination,
- Etudier les facteurs de variation de la protéolyse endogène,
- Etudier les interactions entre ces deux types de protéolyse,
- Caractériser un ou des indicateurs de protéolyse, témoins de la dégradation des protéines du lait.

Des contaminations de  $10^6$  germes/ml n'induisent pas de baisses des rendements fromagers, ni des défauts de goût en transformation de type pâte molle. La protéolyse microbienne, mesurée par une diminution du pourcentage en k-caséines, n'est significative que pour des contaminations supérieures à  $10^7$  germes/ml, niveau obtenu après 144 heures de stockage à 4°C.

Le stockage du lait au froid pendant plusieurs jours induit des phénomènes protéolytiques endogènes d'autant plus intenses que le dénombrement cellulaire initial est important.

La protéolyse endogène, mesurée par augmentation du pourcentage des  $\gamma$ -caséines ou de la teneur en protéose peptones, est significative pour des laits de quartier à faibles dénombrements cellulaires (< 250 000 cellules/ml).

Aucune interaction entre protéolyse endogène et microbienne n'a été observée.

Le dénombrement cellulaire n'est pas un indicateur précis de l'intensité de la protéolyse dans les laits de quartier ou individuels, par contre, les variations de cette protéolyse peuvent être expliquées par la mesure combinée de la teneur en chlorures, du pH et du nombre de cellule ( $r^2 = 0,77$ ).

La teneur en protéose peptone, contrairement à la mesure de la teneur en acides  $\alpha$ -aminés libres par l'acide 2,4,6 trinitrobenzène sulfonique, est une mesure sensible de la protéolyse microbienne et endogène.

Le composant  $\beta$ -caséine-1P (f 29-105/107) de la fraction protéose peptones s'avère un très bon indicateur de la protéolyse endogène dans les laits de quartier.



# SOMMAIRE

---

**Introduction générale**
**PREMIERE PARTIE**
**SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

<b>Introduction</b>	13
<b>1 Facteurs de variation de la protéolyse du lait</b>	15
<b>1.1 Facteurs de variation de la protéolyse microbienne</b>	16
1.1.1 Les micro-organismes du lait	16
1.1.1.1 Flore du lait	16
1.1.1.1.1 Flore originelle présente dans la mamelle	16
1.1.1.1.2 Flore exogène de contamination	16
1.1.1.1.3 Multiplication de la flore originelle et exogène	17
1.1.1.2 Flore psychrotrophe	17
1.1.1.2.1 Facteurs influençant la croissance de la flore psychrotrophe	18
- Temps de génération, remontées de température	18
- Phase de latence	18
- Charge initiale	18
1.1.1.2.2. Conclusion	18
1.1.1.3 Autres flores	19
1.1.1.3.1 Flore lactique	19
1.1.1.3.2 Flore thermorésistante	19
1.1.1.3.3 Flore pathogène	19
1.1.1.4 Conclusion	20
1.1.2 Protéases des bactéries psychrotrophes	21
1.1.2.1 Introduction	21
1.1.2.2 Relation croissance bactérienne et production de protéases	21
1.1.2.3 Propriétés et spécificités des protéases bactériennes	22
- Propriétés	22
- Spécificités	22
1.1.2.4 Conclusion	24
<b>1.2 Facteurs de variation de la protéolyse endogène</b>	24
1.2.1 Protéases d'origine somatique	24

1.2.2 La protéase alcaline (plasmine)	26
1.2.2.1. Distribution	26
- Système plasmine-plasminogène	26
- Activateurs, inhibiteurs	26
1.2.2.2 Spécificités et propriétés de la protéase alcaline	27
- Spécificités	27
- Propriétés	27
1.2.2.3 Facteurs de variation de l'activité plasminique	29
- variations individuelles	29
- Stade et numéro de lactation	29
- Race	29
- Variant de la $\beta$ -lactoglobuline	30
- Etat sanitaire de la mamelle	30
- Effet de l'injection de somatotropine	30
- Alimentation	30
1.2.2.4 Conclusion	31
<b>2 Conséquences technologiques de la protéolyse du lait</b>	<b>31</b>
<b>2.1 Protéolyse dans le lait U.H.T.</b>	<b>32</b>
2.1.1 Influence de la plasmine	32
2.1.2 Influence des protéases microbiennes	32
<b>2.2 Protéolyse dans le lait pasteurisé</b>	<b>33</b>
2.2.1 Influence de la plasmine	33
2.2.2 Influence des protéases microbiennes	33
<b>2.3 Protéolyse et transformations fromagères</b>	<b>34</b>
2.3.1 Pâtes pressées	35
2.3.1.1 Cheddar	35
2.3.1.1.1 Protéolyse d'origine endogène	35
- Influence de la plasmine	35
- Influence du dénombrement cellulaire du lait	35
2.3.1.1.2 Protéolyse d'origine microbienne	36
2.3.1.2 Emmental	36
2.3.1.2.1 Influence de la plasmine	36
2.3.1.2.2 Influence des bactéries se développant lors du stockage	36
2.3.2 Pâtes molles	37
2.3.2.1 Protéolyse plasminique	37
2.3.2.2 Protéolyse d'origine microbienne	37
2.3.3 Fromage blanc	38
2.3.4 Telem Cheese	38
<b>2.4 Conclusion</b>	<b>38</b>

<b>3 Indicateurs et méthodes d'estimation de la protéolyse dans le lait</b>	<b>38</b>
<b>3.1 Méthodes d'estimation de la protéolyse microbienne</b>	<b>39</b>
3.1.1 Estimation du potentiel protéolytique du lait à partir de sa qualité bactériologique	40
3.1.1.1 Méthodes basées sur l'activité métabolique des bactéries	40
3.1.1.1.1 Méthodes traditionnelles	40
- Méthodes colorimétriques	40
- Autres méthodes	40
- Conclusion	40
3.1.1.1.2 Nouvelles méthodes	40
- Microrespirométrie	41
- Conductimétrie	41
- Cytochrome oxydase	41
- ATP bactérien	41
3.1.1.2 Comptage direct ou indirect du nombre de bactéries	42
3.1.1.2.1 Comptage direct	42
3.1.1.2.2 D.E.F.T.	42
3.1.1.2.3 Test Limulus (LAL)	43
3.1.2 Méthodes basées sur la détection des produits de dégradation de la protéolyse microbienne	43
3.1.2.1 Teneur en acide sialique (N-acétylneuraminique)	43
3.1.2.2 Mesure de la dégradation de la $\kappa$ -caséine par électrophorèse	
3.1.2.3 Méthodes de détection de la para- $\kappa$ -caséine	44
3.1.2.3.1 Méthodes immunologiques	44
3.1.2.3.2 Autre méthode	45
3.1.3 Méthodes de détection de l'activité des protéases par l'utilisation de substrats spécifiques	45
3.1.3.1 Méthode H.P.A (Hyde Powder Azur)	45
3.1.3.2 Mesure des protéases	45
3.1.3.3 Autres méthodes	45
3.1.4 Détection de modifications chimiques du milieu : le test à l'alcool	46
<b>3.2 Méthodes d'estimation de la protéolyse endogène</b>	<b>46</b>
3.2.1 Méthodes indirectes d'estimation de la protéolyse endogène	46
3.2.1.1 Dénombrement cellulaire, conductivité électrique	46
3.2.1.2 Activité enzymatique	47
3.2.2 Méthodes directes d'estimation de la protéolyse endogène	47
3.2.2.1 Méthodes électrophorétiques	47
3.2.2.2 Méthodes chromatographiques	47
3.2.2.3 Méthodes immunologiques	47
<b>3.3 Méthodes de détection de la protéolyse globale</b>	<b>48</b>
3.3.1 Méthodes chimiques	48
3.3.1.1 Mesure de l'azote non protéique	48
3.3.1.2 Mesure de la teneur de la fraction protéose peptones	48

3.3.2 Méthodes spectrophotométriques basée sur la détection de produits de dégradation non spécifiques	49
3.3.2.1 Mesure de l'absorption à 280 nm	49
3.3.2.2 Méthode de Lowry	49
3.3.2.3 Méthode à la ninhydrine	49
3.3.2.4 Dosage des groupements $\alpha$ -aminés par la technique TNBS	50
3.3.2.5 Méthode à la fluoescamine	50
3.3.2.6 Méthode à l' <i>o</i> -phthalaldehyde (OPA)	51
3.3.3 Méthode spectrophotométrique basée sur la détection de l'activité des protéases par utilisation de la fluoescéine isothiocyanate liée à la caséine	
3.3.4 Autres méthodes	51
3.3.4.1 Méthodes chromatographiques	51
3.3.4.2 Utilisation de la radioactivité	51
3.3.4.3 Méthode cinétique avec inhibition	52
3.3.4.4 Utilisation de peptides synthétiques	52
<b>3.4 Conclusion</b>	<b>52</b>
<b>Conclusion</b>	<b>54</b>

## DEUXIEME PARTIE

### MATERIEL ET METHODES

<b>1 Méthodes</b>	<b>55</b>
1.1 Dénombrements bactériens	55
1.2 Taux Protéique (TP), Taux Butyreux (TB), dénombrement cellulaire, teneur en acides gras libres	55
1.3 pH et teneur en chlorures	55
1.4 Détermination de la nature et de la teneur des matières azotées du lait	55
1.5 Pourcentage des différentes caséines	56
1.6 Teneur en azote et nature de la fraction protéose peptones	56
1.6.1 Teneur en azote de la fraction protéose peptones	56
1.6.2 Nature de la fraction protéose peptones	56
1.7 Concentration en calcium colloïdal	56
1.8 Temps de coagulation (R) et temps d'obtention de la fermeté standards (K20)	
1.9 Dosage des groupements $\alpha$ -aminés par la technique TNBS	57
1.10 Dosage de l'activité de la plasmine et de la teneur en plasminogène	57
1.11 Fabrication fromagère	57
1.12 Techniques électrophorétiques	58
1.12.1 Electrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions non dénaturantes (PAGE-native)	58
1.12.2 Electrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (PAGE-SDS)	59
1.12.3 Electrophorèse bidimensionnelle (PAGE-2D)	59
1.12.4 Révélation des gels d'électrophorèse	59

1.12.5 Transfert des protéines par Western-Blot	59
1.13 Composition en acides aminés	60
1.14 Séquençage des acides aminés	60
<b>2 Origines des laits, analyses effectuées, traitements des données</b>	<b>60</b>
<b>2.1 Etude de la protéolyse microbienne</b>	<b>60</b>
2.1.1 Influence de la contamination microbienne, de la température et de la durée de stockage sur la protéolyse du lait.	60
2.1.2 Influence de l'allongement de la durée de stockage du lait à la ferme sur sa qualité bactériologique.	62
<b>2.2 Etude de la protéolyse endogène</b>	<b>63</b>
2.2.1 Incidence de la protéolyse endogène dans des laits à différents niveaux cellulaires, mesure d'indicateurs sur 86 laits de quartier	63
2.2.2 Relation entre le dénombrement cellulaire et des indicateurs directs et indirects de la protéolyse endogène sur laits de mélange des quatre quartiers	65
<b>2.3 Interactions protéolyse microbienne-protéolyse endogène</b>	<b>66</b>
2.3.1 Influence des protéases microbiennes sur l'activité de la plasmine	66
2.3.2 Influence du dénombrement cellulaire, de la contamination microbienne et de la durée de stockage sur la protéolyse du lait	68

## TROISIEME PARTIE

### RESULTATS et DISCUSSION

<b>I PROTEOLYSE MICROBIENNE</b>	<b>70</b>
<b>1. Influence de la contamination microbienne, de la température et de la durée de stockage sur la protéolyse du lait</b>	<b>70</b>
1.1 Caractéristiques microbiologiques des laits étudiés	70
1.2 Evolution du pH	71
1.3 Evolution de la teneur en azote non protéique et en azote caséique des laits	
1.4 Evolution des différentes caséines	71
1.5 Activité plasminique	72
1.6 Teneur en protéose peptones	73
1.7 Mesure des groupements $\alpha$ -aminés libres par la technique TNBS	73
1.8 Temps de coagulation (R) mesuré par Formagraph	73
1.9 Temps d'obtention de la fermeté standard (K20) mesuré par Formagraph	73
1.10 Transformations fromagères	73
1.11 Indice de lipolyse : mesure des acides libres (A.G.L.)	75



1.12 Conclusion	76
<b>2 Influence de l'allongement de la durée de stockage du lait à la ferme sur sa qualité bactériologique</b>	<b>76</b>
2.1 Evolution de la flore mésophile	76
2.2 Variations du pourcentage de la flore psychrotrophe	76
<b>II PROTEOLYSE ENDOGENE</b>	<b>77</b>
<b>1 Incidence de la protéolyse endogène dans des laits à différents niveaux cellulaires, mesure d'indicateurs sur 86 laits de quartier</b>	<b>77</b>
1.1 Relation entre indicateurs directs et indirects de la protéolyse endogène	78
1.1.1 Corrélations totales	78
1.1.2 Corrélations pour les laits à moins de 250 000 cellules/ml	78
1.1.3 Corrélations pour les laits à plus de 250 000 cellules/ml	78
1.2 Variations intra-individuelles de la composition du lait de quartier	78
1.3 Etude des composants de la fraction protéose peptones	80
1.3.1 Teneurs des composants de la fraction protéose peptones	80
1.3.2 Caractérisation du composant 3 et identification du peptide 4	80
1.4 Conclusion	81
<b>2. Relation entre le dénombrement cellulaire et des indicateurs directs et indirects de la protéolyse endogène sur laits de mélange des quatre quartiers</b>	<b>81</b>
2.1 Caractéristiques moyennes des laits analysés	82
2.2 Liaison entre les variables	82
<b>III INTERACTIONS PROTEOLYSE MICROBIENNE-PROTEOLYSE ENDOGENE</b>	<b>82</b>
<b>1. Influence des protéases microbiennes sur l'activité de la plasmine</b>	<b>82</b>
1.1 Evolution de la croissance microbienne	82
1.2 Evolution du pH	82
1.3 Activité de la plasmine, activation du plasminogène	83
1.4 Evolutions des indicateurs de protéolyse	84
1.4.1 Teneur en azote caséique et en azote non protéique	84
1.4.2 Mesure des groupements $\alpha$ -aminés libres par la technique TNBS	85
1.4.3 Pourcentage des différentes caséines	85
1.4.4 Teneur et nature de la fraction protéose peptones	85
1.4.5 Conclusion	85
1.5 Teneur en calcium colloïdal	86

<b>2 Influence du dénombrement cellulaire, de la contamination microbienne et de la durée de stockage sur la protéolyse du lait</b>	<b>86</b>
2.1 Evolution de la croissance microbienne	86
2.2 Evolution du pH	86
2.3 Activité de la plasmine	86
2.4 Teneur en protéose peptones	87
2.5 Pourcentage des différentes caséines	88

## QUATRIEME PARTIE

### DISCUSSION GENERALE

<b>1 PROTEOLYSE MICROBIENNE</b>	<b>90</b>
1.1 Indicateurs et facteurs de variation de la protéolyse microbienne	91
1.1.1 Niveaux microbiens et protéolyse	91
1.1.2 Influence de la température, de la durée de stockage et de la charge initiale	91
1.1.3 Conclusion	91
1.2 Protéolyse microbienne : applications	92
1.2.1 Niveaux microbiens, durée et température de stockage	92
1.2.2 Interférences avec "l'âge moyen du lait"	92
1.2.3 Incidences sur le paiement du lait	93
<b>2 PROTEOLYSE ENDOGENE</b>	<b>94</b>
2.1 Indicateurs et facteurs de variation de la protéolyse endogène	94
2.1.1 Intérêt des indicateurs directs de protéolyse endogène	94
2.1.1.1 Indice de protéolyse, activité plasminique teneur en protéose peptones	94
2.1.1.2 Composant 3	95
2.1.1.3 Composant $\beta$ -CN-1P (f29-105/7)	95
2.1.1.4 Conclusion	96
2.1.2 Relations entre indicateurs indirects et indicateurs directs de la protéolyse endogène	96
2.1.2.1 Dénombrement cellulaire	96
2.1.2.2 pH, teneur en chlorures	96
2.1.3 Effet de la durée de conservation sur la protéolyse endogène	97
2.1.4 Conclusion	97
2.2 Protéolyse endogène : applications	97
2.2.1 Méthodes indirectes	97
2.2.2 Paiement du lait	98
2.2.3 Gestion du troupeau	98

<b>3 INDICATEURS DE PROTEOLYSE MICROBIENNE ET ENDOGENE</b>	98
<b>CONCLUSION GENERALE</b>	100
<b>ANNEXES</b>	102
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	116
<b>PUBLICATIONS et COMMUNICATION</b>	133

# **INTRODUCTION GENERALE**

## INTRODUCTION GENERALE

Qu'est ce qu'un lait de bonne qualité ? Vouloir répondre à cette question apparaît au moins aussi difficile que prétentieux. En effet, le lait, matière première d'une industrie où la notion de qualité est primordiale, doit pouvoir être produit, conservé et transporté jusqu'à son lieu de transformation dans des conditions optimales.

La première qualité du lait est avant tout sa qualité sanitaire, c'est à dire sa capacité à être consommé sans danger pour l'homme. Cet aspect, certes très important, ne sera pas abordé dans ce travail. Les autres qualités du lait sont plus directement liées à sa composition. En effet, les protéines, les matières grasses, les minéraux et les vitamines peuvent varier quantitativement et qualitativement en fonction des conditions de production, de conservation et de transformation. Au-delà, la qualité technologique est économiquement importante pour la filière.

La teneur en protéines du lait (le taux protéique), ses caractéristiques de coagulation et les rendements fromagers sont étroitement interdépendants (Colin et al., 1992). De plus, la dégradation des protéines, à l'origine de pertes de rendement fromager, de difficultés de transformation et de défauts de goût, est actuellement une préoccupation de la filière laitière régionale car elle induit des coûts importants de non-qualité. Il conviendrait d'assurer, tout au long de la chaîne de production, un lait d'une qualité constante et "objectif" correspondant au besoin de la filière lait lorraine, dirigée en particulier sur les productions fromagères.

Les sources de dégradation des protéines du lait sont multiples :

- La dégradation de l'état sanitaire de la mamelle, l'augmentation du stade et du numéro de lactation provoquent une dégradation de la qualité des protéines du lait et notamment des caséines.
- La conservation du lait au froid pendant plusieurs jours induit une protéolyse consécutive à la production de protéases microbiennes par la flore psychrotrophe, mais aussi une solubilisation des  $\beta$ -caséines rendues ainsi plus accessibles à l'action hydrolytique de la plasmine.

Une meilleure connaissance de la réelle incidence de ces sources de protéolyse, devrait permettre de diminuer les risques de dégradation des protéines, de la production à la transformation. Actuellement, aucun indicateur du potentiel protéolytique et du niveau de protéolyse du lait n'est compatible avec les besoins de la filière laitière, c'est-à-dire, simple d'utilisation, rapide, sensible, automatisable et enfin de faible coût. La caractérisation d'un ou plusieurs indicateurs de protéolyse pourrait permettre sur des laits individuels, des laits de tank ou des laits de grands mélanges, un tri à la ferme ou à l'usine, afin d'éliminer les laits à haut potentiel protéolytique pour les fabrications sensibles.

Ce travail comporte deux grandes parties :

- Une description de l'état des connaissances sur les différentes origines de la dégradation des protéines du lait et leurs conséquences sur les produits laitiers (en particulier les fromages, le lait U.H.T. et pasteurisé) est réalisée ainsi qu'un inventaire des méthodes de détection de la protéolyse.

- Des données expérimentales qui permettent de :

- Préciser l'importance et l'incidence de la protéolyse d'origine microbienne en relation avec les progrès de l'hygiène à la production observés ces 20 dernières années et ainsi définir des seuils microbiens permettant d'assurer une qualité microbiologique compatible avec les exigences de la filière laitière.

- Mesurer l'incidence de la protéolyse d'origine endogène dans des laits individuels et des laits de mélange.

- Etudier les interactions entre protéolyse endogène et microbienne

- Caractériser puis valider un ou plusieurs indicateurs de protéolyse du lait dans les conditions de production au niveau des exploitations.



## SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

### INTRODUCTION

La connaissance des propriétés et des facteurs de variation des protéases rencontrées dans le lait, ainsi que leurs conséquences sur la qualité des produits laitiers, est indispensable à une compréhension globale des phénomènes protéolytiques existant dans le lait.

La protéolyse d'origine microbienne a fait l'objet de très nombreux travaux portant en particulier sur la caractérisation des bactéries rencontrées dans le lait, ainsi que sur les propriétés des protéases synthétisées par ces micro-organismes. D'autres travaux, tout aussi nombreux, portent plus particulièrement sur l'étude de la plasmine (protéase alcaline), enzyme principale impliquée dans les phénomènes protéolytiques endogènes.

Dans cette étude bibliographique, les éléments les plus significatifs et les plus récents quant aux origines et aux conséquences de la protéolyse dans le lait seront développés, puis seront abordées la présentation et la comparaison des méthodes de détection de cette protéolyse.

## 1 FACTEURS DE VARIATION DE LA PROTEOLYSE DU LAIT

### 1.1 Facteurs de variation de la protéolyse microbienne

#### 1.1.1 Les micro-organismes du lait

Les différents groupes de micro-organismes présentés ci-dessous n'obéissent pas à une taxonomie rigoureuse, les souches microbiennes du lait ont été regroupées en fonction de leurs origines, leurs caractéristiques de croissance et leurs pouvoirs pathogènes (une même souche bactérienne peut donc se trouver dans plusieurs groupes). Ce type de classification permet de cibler plus précisément un groupe microbien, qui, en fonction des conditions de production et de transformation, est source de problèmes particuliers.

##### 1.1.1.1 Flore du lait

La flore du lait a trois origines principales :

###### 1.1.1.1.1 Flore originelle présente dans la mamelle

Dans le cas d'une mamelle saine, un lait prélevé stérilement contient moins de 1000 germes/ml. Ceux-ci proviennent de la colonisation du trayon par de nombreuses souches bactériennes (*Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium* etc.).

Dans le cas d'une mammite subclinique (pas de signe extérieur d'inflammation de la mamelle et aucune dégradation visible de la qualité du lait), une prédominance de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* et *Streptococcus uberis* est observée. Le nombre de germes dans le lait peut dépasser 10 000/ml et exceptionnellement 50 000 /ml.

Dans le cas de mammites cliniques (la mamelle présente des caractéristiques visibles d'inflammation et l'aspect du lait est modifié), le quartier mammiteux peut excréter plus de 10 millions de germes/ml (*Mycobacterium*, *Salmonella*, *Listeria* etc.).

###### 1.1.1.1.2 Flore exogène de contamination

Il s'agit essentiellement d'une flore présente sur la peau des trayons, apportée pendant la traite. Cette flore a différentes origines : sol, litière, eau, fourrages. Le nombre de ces germes peut dépasser 100 000/ml si les trayons sont sales et mal lavés.

### 1.1.1.1.3 Multiplication de la flore originelle et exogène

Le lait est un milieu favorable au développement de l'ensemble des bactéries présentes. Cette multiplication dépendra de plusieurs facteurs qui agiront dans le sens de la sélection d'une flore spécifique : une température d'eau de nettoyage du matériel de traite et du tank insuffisante sélectionnera une flore thermorésistante (*Micrococcus*, *Microbacterium*), l'absence de nettoyage sélectionnera surtout les bactéries coliformes, un lait non refroidi verra le développement d'une flore lactique et, enfin, la réfrigération du lait favorisera la multiplication des bactéries psychrotrophes (*Pseudomonas fluorescens* en particulier).

La flore mésophile, du fait de sa méthode de détection, est une flore spécifique car elle exclut du dénombrement les clostridies anaérobies strictes (notamment la flore butyrique), et sous-estime les psychrophiles et thermophiles ainsi que les mauvais compétiteurs (certains pathogènes comme *Staphylococcus*).

### 1.1.1.2 Flore psychrotrophe

Les psychrotrophes ne constituent pas un groupe taxonomique spécifique. Eddy (1960) en propose une définition : "les psychrotrophes sont des micro-organismes qui peuvent se développer à une température égale ou inférieure à 7°C, indépendamment de leur température optimale de croissance". Le nom et la définition relative aux psychrotrophes ont été retenus par la F.I.L. en 1968. De nombreux genres ont été isolés : Gram +, Gram -, coques, bâtonnets, vibrions, aérobies ou non, sporulants ou non etc..

Ubiquitaires, les psychrotrophes sont trouvés dans l'eau, le sol, l'air et les végétaux. Un matériel de traite insuffisamment nettoyé est à l'origine de fortes contaminations en bactéries psychrotrophes, résistantes aux détergents (Thomas et Thomas, 1973). Actuellement, les méthodes de nettoyage permettent de limiter ce type de contamination en deçà de  $10^4$  germes/ml. Certains coliformes étant psychrotrophes (*Enterobacter*), des contaminations par les fèces des animaux peuvent être observées. Toutefois, ce type de contamination reste mineur. Pour Cousin (1982), un lait produit dans de bonnes conditions d'hygiène contient moins de 10% de bactéries psychrotrophes contre 75% dans de mauvaises conditions.

L'apparition des méthodes de conservation du lait au froid, depuis une vingtaine d'années, a favorisé le développement de la flore psychrotrophe aux dépens, notamment, de la flore lactique des laits destinés à la transformation. En effet, la flore psychrotrophe n'est pas majoritaire dans la flore du lait cru mais le devient rapidement durant le stockage au froid. Deux groupes sont dominants : le genre *Pseudomonas* (40 à 65 %, notamment *Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas putida*) et les genres *Acinetobacter* et *Alcaligene* (anciennement regroupés dans le genre *Achromobacter*). Sont trouvées aussi de nombreuses autres espèces mais de façon non systématique : *Serratia liquefaciens*, *Citrobacter freundii* et *Hafnia alvei*. On notera quelques bactéries Gram + : *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Lactobacillus* et *Streptococcus* du groupe D (Richard, 1992). Certaines bactéries psychrotrophes peuvent sporuler (*Bacillus cereus*) et résister à la plupart des traitements thermiques. On trouve également des souches pathogènes (*Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*...)

Tableau 1 : Probabilité d'atteindre  $5.10^6$  germes/ml en fonction de la charge initiale, de la température et de la durée de stockage (adapté de Muir, 1981).

Durée de stockage	Charge initiale (/ml)	Temps de génération théorique (heures) pour atteindre $5.10^6$ germes/ml.	Probabilité de dépasser $5.10^6$ germes/ml		
			4°C	6°C	8°C
24 h	50 000	3,61	0	0	0
	100 000	4,25	0	0	0
	150 000	4,74	0	0	0,03
	200 000	5,17	0	0,02	0,08
	250 000	5,55	0,03	0,04	0,15
48 h	5 000	4,80	0	0	0
	15 000	5,73	0,03	0,07	0,20
	25 000	6,28	0,06	0,15	0,34
	50 000	7,22	0,17	0,31	0,64
	100 000	8,5	0,34	0,65	0,84
72 h	250	5,04	0	0,02	0,07
	500	5,42	0,02	0,03	0,14
	1000	5,86	0,05	0,09	0,21
	2000	6,38	0,07	0,16	0,36
	5000	7,22	0,17	0,31	0,64

### 1.1.1.2.1 Facteurs influençant la croissance de la flore psychrotrophe

La multiplication de la flore psychrotrophe dans le lait dépend de plusieurs facteurs.

#### - Temps de génération, remontées de température

Les temps de génération des bactéries psychrotrophes sont voisins et dépendent de la température de conservation. Ils dépassent 24 h à 0-2°C (25 à 30 h pour les *Pseudomonas*), sont de 5 à 10 h à 4-6°C et de l'ordre de 1 à 2 h à 20°C (Cousin, 1982). Des équations prédictives mesurant la probabilité de dépasser  $5.10^6$  germes/ml (seuil bactérien pouvant induire une dégradation de la qualité du lait) ont été calculées par Muir (1984). Pour plusieurs niveaux de contamination initiale ( $10^3$  à  $2.10^5$  germes/ml) et pour des durées et des températures différentes de stockage, un temps de génération théorique est calculé pour atteindre  $5.10^6$  germes/ml, ensuite la probabilité de rencontrer ce temps de génération théorique est calculée (tableau 1). Une réduction moyenne significative de 0,9 h (8,8 h contre 9,7 h) du temps de génération des bactéries lactose-négatives, assimilables au genre *Pseudomonas*, est observée entre des laits refroidis normalement et des laits subissant une remontée de température à 15°C en 1 h et un retour à 4°C en 1 h, après 15 h de conservation à 4°C (Richard et al., 1988). Cette réduction du temps de génération résulterait d'une adaptation du métabolisme des bactéries, par notamment, une augmentation de la perméabilité cellulaire et de l'activité enzymatique, qui améliorerait l'utilisation des nutriments du milieu de culture.

#### - Phase de latence

La durée de la phase de latence de la flore psychrotrophe est très variable, comprise entre 1,5 et 4,2 jours, en fonction de la composition moyenne de la flore des laits. La durée de cette phase est d'autant plus courte que le délai de refroidissement du lait est élevé (Mourgues et al., 1967).

#### - Charge initiale

Plusieurs auteurs (Durr, 1974; Mourgues et al., 1967) ont montré que la croissance de la flore psychrotrophe est d'autant plus rapide que la charge initiale est élevée. En effet, le pourcentage de germe en phase de croissance active est généralement plus important dans un lait à nombre de germes élevé (Flückiger cité par Mottar, 1984 a).

### 1.1.1.2.2 Conclusion

L'étude précise du développement de la croissance de la flore psychrotrophe passe nécessairement par la mesure, ou l'estimation, des facteurs définis ci-dessus : temps de génération moyen (variable en fonction de la température de conservation), durée moyenne de la phase de latence, charge initiale en bactéries, remontée de

température et phénomène de dilution. La modélisation de la croissance de la flore psychrotrophe du lait comporte de trop nombreux paramètres pour pouvoir être fiable et complète. Il conviendrait donc, de mesurer cette croissance en conditions de production, en contrôlant les principaux facteurs de variation afin de pouvoir les hiérarchiser.

### 1.1.1.3 Autres flores

#### 1.1.1.3.1 Flore lactique

La flore lactique sauvage est non contrôlée, à l'opposé des levains lactiques utilisés dans l'industrie. Cette flore sauvage (*Lactobacillus* et *Streptococcus*, en particulier) se compose de bactéries lactiques homofermentaires (transformant le lactose exclusivement en acide lactique) et de bactéries lactiques hétérofermentaires (indésirables car transformant le lactose en acide lactique mais aussi en acide acétique, alcools et gaz). Les souches sauvages peuvent être porteuses de virus bactériophages capables d'inhiber la fermentation lactique issue des levainsensemencés. Entre 12 et 30°C et si elles sont en assez grand nombre, les bactéries lactiques sont capables de coloniser le lait en quelques heures. En effet, leur capacité à acidifier le lait empêche le développement des autres germes. Cette acidification du lait est positive pour certaines transformations, mais ne doit pas entraîner une dégradation trop importante de la qualité du lait. La flore lactique n'est pas à caractère psychrotrophe, c'est pourquoi, le développement des systèmes de conservation du lait au froid limite, actuellement, les problèmes posés cette flore.

#### 1.1.1.3.2 Flore thermorésistante

Une bactérie est dite thermorésistante si elle survit au moins à la pasteurisation (c'est à dire à des températures de 70-74°C appliquée pendant quelques dizaines de secondes). Cette résistance permet un développement et une multiplication dans les produits laitiers et peut entraîner une dégradation de leurs qualités technologiques et organoleptiques.

#### 1.1.1.3.3 Flore pathogène

C'est une flore dont la persistance et/ou le développement dans le lait et les produits laitiers constituent un risque pour la santé du consommateur. Pratiquement tous les groupes de bactéries décrits ci-dessus comportent des souches pathogènes (principalement : *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli*..). Le risque pour la santé humaine provient de la conjonction de trois facteurs : le pouvoir pathogène de la bactérie, la concentration de toxine ingérée (liée au nombre de bactéries présentes) et la résistance de l'individu (liée à l'efficacité du système immunitaire). Les seuils de contamination à risques sont beaucoup plus faibles que pour une contamination ayant pour origine une flore commune.



Les origines de la flore pathogène sont très variées mais chaque souche a une voie d'entrée préférentielle dans le lait. Ces bactéries, sauf celles qui sporulent (*Bacillus cereus* et *Clostridium perfringens*), sont toutes sensibles à la chaleur et sont détruites à la pasteurisation. De plus, les bactéries pathogènes sont rapidement concurrencées par les ferments lactiques utilisés en laiterie.

#### 1.1.1.4 Conclusion

La contamination du lait et des produits laitiers par des micro-organismes présente deux implications majeures :

- pour des niveaux de contaminations importants, les bactéries sont des agents d'altération donnant des produits indésirables par acidification, protéolyse ou lipolyse.
- la flore pathogène même à des niveaux faibles de contamination, présente un danger pour la santé humaine.

Chatelin et Richard (1981), Richard (1981) ont tenté de déterminer, à partir du profil microbien de laits de tank, l'origine de l'altération de la qualité bactériologique du lait. Les conclusions montrent qu'il est difficile, hormis une faute flagrante d'hygiène, de prévoir un profil microbien moyen, deux exploitations de même type pouvant présenter des profils très différents. Par contre, quelques grandes lignes peuvent être dégagées : durant la traite, des mamelles mal lavées provoquent une augmentation de la flore mésophile, des germes psychrotrophes ainsi que des bactéries thermorésistantes (mais pas les coliformes); une machine à traire mal nettoyée entraîne une prépondérance de thermorésistants et une installation de traite défectueuse peut favoriser le développement de coliformes.

Le développement du refroidissement du lait à la ferme, a renforcé l'impact de la flore psychrotrophe qui tend à poser le plus de problèmes. Si l'abaissement du niveau de contamination dans les laits collectés, entraîne une amélioration globale de la qualité microbiologique des laits, la flore psychrotrophe est souvent à l'origine de la dégradation de la qualité protéique des laits. Les bactéries psychrotrophes protéolytiques sont en particulier responsables de la baisse des rendements fromagers et de l'apparition des goûts amers dans les produits laitiers.

## 1.1.2 Protéases des bactéries psychrotrophes

### 1.1.2.1 Introduction

De nombreuses souches de bactéries psychrotrophes sont capables de synthétiser des protéases exocellulaires. La connaissance de leurs propriétés et de leurs spécificités est nécessaire afin de mieux apprécier quelles peuvent être les conséquences de l'action de ces enzymes sur les protéines du lait.

Deux très importantes synthèses bibliographiques effectuées par Cousin (1982) et Fairbairn et Law (1986) et de très nombreuses études, concernent l'activité protéolytique de souches pures psychrotrophes. Cependant, ces résultats ne sont pas ou peu applicables à une flore moyenne représentative de la flore psychrotrophe du lait.

Dans le lait, le pourcentage de germes psychrotrophes protéolytiques est compris entre 8 % pour Poffé et Mertens (1988), 17 % pour Reinheimer et al. (1990), 39 % pour So et al. (1992) et plus de 85% pour Garcia et al. (1989). Ces pourcentages sont très variables et fonctions de nombreux paramètres : sources de contamination potentielle (sol, eau, nourriture, hygiène de traite), mode de conservation du lait et méthode de nettoyage du matériel de traite, il semble donc difficile de prévoir l'importance de ce type de contamination dans un lait.

Par ailleurs, Mottar (1984 a) montre que, dans des laits stockés au froid, le nombre de germes totaux, contrairement au nombre de germes psychrotrophes protéolytiques, n'est pas explicatif de la présence d'enzyme protéolytique.

### 1.1.2.1 Relation croissance bactérienne et production de protéases

La synthèse des enzymes exocellulaires s'effectue pendant la phase exponentielle de croissance, leur libération ayant lieu à la fin de cette phase et/ou au début de la phase stationnaire (Griffiths, 1989; Stead, 1987 a; Rowe et Gilmour, 1983).

La synthèse des protéases exocellulaires serait la marque d'un appauvrissement du milieu en nutriments; la libération de ces protéases permettrait la dégradation des protéines du lait en peptides facilement assimilables par les micro-organismes (Stead, 1987 a). Pour Mc Kellar et Cholette (1984 b), la production de protéases dans le lait stocké au froid pourrait être régulée notamment par la teneur en phosphate du lait.

Les niveaux de contamination nécessaires à la détection de l'activité protéolytique sont compris entre  $10^5$  et  $10^9$ /germes/ml et sont fonction du pouvoir protéolytique des souches microbiennes étudiées, mais aussi de la méthode de détection utilisée. L'amplitude de cet intervalle traduit les difficultés de lier contamination microbienne et détection de la protéolyse.

Pour la plupart des auteurs, la production maximale d'enzyme a lieu à la température optimale de croissance mais cette activité reste très importante aux basses températures (de 25% à 65% de l'activité maximale à 4°C; Villafafila et al., 1993; Stepaniak et al., 1982). Une adaptation du système enzymatique compense la

Tableau 2 : Propriétés des protéases des bactéries psychrotrophes; revue bibliographique.

Souche	T°C Optim.	pH Optim.	EDTA (%inhi)	Stabilité thermique (activité résiduelle)	Poids moléculaire	Références
Pseudo. fluo.P1	45°C	7,2	2,5 mM : 62 % 10 mM : 79 %		47 500	Stepaniak et al (1985)
Pseudo. fluo.T2	22-30°C	ND	ND	120°C, 2 min : 20%	39 000	Patel et al (1983)
Pseudo. fluo.T6	25°C	ND	ND	120°C, 2 min : 21%	39 000	"
Pseudo. fluo.T15	15-25°C	ND	ND	120°C, 2 min : 24%	ND	"
Pseudo. fluo.T16	25°C	ND	ND	120°C, 2 min : 41%	38 000	"
Pseudo. fluo.T20	25°C	ND	ND	120°C, 2 min : 25%	44 000	"
Pseudo fluo M316	23-45°C	8,0	1mM : 60% 10 mM : 100%	72°C, 16s :36%	45 000	Kohlman et al (1991 b)
Micrococcus I	45°C	8,5	2 mM : 100%	65°C, 25 min : 20%	23 500	Garcia et Fox (1991)
Micrococcus II	45°C	9-11	2 mM : 100%	65°C, 10 min : 20%	42 500	"
Pseudo Fragi	37°C	7-8	1 mM : 7,3% 10 mM : 1%	140°C, 16s : 43% 95%, 16s : 68% 72°C, 16s : 70%	ND	Kohlman et al (1991 b)
Pseudo Sp AFT21 I	45-47,5°C	7,2-7,5	10mM :22%	140°C, 13s : 50%	46 200	"
Pseudo Sp AFT21 II	45-47,5°C	7,0-7,5	10 mM : 1,5%	140°C, 5,8s : 50%	47 000	"
Pseudo Sp AFT21 III	45-47,5°C	8,5	10 mM : 5,6 %	140°C, 22s : 50%	46 200	"
Pseudo fluoAR11	45°C	6,5		140°C, 9s : 50%	38 400	Alichanidis et Andrews (1977)
Pseudo. sp AFT36	ND	ND	1mM : 65,7%	55°C, 30min : 80% 75°C, 30min : 25%	39 000	Matta et al (1994)
Pseudo fluo NC1	45°C	ND	1mM : <1%	63°C, 30 min : 12% 140°C, 5 s : 42%	45 000	Frias et al (1994)

baisse de l'activité (suite à la diminution de température), et provoque une libération accrue d'enzyme dans le milieu extérieur (Fairbairn et Law, 1986).

D'autres facteurs peuvent influencer la production de protéases (Fairbairn et Law, 1986) :

- L'absence d'azote organique dans le milieu de culture inhibe la synthèse de protéases

- La présence de  $\text{CaCl}_2$  favorise la production de protéases chez *Pseudomonas fluorescens*

- La présence de fer, zinc, manganèse, et la teneur en oxygène influenceraient positivement aussi cette synthèse.

Pour des contaminations égales de *Pseudomonas aeruginosa*, l'activité protéolytique est plus intense dans un lait écrémé que dans un lait entier, l'activité protéolytique serait partiellement inhibée par les matières grasses (Grover et al., 1989).

Deux mécanismes de contrôle de la synthèse des protéases sont proposés. Le premier repose sur une augmentation, dans le cytoplasme de la bactérie, du pool de nucléotides, précurseurs de l'ARN, durant la phase exponentielle de croissance, ce qui entraînerait une synthèse accrue de protéases. Le deuxième mécanisme est fondé sur un phénomène d'induction-répression de la synthèse en fonction de la présence ou de l'absence d'un catabolite issu du métabolisme de la bactérie (Fairbairn et Law, 1986).

Si les mécanismes et les facteurs favorisant la synthèse de ces protéases et par la suite leur libération, ne sont pas encore clairement établis, de nombreux travaux ont permis de connaître précisément leurs propriétés et leurs spécificités.

### 1.1.2.3 Propriétés et spécificité des protéases bactériennes.

#### - Propriétés

La plupart des protéases bactériennes sont des métalloprotéines contenant des ions  $\text{Ca}^{++}$  et  $\text{Zn}^{++}$  qui les rendent sensibles aux agents chélatants (notamment l'EDTA). La majorité de ces protéases présente une activité optimale à des températures supérieures à 20°C et à un pH proche de la neutralité. Leur poids moléculaire n'excède pas 50 kDa (tableau 2).

La caractéristique fondamentale des protéases microbiennes est leur thermostabilité. En effet, elles conservent une activité résiduelle importante après des traitements thermiques supérieurs à 140°C durant quelques secondes (de 40 à 50% de l'activité initiale). La suppression totale de l'activité protéolytique d'origine microbienne dans le lait passe par des traitements thermiques incompatibles avec le respect de l'intégrité des protéines du lait.

Un phénomène d'inactivation partiel (supérieur à 50% de l'activité initiale) ou total de l'activité catalytique est noté pour la plupart des protéases après un traitement thermique de 50-55°C pendant quelques minutes (Kumura et al., 1993; Kumura et al., 1991; Diermayr et al., 1987).

Matta et al. (1994), contrairement à la plupart des auteurs, mesurent que pour un traitement de 55°C pendant 30 minutes, 80% de l'activité maximum est retrouvée.

L'inhibition mesurée à 50-55°C serait due à un changement de conformation suite au traitement thermique qui entraînerait une perte réversible de l'activité catalytique et une susceptibilité à la protéolyse par les protéases non dénaturées. Par la suite, ces protéases dénaturées formeraient un complexe avec les micelles de caséines par des liaisons hydrophobes, ce complexe bloquant totalement leur capacité protéolytique (Fairbairn et Law, 1986).

Bucky et al. (1988) montrent qu'un traitement U.H.T. (140°C, 5 s) suivi d'une pasteurisation réduit de 25 fois le taux de protéolyse et de lipolyse comparé au même lait traité simplement à l'U.H.T. L'association de ces deux traitements permettrait une inhibition importante des protéases microbiennes ainsi qu'une destruction des micro-organismes pour la plupart résistants à la pasteurisation.

#### - Spécificités des protéases

La conséquence principale de la libération des protéases microbiennes dans le lait est l'hydrolyse des protéines. Toutes les protéines du lait ne sont pas sensibles de manière égale aux protéases et toutes les protéases, en fonction de leur origine, n'ont pas les mêmes spécificités.

L'hydrolyse la plus rapide est pour les  $\kappa$ -caséines qui donnent un composé hydrophobe de même comportement électrophorétique que la para- $\kappa$ -caséine et un composé hydrophile, le caséinomacropéptide (CMP, hydrolyse au niveau de la liaison Phe(105)-Met(106) de la  $\kappa$ -caséine) (Millière et Veillet-Poncet, 1979; Law et al., 1977).

Les  $\beta$ -caséines sont attaquées plus lentement que les  $\kappa$ -caséines mais plus rapidement que l' $\alpha_{s1}$ -caséine. Les produits de dégradation des  $\beta$ -caséines ont une mobilité électrophorétique comparable à celle des  $\gamma$ -caséines. Les protéines du lactosérum semblent être résistantes à l'activité des protéases microbiennes même si pour Adams et al. (cité par Miranda et Gripon, 1986), certaines souches de *Pseudomonas* peuvent dégrader l' $\alpha$ -lactalbumine et la  $\beta$ -lactoglobuline après un stockage du lait pendant 13 jours à 5°C (ce qui correspond à des durées extrêmes de stockage à cette température).

Shamsuzzaman et Mc Kellar (1987) ont isolé deux enzymes intracellulaires thermolabiles (une aminopeptidase et une endopeptidase) mais aucune activité notable sur les protéines du lait n'a été observée. Leur libération, (éclatement des bactéries lors des processus technologiques), n'aurait pas de conséquence importante.

#### 1.1.2.4 Conclusion

L'étude des psychrotrophes protéolytiques montre que même s'il existe une grande variabilité dans l'origine de ces bactéries, 3 propriétés caractérisent toutes les protéases microbiennes :

- Le maintien d'une activité catalytique à basse température pourra engendrer des problèmes protéolytiques, surtout dans les conditions de conservation actuellement utilisées.

- La thermostabilité de ces protéases rend leur inactivation très difficile sans dégradation de la qualité des protéines.

- L'attaque préférentielle des  $\kappa$ -caséines devrait permettre de caractériser cette protéolyse d'origine microbienne par des indicateurs spécifiques.

### 1.2 Facteurs de variation de la protéolyse endogène

Le lait contient de nombreuses enzymes hydrolytiques présentes dès sa sécrétion dont une proportion importante de protéases. Deux groupes de protéases peuvent être définis : les protéases d'origine somatique et les protéases natives.

#### 1.2.1 Protéases d'origine somatique

Le lait contient de nombreuses cellules somatiques (leucocytes polynucléaires neutrophiles et mononucléaires, cellules mortes issues du tissu épithélial etc.). Ces cellules sont susceptibles d'être lysées à chaque moment par les processus de transformation du lait et peuvent ainsi libérer leurs protéases dans le milieu extérieur (Humbert, 1986).

Chaque type de cellules peut produire ses propres protéases. Sont trouvées principalement des protéases acides semblables aux cathepsines B, D, et G avec une spécificité proche de la chymosine, ainsi que des protéases avec des propriétés analogues à l'élastase et à la collagénase (cité par Verdi et Barbano, 1991 b).

L'activité protéolytique des polynucléaires neutrophiles et des leucocytes mononucléaires reste en général marginale. Même dans un lait dépassant  $10^6$  cellules/ml, le niveau de protéolyse issu uniquement des cellules est inférieur à la protéolyse totale d'un lait sain (défini comme ayant un faible dénombrement cellulaire) (Grieve et Kitchen, 1985). Ce faible niveau protéolytique pourrait s'expliquer par la présence d'inhibiteurs intracellulaires de protéases mais aussi par le fait que la sécrétion des protéases actives par les cellules somatiques est contrôlée physiologiquement par des mécanismes non élucidés (Smolen et Weissman cité par Grieve et Kitchen; 1985).

Pour des laits à moins de 250 000 cellules/ml, l'activité protéolytique d'origine non plasminique est de 17% contre 46% pour des laits à plus de  $3 \cdot 10^6$  cellules/ml

(Saemens et al., 1988), elle atteint 66 % dans des laits à  $20-30 \cdot 10^6$  cellules/ml (De Rham et Andrews, 1982 b)

L'action de ces protéases montre une plus grande sensibilité de l' $\alpha_1$ -caséine, puis des  $\beta$ -caséines alors que les  $\kappa$ -caséines seraient résistantes.

Les protéases cellulaires sont plus actives à un pH de 6.6 qu'à un pH de 5.2 (Verdi et Barbano, 1991 b). Ces deux auteurs montrent que l'activité protéolytique des PMN (polymorphonuclear) issus d'un lait de mammité est plus importante que celle des leucocytes issus du sang. Cette différence pourrait s'expliquer par une proportion plus importante de macrophage dans un lait à dénombrement cellulaire élevé que dans le sang.

L'action protéolytique des enzymes issues des cellules somatiques apparaît donc négligeable dans les laits à faible dénombrement cellulaire. Par contre, le risque de dégradation des protéines inhérent à ce type de protéolyse pourrait être important dans les laits à dénombrement cellulaire élevé. Les études relatives à la protéolyse d'origine cellulaire restent très partielles et des travaux complémentaires sur le contrôle physiologique de l'activation et de l'inhibition de ces protéases sont nécessaires à la compréhension des mécanismes de la dégradation des protéines du lait.

### 1.2.2 La protéase alcaline (plasmine)

Le lait contient de nombreuses protéases : exopeptidases dans le lactosérum et endopeptidases liées aux micelles de caséines ou aux membranes des globules gras (Humbert, 1986). Une protéase de type II, trypsin-like associée aux micelles de caséines et ayant une activité arginyl-protéase analogue à une thrombinase (Reimerdes, 1983), une protéase analogue à la cathepsine et une aminopeptidase (De Rham et Andrews, 1982 a) ont été identifiées. La protéase alcaline (plasmine) est l'enzyme principale impliquée dans les phénomènes protéolytiques du lait frais et de nombreux auteurs se sont intéressés à ses propriétés (Politis et al., 1992; Grufferty et Fox, 1988 a; Humbert, 1986; Visser, 1981).

La plasmine est une enzyme protéolytique classée dans les protéases à sérine. Comme la trypsine, l'élastase ou la thrombine, elle est inactivée par les inhibiteurs spécifiques de ces enzymes tels que le DFP (diisopropylfluorophosphate) (Hartley, 1960). Elle existe dans le lait sous une forme native inactive, le plasminogène. Les deux formes, plasmine et plasminogène, proviennent du sang et interviennent dans le processus de fibrinolyse. Le plasminogène (synthétisé dans le foie) est une molécule de 786 acides aminés, l'activation en plasmine provoque par clivage de la liaison 577-578, la coupure de la chaîne lourde (1-577) et de la chaîne légère (578-786). De plus, la plasmine coupe la liaison 77-78, libérant le peptide d'activation. (Humbert, 1986). La séquence des acides aminés de la plasmine bovine a été définie et comporte 80% d'homologie avec la plasmine humaine, son poids moléculaire est de 88 kDa.

### 1.2.2.1 Distribution

#### - Système plasmine-plasminogène

Plus de 80% de la plasmine et du plasminogène sont associés aux micelles de caséines par des interactions avec les résidus lysine, le reste se trouvant dans la phase soluble. Une activité plasminique a été mesurée au niveau de la membrane des globules gras, cette activité serait due à la présence de caséines entières dans cette membrane (Politis et al., 1992). Il n'a pas été trouvé de plasminogène dans les extraits cellulaires provenant du lait confortant l'origine exclusivement sanguine du système plasmine-plasminogène.

#### - Activateurs, inhibiteurs

Dans le lait, 4 activateurs du plasminogène ont été isolés par Deharveng et Nielsen (1991). Lu et Nielsen (1993) ont partiellement purifié de(s) activateur(s) du plasminogène de type urokinase qui serait associé à l'activité plasminique dans des laits de quartier mammitieux (Kaartinen et al., 1988). Dans ces laits, la fibrine stimulerait les activateurs du plasminogène (Zachos et al., 1992).

La streptokinase est un activateur spécifique du plasminogène dans la plupart des espèces, sauf chez les bovins (Humbert, 1986).

Les macrophages du lait interviennent sur le système plasmine-plasminogène par production d'activateurs (associés aux micelles de caséines) ou d'inhibiteurs (trouvés dans la phase soluble) (Politis et al., 1992; Verdi et Barbano, 1991 b; Korycka-Dahl et al., 1983). Sont trouvés également des inhibiteurs des activateurs du plasminogène. L' $\alpha_1$ -antitrypsine, l' $\alpha_2$ -macroglobuline sont des inhibiteurs plasminiques non spécifiques présents dans le sang et dans le lait.

L'activation du plasminogène augmente après pasteurisation, suite à l'inactivation d'un inhibiteur du plasminogène et à la résistance à la pasteurisation d'un activateur du plasminogène (Richardson, 1983 a). De même, l'activité de la plasmine augmente de 30 à 40 % après pasteurisation, ce qui suggère la destruction d'un inhibiteur de la plasmine à cette température (Noomen, 1975).

Verdi et Barbano (1991 a) montrent que les coagulants du lait (présure, protéases purifiées de *Mucor spp*), les enzymes extracellulaires d'origine bactérienne et les protéases leucocytaires issus du sang ne sont pas capable de convertir le plasminogène en plasmine.

Les connaissances sur les activateurs et les inhibiteurs du système plasmine-plasminogène sont encore très partielles. Une meilleure compréhension des facteurs induisant des variations dans leur activité permettrait de mieux estimer le potentiel protéolytique endogène des laits.



Tableau 3 : Protéases endogènes du lait : substrat et produits de protéolyse

Protéases	substrats	produits	Références
Plasmine (Protéase alcaline ou Protéinase I)	<u>Préférentiel</u>		
	$\beta$ -caséines	$\gamma$ 1-caséine (f29-209) $\gamma$ 2-caséine (f106-209) $\gamma$ 3-caséine (f108-209) $\gamma$ n-caséine (non identifié)	Eigel (1977)  Trieu-Cuot et Gripon (1981)
		<b>Protéose peptones :</b> $\beta$ -CN-5P ou PP5 (f1-105/107) $\beta$ -CN-4P ou PP8F (f1-28) $\beta$ -CN-1P (f29-105/107)*	Andrews et Alichanidis (1983) (plasmine porcine)
	<u>Non spécifiques</u>		
	$\alpha_{s2}$ -caséine	<b>Nombreux fragments (au moins une dizaine)</b>	Andrews et Alichanidis (1983) (plasmine porcine)
	$\alpha_{s1}$ -caséine	$\lambda$ -caséines	Aimutis et Eigel (1985)
$\kappa$ -caséine	<b>Produit ayant la même mobilité électrophorétique que la para-<math>\kappa</math>-caséine</b>	Andrews et Alichanidis (1983) (plasmine porcine)	
	$\beta \approx \alpha_{s2} > \alpha_{s1} \gg \kappa$		
	Résistance des protéines du lactosérum		
Thrombine (Protéinase II)	Inconnu arginyl protéase	Inconnus	Reimerdes (1983)
Aminopeptidase	Inconnu	Inconnus	"
Cathepsine D (Protéase acide)	même spécificité que la plasmine $\alpha_{s1} > \beta \gg \kappa$		"
Protéases cellulaires			
Leucocytes polymorphonucléaire et mononucléaires	$\alpha_{s1} > \beta \gg \kappa$	Inconnus	Grieve et Kitchen (1985) Verdi et Barbano (1991)

\* l'identification du  $\beta$ -CN-1P (f29-105/107) comme étant le PP8S de la fraction protéose peptones est remise en cause par Andrews et Alichanidis (1985)

### 1.2.2.2 Spécificités et propriétés de la protéase alcaline

#### - Spécificités

La plasmine coupe spécifiquement les liaisons LYS-X, certaines liaisons de type ARG-X sont également hydrolysées, mais beaucoup plus lentement. Les cinétiques de dégradation placent les  $\beta$ -caséines et l' $\alpha_{s2}$ -caséine comme substrat préférentiel de la plasmine (tableau 3).

La plasmine dégrade les  $\beta$ -caséines en donnant les fractions  $\gamma_1$  (f29-209),  $\gamma_2$  (f106-209)  $\gamma_3$  (f108-209) (Eigel, 1977) et  $\gamma_n$  (Trieu-Cuot et Gripon, 1981) caséines, ainsi que les composants PP5 ( $\beta$ -CN 5P; f1-105/7), PP8 Fast ( $\beta$ -CN 4P; f1-28) et PP8 Slow ( $\beta$ -CN 1P; f29-105/7) de la fraction protéose peptones. Le composant PP8 Fast de la fraction protéose peptones est un produit stable de l'hydrolyse des  $\beta$ -caséines, contrairement à la fraction PP5 qui semble un composé intermédiaire (Andrews, 1978 a).

Andrews et Alichanidis (1983) montrent la sensibilité de l' $\alpha_{s2}$ -caséine à la plasmine par formation de peptides de haute mobilité électrophorétique.

Après hydrolyse par la plasmine, l' $\alpha_{s1}$ -caséine conduit à des peptides de poids moléculaires de 5500-6000 D ( $\lambda$ -caséines) (Aimutis et Eigel, 1982).

Pour Andrews et Alichanidis (1983), les  $\kappa$ -caséines seraient sensibles à la plasmine en donnant un composé analogue à la para- $\kappa$ -caséine. Cependant, Chen et Ledford (1971) et Eigel (1977) ont montré la résistance des  $\kappa$ -caséines. Les différences observées ont certainement pour origine des conditions expérimentales variables (concentration en enzyme, température etc..).

Les protéines du lactosérum seraient résistantes à la plasmine (Kaminogawa et Yamauchi, 1972).

Pour Andrews et Alichanidis (1983), 25 des 38 bandes de la fraction protéose peptones visibles en électrophorèse seraient issues de l'hydrolyse des caséines par la plasmine : 52% des  $\beta$ -caséines, 29% de l' $\alpha_{s1}$ -caséine, 9% de l' $\alpha_{s2}$ -caséine et 4% des  $\kappa$ -caséines.

Le composant 3 de la fraction protéose peptones serait sensible à l'hydrolyse par la plasmine en donnant 2 peptides de 19 et 11 kDa (Mati, 1992).

#### - Propriétés

L'activité de la plasmine est maximale à 37°C (Humbert, 1986).

L'activité de la plasmine en réponse à un abaissement de température est variable : une apparition plus importante des  $\gamma$ -caséines est notée du fait de la dissolution des  $\beta$ -caséines (Reimerdes et Herliz, 1979), une inhibition partielle de la dégradation des

$\beta$ -caséines est mesurée (Donnelly et Barry, 1983), ou aucune perte d'activité n'est observée (Grufferty et Fox, 1988 b).

Enzyme thermostable, la plasmine résiste à la pasteurisation (le plasminogène a la même propriété; Alichanidis et al., 1986), 83% de l'activité initiale est retrouvée après un traitement thermique de 72°C pendant 15 secondes (Richardson, 1983 a). Une augmentation de l'activité de la plasmine, pendant le stockage du lait, peut parfois être observée après pasteurisation ou stérilisation (Baer cité par Humbert, 1991). Deux hypothèses sont avancées : soit une modification spatiale des substrats facilitant l'accessibilité de l'enzyme, soit une thermo-inactivation d'un inhibiteur de la plasmine ou d'un activateur d'inhibiteur du plasminogène.

Une activité résiduelle de 10% est notée après un traitement de 142°C pendant 12 secondes, mais après 142°C pendant 16 secondes, l'inhibition est totale (Driessen et Van Der Waals, 1978). Un traitement de 100°C pendant 235 secondes permet une inactivation de la plasmine sans régénération pendant au moins 30 jours de conservation à 4°C (Ren et al., 1987).

La plasmine comportant un pont disulfure et des résidus cystéines libres, la complexation avec les groupes thiols de la  $\beta$ -lactoglobuline, après thermodénaturation, inactive partiellement son activité (Rollema et Poll, 1986; Alichanidis et al., 1986). L'inhibition est plus forte pour la  $\beta$ -lactoglobuline que pour la  $\beta$ -lactoglobuline dénaturée (100°C, 15 minutes) (Bastian et al., 1993). Associé à un traitement thermique (90°C pendant 15 minutes) un ajout de  $\beta$ -lactoglobuline native permet une inhibition plus importante que le traitement thermique seul (Grufferty et Fox, 1988 b). La Bovine Sérum Albumine inhibe 63% de cette même activité et l' $\alpha$ -lactalbumine 20%.

Il semble que l'inhibition de l'activité de la plasmine par les traitements thermiques est incompatible avec le respect de l'intégrité des protéines du lait. De plus, contrairement aux protéases microbiennes, aucune inhibition significative de l'activité de la plasmine n'a été observée à des températures de 50-55°C. Le seul moyen de s'affranchir de ce type de protéolyse semble le contrôle dès la production des facteurs entraînant l'augmentation de son activité.

Le pH optimal est légèrement alcalin (environ 8), mais la zone d'activité de la plasmine s'étend de 5 à 9 avec des pertes d'activité plus ou moins élevée (Grufferty et Fox, 1988 a). En dehors de cette plage, la plasmine perd sa stabilité (Kaminogawa et Yamauchi, 1972).

A pH 4,6, une grande partie de l'activité de la plasmine n'est plus située sur les micelles de caséines. Ainsi, lors de la coagulation acide du lait, contrairement à la coagulation présure, la plasmine sera en grande partie éliminée dans le sérum (Grufferty et Fox, 1988 a).

Un accroissement de l'activité de la plasmine est noté en milieu légèrement salin (2 à 4%), au-delà, l'enzyme est progressivement inhibée (cité par Humbert, 1991).

### 1.2.2.3 Facteurs de variation de l'activité plasminique

Comme les facteurs physico-chimiques (pH, température, force ionique), les facteurs individuels, génétiques, physiologiques, alimentaires et sanitaires peuvent influencer l'activité plasminique dans le lait.

#### - Variations individuelles

Les variations individuelles de teneur en plasmine du lait sont très importantes et comprises entre 0,7 et 2,4 mg/l (Rollema et al., 1983). Le rapport plasminogène/plasmine est également très variable, voisin de 6 à 8,5 pour Korycka-Dahl et al. (1983), parfois supérieurs à 17 (Politis et al., 1989 b), il varie de 4,8 à 37 pour Rollema et al. (1983).

En plus des facteurs de variation propres à la plasmine, les méthodes de mesure (substrats et méthodologies différents) expliquent en partie les différences observées entre les auteurs. Cependant, des variations inexplicables de teneur en plasmine-plasminogène sont observées pour des laits individuels issus d'animaux présentant les mêmes caractéristiques physiologiques (Humbert, 1986).

#### - Stade et numéro de lactation

L'effet du stade de lactation n'est pas indépendant de l'effet saison. Ces deux facteurs sont la plupart du temps regroupés. En général, une augmentation de la teneur en plasmine et en plasminogène entre le début et la fin du stade de lactation est notée (+ 50% pour Richardson, 1983 b). Une faible augmentation du rapport plasminogène/plasmine, qui passe de 4,5 à 5,3, est mesurée par Benslimane et al. (1990) mais Politis et al. (1989 b) notent que ce rapport de 6,23 en début de lactation diminue fortement pour atteindre 3,29 en fin de lactation. Il semblerait que l'activation du plasminogène soit plus importante au fur et à mesure de l'avancée dans le stade de lactation traduisant des variations d'activité au cours du stade des activateurs et/ou des inhibiteurs du système plasmine/plasminogène.

Pour Politis et al. (1989 b) l'augmentation de l'activité de la plasmine au cours du stade de lactation devient significative à partir du cinquième mois de lactation. La plasmine interviendrait dans la protéolyse des récepteurs hormonaux des cellules épithéliales de la mamelle ce qui induirait des changements de perméabilité membranaire vis à vis des produits issus du sang et ainsi provoquerait une baisse de production laitière (Ossowski et al., 1979).

Le numéro de lactation est un facteur de variation significatif de l'activité plasminique (Bastian et al., 1991 b; Politis et al., 1989 b; Schaar, 1985).

#### - Race

Le lait de montbéliarde présente une activité plasminique plus élevée que les races Holstein et Jersey (Benslimane et al., 1990). Entre Holstein et Jersey, Bastian et al.

(1991 a) ne mesurent pas de différence contrairement à Schaar (1985) et Richardson (1983 b) qui mesurent une activité plasminique plus élevée chez les animaux jersey. Les différences d'activité plasminique observées entre les races seraient dues à une teneur différente en caséines (Schaar, 1985).

#### - Variant de la $\beta$ -lactoglobuline

Pour les laits présentant le variant AA de la  $\beta$ -lactoglobuline, une inhibition de l'activité de la plasmine est mesurée (Politis et al., 1993), la teneur en protéose peptones du lait est moins élevée pour des animaux de type AA que pour ceux de type BB, le variant AB étant intermédiaire (Schaar, 1985).

#### - Etat sanitaire de la mamelle

La dégradation de l'état sanitaire de la mamelle se traduit par une augmentation du dénombrement cellulaire et par une altération des cellules épithéliales associée à une plus grande perméabilité des capillaires vis à vis des constituants du sang (enzymes, immunoglobulines etc.). La teneur en plasmine augmente avec l'accroissement du dénombrement cellulaire (Schaar, 1985), son activité voisine de 100 pour 100 000 cellules/ml passe à 167 puis 230 quand le dénombrement cellulaire passe à 290 000 puis 1 300 000 (Politis et al., 1989 b).

Si la protéolyse totale peut augmenter de 5 à 10 fois dans les laits de mammite (De Rham et Andrews, 1982 b), il semble que la part relative dans cette protéolyse de la plasmine diminue au profit des protéases d'origine cellulaire (Saeman et al., 1988). Le rapport plasminogène sur plasmine diminue lui aussi (Schaar et Funke, 1986; De Rham et Andrews, 1982 b) cette diminution serait principalement due à une activation du plasminogène (Politis et al., 1989 b). Par ailleurs, l'infusion d'urokinase dans la mamelle accroît simultanément l'activité plasminique et le dénombrement cellulaire (Hedviskt et al., 1989).

#### - Effet de l'injection de somatotropine

Pour Politis et al. (1990), l'injection de bST, augmente significativement la production laitière et permet de maintenir une teneur en plasmine significativement plus basse par rapport à des animaux non traités. Cette diminution de teneur en plasmine permettrait de ralentir et même de supprimer l'involution de la mamelle car, l'arrêt de l'injection de bST entraîne un retour rapide de la teneur en plasmine au niveau des animaux non traités (Politis et al., 1990).

#### - Alimentation

Les effets directs de l'alimentation sur la teneur en plasmine/plasminogène apparaissent peu importants, même si Aaltonen et al. (1988) observent que l'activité plasminique est plus élevée chez des animaux nourris à base de foin que chez des

animaux nourris à base d'ensilage (25 et 16 nmol p-nitroaniline/h/ml respectivement).

#### 1.2.2.4 Conclusion

L'influence significative du stade et du numéro de lactation et du nombre de cellule sur le système plasmine-plasminogène est bien définie, par contre les phénomènes physiologiques entraînant ces variations restent encore imprécis.

Dans les laits à dénombrements cellulaires élevés, l'augmentation de l'activité de la plasmine n'est pas due principalement à l'activation du plasminogène mais plutôt à un passage accru de plasmine et plasminogène du sang vers le lait quand l'intégrité des cellules épithéliales est compromise (Politis et al., 1989 a). Les leucocytes provenant du sang étant incapables, comme les protéases microbiennes, d'activer le plasminogène, les cellules somatiques seraient alors la seule source d'activation du plasminogène (Verdi et Barbano, 1991 a). La présence dans les cellules somatiques d'une enzyme capable d'activer le plasminogène confirme leur hypothèse. La perméabilité accrue des cellules épithéliales, suite à une inflammation de la mamelle, pourrait aussi induire une activation du plasminogène à partir d'éléments provenant du sang.

L'avancée dans le stade de lactation provoque une activation du plasminogène et entraîne une diminution du ratio plasminogène/plasmine sans dégradation de l'épithélium sécréteur de la mamelle. (Politis et al., 1989 b).

## 2. CONSEQUENCES TECHNOLOGIQUES DE LA PROTEOLYSE DU LAIT

Trois facteurs principaux entraînent une modification de la qualité des protéines du lait lors de son stockage au froid :

- la conservation du lait au froid sélectionne les bactéries psychrotrophes qui à la fin de la phase exponentielle de croissance ou au début de la phase stationnaire vont sécréter des protéases exocellulaires thermorésistantes. Ces protéases entraînent une hydrolyse des caséines et induisent une dégradation de la qualité protéique des laits et l'apparition de goûts amers dans les produits laitiers (Gripon, 1991).
- l'activité des protéases endogènes et notamment celle de la plasmine, lors de la conservation du lait au froid, entraîne une augmentation des teneurs en  $\gamma$ -caséines et protéose peptones par hydrolyse des  $\beta$ -caséines.
- le lait maintenu à basse température subit des modifications physico-chimiques importantes. La dissolution du phosphate de calcium qui participe à la structure micellaire associée à une dissolution des  $\beta$ -caséines entraînent une déstabilisation des micelles de caséines. De plus, la plasmine en passant de la phase colloïdale (micelle de caséine) à la phase soluble favorise une hydrolyse des  $\beta$ -caséines. Ces

phénomènes entraînent la formation des  $\gamma$ -caséines et des protéose peptones. Une diminution de la taille des micelles de caséines par une réduction des liaisons hydrophobes est observée, parallèlement le degré d'hydratation de ces micelles augmente (Ichilczyk-Leone et al., 1981).

Lors de la conservation du lait au froid, protéases microbiennes et endogènes interagissent, entraînant ultérieurement une baisse des rendements fromagers et des qualités organoleptiques des produits laitiers.

## **2.1 Protéolyse dans le lait U.H.T.**

Le traitement Ultra Haute Température permet une stérilisation du lait, la contamination résiduelle autorisée devant être inférieure à une spore par litre (notamment *Clostridium botulinum*). L'intensité du traitement thermique entraîne des modifications physico-chimiques des constituants du lait et du fait de la thermostabilité des protéases microbiennes et de la plasmine, une déstabilisation et une gélification, accompagnées d'un développement de goûts amers sont parfois observés pendant la conservation des laits U.H.T.

### **2.1.1 Influence de la plasmine**

Un ajout de 0,15 mg/ml de plasmine dans du lait stérilisé (niveau compatible avec les teneurs de plasmine active mesurées dans certains laits U.H.T.) provoque une gélification du lait en 90 jours, une augmentation de la viscosité et une hydrolyse importante des  $\beta$ -caséines et des  $\alpha$ -caséines (Kohlman et al., 1991 a).

Si le temps de gélification des laits non concentrés semblent en relation avec l'activité plasminique, aucune activité protéolytique n'est mesurée lors de la gélification des laits concentrés (Kohlman et al., 1991 a). Les mécanismes impliqués dans la gélification des laits concentrés sont très mal connus.

La déstabilisation des laits U.H.T. au cours de la conservation pourrait dépendre, à la fois de la formation, lors du chauffage, de complexes entre la  $\beta$ -lactoglobuline et les caséines (Corradini et Panini-Peci cités par Humbert, 1986), mais aussi du niveau de protéolyse pour la phase initiale de gélification (Hawalkar et Ureeman cités par Miranda et Gripon, 1986; Manji et al., 1986). L'apparition des goûts amers dans le lait U.H.T. surviendrait après des temps de stérilisation courts (Miranda et Gripon, 1986). Aucun mécanisme explicatif n'est proposé.

### **2.1.2 Influence des protéases microbiennes**

L'activité résiduelle des protéases microbiennes, malgré la stérilisation du lait, peut entraîner une diminution de la durée de conservation du lait U.H.T. Cette activité varie fortement selon les niveaux de contaminations initiaux.

L'activité protéolytique des laits U.H.T. et le niveau initial en bactérie psychrotrophe protéolytique sont corrélés ( $r = 0,79$ ) (Mottar, 1984 b).

La protéolyse serait effective à partir de  $10^4$  psychrotrophes/ml de lait (Gebre-Egziabehr et al., 1980; Adams et al., 1976), mais des valeurs supérieures à  $10^6$ - $10^7$  psychrotrophes/ml sont souvent avancées (Dousset et al., 1988; Law, 1979).

La gélification du lait est plus rapide quand la population microbienne augmente (Miranda et Gripon, 1986) et les goûts amers apparaissent 6 à 10 semaines avant cette gélification (Mc Kellar et al., 1984 a).

Tous ces seuils ont été déterminés dans des conditions très éloignées de celles de la production (contamination du lait avec des souches contrôlées, stérilisation du lait et ajout de souche protéolytique). De plus, le plus souvent, aucune mesure concernant l'activité de la plasmine n'a été effectuée, d'où les différences très importantes entre les seuils microbiens à l'origine de la gélification ( $10^4$  à  $10^7$  bactéries/ml). Une meilleure appréciation de ces seuils bactériens, en tenant compte de la protéolyse endogène, permettrait une meilleure maîtrise d'éventuels problèmes de gélification des laits U.H.T.

## **2.2 Protéolyse dans le lait pasteurisé**

La pasteurisation a pour objectif d'éliminer toute flore pathogène non sporulée et la majorité de la flore banale, tout en conservant l'intégrité des constituants du lait. Le couple temps-température varie de  $63^\circ\text{C}$ -30 minutes à  $95^\circ\text{C}$  quelques secondes, le couple le plus couramment utilisé étant  $72^\circ\text{C}$  quelques dizaines de secondes.

### **2.2.1 Influence de la plasmine**

La pasteurisation ne détruit pas ou peu la plasmine (Richardson, 1983 a; Korycka-Dahl et al., 1983). Une augmentation de l'activité de la plasmine est notée après la pasteurisation du lait, suite à l'inactivation d'un inhibiteur spécifique de la plasmine, ou à une plus grande accessibilité du substrat pour l'enzyme (Noomen, 1975). Les effets de la plasmine sur la qualité des laits pasteurisés sont identiques à ceux observés sur les laits U.H.T. : apparition de goûts amers et diminution de la durée de conservation (Suhren cité par Miranda et Gripon, 1986).

### **2.2.2 Influence des protéases microbiennes**

Les bactéries thermorésistantes, ainsi que leurs protéases, résistent à la pasteurisation. Washam et al. (1977) notent que parmi 700 souches bactériennes isolées à partir de 227 échantillons de laits pasteurisés, 137 étaient capables de se redévelopper à  $7,2^\circ\text{C}$  après une nouvelle pasteurisation.

Mourgues et al. (1983) montrent que la durée de conservation du lait pasteurisé est fonction du nombre de thermorésistants pouvant se développer après le traitement thermique. Par ailleurs, un abaissement de température de conservation permet d'augmenter de 8 à 10 jours la durée de conservation avant apparition de mauvais goûts. Ceux-ci apparaissant, 15 jours après pasteurisation pour des contaminations en germes supérieures à  $10^7$ /ml



Les problèmes de conservation et de dégradation de la qualité des laits pasteurisés sont proches de ceux rencontrés pour le lait U.H.T. Cependant le développement d'une flore thermorésistante réduit la durée de conservation des laits à quelques jours, ce qui limite l'influence des protéases endogènes.

### **2.3 Protéolyse et transformations fromagères**

La protéolyse en technologie fromagère intervient lors du stockage du lait sous l'action des protéases microbiennes ou endogènes, mais aussi lors de l'affinage des fromages. La plasmine et la présure sont à l'origine de la dégradation limitée des caséines pendant l'affinage. Les polypeptides ainsi formés, sont dégradés en peptides et acides aminés par les protéases et peptidases sécrétées par les ferments mis en oeuvre lors du processus technologique. La texture des fromages est contrôlée d'abord par le pH et le rapport caséine intacte sur la teneur en matière sèche du fromage, mais aussi par l'activité de la plasmine (Lawrence et al., 1987). La flaveur des fromages dépend en partie de la présence des protéases microbiennes, de la plasmine et des enzymes sécrétées par les ferments lactiques (Moskowitz et Noelck, 1987).

La contribution des protéases endogènes, autres que la plasmine, dans l'affinage et la production de peptides dans les fromages est encore inconnue (Visser, 1993).

Pour maîtriser ces différentes phases de protéolyse, il est important de contrôler l'ensemble des protéases présentes dans le lait. En effet, si l'activité des protéases est un facteur essentiel dans le développement de la texture et de la flaveur des fromages, ces protéases peuvent aussi être source de pertes de rendement et de défauts de goût.

L'influence de la plasmine dans l'affinage des fromages dépend du pH et de la teneur en sel du lait avant et pendant sa transformation. Ces deux facteurs peuvent dissocier la plasmine des micelles de caséines, et ainsi favoriser son passage dans le lactosérum. La thermorésistance de la plasmine, ainsi que la thermosensibilité des activateurs des inhibiteurs du plasminogène, renforcent le rôle de la plasmine dans l'affinage des fromages pour des technologies basées sur un chauffage du lait supérieur à 50°C (cas des pâtes pressées cuites), température où la présure est en grande partie inactivée.

De la production à la conservation puis à la transformation, la protéolyse du lait est un processus qui participe négativement (protéases microbiennes non contrôlées, protéases endogènes) ou positivement (lors de l'affinage par ajout de souches bactériennes contrôlées) à la qualité des produits fromagers. Les relations entre la protéolyse non contrôlée (protéases microbiennes et plasmine) et la qualité des transformations fromagères seront abordées dans cette partie.

## 2.3.1 Pâtes pressées

### 2.3.1.1 Cheddar

#### 2.3.1.1.1 Protéolyse d'origine endogène

##### - Influence de la plasmine

Pour Green et Forster, cités par Humbert (1991), le rôle de la plasmine lors de l'affinage du cheddar est négligeable par rapport à celui des enzymes coagulantes. En effet, le présalage du lait avant coagulation va dissocier le complexe plasmine-caséine et le caillé est alors appauvri en enzyme. De même, Grappin et al. (1985) affirment que la contribution de la plasmine dans l'affinage du cheddar est insignifiante du fait notamment du pH acide (5.2) qui ralentirait l'activité de la plasmine.

Contrairement à ces conclusions de nombreux auteurs ont montré une influence de la plasmine sur l'affinage du cheddar. L'amertume dans les fromages de type cheddar est associée à la présence de peptides hydrophobes (Visser, 1993) et aurait pour origine l'activité protéolytique de la plasmine (Le Bars et Gripon, 1989).

L'ajout de plasmine dans le lait (6 fois la concentration du lait témoin) entraîne une dégradation plus importante des  $\beta$ -caséines, l'azote soluble mesuré sur les fromages, fabriqué à partir des laits traités, est 20% supérieur à celui des fromages témoins, aucune amertume n'a été détectée dans les fromages (Farkye et Fox, 1992). Pour ces auteurs, les difficultés de transformation des laits de fin de lactation (problèmes de synérèse) ne peuvent être expliquées par l'augmentation de l'activité de la plasmine mais plutôt par des variations de composition en minéraux et par une structure micellaire perturbée.

Mulvihill et McCarthy (1993), sur des coagulum présure de caséines, montrent une corrélation significative ( $r = 0,72$ ) entre la teneur en plasmine et le pourcentage de  $\beta$ -caséines hydrolysées après 6 mois de stockage à 4°C. Une corrélation de  $r = - 0,52$  est mesurée entre l'élasticité de ces coagulum et la teneur en plasmine.

##### - Influence du dénombrement cellulaire du lait

Une augmentation du dénombrement cellulaire induit une diminution de la force des gels, une augmentation de 2 à 3% de la teneur en eau des fromages et des défauts de goût (Grandison et Ford, 1986). Les pertes en matières grasses et en protéines dans le lactosérum sont augmentées, la dégradation des protéines commence pour des dénombrements cellulaires supérieurs à  $100 \cdot 10^3$ /ml. Cependant, cette dégradation n'est pas liée linéairement au dénombrement cellulaire, et celui-ci, n'apparaît pas adapté comme indicateur des rendements fromagers (Barbano et al., 1991).

L'influence de la plasmine dans la fabrication et l'affinage du cheddar, contrairement au dénombrement cellulaire, reste à préciser du fait de conclusions encore opposées.

Néanmoins, il semble que ces deux facteurs ont le plus souvent une influence négative sur les potentialités du lait à être correctement transformé en cheddar.

#### 2.3.1.1.2 Protéolyse d'origine microbienne

Des baisses de rendements de 5% sont observées pour des contaminations de  $10^6$  germes/ml et plus (Hicks et al., 1986; Hicks et al., 1982; Cousin et Marth, 1976) ainsi qu'une dégradation des qualités organoleptiques (Weatherup et Mullan, 1994). Par contre, si  $10^7$  psychrotrophes/ml entraînent une dégradation des caséines, cette contamination est insuffisante pour diminuer le rendement fromager (Law et al., 1979).

Les conditions dans lesquelles ont été effectués ces différents travaux sont très diverses et peu comparables (utilisation de souches pures protéolytiques, inoculation de souches bactériennes après pasteurisation du lait ou conservation de la flore initiale). Il semble pourtant que pour ce type de fabrication, la limite de  $10^6$  germes ne doit pas être dépassée pour conserver au lait toutes ses qualités.

#### 2.3.1.2 Emmental

##### 2.3.1.2.1 Influence de la plasmine

Pendant l'affinage, une diminution de l'activité de la plasmine est notée pendant les 5 premiers jours, mais par la suite, cette activité augmente au cours de l'affinage. Il existe un potentiel de plasminogène non activé au cours de l'affinage, car la teneur en plasmine+plasminogène après 5 jours d'affinage est supérieure à la teneur en plasmine mesurée après 90 jours d'affinage (Ollikainen et Nyberg, 1988).

Pour Humbert (1991), la plasmine est retenue dans le caillé et son activité augmente en cours d'affinage avec une forte hausse vers le 14<sup>ème</sup> jour juste avant l'apparition des yeux. Une relation existerait entre l'apparition des lainures et l'augmentation du taux de plasmine à certaines époques de l'année. La texture ferme de l'emmental est conservée parce que l'enzyme ne s'attaque pas, ou peu, à l' $\alpha_{s1}$ -caséine (Humbert, 1991) mais l'hydrolyse des  $\beta$ -caséines et de l' $\alpha_{s2}$ -caséine est forte avec une production marquée de  $\gamma$ -caséines (Richardson et Pearce, 1982).

Comme pour le cheddar, le rôle de la plasmine dans le processus de fabrication de l'emmental n'est pas clairement explicité, cependant, la technologie employée (pâte pressée cuite) semble favoriser la plasmine, thermorésistante au détriment des protéases coagulantes.

##### 2.3.1.2.2 Influence des bactéries se développant lors du stockage

Dans des essais proches des conditions de production, l'Institut Technique du Gruyère (I.T.G., 1989) montre qu'une contamination proche de  $10^6$  germes/ml entraîne une dégradation des propriétés technologiques du lait et des pertes d'azote dans le sérum.

### 2.3.2 Pâtes molles

Les principales études menées sur l'influence de la protéolyse microbienne et plasminique sur les transformations en pâtes molles datent de plus de 10 ans et sont pour la plupart le fait de chercheurs français, depuis, à notre connaissance, aucune étude importante n'a été menée.

#### 2.3.2.1 Protéolyse plasminique

La technologie employée lors de la fabrication des fromages de type pâte molle (notamment le camembert) favorise l'activité de la plasmine, stimulée par le NaCl dont la concentration est d'environ 3%. De plus, l'utilisation du lactate par la flore de surface augmente le pH dans une plage favorable à l'activité de la plasmine, surtout en surface et en sous-croûte (Humbert, 1991). Aucune étude complète ne permet de comprendre les effets de la protéolyse plasminique sur la capacité du lait à être correctement transformé en camembert et sur son rôle lors de l'affinage.

#### 2.3.2.2 Protéolyse d'origine microbienne

Des contaminations initiales de 500 à 2500 psychrotrophes/ml de lait (obtenues par ensemencement de souches protéolytiques) permettent une durée de stockage du lait de 5 jours sans entraîner de pertes de rendements en matières azotées (Feuillat et al., 1976) Une contamination de  $2.10^6$  germes/ml entraînent une diminution de 5% du rendement en matières azotées (Mietton et al., 1977; Feuillat et al., 1976)

Dans ces essais, les temps de prise augmentent après un ou deux jours de conservation au froid suite aux modifications des caractéristiques physico-chimiques du lait. Une dispersion plus grande des micelles de caséines est observée, associée à une augmentation de la couche d'hydratation micellaire et une modification des équilibres salins. Par ailleurs, l'augmentation du phosphate de calcium soluble et la solubilisation des  $\beta$ -caséines tendent à amoindrir la cohésion du réseau protéique qui se constitue lors de la coagulation du lait (Remeuf, 1991). Ces modifications physico-chimiques sont en grande partie réversibles par pré maturation du lait et ajout de chlorure de calcium (Amram et al., 1981). Par la suite dans les laits les plus contaminés, Feuillat et al. (1976) et Mietton et al. (1977) notent une diminution du temps de prise. Ce phénomène s'expliquerait par une sensibilisation des micelles de caséines à l'action de la présure par modifications biochimiques du milieu (diminution du pH, activité protéolytique des bactéries psychrotrophes).

La protéolyse microbienne peut même après pasteurisation générer des fromages avec une texture plus compacte et moins onctueuse et présentant des goûts amers et rances (Dumond et al., 1977). Le ralentissement de la protéolyse pendant l'affinage des fromages fabriqués à partir de laits fortement contaminés serait dû à une inhibition de la croissance des ferments par la forte teneur en acides gras libres du lait.

### 2.3.3 Fromage blanc

Des baisses de rendement d'au moins 5 % sont observées pour des contaminations dépassant  $10^8$  psychrotrophes/ml (après 8 jours de stockage à 4°C; Yan et al., 1983) ou après inoculation par une souche de *Pseudomonas* et pasteurisation (Hicks et al., 1982).

### 2.3.4 Telem Cheese

Kalogridou-Vassiliadou et Alichanidis (1984) montrent que des niveaux très importants de contamination en germes psychrotrophes ( $10^8$  germes/ml) entraînent des problèmes de goûts imputables à la dégradation des matières grasses (lipolyse). Les profils électrophorétiques des caséines, quant à eux, ne montrent pas de différence entre les laits faiblement ou fortement contaminés.

## 2.4 Conclusion

La protéolyse dans le lait conservé au froid apparaît un facteur limitant des possibilités d'allongement de la durée de stockage. Si, les modifications physico-chimiques consécutives à l'action du froid sont en grande partie réversibles elles favorisent la dégradation des  $\beta$ -caséines par la plasmine.

L'influence de la protéolyse microbienne sur les produits laitiers ne devient significative que pour des niveaux de contamination élevés. Les niveaux de contamination entraînant une dégradation de la qualité des protéines sont variables mais semblent se situer au-delà de  $10^6$  psychrotrophes/ml.

Les conséquences de la protéolyse endogène sont plus complexes, il semble cependant, que la limitation de cette protéolyse soit favorable à une meilleure qualité des produits laitiers.

## **3 INDICATEURS ET METHODES D'ESTIMATION DE LA PROTEOLYSE DANS LE LAIT**

La protéolyse dans le lait peut s'estimer par la mesure du potentiel protéolytique, la mesure de l'activité des protéases ou par la mesure des produits de dégradation. L'estimation de cette protéolyse passe donc par la mesure d'un ou plusieurs traceurs qui devront :

- traduire de manière fiable, et avec une sensibilité suffisante, l'état des protéines du lait;

- être reproductibles;

- être simples, rapides et peu coûteux, applicables en routine avec une automatisation possible

La première approche serait de définir deux paramètres permettant de caractériser chacun une source de protéolyse soit microbienne, soit endogène, en respectant les contraintes exposées ci-dessus. La deuxième approche serait de rechercher un paramètre global, respectant toujours les obligations déjà citées et intégrant toutes les sources de protéolyse.

L'inventaire des méthodes réalisé ci-dessous, tant pour l'estimation de la protéolyse microbienne ou endogène, que pour l'estimation de la protéolyse globale, montre qu'aucune des méthodes utilisées actuellement ne réunit l'ensemble de ces caractéristiques.

### **3.1 Méthodes d'estimation de la protéolyse microbienne**

La protéolyse d'origine microbienne dans le lait peut s'estimer par la mesure directe de l'activité des protéases microbiennes et de leurs produits de dégradation mais aussi par l'évaluation de la qualité bactériologique du lait. La mesure de la contamination du lait peut permettre de caractériser son potentiel protéolytique, c'est-à-dire le risque de dégradation des protéines entraînant des défauts de transformation et/ou d'affinage des produits.

#### **3.1.1 Estimation du potentiel protéolytique du lait à partir de sa qualité bactériologique**

Les niveaux de contamination microbiens induisant une dégradation de la qualité des protéines du lait varient (de  $10^5$  et  $10^9$  germes/ml) en fonction des souches bactériennes utilisées, des types de transformation effectués et des techniques de mesure de la protéolyse. Pour contourner cette difficulté, la filière laitière a imposé des seuils inférieurs à <100 000 et même 50 000 germes/ml. La notion de risque ayant été intégrée dans la démarche du contrôle de la protéolyse microbienne, la mesure du nombre de germes dans le lait peut s'utiliser comme une estimation du risque potentiel de protéolyse.

La mesure de la qualité bactériologique du lait comme indicateur du potentiel protéolytique nécessite la mesure de la flore mésophile et/ou de la flore psychrotrophe qui est la flore majoritaire dans les laits conservés au froid. Les méthodes de référence impliquent une incubation de 72 h à 30°C (flore mésophile; FIL, 1991 a) et 10 jours à 6,5°C (flore psychrotrophe; FIL, 1991 b) durées peu compatibles avec les contraintes industrielles. Ceci a conduit au développement d'un grand nombre de méthodes rapides et automatisables proposées comme techniques substitutives aux méthodes de référence.

### 3.1.1.1 Méthodes basées sur l'activité métabolique des bactéries.

#### 3.1.1.1.1 Méthodes traditionnelles

##### - Méthodes colorimétriques

Certaines enzymes microbiennes ont la capacité de transférer un hydrogène d'un substrat vers un accepteur biologique. La réaction se traduit par la réduction d'un colorant qui dépend de l'activité de l'enzyme et de sa concentration. Le temps nécessaire à l'obtention des résultats est de 6 à 8 h pour le test au bleu de méthylène et de 3 à 4 h pour le test à la résazurine.

La réduction des nitrates en nitrites peut aussi être suivie par l'intermédiaire d'un indicateur coloré (durée d'incubation : 5 h).

L'intensité de la coloration peut être reliée pour ces 3 méthodes à la contamination microbienne (0,62 et 0,40 et 0,57 respectivement; FIL 256, 1990)

Du fait de leur faible précision et des délais de réponse, ces méthodes, longtemps utilisées, sont maintenant tombées en désuétude.

##### - Autres méthodes

Le dosage des acides gras libres, de l'ammoniaque, du pyruvate et la mesure de l'oxygène dissous sont peu corrélés avec la contamination microbienne mesurée par les méthodes de référence (de 0,48 à 0,63), et les seuils de sensibilité correspondent à des contaminations microbiennes d'au moins  $10^6$  germes/ml (FIL 256, 1990).

Le test à la catalase doit être proscrit car l'activité de cette enzyme n'est pas toujours proportionnelle au nombre de micro-organismes présents dans le lait (FIL 256, 1990).

##### - Conclusion

Les méthodes traditionnelles d'estimation de la contamination microbienne développées dans les années 1960-1975, présentaient l'avantage d'être simples et peu coûteuses à réaliser. Cependant, la durée nécessaire à l'obtention des résultats, leur seuil de sensibilité trop faible (correspondant à des niveaux microbiens très élevés), leurs trop faibles corrélations avec les méthodes de référence font que toutes ces techniques sont actuellement abandonnées.

#### 3.1.1.1.2 Nouvelles Méthodes

Ces méthodes découlent du développement de nouveaux matériels, certaines s'appuyant sur des principes anciens.

### - Microrespirométrie

La mesure de l'oxygène consommé par les populations bactériennes par un microrespiromètre est fortement corrélée avec la flore mésophile mesurée par la méthode de référence (0,96). Cette méthode nécessite une incubation de 4 h et son seuil de sensibilité est d'environ  $5.10^4$  germes/ml. Malgré la durée nécessaire à l'obtention des résultats, une automatisation de la méthode permettrait de la rendre très attractive (Rongvaux-Gaïda et al., 1990).

### - Conductimétrie

La production d'ions, par le métabolisme microbien, devient suffisant pour entraîner une modification significative de la conductance du milieu, le temps de réponse étant d'autant plus grand que la contamination initiale est faible (Piton et Rongvaux-Gaïda, 1990).

Les corrélations relevées entre la conductimétrie et les différentes flores, mesurées par les méthodes de référence, sont élevées pour les coliformes et la flore mésophile ( $r = 0,82$ ) et sont très élevées pour la flore psychrotrophe ( $r = 0,95$ ). Le temps moyen pour atteindre une modification significative de conductance est de 7 à 9 h pour la flore mésophile. Pour la flore psychrotrophe, une incubation de 48 h à  $10^{\circ}\text{C}$  est nécessaire. Les durées d'obtention des résultats limitent grandement l'intérêt de cette méthode.

### - Cytochrome oxydase

La cytochrome oxydase est l'enzyme terminale de la chaîne respiratoire qui réduit l'oxygène moléculaire en eau. L'oxydation du TMPD (NNN'N' tétraméthyl-*p*-phénylène diamine dihydrochloride) par la cytochrome oxydase forme un radical stable et coloré. Les bactéries psychrotrophes, pour la plupart Gram -, possèdent une cytochrome oxydase très active.

Sur des laits contaminés artificiellement, Kroll, cité par Rongvaux-Gaïda et Piton-Malleret (1992) obtient des coefficients de corrélation de 0,84 entre l'activité cytochrome oxydase et la mesure de la flore psychrotrophe par la méthode de référence. Sur des laits de citerne et avec des temps d'incubation importants (48 h), les corrélations sont inférieures à 0,64 (Rongvaux-Gaïda et Piton-Malleret, 1992). Ces travaux démontrent les difficultés d'application, dans des conditions de production, d'une technique mise au point sur des laits parfaitement contrôlés.

### - ATP bactérien

L'augmentation du nombre et du métabolisme des micro-organismes se traduit par une augmentation de la teneur en ATP, intermédiaire énergétique ubiquitaire. Le dosage de l'ATP pourrait fournir une estimation du niveau de contamination du lait. Ainsi après une élimination de l'ATP des cellules somatiques, une extraction de l'ATP bactérien est effectuée, celui-ci réagissant spécifiquement avec la luciférine (Rongvaux-Gaïda et Piton, 1991).



Tableau 4 : Intérêt de la DEFT comme estimation de la flore bactérienne du lait cru

Nombre d'échantillon	Etendue (germes/ml)	Coefficient de corrélation	$\sigma^*$	Références
167 639 690	$7 \cdot 10^3 - 4 \cdot 10^6$ $10^{3,5} - 10^{7,5}$ $10^{3,5} - 10^{6,8}$	0,94 0,77 0,91	0,24	Cité par Hill (1991)
563	$10^3 - 10^{5,5}$	-	0,276	Dasen et al. (1991)
165	$10^{3,6} - 10^6$	0,76	0,306	Marin et Guyot (1993)

\* : écart-type résiduel de la régression en log

Quand la luciférine,  $Mg^{++}$  et l'oxygène sont présents en excès et que le pH est proche de 7,75, l'émission de lumière (mesurée à 550 nm) est proportionnelle à la concentration en ATP.

Trois méthodes ont été étudiées par plusieurs auteurs

- mesure de l'ATP bactérien (ATPp)
- mesure de l'ATP bactérien - l'ATP résiduel des cellules somatiques ( $\Delta$ ATP)
- mesure de l'ATP bactérien après séparation physique des différentes sources d'ATP (ATP-F)

La meilleure méthode est la mesure de l'ATP-F, qui présente en laboratoire, un écart-type résiduel de la régression, numération de la flore mésophile sur la teneur en ATP-F, de 0,301.

Rongvaux-Gaïda et al. (1991) ont testé la mesure de l'ATP-F avec un appareil automatique qui effectue un cycle complet d'analyse en 3 minutes (Bacto-Foss). L'écart-type résiduel est de 0,42 pour des laits de citernes et de 0,56 pour des laits de petits mélanges (tank à la ferme). La méthode automatique n'est pas compromise par l'augmentation de l'écart-type résiduel, la rapidité et la précision relative de la méthode en font une technique prometteuse pour l'avenir.

### 3.1.1.2 Comptage direct ou indirect du nombre de bactéries

#### 3.1.1.2.1 Comptage direct

Le comptage direct de la flore du lait s'effectue à partir d'un prélèvement de 0,01 ml disposé sur une surface de  $1\text{ cm}^2$ . Le comptage est manuel, la méthode est rapide (10 à 15 minutes) et très simple car ne nécessite pas de traitement spécifique du lait (FIL 256, 1990) et présente des corrélations de 0,93 avec la méthode de référence. La limite de cette méthode est liée à son seuil élevé de sensibilité (plus de 100 000 germes/ml).

#### 3.1.1.2.2 Direct Epifluorescent Filter Technique (DEFT)

Après un traitement protéolytique de surface, qui lyse les cellules somatiques, et une filtration, qui retient les globules gras, une teinture à l'acridine permet de colorer en orange les bactéries métaboliquement actives, les bactéries ou cellules mortes restant vertes. Le comptage des bactéries se fait avec un microscope à épifluorescence. La lecture est manuelle ou automatique. L'utilisation de la DEFT, du fait de sa rapidité et de ses bonnes corrélations avec les méthodes de référence apparaît comme une technique compatible avec les besoins de la filière lait. De nombreux appareils ont d'ailleurs été développés ces dernières années.

Le seuil de sensibilité de cette méthode, en fonction de l'appareil utilisé, est compris entre  $10^4$  germes/ml et  $6.10^4$  germes/ml (Dasen et al., 1991; FIL 256, 1990). Les corrélations avec la méthode de référence sont bonnes (de 0,77 à 0,91, voir tableau 4). L'obtention des résultats est rapide (15 minutes). Pour la zone 0-100 000 germes/ml,

Tableau 5 : Intérêt du test Limulus comme estimation de la flore gram moins du lait cru

Coefficient de corrélation	$\sigma^*$	Seuil de détection	Références
0,85	-	$10^3$ - $10^4$	Mickolajczik et Brunner (1978)
0,97	0,29	$<10^3$	Mottar (1987)
0,7	0,448	29 000	Rongvaux-Gaïda et Piton-Malleret (1991)
0,99	-	$<10^3$	Mottar (1993)

\* : écart-type résiduel de la régression en log

16 % des échantillons mesurés comme inférieurs à 100 000 germes/ml sont détectés comme supérieurs à 100 000 germes/ml (Marin et Guyot, 1993).

Une corrélation de 0,39 entre la DEFT et le nombre initial de psychrotrophes est mesurée ( $r = 0,73$  après pré-incubation 42 h à 7°C) (Tatini et al., 1991).

La DEFT apparaît adaptée aux besoins de la filière lait : rapidité, coût faible et bonne corrélation avec les méthodes de référence. Il convient cependant de noter qu'avec l'abaissement des seuils de paiement du lait utilisés par les laiteries (maintenant <50 000 germes totaux/ml), la précision de la DEFT est alors moins bonne.

### 3.1.1.2.3 Test Limulus (LAL : Limulus Amoebocyte Lysate test)

La flore psychrotrophe est constituée en grande majorité de bactéries Gram- (Richard, 1981). Les lipopolysaccharides (LPS) présents dans la paroi cellulaire de ces bactéries activent, en présence d'ions  $Ca^{++}$  ou  $Mg^{++}$ , une pro-enzyme coagulante qui réagit avec une protéine (le coagulogène) contenue dans le lysat d'amoebocyte de *Limulus*.

Les méthodes utilisant le LAL sont basées sur la gélification (Svensson et Hahn-Hägerda, 1987), les variations turbidimétriques du lait (Rongvaux-Gaïda et Piton-Malleret, 1991) ou sur une réaction colorimétrique entre l'enzyme activée et un substrat de synthèse (Mottar et al., 1993; Svensson et Hahn-Hägerda, 1987; Mottar, 1987). Les seuils de sensibilité sont très faibles (proches de  $10^3$ - $10^4$  germes/ml). Les corrélations avec la méthode de référence sont élevées (de 0,70 à 0,99, tableau 5).

Mottar et al. (1993) ont développé un test en routine. La méthode est rapide (<1h), le seuil de détection est inférieur à  $10^3$  germes/ml, la corrélation avec la flore Gram - est très élevée ( $r = 0,99$ ) et la déviation standard est la plus faible de toutes les méthodes développées actuellement. Dans ces conditions, la méthode devrait pouvoir trouver un développement à l'échelon industriel. La limite de cette technique, comme toutes les techniques de dénombrement microbien, reste la relation réelle existant entre ce dénombrement et l'éventuelle dégradation des constituants du lait.

## 3.1.2 Méthodes basées sur la détection des produits de dégradation de la protéolyse microbienne

### 3.1.2.1 Teneur en acide sialique

L'hydrolyse des  $\kappa$ -caséines par les protéases microbiennes forme la para  $\kappa$ -caséine et le fragment 106-169 (caséinoglycopeptide, soluble à pH 4,6) qui porte l'ensemble des glucides de la  $\kappa$ -caséine et notamment le N-acétylneuraminique (ou acide sialique). La teneur en acide sialique du lactosérum augmente lors de l'hydrolyse des  $\kappa$ -caséines.

Le coefficient de corrélation entre la teneur en acide sialique et le nombre des bactéries psychrotrophes protéolytiques est de 0,713 (Zalazar et al., 1993). La concentration en acide sialique est un critère adapté à l'évaluation de la contamination microbienne (Bishop et White, 1985; Mottar, 1984 b).

La teneur en acide sialique de la  $\kappa$ -caséine bovine de laits individuels est très variable, indépendamment de toute protéolyse microbienne (23 à 166  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de caséine) (Robitaille et al., 1991). Elle augmente significativement avec le stade de lactation, mais diminue fortement avec le nombre de lactation et le dénombrement cellulaire. De plus, le génotype AB de la  $\kappa$ -caséine est associé à une teneur élevée en acide sialique. L'utilisation de cette méthode comme indicateur de protéolyse de troupeau doit tenir compte de ces interférences.

L'intérêt de cette méthode repose sur une mesure directe du niveau de protéolyse des  $\kappa$ -caséines. Malgré l'utilisation de souches psychrotrophes protéolytiques, la relation entre la teneur en acide sialique et le nombre de psychrotrophes protéolytiques n'est pas excellente. Ceci pourrait s'expliquer par une absence, dans les travaux de Zalazar et al. (1993), d'ajustement de la teneur en acide sialique des laits étudiés par les facteurs de variation signalés par Robitaille et al. (1991).

### 3.1.2.2 Mesure de la dégradation de la $\kappa$ -caséine par électrophorèse

Les protéines du lait sont séparées par PAGE ou PAGE-SDS et leur quantification est assurée par densitométrie. De nombreux auteurs ont utilisé cette méthode pour mesurer la dégradation des  $\kappa$ -caséines par les protéases microbiennes, les seuils de sensibilité de la méthode sont supérieurs à  $10^6$ - $10^7$  germes/ml (Reinheimer et al., 1990; Guamis et al.; 1987; Adams et al., 1976). Malgré une mesure directe de la dégradation des  $\kappa$ -caséines, le temps nécessaire à l'obtention des résultats (au minimum plusieurs heures) interdit son utilisation comme indicateur de routine.

### 3.1.2.3 Méthodes de détection de la para- $\kappa$ -caséine

#### 3.1.2.3.1 Méthodes immunologiques

A priori, les méthodes immunologiques apparaissent les mieux adaptées à la mesure de la protéolyse dans le lait. Elles sont très sensibles (au moins de l'ordre du  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), très spécifiques et la mise au point de "kits" de mesure peut rendre ces techniques rapides. Cependant, les difficultés sont multiples : la production d'anticorps nécessite la purification du composant ou des composants retenus comme indicateurs de protéolyse, il est impératif d'éviter les réactions croisées, de plus le coût de la méthode ne doit pas être prohibitif.

Le plus souvent, ces méthodes sont semi-quantitatives car elles ont pour objectif principal d'indiquer un seuil maximal acceptable, compatible avec les besoins de la filière lait.

La protéolyse microbienne peut s'estimer par la mesure du caséinomacropéptide (CMP) ou de la para- $\kappa$ -caséine. Récemment, Picard et Collin (communication

personnelle, 1993) ont développé un test ELISA permettant de détecter la présence du caséinomacropéptide dans le lait.

### 3.1.2.3.2 Autre méthode

Valles et al. (1986) ont mis au point une méthode rapide (15 min) de mesure de la para- $\kappa$ -caséine basée sur l'apparition de flocons dans le lait en présence d'un réactif alcoolisé. Ce test s'avère cependant peu précis et peu sensible.

## 3.1.3 Méthodes de détection de l'activité des protéases par utilisation de substrats spécifiques

### 3.1.3.1 Méthode H.P.A. (Hyde Powder Azur)

L'Hyde Powder Azur (H.P.A.) est une méthode basée sur le relargage d'un peptide soluble bleu issu d'un substrat artificiel (dérivé du collagène) lié à un marqueur coloré.

Développée par Cliffe et Law (1982) pour mesurer l'activité des protéases extracellulaires des bactéries psychrotrophes Gram -, elle a été améliorée par Stead (1987 b) qui utilise un réactif de clarification pour une utilisation plus rapide.

Cette méthode permettrait de détecter une protéolyse dans le lait pour des niveaux d'au moins  $1,5$  à  $2,5 \cdot 10^6$  germes/ml (Stead, 1987 b; Cliffe et Law; 1982), alors que les méthodes électrophorétiques ne révèlent aucune dégradation des caséines (Kalogridou-Vassiliadou et Alichanidis, 1984).  $10^{10}$  germes/ml sont nécessaires pour Sanjose et al. (1987).

### 3.1.3.2 Mesure des protéases

Un dosage ELISA des protéases microbiennes de deux souches a été proposé par Stepaniak et al. (1987). Une bonne corrélation est observée entre ce dosage et l'activité des enzymes. Cependant, l'utilisation d'une telle méthode, au vu de la multiplicité antigénique des protéases microbiennes, nécessiterait une production de très nombreux anticorps, ou d'anticorps à très large spécificité afin de doser l'ensemble des protéases présentes dans le lait (Azcona et al., 1989).

### 3.1.3.3 Autres méthodes

La cinétique de l'hydrolyse de l'azocaséine (Kohlman, 1991 b,c) et l'estimation de la surface d'hydrolyse de la caséine dans un milieu contenant de l'agar (Stepaniak et

al., 1987; Christen et Marshal, 1984; Richardson et Newstead, 1979) sont des méthodes peu sensibles et essentiellement qualitatives (nécessitant au moins  $10^9$  germes/ml).

### 3.1.4 Détection de modifications chimiques du milieu : le test à l'alcool

Le test à l'alcool est utilisé comme indicateur de la stabilité des laits à la chaleur, mais aussi comme critère de qualité à la production pour la collecte des laits ayant subi un mauvais refroidissement.

Méto et al. (1979) montrent que l'instabilité des laits à l'alcool est détectée pour des contaminations de  $10^9$  *Pseudomonas fluorescens*/ml ou  $10^6$  microcoques protéolytiques/ml. Parallèlement, pour les deux flores, une protéolyse des caséines, et notamment des  $\kappa$ -caséines est mesurée par électrophorèse et une libération importante de groupements  $\alpha$ -aminés est notée par dosage à la ninhydrine. A l'opposé, un lait acidifié par des ferments lactiques devient très rapidement instable à la chaleur mais aucune protéolyse des caséines ni apparition de groupements  $\alpha$ -aminés ne sont observées au cours de la croissance de *Streptococcus diacetylactis*.

La stabilité des laits à l'alcool est très dépendante du pH du lait (Donnelly et Horne, 1986) ce qui limite son intérêt comme indicateur indirect de la qualité des protéines. Son utilisation ne se justifie donc que dans la détection d'une acidification excessive du lait suite à un mauvais refroidissement.

## 3.2 Méthodes d'estimation de la protéolyse endogène

### 3.2.1 Méthodes indirectes d'estimation de la protéolyse endogène

#### 3.2.1.1 Dénombrement cellulaire, conductivité électrique

Les mammites cliniques ou subcliniques sont un des facteurs potentiels de dégradation des protéines du lait.

Pour Barbano et al. (1991), des laits avec des dénombrements cellulaires supérieurs à  $100 \cdot 10^3$ /ml présentent des signes de protéolyse significatifs. Par contre, la capacité du dénombrement cellulaire à quantifier correctement la protéolyse pour des dénombrements élevés ( $>400 \cdot 10^3$  cellules/ml) apparaît aléatoire.

La dégradation de l'état sanitaire de la mamelle induit d'importantes variations de la composition protéique et minérale, en particulier une très forte augmentation de la teneur en chlorures est mesurée (Schultz, 1977). Des études récentes (Landsbergen et al., 1994; Nielen et al., 1993; Nielen et al., 1992; Maatje et al., 1992) montrent que la conductivité électrique du lait (fortement influencée par la teneur en chlorures) augmente avec une dégradation de l'état sanitaire de la mamelle et une baisse de production de lait (Deluyker, 1993 a,b). Cette approche pourrait, dans un proche avenir, être utilisable pour la détection de laits présentant des risques élevés de protéolyse (tri des laits aberrants dès la salle de traite).

### 3.2.1.2 Activité enzymatique

La mesure de la N-acétyl- $\beta$ -D-glucosaminidase, indicateur de mammité, présente de bonnes corrélations avec l'activité de la plasmine, la teneur en chlorures, le dénombrement cellulaire et la conductivité électrique (respectivement, 0,81, 0,88, 0,71, 0,87; Jensen et Knudsen, 1991; Schaar et Funke, 1986; Obara et Komatsu, 1984).

## 3.2.2 Méthodes directes d'estimation de la protéolyse endogène

### 3.2.2.1 Méthodes électrophorétiques

L'utilisation d'électrophorèses PAGE ou PAGE-SDS a permis de montrer une hydrolyse des caséines pour des laits à plus de  $10^6$  cellules/ml (Haelein et al., 1973). Cette hydrolyse est associée à une gélification du lait U.H.T après ajout de plasminogène (Kohlman et al., 1988). Par PAGE, l'activité protéolytique, avant et après infusion dans la mamelle de *Streptococcus agalactiae*, augmente parallèlement au dénombrement cellulaire (Saeman et al., 1988). Des niveaux de dégradation de plus de 50 % des caséines s'accompagnent d'une baisse du temps de coagulation du lait (Pearse et al., 1986).

### 3.2.2.2 Méthodes chromatographiques

Pour la mesure des  $\gamma$ -caséines, produits d'hydrolyse de la  $\beta$ -caséine, les méthodes chromatographiques ou électrophorétiques développées par Igarashi (1989) et Collin et al. (1991) sont des méthodes très fiables et très précises en laboratoire. Cependant, leurs applications en routine apparaissent plus difficiles.

### 3.2.2.3 Méthodes immunologiques

L'immunonéphélométrie microparticulaire a été développée récemment au laboratoire d'immunologie de l'Université Henri Poincaré, Nancy I, et est basée sur la mesure de l'intensité lumineuse diffusée lors de l'agglutination immunologique d'une phase microparticulaire sur laquelle est fixé un antigène. La présence en solution d'un antigène identique, à doser, inhibe, par compétition, l'agglutination des microparticules. La réaction est rapide (30 minutes à 1 heure, lecture par néphélométrie), le seuil de détection est de quelques femtomol/l et permet une dilution de l'échantillon limitant les risques d'interférences.

La méthode a été mise au point pour la mesure des teneurs en  $\alpha_s$ -caséines,  $\kappa$ -caséines (Collard-Bovy et al., 1991)  $\beta$ -caséines (El Bari et al., 1991), et plasmine (Marchal et al.,



Tableau 6 : nature des composants 5 et 8 de la fraction protéose peptones (Girardet, 1992)

Ancienne nomenclature	Fragment de la caséine $\beta$	Poids moléculaire (Da)	Nomenclature proposée
Composant 5	1-105 1-107	11500-13000	$\beta$ -CN-5P
Composant 8S	29-105 29-107	8800	$\beta$ -CN-1P
Composant 8F	1-28	3300-3900	$\beta$ -CN-4P

1989). El Bari et al. (1992) montrent que cette méthode est adaptée pour estimer le niveau de dégradation de la  $\beta$ -caséine par la plasmine.

Des tests ELISA ont été développés pour la mesure de la teneur du complexe plasmine-plasminogène (Politis et al., 1993; Collin et al., 1988)

### **3.3 Méthodes de détection de la protéolyse globale**

Ces méthodes sont dites globales car, même si elles ont le plus souvent été mises au point et utilisées pour la mesure de la protéolyse microbienne, leur principe repose sur la détection de produits de dégradation non spécifiques.

#### **3.3.1 Méthodes chimiques**

##### **3.3.1.1 Mesure de l'azote non protéique (ANP)**

Humbert et al. (1983), Noomen (1975) ont estimé les produits de dégradation du lait par la mesure de l'ANP (mesure par la méthode de Kjeldahl du surnageant filtré issu d'une précipitation du lait au TCA 12%). Cependant, l'azote non protéique, composé en partie des acides aminés libres et des peptides non précipitables issus de la protéolyse, comprend aussi des composants dont les variations sont a priori indépendantes de la protéolyse (cas de l'urée). Cette technique est à l'heure actuelle abandonnée car trop peu précise.

##### **3.3.1.2 Mesure de la teneur de en protéose peptones**

La fraction protéose peptones est obtenue après précipitation au TCA du surnageant de thermocoagulation du lait (Andrews, 1978 a,b; Rowland, 1937, 1938). Cette fraction a une teneur qui varie de 0,5 à 3 g/l dans un lait frais (Pâquet, 1989). Elle comprend quatre composants principaux : trois de ces composants sont issus de l'hydrolyse de la  $\beta$ -caséine :  $\beta$ -CN 5P (f1-105/107),  $\beta$ -CN 4P (f1-28),  $\beta$ -CN 1P (f29-105/107) (tableau 6). L'origine du quatrième (composant 3) n'est pas déterminée avec certitude (Girardet, 1992).

Pâquet (1987) montre que la teneur en protéose peptones augmente de 22 à 150% pour des contaminations supérieures à  $10^6$  bactéries/ml (utilisation de souches pures) avec une diminution des composants 3 et  $\beta$ -CN 5P au profit de peptides de faibles poids moléculaires.

Cette teneur augmente fortement dans les laits de mammites (1,8 g/l dans un lait sain et jusqu'à 9,2 g/l dans un lait de mammite; Singh et Ganguli cités par Kitchen, 1981) et au cours de la conservation du lait cru (2,5 mg/ml à 11,1 mg/ml après 7 jours; Andrews et Alichanidis, 1983).

La fraction protéose peptones apparaît sensible à la fois à la protéolyse microbienne et endogène. Le nombre important des constituants de cette fraction (38 composants séparés en électrophorèse par Andrews et Alichanidis, 1983) devrait permettre l'identification et la caractérisation d'un ou plusieurs composants, témoins fiables de la protéolyse globale du lait.

### 3.3.2 Méthodes spectrophotométriques basées sur la détection des produits de dégradation

#### 3.3.2.1 Mesure de l'absorption à 280 nm

L'absorption à 280 nm, très simple et rapide, a été utilisée par plusieurs auteurs comme mesure de la protéolyse dans le lait. Elle est peu sensible et ne mesure que les acides aminés aromatiques. L'absorption à 280 nm nécessite de mieux connaître les sites de clivage des protéases microbiennes et endogènes sur les protéines du lait, afin de mesurer la proportion des acides aminés aromatiques des produits d'hydrolyse. Ceci permettrait d'estimer leur correspondance avec les proportions des protéines du lait et ainsi d'éviter une sur ou sous-estimation de la concentration de ces produits d'hydrolyse.

#### 3.3.2.2 Méthode de Lowry

Le principe de la méthode est tiré des travaux de Hull (1947) et a été adapté par Lowry et al. (1951). Les peptides et acides aminés, solubles dans le TCA, sont mis en solution avec le réactif de Folin-Ciocalteu. Les résultats sont exprimés en concentration de tyrosine ("tyrosine value", TV).

L'activité protéolytique microbienne est détectée pour des niveaux de  $10^7$  à  $10^8$  germes/ml (Grover et al., 1989; Rowe et Gilmour, 1983; Patel et al., 1983; Juff, 1973). La protéolyse est corrélée à une augmentation du dénombrement cellulaire ( $r = 0,60$ ). L'incubation des laits à  $37^\circ\text{C}$ , en présence de bactéricide permet d'améliorer très sensiblement cette corrélation ( $r = 0,79$ ). Aucune variation en "tyrosine value" n'est notée pour des laits présentant des dénombrements inférieurs à 200 000 cellules/ml (Senyk et al., 1985).

Du fait de sa trop faible sensibilité, du manque de tyrosine dans les protéines laitières et du nombre important de produits pouvant interférer avec la méthode, cette technique est maintenant délaissée au profit de méthodes plus sensibles.

#### 3.3.2.3 Méthode à la ninhydrine

La ninhydrine est un réactif chromogène (570 nm) qui réagit avec les groupements  $\alpha$ -aminés. Développée par Moore et Stein (1954) et Reimerdes et Klostermeyer (1976), cette méthode a été beaucoup utilisée dans les années 1960-1980.

Hockney et Cousin (1982) ont montré que la méthode à la ninhydrine ne détecte pas les faibles niveaux protéolytiques (non définis). Cette méthode est adaptée à la détection de niveaux protéolytiques élevés.

#### 3.3.2.4 Dosage des groupements $\alpha$ -aminés par l'acide 2.4.6. trinitrobenzène sulfonique (TNBS)

Cette technique est basée sur le dosage à 420 nm du complexe trinitrophénylé formé entre l'acide 2.4.6. trinitrobenzène sulfonique (TNBS) et les groupements  $\alpha$ -aminés libres des acides aminés, des peptides ou des protéines. Cette méthode est rapide (1 heure) et peu coûteuse.

Elle permet de détecter des phénomènes protéolytiques avant le développement de mauvais goûts dans les laits U.H.T (Mc Kellar, 1981), pour des seuils de contamination supérieurs à  $3,2 \cdot 10^7$  germes/ml (Griffiths, 1989). Cette méthode est aussi utilisée pour mesurer l'activité des protéases natives du lait (De Rham et Andrews, 1982 a).

Humbert et al. (1990) en améliorant la méthodologie par l'utilisation d'un réactif de transparisation des milieux biologiques rend la méthode TNBS facilement utilisable dans le lait. Le seuil de sensibilité dans des laits de grands mélanges conservés à 5°C est de  $10^7$ - $10^8$  germes/ml, la flore mesurée n'étant pas spécifique mais une flore moyenne non sélectionnée sur son caractère protéolytique.

#### 3.3.2.5 Méthode à la fluorescamine

Les acides aminés et les peptides, solubles dans le TCA, sont mis en présence de fluorescamine (excitation : 390 nm; émission : 475 nm). Leur concentration est proportionnelle à l'émission mesurée.

Des variations de l'activité protéolytique sont notées pour des contaminations de  $10^6$  à  $10^8$  germes/ml (Fernandez et al., 1992; Rowe et al., 1990; Grieve et Kitchen, 1985). Beeby (1980) a utilisé cette technique pour suivre la libération du caséinomacropéptide.

Pour Rollema et al. (1987) qui ont comparé 7 méthodes de détection de l'activité protéolytique bactérienne, la sensibilité des méthodes à la fluorescamine, TNBS et azocaséine est comparable. La méthode la plus sensible est l'ELISA mais reste trop spécifique d'une protéase. Dans cette étude, l'Hyde Powder Azur a montré une faible sensibilité, la mesure des tyrosines solubles dans le TCA et la diffusion dans l'agar apparaissent très peu sensibles.

La méthode à la fluorescamine apparaît la plus sensible des techniques colorimétriques et peu d'interférences peuvent intervenir dans la mesure (Kwan et al, 1983; Chism et al., 1978). Son intérêt comme technique de mesure de la protéolyse endogène devra être testé.

### 3.3.2.6 Méthode à l'o-phthalaldéhyde (OPA)

L'o-phthalaldéhyde (OPA), associé à un produit contenant un radical thiol (SH) réagit quasiment avec tous les groupements aminés pour donner un produit qui absorbe à 335-340 nm.

Church et al. (1983) montrent que l'OPA, associé au  $\beta$ -mercaptoéthanol, a une sensibilité plus forte que la plupart des méthodes basées sur la réactivité d'un produit avec les groupements  $\alpha$ -aminés (TNBS, Lowry). La lecture se fait dans le visible et nécessite donc simplement un spectrophotomètre, moins coûteux.

Medina Hernandez et al. (1991) ont amélioré la méthode OPA en utilisant comme produit associé le N-acétyl-L-cystéine plus stable que le  $\beta$ -mercaptoéthanol et que l'éthanthiol (méthode proposée par Frister et al., 1986).

L'intérêt de cette méthode par rapport aux autres techniques de mesure des groupements  $\alpha$ -aminés semble encore à vérifier.

### 3.3.3 Méthode spectrophotométrique basée sur la détection de l'activité des protéases par utilisation de la fluorescéine isothiocyanate liée à la caséine

C'est une méthode basée sur la mesure par fluorescence de l'isothiocyanate libéré lors de la protéolyse d'un substrat caséique marqué.

Comme la méthode utilisant le TNBS, cette technique détecte des phénomènes protéolytiques pour des contaminations de  $10^8$  bactéries/ml (Christen et Senica, 1987) par contre, pour ces auteurs, elle ne présente pas de corrélation avec le niveau de contamination microbien.

### 3.3.4 Autres méthodes

#### 3.3.4.1 Méthodes chromatographiques

Lopez-Fandino et al. (1993) ont développé une méthode chromatographique (HPLC) pour l'étude de la protéolyse dans le lait U.H.T. Cette méthode permet de séparer les produits d'hydrolyse issus de la dégradation microbienne ou plasminique.

#### 3.3.4.2 Radioactivité

Donnelly et Barry (1983) utilisent de la  $\beta$ -caséine marquée au  $^{14}\text{C}$  pour étudier l'évolution de l'activité des protéases endogènes (de type plasmine). La mesure de la radioactivité émise par les  $\gamma$ -caséines permet d'évaluer le taux de conversion de la  $\beta$ -caséine en  $\gamma$ -caséines.

Cette méthode est aussi sensible que la méthode à la fluorescéine isothiocyanate liée à la caséine, 10 fois plus sensible que la méthode TNBS et 1000 fois plus sensible que la méthode de Hull (dérivée de la méthode de Lowry) (Christen, 1987).

#### 3.3.4.3 Méthode cinétique avec inhibition

La titration du site actif de la protéase, au moyen d'inhibiteurs et en présence d'un substrat spécifique permet de mesurer l'activité de la protéase (Humbert, 1986). Malgré une très bonne sensibilité, le coût et la toxicité des inhibiteurs rendent ces techniques difficiles à employer. De plus ces méthodes sont peu utilisables si on s'adresse à une protéase inconnue ou à un mélange de protéases.

#### 3.3.4.4 Utilisation de peptides synthétiques

L'utilisation de peptides synthétiques spécifiques pour la détection d'activité protéasiques a été beaucoup étudiée par Humbert (1986), ont été notamment testés différents peptides de la famille des nitroanilides. Ces méthodes peuvent être couplées avec un réactif de transparisation.

Ces techniques, très intéressantes d'un point de vue fondamental, sont actuellement inapplicables en routine de par la complexité et le coût des méthodologies à mettre en oeuvre.

### 3.4 Conclusion

#### - Méthodes de détection de la protéolyse microbienne

Si les méthodes de mesure rapide de la contamination du lait sont insuffisantes pour traduire la qualité protéique du lait, elles sont cependant indispensables à l'estimation du potentiel protéolytique microbien du lait. Parmi toutes les méthodes rapides d'estimation de la contamination microbienne développées ces dernières années, les méthodes LAL et DEFT présentent toutes les caractéristiques (rapidité, précision, faible coût) d'une utilisation en routine correspondant aux besoins de la filière lait. Ces méthodes pourraient se développer, non pas comme mesures a posteriori pour le paiement du lait, mais plutôt comme méthodes de contrôle du potentiel protéolytique microbien du lait à la collecte et à l'usine.

La mesure des produits de dégradation des protéines du lait par les protéases microbiennes n'a pas pour objectif de mesurer le potentiel protéolytique microbien du lait, mais plutôt d'estimer juste avant transformation, les capacités du lait à être utilisé (l'exemple du lait U.H.T. est significatif). Actuellement, aucune méthode spécifique ne répond complètement aux besoins des industriels. La mise sur le marché d'un test ELISA pour la mesure du CMP dans les laits U.H.T. est un premier pas qui permettra de répondre aux exigences de qualité imposées à l'ensemble de la filière.

La maîtrise et le contrôle de la pollution microbienne du lait ne doivent pas sous-estimer le rôle des protéases natives qui provoquent elles aussi une dégradation des protéines.

#### - Méthodes de détection de la protéolyse endogène

Les protéases natives, contrairement aux protéases microbiennes, sont, quel que soit le mode de production, présentes dans le lait.

Les méthodes de mesure spécifique des produits de dégradation issus de cette protéolyse sont comme pour la protéolyse microbienne, encore très peu développées. Ces méthodes sont souvent indirectes, peu précises et n'ont pas pour objectif initial la mesure de la qualité des protéines (conductivité électrique du lait, dénombrement cellulaire). Les mesures directes sont précises mais très lourdes à utiliser (teneur en  $\gamma$ -caséines, teneur en protéose peptones, activités protéasiques). Le développement récent de l'immunonéphélométrie particulière pourrait permettre une avancée significative dans le contrôle de la protéolyse endogène. La complexité du système protéasique natif du lait explique en partie la carence de méthodes rapides de détection. De plus, les travaux portant sur les protéases natives du lait sont beaucoup plus récents et moins nombreux que ceux concernant la protéolyse microbienne.

Les méthodes de mesure de la protéolyse globale du lait (intégration de la protéolyse microbienne et endogène) reposent sur des principes simples. De nombreuses méthodes ont été développées ces vingt dernières années, comme indicateurs de protéolyse microbienne mais très peu comme estimateur de protéolyse globale. La sensibilité de la méthode de Lowry, l'absorption à 280 nm, la méthode à la ninhydrine et la mesure de l'azote non protéique sont notoirement insuffisantes pour détecter les premiers stades de la protéolyse dans le lait. Par contre, les différentes méthodes utilisant la fluorescence ou le TNBS (surtout depuis le développement nouveau donné à cette méthode par l'utilisation d'un produit de transparisation) réalisent un bon compromis entre sensibilité, rapidité et coût d'utilisation.

Toutes ces méthodes globales présentent le handicap d'avoir été testées et développées comme mesure de la dégradation protéolytique microbienne, des études supplémentaires devront être faites pour valider ces méthodes comme indicateurs de protéolyse globale.

## CONCLUSION

L' étude des facteurs de variation de la protéolyse dans le lait, qu'elle soit d'origine microbienne ou endogène, montre bien la difficulté d'appréhender dans leur totalité les phénomènes de dégradations de la qualité des protéines.

La dualité d'origine et d'action des protéases microbiennes et endogènes a induit, ces vingt dernières années, une orientation des travaux de recherche par type de protéolyse. Peu d'études ont traité de la protéolyse globale et de l'ensemble des facteurs pouvant influencer sur la qualité des protéines du lait.

La compréhension des phénomènes protéolytiques du lait devra passer par l'étude séparée de la protéolyse endogène et microbienne, mais aussi par l'analyse des interactions existant entre ces deux types de protéolyses. Egalement, la recherche d'indicateurs de protéolyse doit être entreprise; ces indicateurs devront être adaptés à la ou aux sources de protéolyses étudiées, mais aussi au niveau d'approche considéré, c'est-à-dire le lait de quartier, le lait de petits mélanges ou de grands mélanges.



# **MATERIEL ET METHODES**

## MATERIEL ET METHODES

### 1 METHODES

#### 1.1 Dénombrements bactériens

Les dilutions décimales du lait sont réalisées avec une solution de tryptone-sel (1g de tryptone + 8,5 g de NaCl dans 100 ml d'eau à pH 7) et les numérations sont effectuées sur un milieu PCA (Plate Count Agar).

- Le dénombrement de la flore aérobie mésophile est effectué après 3 jours d'incubation à 30°C.
- Le dénombrement de la flore psychrotrophe est effectué après 10 jours d'incubation à 7°C.

#### 1.2 Taux Protéique (TP), Taux Butyreux (TB), dénombrement cellulaire, teneur en acides gras libres

Le TP, le TB (Analyseur Irma), le dénombrement cellulaire (Fossomatic 215, Foss electric Hillerød, Danemark) et la teneur en acides gras libre (méthode BDI, annexe 1) et en lactose sont mesurés aux laboratoires interprofessionnels de Pixérécourt ou d'Epinal.

#### 1.3 pH et teneur en chlorures

Le pH et la teneur en chlorures sont mesurés sur le lait refroidi à 4°C moins de 3 h après prélèvement (pH-meter/ionometer, Orion, 920A, Boston, Ma, USA).

#### 1.4 Détermination de la nature et de la teneur des matières azotées du lait.

La teneur en azote total (NT), en azote soluble (Nsol) et en azote non protéique (ANP) est mesurée par la méthode de Kjeldahl (annexe 2).

Les teneurs en protéines et caséines, exprimées en g de protéines par litre de lait, sont obtenues à partir des valeurs en azote protéique (NT-ANP) et azote caséique (NT-Nsol) corrigées par les facteurs de conversion 6,34 et 6,30 (Ribadeau-Dumas et Grappin, 1989).

Teneur en protéines = 6,34 \* (NT - ANP)

Teneur en caséines = 6,30 \* (NT - Nsol)

### 1.5 Pourcentage des différentes caséines

Les caséines du lait sont obtenues par précipitation à l'acide acétique 1 N (pH 4,6). Après centrifugation, le culot est récupéré et dissout dans NaOH (1N). L'ensemble est dialysé 48 h, puis lyophilisé.

Les différentes caséines sont séparées par chromatographie FPLC (Pharmacia, Uppsala Sweden) sur une colonne échangeuse d'anions Mono Q HR 5/5 (Pharmacia) d'après Collin et al (1991). Les profils sont traités à partir du logiciel Maxima (Waters, Fullerton, USA). L'absorption à 280 nm n'étant pas identique pour toutes les caséines (Guillou, 1986), des facteurs de correction sont appliqués en fonction des caractéristiques des colonnes et des étalons de caséines utilisés (Sigma Chemical Company, St Louis, USA).

### 1.6 Teneur en azote et nature de la fraction protéose peptones

#### 1.6.1 Teneur en azote de la fraction protéose peptones

L'extraction est effectuée selon le fractionnement préconisé par Rowland (1938) et adapté par Andrew (1978 a, b). Le facteur de conversion utilisé pour obtenir la teneur en protéines est 6,54 (Ribadeau-Dumas et Grappin, 1989) (annexe 3).

#### 1.6.2 Nature de la fraction protéose peptones

Les constituants de la fraction protéose peptones sont séparés par électrophorèse PAGE. La teneur relative des constituants de la fraction protéose peptones est obtenue, en divisant les valeurs trouvées par densitométrie pour chacun des constituants, par la valeur totale densitométrique de la fraction protéose peptones. La concentration des composants de la fraction protéose peptones dans le lait est obtenue en multipliant la valeur relative de chaque composant par la teneur en protéose peptones mesurée par la méthode de Kjeldhal.

### 1.7 Concentration en calcium colloïdal

La teneur en calcium colloïdal est mesurée par spectrométrie d'absorption atomique (Perkin Elmer, modèle 305, Uberlingen, Germany) (annexe 4).

### 1.8 Temps de coagulation (R) et temps d'obtention de la fermeté standard (K20)

Le temps de coagulation (R) et le temps d'obtention de la fermeté standard (K20) sont mesurés à partir d'un échantillon de lait écrémé. Le lait, empréuré, est soumis à des oscillations linéaires périodiques, un pendule solidaire d'un miroir étant plongé dans l'échantillon (Formagraph, Foss Electric, Hillerød, Danemark). Un flash lumineux régulier permet d'enregistrer les mouvements du pendule sur un papier photosensible. Le diagramme obtenu indique l'évolution de la fermeté du caillé (Mac Mahon et Brown, 1982). Il s'agit d'une méthode destructive (annexe 5).

### 1.9 Dosage des groupements $\alpha$ -aminés par l'acide 2, 4, 6 trinitrobenzène sulfonique (TNBS)

Cette méthode est basée sur le dosage, par spectrométrie d'absorption moléculaire, du complexe coloré (jaune, absorption à 420 nm) trinitrophénylé formé entre l'acide 2, 4, 6 trinitrobenzène sulfonique (TNBS) et les groupements  $\text{NH}_2$  libres des acides aminés, des peptides ou des protéines (annexe 6).

### 1.10 Dosage de l'activité de la plasmine et de la teneur en plasminogène

L'activité protéolytique de la plasmine peut être mise en évidence par l'emploi de différents substrats de synthèse, appartenant à la série des 4-p-Nitroanilides, qui sont hydrolysés au cours de l'incubation par les protéases de type plasmine. La mesure se fait par spectrométrie après transparisation totale du milieu réactionnel par un réactif de transparisation (annexe 7).

L'activation du plasminogène en plasmine se fait par ajout de 380 UI d'urokinase/ml de solution à doser. Le mélange est ensuite placé 30 minutes à 37°C pour permettre une activation complète du plasminogène libre contenu dans le lait.

Le dosage de l'activité de la plasmine+plasminogène correspond à la méthode de mesure de l'activité de la plasmine.

### 1.11 Fabrication fromagère

Les transformations sont de type pâte molle.

42 kg de lait cru sont pasteurisés (72-74°C, 40 secondes) puisensemencés avec des ferments lactiques mésophiles lyophilisés (2 g/100 kg; Ezal ®, MM101).

La température de la salle de transformation est maintenue à 25°C et l'hygrométrie à 80%.

Après une maturation de 35 min à 34°C, les laits sont emprésurés avec une présure titrant 520 mg de chymosine active par litre (force 1/10 000) à raison de 25 ml par 100 kg de lait et à une température de 34°C. Le temps de floculation (Tf) est estimé visuellement : la floculation est considérée comme ayant lieu dès la formation d'un gel. Un tranchage vertical en colonnes de 2 \* 2 cm est effectué après 3 Tf. Le caillé est ensuite brassé 0,75 Tf et 1,5 Tf après le tranchage. Le moulage est réalisé 2 Tf après le tranchage avec un répartiteur dans des moules en inox (diamètre : 11 cm; hauteur : 13 cm, 23 trous). Le caillé est retourné . Le démoulage a lieu environ 21 h après moulage. Les fromages sont alors plongés pendant 45 minutes dans une saumure saturée en NaCl puis égouttés pendant 24 h. Ils sont ensuite placés en salle d'affinage à une température d'environ 13°C. Une pulvérisation d'une suspension de spores de Pénicillium (SAM + SA + BH + VB) est effectuée pendant les trois premiers jours d'affinage. Les fromages sont emballés 11 jours après le début de l'affinage et sont conservés 4 semaines à +6°C.

Les paramètres mesurés sont :

- Cinétique d'égouttage et d'acidification : pesée de la quantité de lactosérum égoutté et mesure de l'acidité Dornic à 1 h, 2 h, 4 h 30, 7 h 30 et 18 h 30 après moulage.
- Détermination des teneurs en matière sèche (MS), azote total (NT) et azote non protéique (ANP) sur un échantillon moyen de lactosérum (annexe 2).
- Pesée des fromages au démoulage (J+1), après ressuyage (J+2) et à l'emballage (J+10). Les teneurs en matière sèche (MS), matières grasses (MG), NT et ANP sont déterminées à ces mêmes dates.

Le rendement fromager brut correspond au poids de fromage obtenu au démoulage pour 100 kg de lait mis en oeuvre. Le rendement ajusté en MS est calculé selon la correction proposée par Maubois et Mocquot (1967) :

$$\text{Rdt aMS} = \text{Rendement brut} * (\text{MSf} - \text{MSlact}) / (\text{MSfmoy} - \text{MSlact})$$

Rdt aMS : Rendement ajusté en MS; MSf : matière sèche des fromages; MSlact : matière sèche du lactosérum; MSfmoy : matière sèche moyenne des fromages fabriqués.

Pour un écart d'un point de TB du lait par rapport à la moyenne, le rendement est corrigé de 0,25 kg et pour un écart d'un point de TP, le rendement est corrigé de 0,19 kg selon l'équation de Maubois et al (1970).

Un jury de dégustation composé de 8 personnes a évalué l'aspect, la forme extérieure, la texture et les qualités organoleptiques des fromages (annexe 8).

## 1.12 Techniques électrophorétiques

### 1.12.1 Electrophorèse en gel de polyacrylamide et en conditions non dénaturantes (PAGE- native).

La méthode de Hillier (1976) a été adaptée par Pâquet (1986) (PAGE-native) au système vertical, 2001 apparatus (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden), pour un gel d'épaisseur 1,5 mm (T : 9,3%; C : 4,3%) dans un tampon Tris 0,38 M (pH 8,9). Le tampon d'électrode contient du Tris 0,005 M, de la glycine 0,07 M, pH 8,3. Les échantillons (5 mg/ml) sont dissous dans le tampon Tris-HCL 0,38 M pH 8,9, contenant 10% (v/v) de glycérol et du bleu de bromophénol.

### 1.12.2 Electrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (PAGE-SDS).

La méthode en tampons discontinus de Laemmli et Favre (1973) est utilisée. Le gel est formé d'un gel de séparation (T: 15,4%; C: 2,7%) en tampon Tris-HCL 0,38M, pH 8,8 contenant 0,1% (wt/v) de sodium dodécylsulfate (SDS) et d'un gel de concentration (T : 4,9%; C : 2,7%) en tampon Tris-HCL 0,125 M, pH 6,8 contenant 0,03 % (wt/v) de SDS. Les échantillons (5 mg/ml) sont dissous dans un tampon tris-HCL 0,125 M, pH 6,8 contenant 2% (v/v) de SDS et 5% (v/v) de 2-mercaptoéthanol. Ils subissent un chauffage à 100°C pendant 3 minutes avant addition d'un cinquième de glycérol 50% (v/v) contenant du bleu de bromophénol. Le tampon d'électrode contient du Tris 0,05 M de la glycine 0,4M et 0,1% (p/v) de SDS. Des conditions électriques de 60 mA, 500 V, 30 W sont appliquées par gel.

Les protéines standard utilisées sont la séralbumine (66 kDa), l'ovalbumine (45 kDa), la glycéraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase (36 kDa), l'anhydrase carbonique (29 kDa), le trypsinogène (24 kDa), l'inhibiteur de trypsine (20,1 kDa), et l' $\alpha$ -lactalbumine (14,2 kDa) (Sigma Chemical Compagny, Saint Louis, MO).

### 1.12.3 Electrophorèse bidimensionnelle (PAGE-2D)

Pour l'électrophorèse PAGE bidimensionnelle, la première dimension (PAGE en condition non dénaturante) est d'une épaisseur de 1,0 mm. Après la migration, la partie du gel contenant les protéines séparées, est excisée et équilibrée pendant 15 minutes dans un tampon Tris (0,125 M; pH 6.8) contenant 0,1% (wt/vol) de SDS. Ce morceau de gel est inséré au sommet d'une SDS-PAGE de 1,5 mm d'épaisseur (seconde dimension), une solution chauffée d'agarose (1% wt/vol) et de SDS à 0,1% (wt/vol) permet de sceller les deux gels.

### 1.12.4 Révélation des gels d'électrophorèse

La quantification des protéines séparées électrophorétiquement a été réalisée par densitométrie (Ultrosan XL densitometer, Pharmacia) après coloration au bleu de Coomassie (0,1% (wt/vol) de bleu de Coomassie R-250 dans 50% (vol/vol) de méthanol et 10% (vol/vol) d'acide acétique pendant 30 minutes). La décoloration est effectuée pendant la nuit dans la même solution sans bleu de Coomassie.

### 1.12.5 Transfert des protéines par Western-Blot

Pour l'électroblotting, les protéines sont transférées sur une membrane de polyvinylidene difluoride. Avant l'électroblotting, la membrane Immobilon-P (Millipore Corp., Milford, MA) est humidifiée dans une solution de méthanol (100%) pendant 1 à 3 secondes, transférée dans l'eau (1-2 minutes), et finalement plongée dans la solution de transfert (10 minutes). Le gel est équilibré 10 minutes dans le tampon de transfert puis posé sur la membrane Immobilon-P, le tout est placé dans une cuve verticale (Hoeffer TE-50 Transphor cell, Hoeffer Scientific Instrument, San Francisco, CA). L'orientation du système est telle que le gel est disposé côté cathode et la membrane côté anode. Le transfert se fait à 4°C pendant 15 h sous une tension constante de 90V.

### 1.13 Séquençage des acides aminés

La séquence d'acides aminés est réalisée sur un séquenceur Applied Biosystems 476A (Applied Biosystems, Foster city, CA) par identification des dérivés phénylthiohydantoïne. Les protéines à séquencer sont repérées par coloration au rouge Ponceau pendant 30 minutes (2% (wt/vol)), excisées de la membrane immobilon-P, coupées en petits fragments (1×5 mm) et placées sur le support Zitex support du séquenceur 476A. Tous les produits chimiques utilisés ont été fournis par Applied Biosystems, Inc-Perkin Elmer.

### 1.14 Composition en acides aminés

Pour la composition en acides aminés, les protéines sont excisées de la membrane immobilon-P et hydrolysées avec HCL 6 M à 110°C pendant 24 h en présence de phénol (0,5%; wt/vol) et de 2-mercaptoéthanol (0,1%; vol/vol) pour réduire la perte des acides aminés labiles. La composition en acide aminé est réalisée sur le système Biotronick LC 3000 analyzer (Braun Scientec, Melsungen, Germany) par identification des dérivés ninhydrine.

## **2 ORIGINE DES LAITS, ANALYSES EFFECTUEES, TRAITEMENT DES DONNEES**

### **2.1 Etude de la protéolyse microbienne**

#### **2.1.1 Influence de la contamination microbienne, de la température et de la durée de stockage sur la protéolyse du lait**

L'étude des facteurs de variation de la protéolyse microbienne et la mesure d'indicateurs de dégradation des protéines dans des conditions de conservation proches de celles de la production sont les objectifs principaux de cette partie.

#### **Origine des laits**

Les laits ont été prélevés dans une exploitation du sud de la Meurthe et Moselle. Le lait de la traite du matin est prélevé refroidi (température < 4°C) moins de deux heures après la traite puis transféré dans trois tanks réglés respectivement à 2°C, 3°C et 4°C (250 litres de lait par tank, chacun d'une capacité de 320 litres). Les tanks sont munis d'une agitation automatique réglée toutes les 15 minutes, le contrôle de la température est assuré par une sonde digitale d'une précision de 0,1°C. Le lait est ainsi conservé 96 h. Aucun report de lait n'est effectué durant la période de conservation, "l'âge" du lait correspond ainsi exactement à la durée de conservation.

Pour chaque température de stockage, trois niveaux de flore mésophile à 48h sont utilisés :

- < 10 000/ml (B1)
- < 50 000/ml (B2)
- >100 000/ml (B3)

Les prélèvements de lait ont été effectués dans d'excellentes conditions d'hygiène pour le niveau B1 de contamination. Pour le niveau B2, le refroidissement du lait a été bloqué pendant environ 6 h le premier jour (la température finale a été de 6 à 6,5°C). Pour obtenir le niveau B3 le refroidissement a été bloqué pendant environ 18 h (la température finale a été d'environ 8° C). Trois répétitions par niveau de contamination ont été effectuées.

### Analyses

Ont été mesurés :

*A 0 h, jour de traite*

- dénombrement cellulaire, taux protéique (TP), taux butyreux (TB)
- activité plasminique

*A 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h*

- teneur en matière sèche (MS)
- dénombrement de la flore aérobie mésophile et de la flore psychrotrophe
- fractionnement azoté : teneur en azote total (Nt), azote non protéique (ANP) et azote soluble (Nsol),
- temps de coagulation (R) et temps d'obtention de la fermeté standard (K20)
- pourcentage des différentes caséines
- teneur de la fraction protéose peptones
- mesure des groupements  $\alpha$ -aminés par la méthode TNBS

Des transformations fromagères pilotes de type pâtes molles ont été réalisées pour deux des trois répétitions à J+2, J+3, J+4.

### Traitement et analyse statistique des données

L'analyse des données a été effectuée selon la procédure GLM (General Linear Model) en mesures répétées du logiciel SAS.



Le modèle est décrit ci-dessous :

<u>Modèle global</u>	<u>Modalités</u>	<u>DDL</u>
- Température	2°C, 3°C, 4°C	2
- Bloc	B1, B2, B3	2
- Résiduelle		22
<u>Interaction avec le temps</u>		
- Temps	0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h	4
- Temps*Température		8
- Temps*Bloc		8
- Résiduelle		88
Total (3 températures * 3 blocs * 5 temps * répétitions)		134

Chaque bloc correspond à un niveau bactérien. Les éventuelles différences observées entre blocs peuvent provenir soit d'un effet du niveau bactérien, soit d'un effet propre du lait, les 3 répétitions d'un même niveau bactérien ne provenant pas du même lait mais de la même exploitation.

Les résultats des différentes variables sont présentés soit en fonction du temps de conservation seul, soit en fonction du temps de conservation et des niveaux bactériens enfin soit en fonction du temps de conservation, des niveaux bactériens et de la température en cas d'influence significative d'un ou plusieurs de ces facteurs.

### 2.1.2 Influence de l'allongement de la durée de stockage du lait à la ferme sur sa qualité bactériologique

L'objectif est d'étudier l'influence de l'allongement de la durée de stockage du lait à la ferme sur la croissance microbienne pour une durée de stockage passant de 2 à 3 jours.

Des mesures de la flore mésophile et psychrotrophe ont été effectuées sur des laits de tank, après 0h, 24h, 48h et 72h de conservation à la ferme chez 48 producteurs de l'Union Lorraine des Producteurs de Lait. Ces mesures ont été répétées 2 fois chez 16 de ces 48 producteurs. 256 prélèvements (64\*4) ont ainsi été effectués en juillet 1993.

## 2.2 Etude de la protéolyse endogène

### 2.2.1 Incidence de la protéolyse endogène dans des laits à différents niveaux cellulaires, mesure d'indicateurs sur 86 laits de quartier.

L'incidence de la protéolyse endogène sur l'intégrité des caséines et la comparaison d'indicateurs directs de protéolyse (activité de la plasmine, teneur en protéose peptones et % $\gamma$ -caséines/%( $\alpha$ + $\beta$ + $\kappa$ )-caséines) et indirects de la protéolyse (teneur en chlorures, pH, dénombrement cellulaire) sont étudiées sur 86 laits de quartier.

#### Origine des laits

60 animaux Prim'holstein issus de 3 exploitations ont été sélectionnés pour leur dénombrement cellulaire élevé (>400 000/ml) à partir des résultats du contrôle laitier des 3 mois précédant l'expérimentation. Au cours de la traite du soir, un dénombrement cellulaire a été effectué quartier par quartier pour chacune de ces vaches. Pour ceux présentant des dénombrements cellulaires variables entre les quartiers (différence > 100 000 cellules/ml) un nouveau prélèvement a été réalisé le lendemain matin. Pour chaque animal, les laits ont été prélevés uniquement sur les 2 quartiers avants et/ou sur les 2 quartiers arrières, 31 vaches, soit 86 quartiers, répondant à ces critères. Les animaux retenus ne présentaient pas de mammites cliniques.

#### Analyses

Sur chaque lait ont été déterminés :

- dénombrement cellulaire, pH et teneur en chlorures
- fractionnement azoté : Nt, ANP, Nsol
- pourcentages des différentes caséines, le rapport % $\gamma$ -caséines/%( $\alpha$ + $\beta$ + $\kappa$ )-caséines étant défini comme indice de protéolyse endogène
- mesure des groupements  $\alpha$ -aminés par la méthode TNBS
- activité plasminique
- teneur en protéose peptones, séparation des différents composants par électrophorèse PAGE- native.
- R

Sur deux laits, l'un faiblement et l'autre fortement protéolysés, ont été effectués

- électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (PAGE-SDS).
- électrophorèse bidimensionnelle (PAGE-2D)
- transfert des protéines par Western-Blot
- séquençage des acides aminés et composition en acides aminés de composants de la fraction protéose peptones

## Traitement et analyse statistique des données

### Corrélations

Les corrélations sont calculées deux à deux à l'aide du logiciel STATITCF (Philippeau, 1989) pour l'ensemble des données. Puis, pour les variables les plus corrélées entre-elles, successivement pour les laits à moins de 250 000 cellules/ml et à plus de 250 000 cellules/ml, des tableaux de corrélations sont présentés. Le dénombrement cellulaire est linéarisé en prenant sa transformée logarithmique.

### Régressions

Une régression linéaire simple est effectuée entre le rapport  $\% \gamma$ -caséines/ $\%(\alpha + \beta + \kappa)$ -caséines et le dénombrement cellulaire. Une approche par régression multiple permet de relier ce rapport et des indicateurs liés à l'état sanitaire de la mamelle dont les variations sont facilement mesurables (pH, teneur en chlorures, dénombrement cellulaire). Enfin, les variables associées directement à la dégradation des protéines dans les laits à dénombrements cellulaires élevés (activité plasminique, teneur en protéose peptones) sont reliées avec l'indice de protéolyse. Les données mesurées pour les 86 quartiers prélevés sont utilisées (logiciel STATITCF) pour les calculs de corrélations et de régression.

### Analyse de variance

Parmi les 31 vaches prélevées, 20 présentent un quartier (droit ou gauche) à moins de 250 000 cellules/ml et son symétrique à plus de 250 000 cellules/ml. Une analyse de variance est effectuée sur ces 40 données pour mesurer l'influence des facteurs dénombrement cellulaire du quartier et stade de lactation sur la qualité des protéines, l'effet d'un facteur étant ajusté de l'effet éventuel de l'autre facteur.

Les données sont traitées selon la procédure GLM du logiciel Statistics Analysis System.

Le modèle est décrit ci-dessous

Modèle global	Modalités	DDL
- Etat sanitaire	< ou > 250 000 cellules/ml	1
- Stade de lactation	<150 , >150 et <240 jours, >240 jours	2
- Vache(stade de lactation)	1,2,.. ,20	17
- Résiduelle		65
<hr/>		
Total		85

L'effet vache (considéré comme un bloc) est hiérarchisé par le stade de lactation car toutes les modalités du stade de lactation ne sont pas retrouvées dans un même bloc. Les moyennes présentées dans les tableaux sont les moyennes ajustées par le modèle. Les différences entre les moyennes sont évaluées par le test de Student ( $P < 0,05$ ).

### 2.2.2 Relation entre le dénombrement cellulaire et des indicateurs directs ou indirects de la protéolyse endogène sur des laits de mélange des quatre quartiers.

Les relations existant entre le dénombrement cellulaire et des indicateurs de protéolyse endogène (teneur en protéose peptones), et d'état sanitaire (teneur en chlorures et en lactose) sont mesurées dans 8 laits de mélange des quatre quartiers.

#### Origine du lait

Les laits proviennent de 8 vaches caractérisées par un dénombrement cellulaire compris entre  $1.10^5$  et  $3.10^6$  cellules/ml (mesures moyennes des 4 semaines précédant l'étude). Les vaches choisies ne présentaient pas de mammites cliniques et avaient toutes plus de 150 jours de lactation. Chaque lait est caractérisé par le stade de lactation, le numéro de lactation et la production de la vache au jour de prélèvement.

Durant 3 semaines consécutives, un prélèvement hebdomadaire (mélange pondéré de la traite du soir et du matin) a été effectué pour chacune des 8 vaches.

#### Analyses :

- dénombrement cellulaire, teneur en lactose, taux protéique (TP), taux butyreux (TB)
- pH et teneur en chlorures
- teneur en protéose peptones

## Traitement et analyse statistique des données

Des corrélations entre les différentes variables sont calculées deux à deux à l'aide du logiciel STATITCF pour l'ensemble des données. Le dénombrement cellulaire est linéarisé en prenant sa transformée logarithmique.

### **2.3 Interactions protéolyse microbienne, protéolyse endogène**

#### 2.3.1 Influence des protéases microbiennes sur l'activité de la plasmine

L'influence des protéases microbiennes sur l'activité de la plasmine et l'activation du plasminogène ainsi que sur des indicateurs directs de protéolyse (%  $\kappa$ -caséines, teneur en protéose peptones) est étudiée pour des laits conservés au laboratoire pendant 6 jours à 4°C.

#### Origine des laits

Le lait, provenant d'un troupeau de 60 vaches, est issu d'une exploitation du sud de la Meurthe et Moselle. Le lait de deux traites est prélevé refroidi (température < 4°C) moins de deux heures après la deuxième traite.

Quatre traitements différents sont appliqués dans les deux heures qui suivent la traite:

- Lait seul : T
- Lait + Urokinase : U
- Lait + Urokinase + Bactéricide : UB
- Lait + Bactéricide : B

L'utilisation de l'urokinase permet d'activer le plasminogène présent dans le lait et ainsi de caractériser l'action protéolytique de la plasmine dans le lait. L'ajout de bactéricide permet par comparaison avec le lait témoin de quantifier l'action protéolytique des micro-organismes.

Une fois les traitements appliqués, les laits sont conservés à 4°C (température de stockage à la ferme et à la laiterie). Ils sont agités doucement manuellement 2 fois par jour afin de prévenir l'apparition d'un bouchon de matières grasses.

Quatre prélèvements sont effectués sur ces laits successivement à 0 h, 48 h, 96 h, 144 h

L'ensemble du protocole a été répété 3 fois pour les 4 traitements et les 4 jours (48 unités expérimentales)

Analyses :*A 0 h, jour de prélèvement*

- dénombrement cellulaire, teneur en lactose, TP (Taux Protéique)
- teneur en chlorures

*A 0 h, 48 h, 96 h, 144 h*

- pH
- teneur en calcium colloïdal
- teneur en protéose peptones, séparation des différents composants par électrophorèse PAGE-native
- dénombrement de la flore mésophile et psychrotrophe
- activité de la plasmine
- pourcentage des différentes caséines
- mesure des groupements  $\alpha$ -aminés par la méthode TNBS
- fractionnement azoté : Nt, ANP, Nsol,

Traitement et analyse statistique des données

Les données sont traitées selon la procédure GLM en mesures répétées du logiciel Statistics Analysis System. Le modèle est de la forme suivante :

<u>Modèle global</u>	<u>Modalités</u>	<u>DDL</u>
- traitement	T, U, UB, B	3
- Résiduelle		8
<u>Interaction avec le temps</u>		
- Temps	0 h, 48 h, 96 h, 144 h	3
- Temps *Traitement		9
- Résiduelle		24
Total (4 traitements * 4 temps * 3 répétitions)		47

Les moyennes présentées dans les tableaux sont les moyennes ajustées par le modèle. Les différences entre les moyennes sont évaluées par le test de Student ( $P < 0,05$ ).

### 2.3.2 Influence du dénombrement cellulaire, de la contamination microbienne et de la durée de stockage sur la protéolyse du lait.

L'influence du dénombrement cellulaire, et de la contamination microbienne sur la dégradation des protéines du lait sont mesurées pour des laits conservés 5 jours à 4°C.

#### Origine des laits

Trois laits de mélange, de troupeaux, à trois niveaux cellulaires différents sont prélevés (<50 000 cellules/ml, ≈200 000 cellules/ml, >500 000 cellules/ml) après la traite dans trois exploitations de Meurthe et Moselle. La contamination bactérienne après la première traite est faible (≈10<sup>4</sup> /ml).

Le lait est conservé 120h à 4°C dans des flacons de 250 ml. Quatre traitements sont appliqués

- Lait seul : T
- Lait + Bactéricide : B
- Lait + Inhibiteur de plasmine + Bactéricide : IB
- Lait + Inhibiteur de plasmine : I

Le lait B permet une mesure de la protéolyse endogène (plasminique et non plasminique); le lait I est une mesure de la protéolyse bactérienne et endogène non plasminique; le lait IB est une mesure de la protéolyse endogène non plasminique et le lait T permet une intégration des trois types de protéolyse.

#### Analyses

Trois échantillons du même lait sont conservés et les analyses notées ci-dessous sont effectuées sur chaque échantillon.

*A 0 h, jour de prélèvement*

- dénombrement cellulaire, TP, TB

*A 0 h, 48 h, 72, 96 h, 120 h*

- flore mésophile, flore psychrotrophe
- teneur en protéose peptones
- activité plasminique
- pourcentage des différentes caséines
- fractionnement azoté : Nt, ANP, Nsol

### Traitement et analyse statistique des données

Les données sont traitées selon la procédure GLM du logiciel Statistics Analysis System. Le modèle est de la forme suivante :

<u>Modèle global</u>	<u>Modalités</u>	<u>DDL</u>
- traitement	B, BI, I, T	3
- niveau cellulaire	1,2,3	2
- traitement*niveau cellulaire		6
- Résiduelle		24
<u>Interaction avec le temps</u>		
- Temps	0 h, 48 h, 72, 96 h, 120 h	4
- Temps*Traitement		12
- Temps*Niveau cellulaire		8
- Résiduelle		120
Total (3 laits * 3 échantillons/lait * 5 temps * 4 traitements)		179

Les moyennes présentées dans les tableaux sont les moyennes ajustées par le modèle. Les différences entre les moyennes sont évaluées par le test de Student ( $P < 0,05$ ).

Les différents essais détaillés dans le Matériel et Méthodes sont rappelés dans un tableau synthétique (Annexe 12).



## **RESULTATS et DISCUSSION**

Figure 1,2,3 : Evolution de la flore mésophile et psychrotrophe pour les niveaux bactériens B1, B2 et B3

Δ : flore totale, □ : flore psychrotrophe  
 :Δ, □ : 2°C; Δ, □ : 3°C; :Δ, ■ : 4°C

Figure 1 : Niveau B1

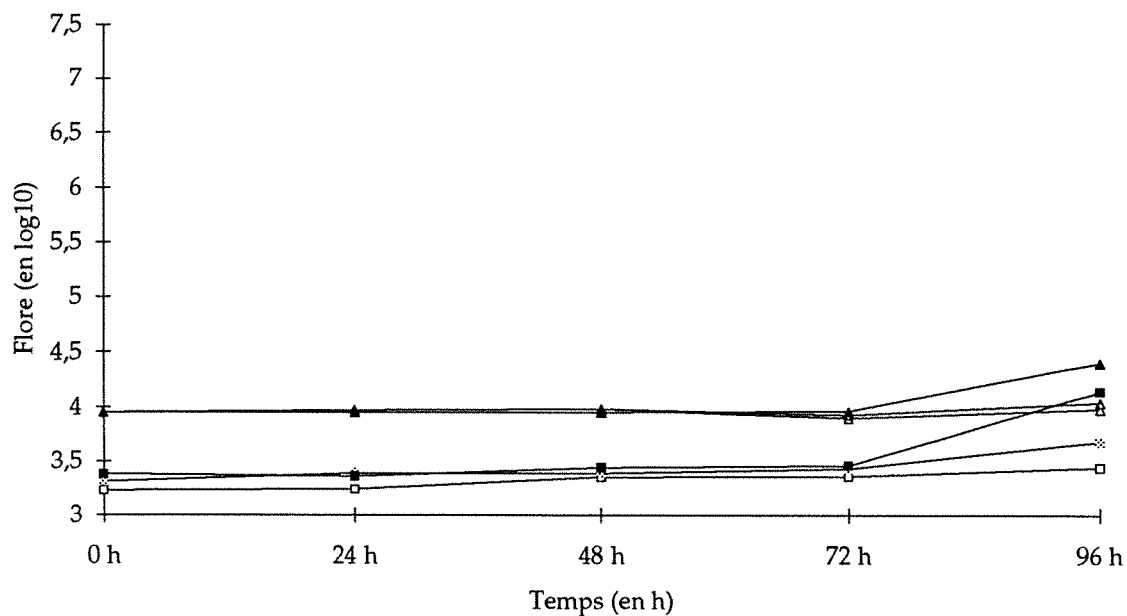


Figure 2 : Niveau B2

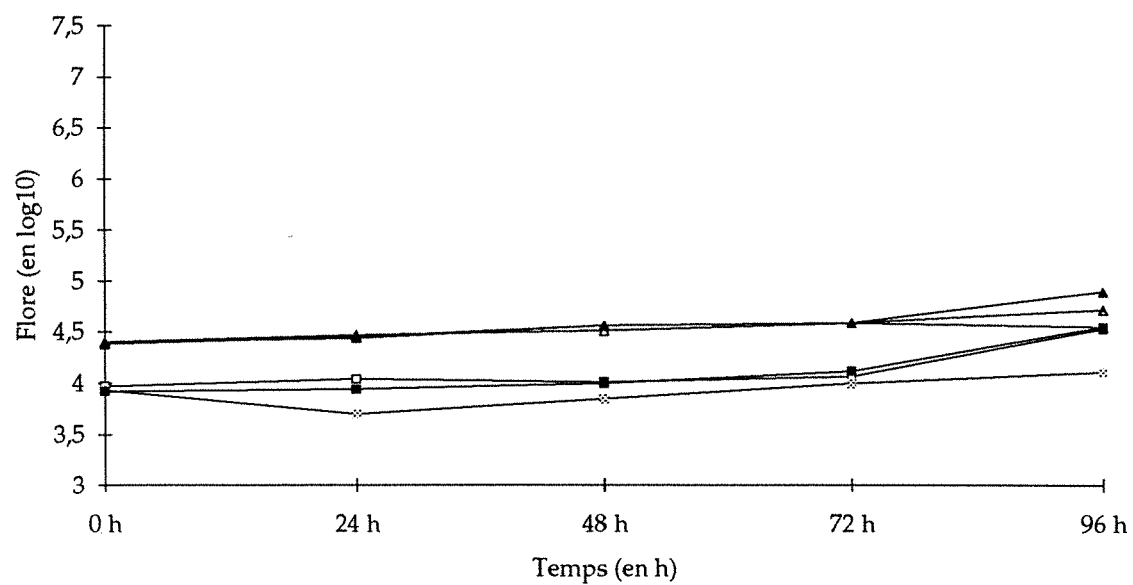


Figure 3 : Niveau B3

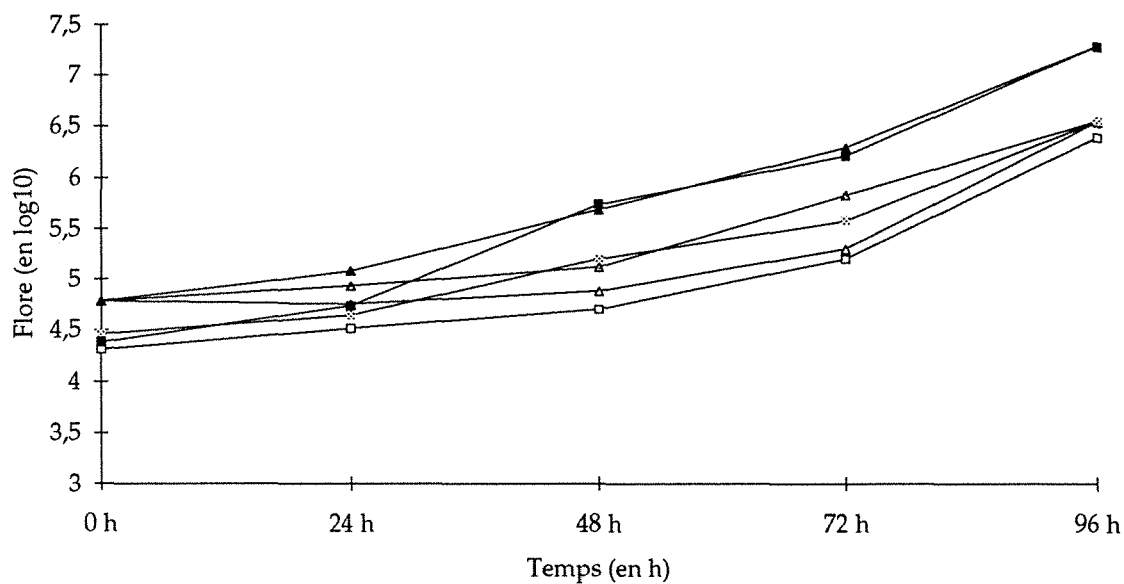


Tableau 7 : Evolution du pH au cours de la conservation du lait à 4°C en fonction de la contamination microbienne initiale

	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	Effet temps	Effet niveau bactérien
B1 (n=9)	B 6,72 b	B 6,73 b	B 6,73 b	A 6,75 a	A 6,75 a		
B2 (n=9)	B 6,71 a	B 6,72 a	B 6,73 a	B 6,73 a	B 6,73 a	P < 0,01	P < 0,01
B3 (n=9)	B 6,72 a	B 6,72 a	B 6,73 a	B 6,72 a	B 6,72 a		

a, b ou A, B : moyennes significativement différentes dans la même colonne (lettres majuscules) ou dans la même ligne (lettres minuscules) (P < 0,05)

## RESULTATS et DISCUSSION

### I PROTEOLYSE MICROBIENNE

#### 1 Influence de la contamination microbienne, de la température et de la durée de stockage sur la protéolyse du lait

Parmi ces trois facteurs, la température de conservation n'influence significativement aucune des variables mesurées, les tableaux de résultats sont donc présentés sans en tenir compte.

##### 1.1 Caractéristiques microbiologiques des laits étudiés

Un comportement identique des flores mésophile et psychrotrophe est observé pour le niveau bactérien B1 (<10 000 germes/ml à 48 h). Pour ce niveau de contamination, la croissance des deux flores semble stoppée pendant 96 h pour des températures de conservation de 2 et 3°C et pendant 72 h à 4°C (figure 1). Ces résultats rejoignent ceux de Cousin (1982) qui montre qu'à 0-2°C, la plupart des bactéries psychrotrophes ont un temps de génération supérieur à 20-30 h et une durée de la phase de latence d'autant plus longue que la température de stockage est basse.

Pour le niveau de contamination B2 (> 10 000 et < 50 000 germes/ml à 48 h), le lait peut être conservé à 2, 3 ou 4°C pendant 72 h sans qu'il se produise de multiplication importante des micro-organismes (figure 2).

Pour le niveau bactérien B3 (> 100 000 germes/ml à 48h), le nombre de germes augmente après 48 h de stockage à 2°C pour atteindre  $10^6$  bactéries psychrotrophes/ml à 96 h (figure 3). A 3°C, après 96 h de stockage, le niveau moyen bactérien est d'environ  $10^{6,5}$  contre  $10^7$  germes/ml à 4°C. Ces résultats sont en accord avec ceux de Mourgues (1967) et Durr (1974) qui ont montré une croissance de la flore psychrotrophe d'autant plus rapide que la charge initiale en bactéries est plus élevée.

Quel que soit le niveau de contamination initial, après 48 h de stockage la totalité de la flore est de type psychrotrophe.

##### 1.2 Evolution du pH du lait

Une alcalinisation significative mais faible (0,03 unités pH) du lait au cours de sa conservation est observée pour les laits du niveau bactérien B1 (tableau 7). Pour les laits B2 et B3, le pH n'évolue pas significativement. L'activité microbienne ne s'est pas traduite par une acidification, même pour les laits les plus contaminés.

Tableau 8 : Evolution de la teneur en azote caséique et en azote non protéique au cours de la conservation du lait à 4°C

	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	Effet temps	Effet niveau bactérien
ANP (en mg/l) (n=27)	277	278	268	274	283	NS	NS
N caséique (en g/l) (n=27)	4,09	4,09	4,11	4,06	4,07	NS	NS

Tableau 9 : Evolution du pourcentage des différentes caséines au cours de la conservation du lait à 4°C

	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	Effet temps	Effet niveau bactérien
$\kappa$ -caséines (n=27)	18,6	18,7	19,1	18,8	18,9	NS	NS
$\delta$ -caséines (n=27)	3,3 b	3,6 b	3,6 b	4,1 a	4,1 a	P < 0,01	NS
$\beta$ -caséines (n=27)	39,1	38,8	38,9	39,0	38,8	NS	NS
$\alpha_s$ -caséine (n=27)	39,0 a	38,9 a	38,4 ab	38,1 b	38,2 b	P < 0,05	NS

Valeurs exprimées en pourcentage du total des caséines

a, b : moyennes significativement différentes dans la même ligne (P < 0,05)

### 1.3 Evolution de la teneur en azote non protéique et en azote caséique des laits

Aucune variation significative de la teneur en azote non protéique et en azote caséique n'est observée (tableau 8). Les contaminations microbiennes atteintes n'induisent pas d'effet protéolytique marqué, mais la faible sensibilité de ces deux méthodes nécessite la mesure d'indicateurs plus sensibles afin de confirmer cette hypothèse.

### 1.4 Evolution du pourcentage des différentes caséines

#### 1.4.1 Pourcentage des $\kappa$ -caséines

La mesure des  $\kappa$ -caséines, les plus sensibles aux protéases bactériennes (Gripon, 1991), paraît donc bien adaptée pour estimer l'intensité de la protéolyse microbienne. Quels que soient la température, le niveau bactérien ou le jour de conservation, le pourcentage des  $\kappa$ -caséines reste stable. Les niveaux bactériens compris entre  $10^6$  à  $10^7$  germes/ml (après 96 h de conservation) sont insuffisants pour entraîner une protéolyse d'origine bactérienne détectable à partir de l'évolution des  $\kappa$ -caséines (tableau 9). Grieve et Kitchen (1985) avaient noté que la protéolyse bactérienne ne contribuait significativement à la protéolyse totale du lait que pour des contaminations en psychrotrophes supérieures à  $10^7$  /ml.

#### 1.4.2 Pourcentage des $\gamma$ -caséines

Une augmentation importante du pourcentage des  $\gamma$ -caséines est notée entre 0 et 96 h de conservation (+ 20%) (tableau 9). Cette évolution est liée à l'activité de la plasmine dans le lait (Grufferty et Fox, 1988). Cette augmentation du pourcentage des  $\gamma$ -caséines, si elle est significative, ne représente cependant que 0,8% des caséines totales.

#### 1.4.3 Pourcentage des $\beta$ -caséines et $\alpha_s$ -caséines

Les  $\gamma$ -caséines provenant de l'hydrolyse des  $\beta$ -caséines, une diminution de la fraction  $\beta$ -caséine aurait dû être notée (tableau 9). Cependant, les écarts enregistrés étant à la limite du seuil de sensibilité de la méthode de séparation, la part des  $\beta$ -caséines n'a alors pas varié significativement.

Contrairement aux  $\beta$ -caséines, l'évolution de la fraction  $\alpha_s$ -caséine, bien que faible, est significative et pourrait aussi résulter de l'action de la plasmine (Snoeren et al., 1980).

Tableau 10 : Evolution de l'activité plasminique au cours de la conservation du lait à 4°C

	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	Effet temps	Effet niveau bactérien
moyenne (n=27)	26,6 a	20,8 b	18,6 c	17,8 c	17,5 c	P < 0,01	NS

en  $\mu\text{moles p-nitroanilide.h}^{-1}.\text{l}^{-1}$

a, b, c : moyennes significativement différentes (P < 0,05)

Tableau 11 : Evolution de la teneur en protéose peptones au cours de la conservation du lait à 4°C

	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	Effet temps	Effet niveau bactérien
(n=27)	0,87 d	1,01 c	1,02 c	1,07 b	1,12 a	P < 0,01	NS

Teneur exprimée en g/l

a, b, c, d : moyennes significativement différentes (P < 0,05)

Tableau 12 : Mesure des groupement  $\alpha$ -aminés libres par la technique TNBS au cours de la conservation du lait à 4°C

	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	Effet temps	Effet niveau bactérien
(n=45)	18,6 a	18,3 a	21,0 b	21,2 b	21,4 b	P < 0,01	NS

Teneur exprimée en mmole équivalent glycine

a, b : moyennes significativement différentes (P < 0,05)

### 1.5 Activité plasminique

L'activité plasminique du lait décroît de manière significative au cours des 48 premières heures de stockage pour se stabiliser entre 48 et 96 h (tableau 10). Ces résultats pourraient être expliqués par une autolyse de la plasmine. En effet, Walsh et Wilcox (1970, cités par Humbert, 1986) montrent qu'une autolyse de la plasmine pourrait se produire à pH 7, valeur proche de celle du pH du lait. Cependant, malgré cette baisse d'activité, les produits issus de l'activité de la plasmine continuent à s'accumuler dans le lait.

### 1.6 Teneur en protéose peptones

La teneur en protéose peptones augmente de manière significative avec la durée de conservation (tableau 11). L'augmentation est plus élevée entre 0h et 24h de conservation (+16% contre +12% entre 24h et 96h). La fraction protéose peptones dérivant en partie de l'hydrolyse de la  $\beta$ -caséine par la plasmine, son évolution semble liée à l'activité plasminique. En effet, la conservation au froid, en induisant la solubilisation des  $\beta$ -caséines par un relâchement des liaisons hydrophobes, qui jouent un rôle important au sein des associations de caséines, rend celles-ci encore plus sensibles à l'hydrolyse par la plasmine (Humbert, 1991).

Dans nos conditions expérimentales, l'effet du niveau bactérien n'est pas significatif. Pâquet (1986) avait montré une augmentation significative de la teneur en protéose peptones dans des laits fortement contaminés ( $>10^7$  germes /ml). Cependant, les conditions expérimentales étaient très différentes (utilisation de souches pures protéolytiques). L'intérêt de la fraction protéose peptones comme indicateur de protéolyse dans les laits fortement contaminés devra être précisée.

### 1.7 Mesure des groupements $\alpha$ -aminés libres par la technique TNBS

Entre 0h et 24h de conservation, la teneur des groupements  $\alpha$ -aminés libres est stable (tableau 12). Une augmentation importante est notée entre 24h et 48h mais celle-ci n'est pas expliquée. En effet, elle ne peut pas être due à une protéolyse d'origine bactérienne compte tenu des niveaux microbiologiques mesurés à 48 h. De plus, elle ne traduit pas non plus une augmentation brutale de la protéolyse endogène car l'augmentation des  $\gamma$ -caséines et de la teneur en protéose peptones est maximum entre 0h et 24h.

Les niveaux microbiens induisant une protéolyse microbienne détectable par cette méthode sont de l'ordre de  $10^7$ - $10^8$  bactéries/ml (Humbert et al., 1990) et peuvent expliquer, entre 48h et 96h, la stabilité de la teneur des groupements  $\alpha$ -aminés libres. Dans nos conditions expérimentales, la mesure de la teneur des groupements  $\alpha$ -aminés libres par la méthode TNBS n'est pas suffisamment sensible pour détecter une protéolyse d'origine plasminique dans les laits conservés au froid.



Tableau 13 : Evolution du temps de coagulation (R) au cours de la conservation du lait à 4°C en fonction de la contamination microbienne initiale

	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	Effet temps	Effet niveau bactérien
B1 (n=9)	B 19,1 c	B 19,0 c	B 22,3 b	B 22,3 b	A 26,1 a	P < 0,01	
B2 (n=9)	A 19,8 c	A 22,0 b	A 25,1 a	A 24,8 a	A 25,3 a	P < 0,01	P < 0,01
B3 (n=9)	B 18,5 b	B 19,6 b	B 21,3 a	B 21,4 a	B 20,6 a	P < 0,01	

Temps de coagulation exprimé en min

a, b, c ou A, B : moyennes significativement différentes dans la même colonne (lettres majuscules) ou dans la même ligne (lettres minuscules) (P < 0,05)

Tableau 14 : Evolution du temps d'obtention de la fermeté standard (K20) au cours de la conservation du lait à 4°C en fonction de la contamination microbienne initiale

	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	Effet temps	Effet niveau bactérien
B1 (n=9)	A 9,9 b	A 10,5 b	A 11,6 b	A 11,5 b	A 14,2 a	P < 0,01	
B2 (n=9)	A 11,5 b	A 11,3 b	A 12,3 b	A 12,8 b	A 15,5 a	P < 0,01	P < 0,01
B3 (n=9)	A 11,2 a	A 12,0 a	A 12,7 a	A 12,7 a	B 10,4 a	P < 0,01	

Temps d'obtention de la fermeté standard exprimé en min

a, b ou A, B : moyennes significativement différentes dans la même colonne (lettres majuscules) ou dans la même ligne (lettres minuscules) (P < 0,05)

### 1.8 Temps de coagulation (R) mesuré par Formagraph

Pour les niveaux bactériens B1 et B2, une augmentation continue du R, d'environ 25 %, est enregistrée entre 0h et 96h de conservation (tableau 13). Pour le niveau bactérien B3, R augmente pendant les premières 48 h puis se stabilise jusqu'à 96 h. Ces observations peuvent s'expliquer par deux facteurs antagonistes interférant sur le temps de coagulation.

- Le maintien du lait au froid provoque une déminéralisation des micelles de caséines par passage notamment du phosphate de calcium colloïdal dans la phase soluble, contribuant ainsi à une désagrégation de la structure micellaire. Le rapprochement des micelles est alors freiné par leur plus grande dispersion, entraînant ainsi une augmentation du temps de prise (Lenoir, 1991).

- Parallèlement, la libération de protéases bactériennes dans le lait provoque une diminution du temps de prise (Zalazar, 1993).

Ces deux phénomènes se superposent sans doute pour les laits du niveau bactérien B3. Pendant les 72 premières heures, l'action du froid conduit à augmenter le temps de prise. Après 96h de conservation, la contamination des laits B3 est d'environ  $10^6$ - $10^7$  germes/ml, niveau proche de celui qui entraîne la libération de protéases. La méthodologie de mesure du temps de coagulation (chauffage du lait à 34°C durant 30 à 60 minutes) peut entraîner une croissance bactérienne importante (le temps de génération des bactéries à 30°C est inférieur à 30 minutes). Ainsi, la libération des protéases bactériennes dans un milieu très favorable à leur activité pourrait induire une diminution du temps de prise.

Pour les laits B1 et B2, l'action du froid semble être la cause principale de l'évolution du temps de coagulation, l'action des protéases bactériennes ne paraissant pas effective.

### 1.9 Temps d'obtention de la fermeté standard (K20) mesuré par Formagraph

Pour les niveaux bactériens B1 et B2, les évolutions du temps d'obtention de la fermeté standard sont parallèles à celles du temps de coagulation (R) (tableau 14). Aucune variation significative du K20 n'est notée pour le niveau bactérien B3.

### 1.10 Transformations fromagères

#### 1.10.1 Caractéristiques des laits mis en fabrication.

##### *Caractéristiques chimiques*

Les laits étudiés présentent une faible numération cellulaire ( $207\ 000 \pm 77\ 000$ ) et un pH relativement constant ( $6,71 \pm 0,02$ ). Le taux protéique est peu variable ( $30,78 \pm 0,29$ ) alors que le taux butyreux est plus irrégulier ( $40,92 \pm 1,52$ ), il est plus élevé pour le niveau bactérien B2 (tableau 15).

Tableau 15 : Caractéristiques chimiques des laits mis en fabrication

Seuil bactérien Répétition	B1		B2		B3	
	1	2	1	2	1	2
TP (g/l)	30,80	30,40	31,10	31,00	31,00	30,40
TB (g/l)	39,60	40,50	42,90	42,30	41,50	38,70
Dénombrement cellulaire (*10 <sup>3</sup> )	120	119	320	248	211	224
pH	6,68	6,71	6,73	6,72	6,70	6,70

Tableau 16 : Evolution du temps de floculation mesuré en fabrication

	48 h	72 h	96 h	Effet temps	Effet niveau bactérien
B1 (n=9)	A 22,1 b	A 22,6 b	B 24,1 a	P < 0,01	
B2 (n=9)	A 22,5 b	A 23,3 b	A 25,0 a	P < 0,01	P < 0,01
B3 (n=9)	B 21,0 b	B 21,4 b	C 22,4 a	P < 0,01	

Temps de floculation exprimé en min

a, b ou A, B : moyennes significativement différentes dans la même colonne (lettres majuscules) ou dans la même ligne (lettres minuscules) (P < 0,05)

### *Temps de floculation mesuré en fabrication*

L'évolution du temps de floculation mesurée en fabrication (tableau 16) est proche de celle mesurée par Formagraph. Les laits mis en fabrication n'ont pas subi de maturation prolongée et d'ajout de  $\text{CaCl}_2$  qui auraient permis de corriger en partie les déséquilibres minéraux consécutifs au stockage prolongé au froid (Amram et al, 1981).

Pour le niveau bactérien B3, le temps de floculation, contrairement à R, augmente significativement avec la durée de stockage. La pasteurisation des laits avant transformation, en détruisant la flore microbienne, a sans doute permis de limiter nettement le potentiel protéolytique des laits du niveau bactérien B3, fortement contaminés après 96 h de stockage.

#### 1.10.2 Caractéristiques moyennes des transformations et des fromages fabriqués

Les résultats sont exprimés pour 100 kg de lait et correspondent à la moyenne des 54 laits mis en fabrication (3 jours\* 3 niveaux bactériens \* 3 températures \* 2 répétitions).

##### *Bilan en matière sèche (au démoulage)*

Le rendement brut moyen est de  $19,33 \pm 1,01$  kg/100 kg. L'ajustement du rendement en matière sèche préconisé par Maubois et Mocquot (1967) réduit l'écart-type à 0,76. La correction en TP et TB du rendement ajusté en matière sèche, d'après l'équation de Maubois et al. (1970) permet encore de diminuer cet écart-type (0,47).

La teneur moyenne en matière sèche du lactosérum est de  $66,8 \pm 0,2$  ‰ celle des fromages  $391,6 \pm 1,0$  ‰. Le poids de lactosérum moyen recueilli est de  $79,50 \pm 1,0$  kg/100 kg. La teneur moyenne en matière sèche des laits mis en fabrication est de  $127,9 \pm 0,3$  ‰. Le bilan matière s'établit donc en moyenne à 100,7 %.

##### *Bilan azoté (au démoulage)*

La teneur moyenne en azote des laits est de  $5,26 \pm 0,11$  g/kg, celle des fromages est de  $21,25 \pm 0,91$  g/kg de poids frais et celle du lactosérum  $1,42 \pm 0,04$  g/kg. Le bilan azoté moyen est donc de 99,5%.

##### *Acidité Dornic, cinétique d'égouttage*

La valeur moyenne mesurée 21 h après moulage est de  $108 \pm 5^\circ$  Dornic. Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les traitements. L'étude graphique des cinétiques d'égouttage et d'acidification n'a pas montré de différences. Les laits très faiblement contaminés n'ont pas entraîné une inhibition du développement des ferments lactiques.

Tableau 17 : Evolution du rendement fromager ajusté en MS et corrigé en TP et TB

	48 h	72 h	96 h	Effet temps	Effet niveau bactérien
B1 (n=9)	19,10	19,20	19,00		
B2 (n=9)	19,20	19,50	19,40	NS	NS
B3 (n=9)	19,67	19,60	19,07		

Rendement exprimé en kg/100 kg de lait

Tableau 18 : Evolution de la teneur en acides gras libres au cours de la conservation du lait à 4°C

	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	Effet temps	Effet niveau bactérien
moyenne (n=27)	0,33 d	0,36 c	0,38 b	0,40 a	0,43 a	P < 0,01	NS

Indice de lipolyse exprimé en meq/100g de matière grasse

a, b : moyennes significativement différentes (P < 0,05)

### *Rendements fromagers ajustés en MS et corrigés en TP et TB*

Les rendements fromagers ajustés en MS et corrigés en TP et TB ne varient pas, quels que soient la température, le niveau bactérien ou la durée de conservation des laits (tableau 17).

Les seuils microbiens atteints pour le niveau bactérien B3 après 96 h de stockage, de  $10^6$  à  $10^7$  psychrotrophes/ml, n'entraînent pas de modification des rendements fromagers. Ces résultats sont à l'opposé des baisses de rendements et des défauts de goût observés par Feuillat et al. (1977), Mietton et al. (1977) et Dumont (1977) pour des fromages fabriqués à partir de laits contenant environ  $10^6$  germes/ml. L'utilisation de souches psychrotrophes protéolytiques (flore déjà adaptée au froid) explique sans doute ces phénomènes de dégradation protéique pour des seuils bactériens inférieurs aux seuils rencontrés en conditions de production.

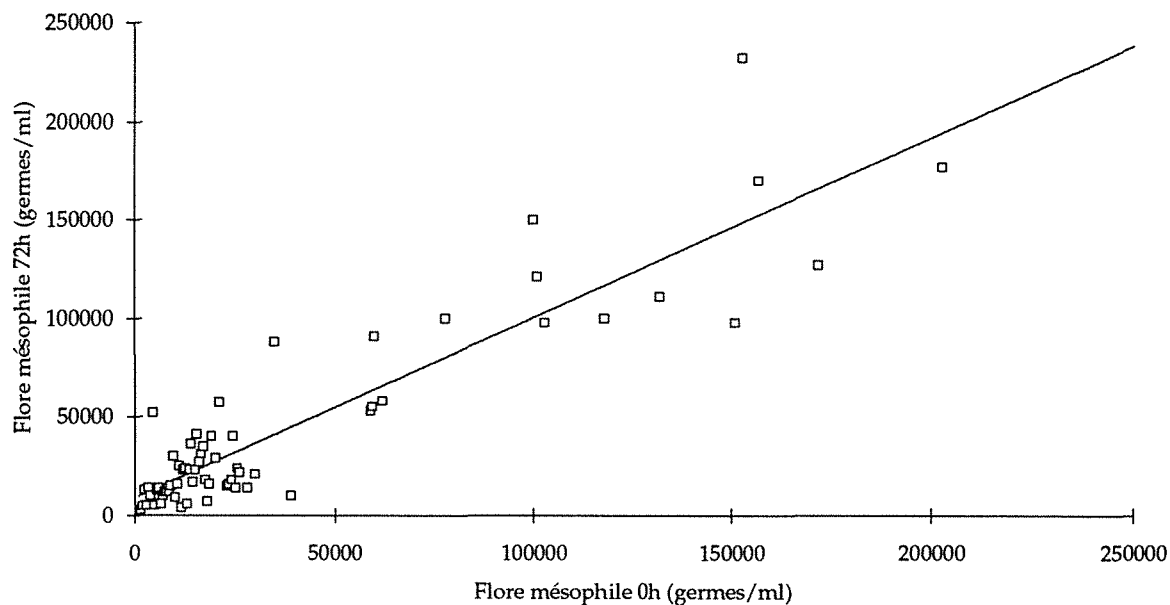
### *Jury de dégustation*

La dégustation n'a pas permis de déceler de différences entre les fabrications analysées quant à l'aspect, la forme extérieure, la qualité et la texture de la pâte ainsi que les qualités organoleptiques des fromages .

#### 1.11 Indice de lipolyse : mesure des acides gras libres (A.G.L.)

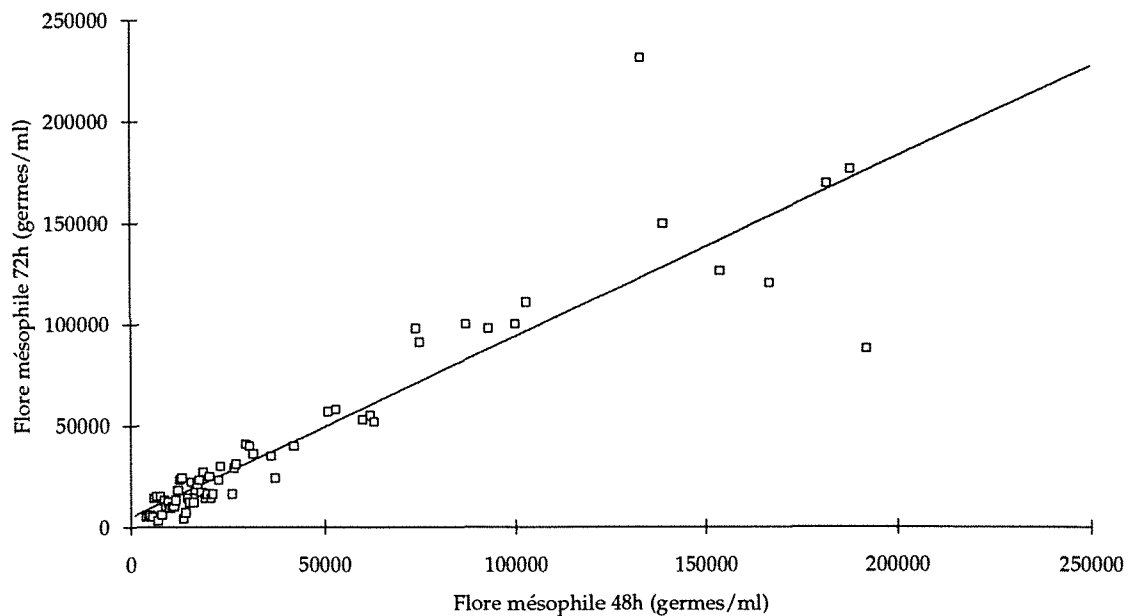
La teneur en acides gras libres augmente avec la durée de stockage mais reste inférieure aux recommandations actuelles des laiteries (0,6 meq/100 g de MG) (tableau 18). Les différents niveaux bactériologiques dans cet essai ne permettent pas la libération des lipases microbiennes, celles-ci étant sécrétées par les bactéries en même temps ou après les protéases (Deeth et Fitz-Gerald, 1976). La lipolyse spontanée (activité de la lipoprotéine lipase) et la lipolyse induite (activation de la lipolyse spontanée par chocs mécaniques et thermiques que subissent les globules gras) apparaissent les causes majeures de l'augmentation régulière de la teneur en acides gras libres. Cette augmentation, même si elle est faible, peut jouer un rôle non négligeable sur l'augmentation du temps de coagulation notée au Formagraph et en fabrication fromagère. En effet, le ralentissement de la coagulation du lait par la présure peut découler soit d'une adsorption des acides gras libres sur les micelles de caséines, soit d'une fixation et d'une insolubilisation partielle du calcium soluble et ionisé (Lenoir, 1974).

**Figure 4 :** Relation entre la flore totale du lait après 0 h et 72 h de stockage à la ferme



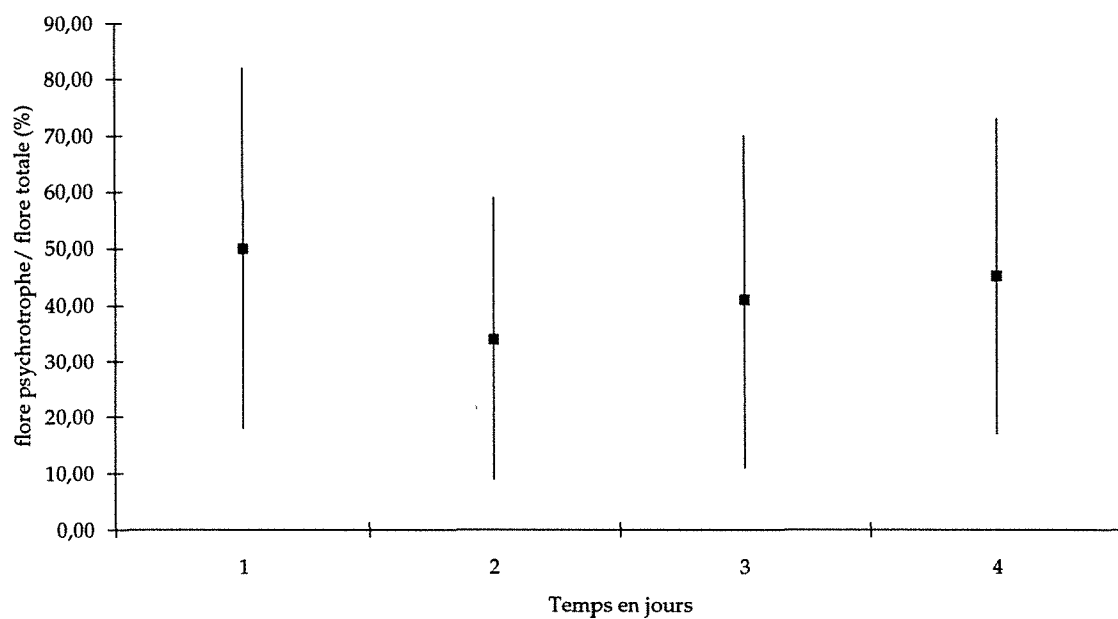
$$\text{Flore 72h} = 0,92 * \text{Flore 0h} + 8000$$
$$n=64; r^2 = 0,82; \text{ETR} = 20\ 000$$

**Figure 5 :** Relation entre la flore totale du lait après 48 h et 72 h de stockage à la ferme



$$\text{Flore 72h} = 0,89 * \text{Flore 48h} + 5000$$
$$(n=64); r^2 = 0,84; \text{ETR} = 20\ 000$$

**Figure 6** : Evolution du pourcentage de la flore psychrotrophe par rapport à la flore totale en fonction de la durée de stockage du lait à la ferme





## 1.12 Conclusion

Les niveaux de contaminations bactériens atteints dans cette étude (entre  $10^6$  et  $10^7$  germes/ml) n'ont pas permis de déceler de protéolyse d'origine microbienne (pas d'évolution du pourcentage des k-caséines). Par contre, malgré des laits issus d'un troupeau présentant un état sanitaire excellent, une protéolyse significative d'origine endogène a été mesurée par une augmentation du pourcentage des  $\gamma$ -caséines et de la teneur en protéose-peptones. Cependant, cette protéolyse d'origine endogène a été insuffisante pour entraîner des baisses de rendements fromagers.

La conservation du lait au froid a induit une forte augmentation du temps de coagulation mesuré par Formagraph et en fabrication. Cependant, la technologie fromagère utilisée tenant compte du temps de floculation comme unité de base, aucune incidence sur le rendement fromager n'a pu être mesurée.

## **2. Influence de l'allongement de la durée de stockage du lait à la ferme sur sa qualité bactériologique.**

### 2.1 Evolution de la flore mésophile

Il existe une relation linéaire significative entre la flore mésophile après 72h de stockage à la ferme et celle après 0h (figure 4). Dans notre étude, tous les dénombrements supérieurs à 100 000 germes/ml à 72h l'étaient déjà à 0h. Cette observation montre que la contamination de la première traite traduit le potentiel de contamination microbienne de l'exploitation et est un des facteurs essentiels de contamination du lait.

La corrélation calculée entre la flore mésophile à 48h et à 72h ( $r^2 = 0,84$ , pente  $<1$ ) (figure 5) montre qu'une éventuelle diminution de fréquence de la collecte du lait à la ferme (passage de 48h à 72h de conservation) ne conduirait pas à une augmentation significative de la flore mésophile.

### 2.2 Variations du pourcentage de la flore psychrotrophe

Les écart-types mesurés entre les exploitations contrôlées sont considérables et traduisent la variabilité des situations de production (figure 6). Le pourcentage moyen de psychrotrophes observé après la première traite est élevé; il diminue brutalement au deuxième jour puis augmente régulièrement (avec un écart type qui reste très important). Il est à noter que ces évolutions sont similaires quel que soit le niveau bactérien initial.

Les observations réalisées lors de la simulation des conditions de conservation montrent quant à elles une augmentation régulière du pourcentage de la flore psychrotrophe. Les remontées biquotidiennes de température du lait consécutives à l'apport de lait chaud peuvent être à l'origine de cette évolution différentielle.

Tableau 19 : Moyenne, Ecart type, minimum et maximum des variables mesurées sur 86 laits de quartier

	Nt*6,38 (g/L)	Nsol*6,34 (g/L)	Ncas*6,30 (g/L)	Ncas/Nt (%)	γ-caséines (%)	β-caséines (%)	αs-caséines (%)	κ-caséines (%)	%γ/%(α+β+ κ)caséines	TPP (g/l)	Activité de la plasmine ( $\mu\text{mol p-nitroaniline/h}^{-1}\text{l}^{-1}$ )	pH	Teneur en chlorures (g/l)	Cellules (log10)	R (min)
<b>ensemble des quartiers (n=86)</b>															
moyenne	34,7	6,3	26,7	77,0	10,4	21,2	58,9	9,5	13,5	1,52	29,3	6,62	1,59	5,61	34,7
Ecart-type	3,9	1,3	3,3	3,9	5,4	2,7	3,4	1,3	8,3	0,68	14,0	0,11	0,38	5,79	23,8
Minimum	26,5	3,7	20,3	62,3	2,4	14,1	47,7	5,6	2,8	0,58	9,7	6,42	1,01	4,28	11,3
Maximum	45,3	10,2	34,9	87,1	28,1	26,5	66,9	12,5	45,7	3,64	78,3	7,09	2,68	6,54	122,5
<b>&lt;250 000 Cellules/ml (n=45)</b>															
moyenne	34,3	5,7	27,0	78,9	7,8	22,3	60,3	9,6	9,7	1,19	21,7	6,58	1,42	5,01	25,6
Ecart-type	4,1	1,2	3,2	3,1	3,7	2,3	2,8	1,4	5,3	0,51	8,0	0,06	0,31	4,80	17,0
Minimum	26,5	3,7	20,3	69,7	2,4	15,2	53,0	5,6	2,8	0,58	9,7	6,42	1,08	4,28	11,3
Maximum	43,3	10,2	33,2	87,1	19,3	26,5	66,9	12,3	27,5	3,51	51,3	6,75	2,68	5,38	94,5
<b>&gt;250 000 Cellules/ml (n=41)</b>															
moyenne	35,2	6,9	26,4	74,9	13,2	20,1	57,3	9,4	17,7	1,89	37,7	6,67	1,78	5,87	44,8
Ecart-type	3,6	1,1	3,3	3,7	5,5	2,8	3,3	1,3	9,1	0,64	14,0	0,13	0,35	5,88	26,3
Minimum	29,6	5,5	20,3	62,3	3,7	14,1	47,7	7,1	4,2	1,10	17,0	6,51	1,01	5,42	13,0
Maximum	45,3	9,6	34,9	80,1	28,1	26,4	63,6	12,5	45,7	3,64	78,3	7,09	2,54	6,54	122,5

Tableau 20 : Matrice de corrélation entre les indicateurs potentiels de protéolyse mesurés sur 86 laits de quartier

	Nt	γ-caséines	β-caséines	αs-caséines	κ-caséines	%γ/(%α+β+κ)-caséines	Nsol	Ncas	Ncas/Nt	TPP	Activité de la Plasmine	TNBS*	pH	Teneur en chlorures	Cellules	R
Nt	.															
γ-caséines	.	.														
β-caséines	.	-.84	.													
αs-caséines	.	-.84	.50	.												
κ-caséines	.31	.	.	.	.											
%γ/(%α+β+κ)-caséines	.	.99	-.84	-.85	.	.										
Nsol	.56	.62	-.59	-.56	.	.62	.									
Ncas	.91	-.36	.	.	.	-.36		.								
Ncas/Nt	.	-.80	.73	.65	.	-.80	-.82	.42	.							
TPP	.34	.85	-.76	-.72	.	.85	.83	.	-.77	.						
Activité Plasmine	.	.82	-.75	-.69	.	.82	.78	.	-.77	.88	.					
TNBS*	.54	.	.	.	.	.	.46	0.43	.	.32	.	.				
pH	.	.71	-.64	-.62	.	.71	.60	.	-.67	.71	.69	.	.			
teneur en chlorures	.	.82	-.76	-.65	.	.82	.61	.	-.68	.80	.78	.	.54	.		
Cellules	.	.64	-.58	-.54	.	.64	.58	.	-.65	.63	.67	.	.55	.53	.	
R	.	.71	-.71	-.57	.	.71	.56	.	-.66	.65	.64	.	.58	.77	.44	.

\* corrélations obtenues avec 62 données

Seules les corrélation significatives au seuil de  $P < .01$  sont montré (n = 86; seuil à  $P < .01$  : .29)

## II PROTEOLYSE ENDOGENE

### 1. Incidences de la protéolyse endogène dans les laits à différents niveaux cellulaires, mesure d'indicateurs sur 86 laits de quartier

#### 1.1 Relation entre indicateurs directs et indirects de la protéolyse endogène

La valeur moyenne, l'écart-type, le minimum et le maximum des différentes variables mesurées sont présentés dans le tableau 19.

##### 1.1.1 Corrélations totales

La teneur des groupements  $\alpha$ -aminés libres (TNBS) est corrélée significativement avec les fractions Nt, Nsol et Ncas (respectivement  $r = 0,54$ ,  $0,46$  et  $0,43$ ) mais ne l'est pas avec les paramètres en relation avec la qualité des protéines dans le lait, c'est-à-dire les indicateurs directs de protéolyse (activité de la plasmine, teneur en protéose peptones, indice de protéolyse) et les indicateurs indirects de protéolyse (dénombrement cellulaire, pH, teneur en chlorures).

Le temps de coagulation (R) est corrélé significativement avec la plupart des variables et en particulier la teneur en chlorures ( $r = 0,77$ ), l'indice de protéolyse ( $r = 0,71$ ), la teneur en protéose peptones ( $r = 0,65$ ), l'activité de la plasmine ( $r = 0,64$ ) et le dénombrement cellulaire ( $r = 0,44$ ) (tableau 20).

Le dénombrement cellulaire est corrélé significativement avec l'activité de la plasmine ( $r = 0,67$ ), le rapport azote caséique/azote total ( $r = -0,65$ ), l'indice de protéolyse ( $r = 0,64$ ) et teneur en protéose peptones ( $r = 0,63$ ).

L'indice de protéolyse est fortement corrélé au pH et à la teneur en chlorures (en relation avec le mauvais état sanitaire de la mamelle, respectivement  $r = 0,71$  et  $0,82$ ), et avec l'activité plasminique ( $r = 0,82$ ) et la teneur en protéose peptones ( $r = 0,85$ ). Ces deux dernières variables sont très fortement corrélées entre elles ( $r = 0,88$ ).

Globalement, les corrélations obtenues dans cette étude, entre indicateurs directs et indirects de protéolyse, sur des laits de quartier, sont supérieures à celles calculées par d'autres auteurs sur des laits de mélange des quatre quartiers (Politis et al. 1989 b) (tableau 21). Schaar (1985) observe que 38% des variations de la teneur en protéose peptones sont expliquées par les variations de l'activité plasminique sur des laits individuels (mélange des quatre quartiers). Cette valeur est très inférieure à celle obtenue dans cette étude ( $r^2 = 0,77$ ). Le prélèvement quartier par quartier permet d'augmenter les plages de variation des paramètres étudiés et améliore ainsi le coefficient de détermination des relations. Le mélange des laits des quatre quartiers induit des effets de moyenne qui diminuent la plupart du temps les corrélations.

Tableau 21. Comparaison entre les corrélations obtenues entre des laits individuels et des laits de quartier

	Activité de la plasmine		Cellules	
	Lait individuel (Politis et al. 1989b)	lait de quartier (nos résultats)	Lait individuel (Politis et al. 1989b)	lait de quartier (nos résultats)
pH	.19 **	.69 **	.10	.55 **
$\alpha_s$ -caséine	-.14	-.69 **	-.12*	-.54 **
$\beta$ -caséine	-.27	-.75 **	.24 **	-.58**
$\kappa$ -caséine	.01	.09		

\*  $P < .05$  \*\* :  $P < .01$

Tableau 22 : Matrice de corrélations pour des laits inférieurs à 250 000 cellules/ml

	$\beta$ -caséines	% $\gamma$ /%( $\alpha$ + $\beta$ + $\kappa$ )-caséines	TPP	Plasmine	R	Teneur en Chlorures	Cellule
$\beta$ -caséines	.						
% $\gamma$ /%( $\alpha$ + $\beta$ + $\kappa$ )-caséines	-0,75	.					
TPP	-0,65	0,76	.				
Plasmine	-0,59	0,70	0,85	.			
R	-0,68	0,76	0,73	0,64	.		
Teneur en chlorures	-0,66	0,80	0,82	0,76	0,48	.	
Cellules	.	0,42	.	0,55	0,62	.	.

Seules les corrélations significatives au seuil de 1% sont représentées (n = 45; seuil de signification à 1% : 0,40)

Tableaux 23: Matrice de corrélations pour des laits supérieurs à 250 000 cellules/ml

	$\beta$ -caséines	% $\gamma$ /%( $\alpha$ + $\beta$ + $\kappa$ )-caséines	TPP	Plasmine	R	Teneur en Chlorures	Cellules
$\beta$ -caséines	.						
% $\gamma$ /%( $\alpha$ + $\beta$ + $\kappa$ )-caséines	-0,84	.					
TPP	-0,77	0,82	.				
Plasmine	-0,76	0,77	0,83	.			
R	-0,65	0,59	0,48	0,50	.		
Teneur en chlorures	-0,75	0,75	0,68	0,70	0,66	.	
Cellules	-0,56	0,49	0,44	0,37 *	.	.	.

Seules les corrélations significatives au seuil de 1% sont représentées (n = 41; seuil de signification à 1% : 0,40)

\* Corrélation significative au seuil de 5%.

### 1.1.2 Corrélations pour les laits à moins de 250 000 cellules/ml

L'indice de protéolyse des laits à moins de 250 000 cellules/ml présente des corrélations très élevées avec l'activité de la plasmine, la teneur en protéose peptones et la teneur en chlorures (respectivement  $r = 0,70$ ,  $0,76$  et  $0,80$ ) (tableau 22). Le dénombrement cellulaire est significativement lié à l'activité de la plasmine ( $r = 0,55$ ). Ce résultat est contraire aux travaux de Bastian et al. (1991) qui ne notent pas de relation entre ces deux variables pour des laits compris entre 100 000 et 300 000 cellules/ml. Ces différences peuvent découler de la nature des échantillons : l'utilisation des laits de quartier si elle augmente la plage de variation des différents paramètres, pourrait de plus, supprimer d'éventuelles interactions consécutives au mélange des laits de quartier (il conviendrait pour vérifier cette hypothèse de comparer les laits de quartier et les laits de mélange issus de ces quartiers).

### 1.1.3 Corrélations pour les laits à plus de 250 000 cellules/ml

Le dénombrement cellulaire est corrélé significativement avec l'indice de protéolyse, le % $\beta$ -caséines, la teneur en protéose peptones et l'activité de la plasmine (respectivement  $r = 0,49$ ,  $-0,56$ ,  $0,44$  et  $0,37$ ) (tableau 23). Pour les laits supérieurs à 250 000 cellules/ml, 61% des variations de l'indice de protéolyse sont expliquées par les variations de l'activité plasminique. Il apparaît que la plasmine n'est donc pas la seule enzyme responsable de la dégradation des caséines dans les laits de mammite subclinique. Le rôle des protéases ayant pour origine les cellules somatiques ou le sang ne semble pas négligeable. Ces résultats sont en accord avec ceux de Saemans et al. (1988) qui montrent que dans des laits à plus de  $3 \cdot 10^6$  cellules/ml, 54% de la protéolyse totale est d'origine plasminique. De Rham et Andrews (1982) observent que pour des laits à plus de  $20 \cdot 10^6$  cellules/ml (valeurs très anormales) un tiers seulement de la protéolyse est d'origine plasminique.

Le seuil de 250 000 cellules/ml ne permet donc pas de s'affranchir de tout phénomène protéolytique. La dégradation de la qualité protéique des laits est effective pour des dénombrements cellulaires faibles qui ne dépendent plus obligatoirement de l'existence de mammites cliniques ou subcliniques.

## 1.2 Variations intra-individuelles de la composition du lait de quartier

Parmi les 20 vaches présentant un quartier à plus de 250 000 cellules/ml et son symétrique à moins de 250 000 cellules/ml, 5 ont moins de 150 jours de lactation, 8 ont entre 150 et 240 jours de lactation et 7 ont plus de 240 jours de lactation (tableau 24).

Le modèle défini pour l'analyse de variance est significatif pour toutes les variables analysées sauf pour le temps de coagulation (R).

Tableau 24 : Effets du dénombrement cellulaire et du stade de lactation sur les indicateurs d'état sanitaire de la mamelle et de protéolyse (moyennes ajustées)

	Cellules du quartier ( $10^3$ /ml)			Stade de lactation (jours)			ETR	
	<250	>250		<150	150-240	>240		
Nt *6.38 (g/L)	33.7	35.0	$P < .05$	33.1 <sup>b</sup>	35.2 <sup>a</sup>	34.8 <sup>a</sup>	$P < .01$	.8
$\gamma$ -Caséines (%)	8.1	11.6	$P < .05$	8.4 <sup>b</sup>	9.3 <sup>ab</sup>	11.8 <sup>a</sup>	$P < .01$	3.4
$\beta$ -caséines (%)	22.3	20.3	$P < .05$	21.5	21.4	21.0 <sup>S</sup>	NS	2.1
$\alpha$ -caséines (%)	60.1	58.5	$P < .05$	60.2 <sup>a</sup>	60.0 <sup>a</sup>	57.8 <sup>b</sup>	$P < .05$	2
$\kappa$ -caséines (%)	9.5	9.6	NS	9.4	10.3	9.8	NS	.6
% $\gamma$ /( $\alpha$ + $\beta$ + $\kappa$ )-caséines	9.0	13.6	$P < .05$	9.5 <sup>b</sup>	10.5 <sup>b</sup>	13.5 <sup>a</sup>	$P < .05$	4.2
Nsol * 6.34 (g/L)	7.3	8.5	$P < .05$	7.5	8.3	7.9	NS	.95
Ncas *6.30 (g/L)	24.8	24.9	NS	24.1	25.1	25.3	NS	1.2
Ncas/Nt (%)	77.3	74.5	$P < .05$	76.2	75.2	76.3	NS	2.1
TPP (g/L)	1.14	1.71	$P < .05$	1.15 <sup>b</sup>	1.54 <sup>a</sup>	1.58 <sup>a</sup>	$P < .01$	.4
Activité de la plasmine ( $\mu\text{mol p-nitroaniline/h}^{-1}\text{.L}^{-1}$ )	21.7	32.7	$P < .05$	24.3 <sup>b</sup>	25.7 <sup>b</sup>	31.0 <sup>a</sup>	$P < .01$	4.4
pH	6.58	6.65	$P < .05$	6.62	6.62	6.60	NS	.1
Teneur en Chlorures (g/L)	1.47	1.68	$P < .05$	1.50	1.57	1.66	NS	.3
R (min)	28.8	42.1	NS	40.7	34.6	31.1	NS	21.0

a, b : moyennes significativement différentes



Après ajustement de l'effet stade de lactation et de l'effet individu, l'indice de protéolyse, la teneur en chlorures, le pH, l'activité plasminique, la teneur en protéose peptones, les teneurs en azote soluble et en azote total, le pourcentage des  $\gamma$ -caséines sont significativement plus élevés dans des laits issus de quartier à plus de 250 000 cellules/ml. Le pourcentage des  $\alpha_s$ -caséines et des  $\beta$ -caséines, le rapport azote caséique sur azote total sont significativement plus faibles pour ces laits. Tous ces résultats sont en accord avec ceux de Haenlein et al. (1973) et Schaar (1985) et sont également retrouvés pour des laits en cas de mammites cliniques (Schultz, 1977).

Des variations de 30 à 40% entre la moyenne des laits issus de quartier à moins de 250 000 cellules/ml et des laits à plus de 250 000 cellules/ml sont notées pour la teneur en protéose peptones, l'activité plasminique et l'indice de protéolyse (respectivement des différences de 0,6 g/l, 11  $\mu\text{mol p-NA/h}^{-1}.\text{l}^{-1}$  et 4 %). Les variations observées pour ces trois variables confirment les relations directes qui existent entre ces paramètres : la fraction protéose peptones dérive en partie de l'hydrolyse des  $\beta$ -caséines par l'action de la plasmine (composant 5, 8F et 8S) (Andrews et Alichanidis, 1983), également responsable de l'apparition des  $\gamma$ -caséines (Visser, 1981).

La stabilité du pourcentage des  $\kappa$ -caséines montre leur résistance à l'hydrolyse par la plasmine, déjà soulignée par Chen et Ledford (1971) et confirmée par Eigel (1977).

Le temps de coagulation R est moins élevé dans les laits à moins de 250 000 cellules/ml que dans les laits à plus de 250 000 cellules mais cet écart n'est pas significatif du fait de l'importance de l'écart-type résiduel.

L'indice de protéolyse, la teneur en protéose peptones, l'activité de la plasmine et le pourcentage de  $\gamma$ -caséines augmentent significativement avec le stade de lactation. L'effet du stade de lactation étant ajusté des effets du dénombrement cellulaire et individuel, la dégradation de la qualité des protéines du lait au cours de la phase descendante de la lactation paraît être un phénomène inévitable, même pour des laits à faible dénombrement cellulaire (aucune interaction significative n'a été notée entre le stade de lactation et le dénombrement cellulaire). L'augmentation de la perméabilité des cellules épithéliales de la mamelle aux protéases endogènes issues du sang est un phénomène consécutif aux mammites cliniques et subcliniques mais aussi à l'avancée du stade de lactation. L'implication de la plasmine dans le processus d'involution de la mamelle est aussi proposée par Politis et al. (1989 a).

Figure 7 : Séparation par PAGE des différents composants de la fraction protéose peptones d'un échantillon faiblement protéolysé (a) et fortement protéolysé (b)

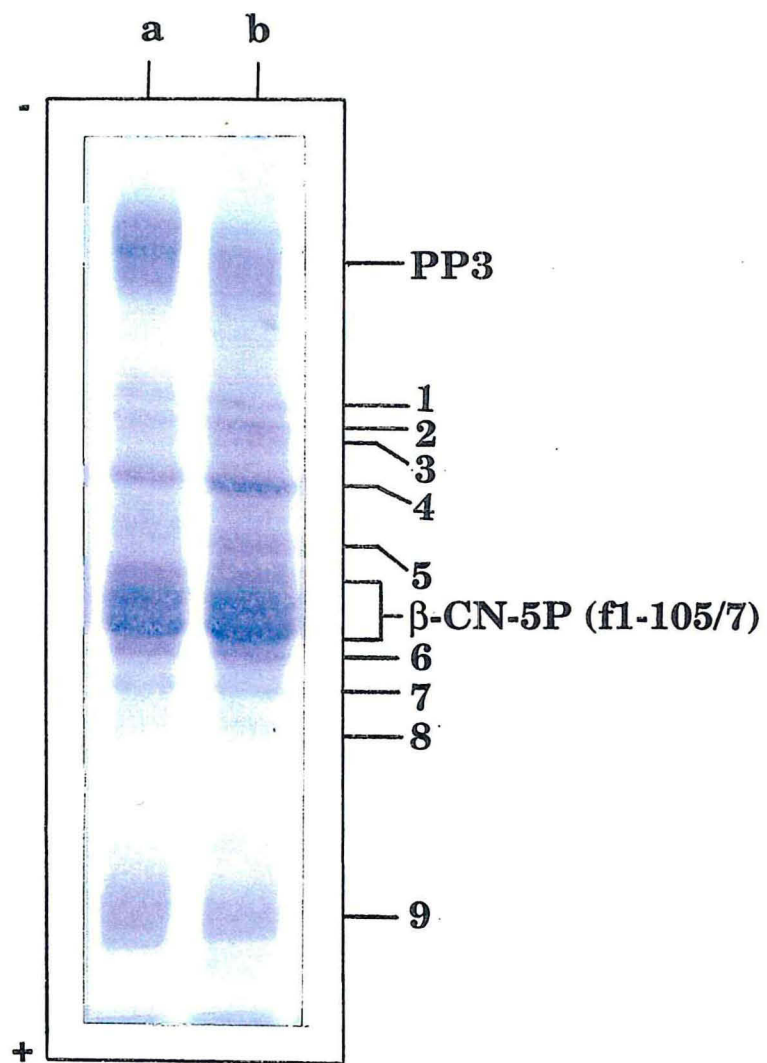


Figure 8 : Evolution de la teneur du peptide 4 dans 86 laits de quartier (en % des protéose peptones totales)

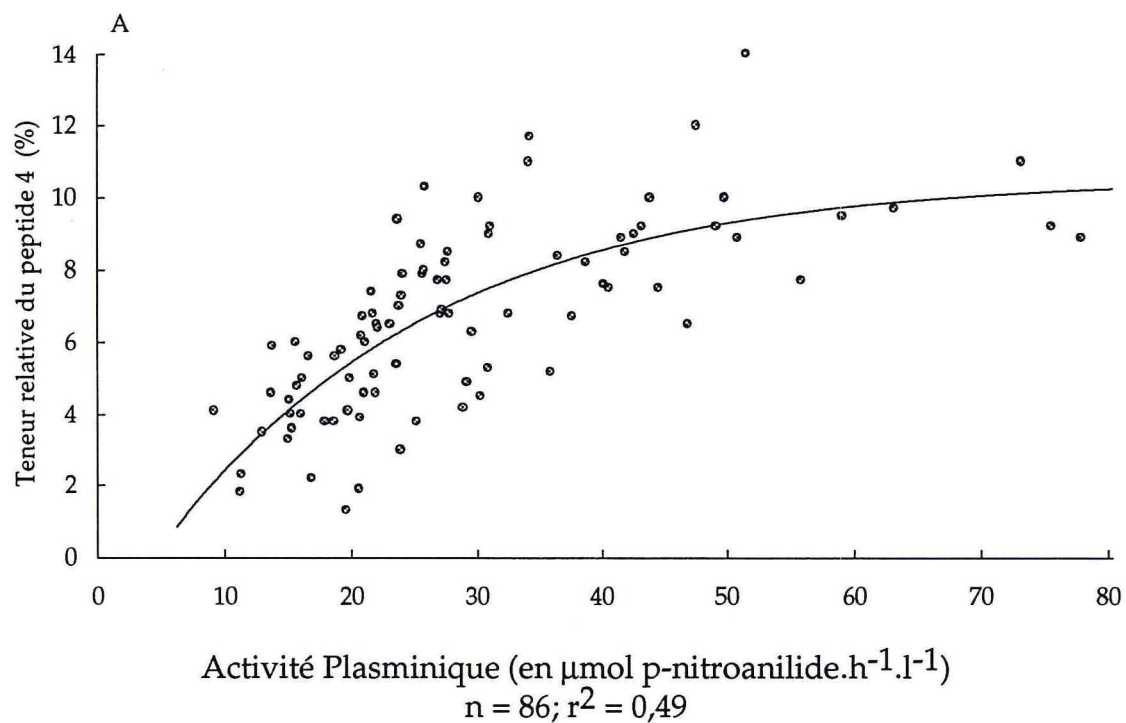


Figure 9 : Evolution de la teneur du composant 3 dans 86 laits de quartier (en % des protéose peptones totales)

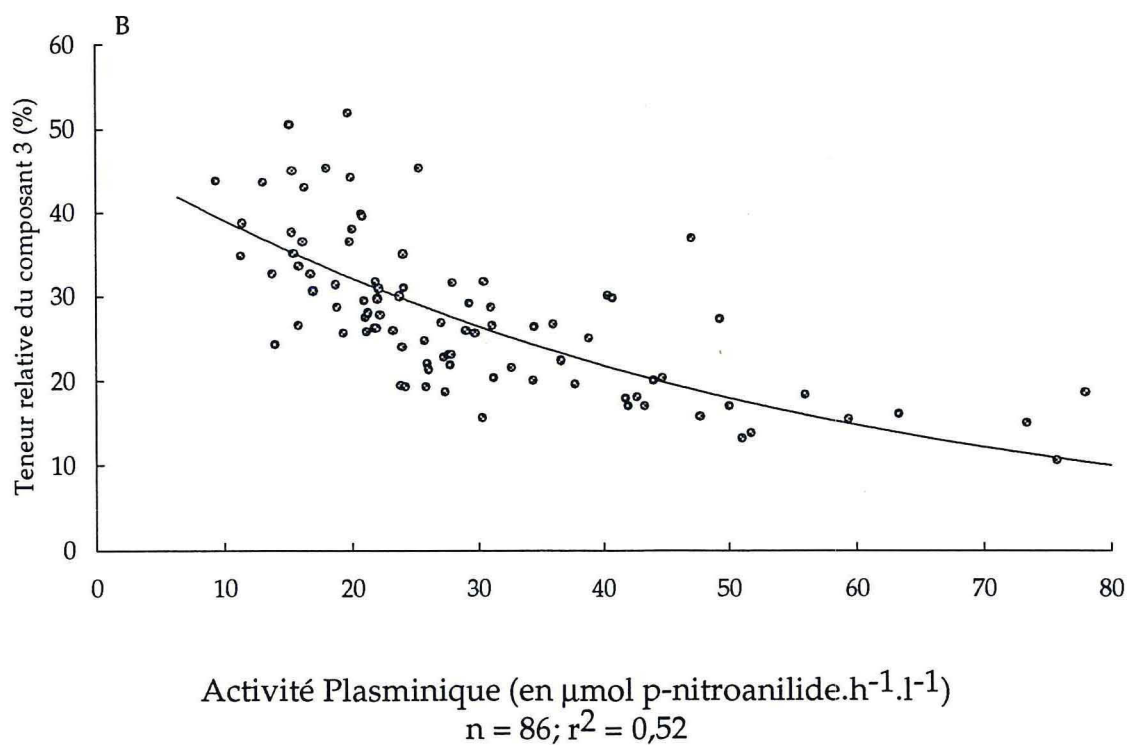


Figure 10 : Evolution de la teneur du peptide 4 dans 86 laits de quartier (en g/l)

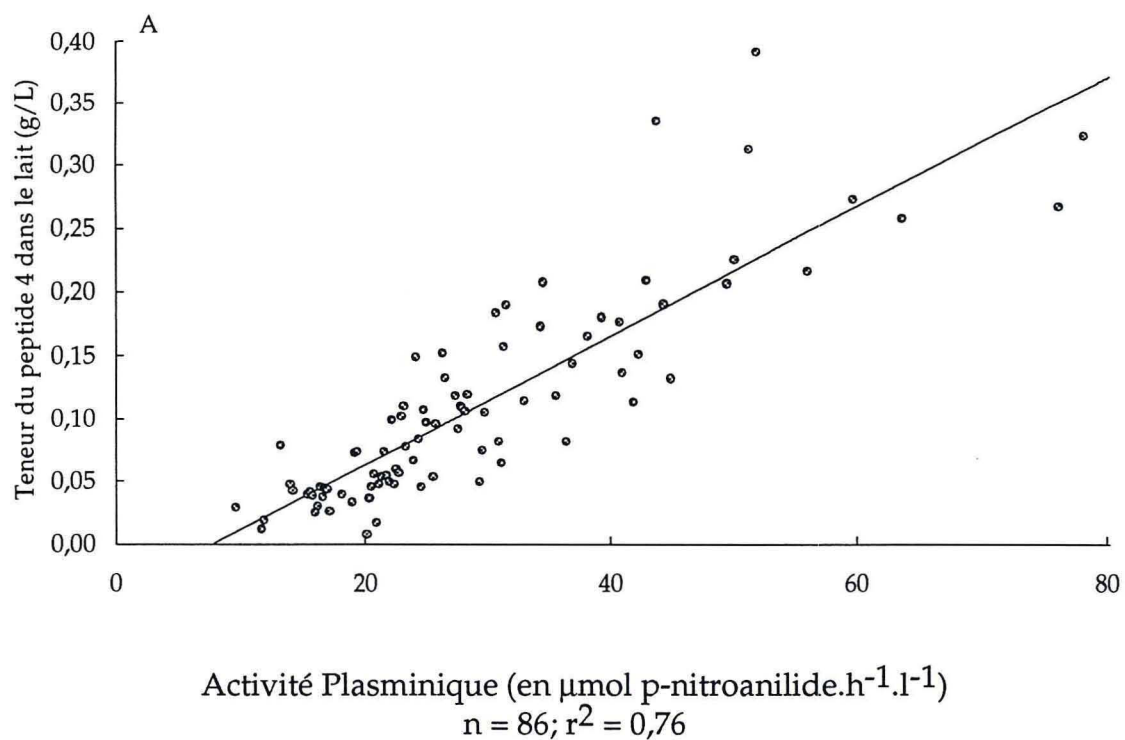


Figure 11 : Evolution de la teneur du composant 3 dans 86 laits de quartier (en g/l)

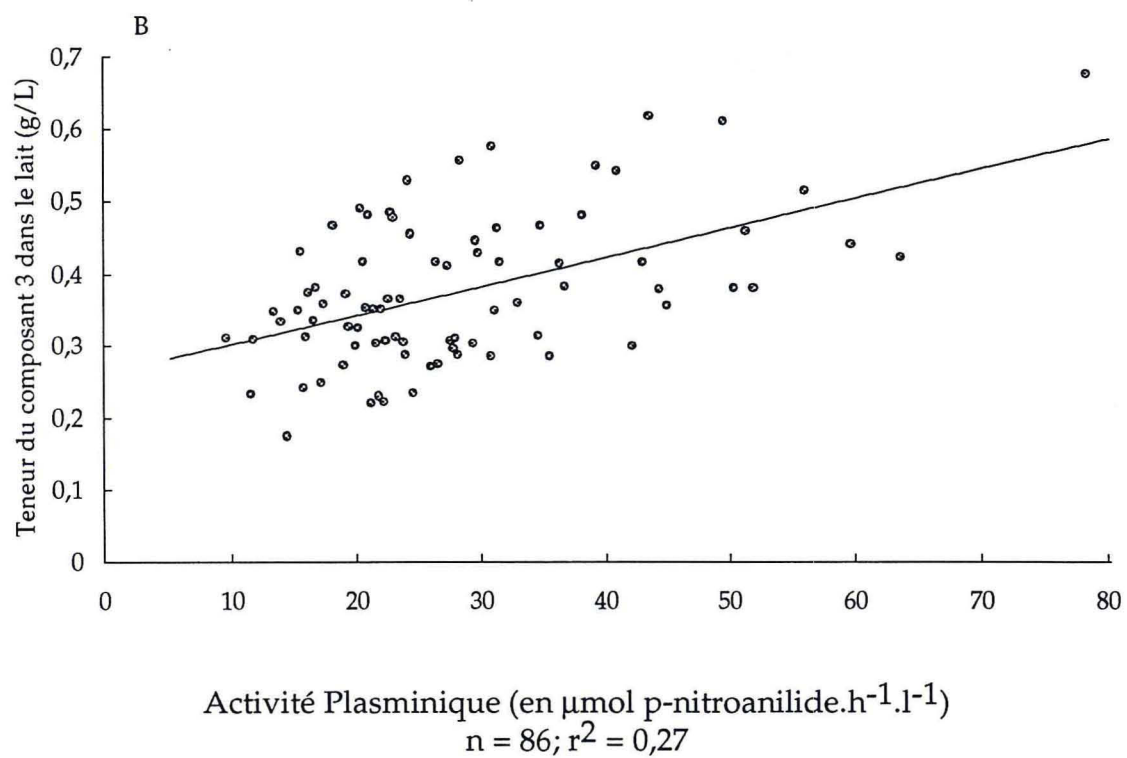


Figure 12 : Identification du poids moléculaire du peptide 4 de la fraction protéose peptones par PAGE-2D

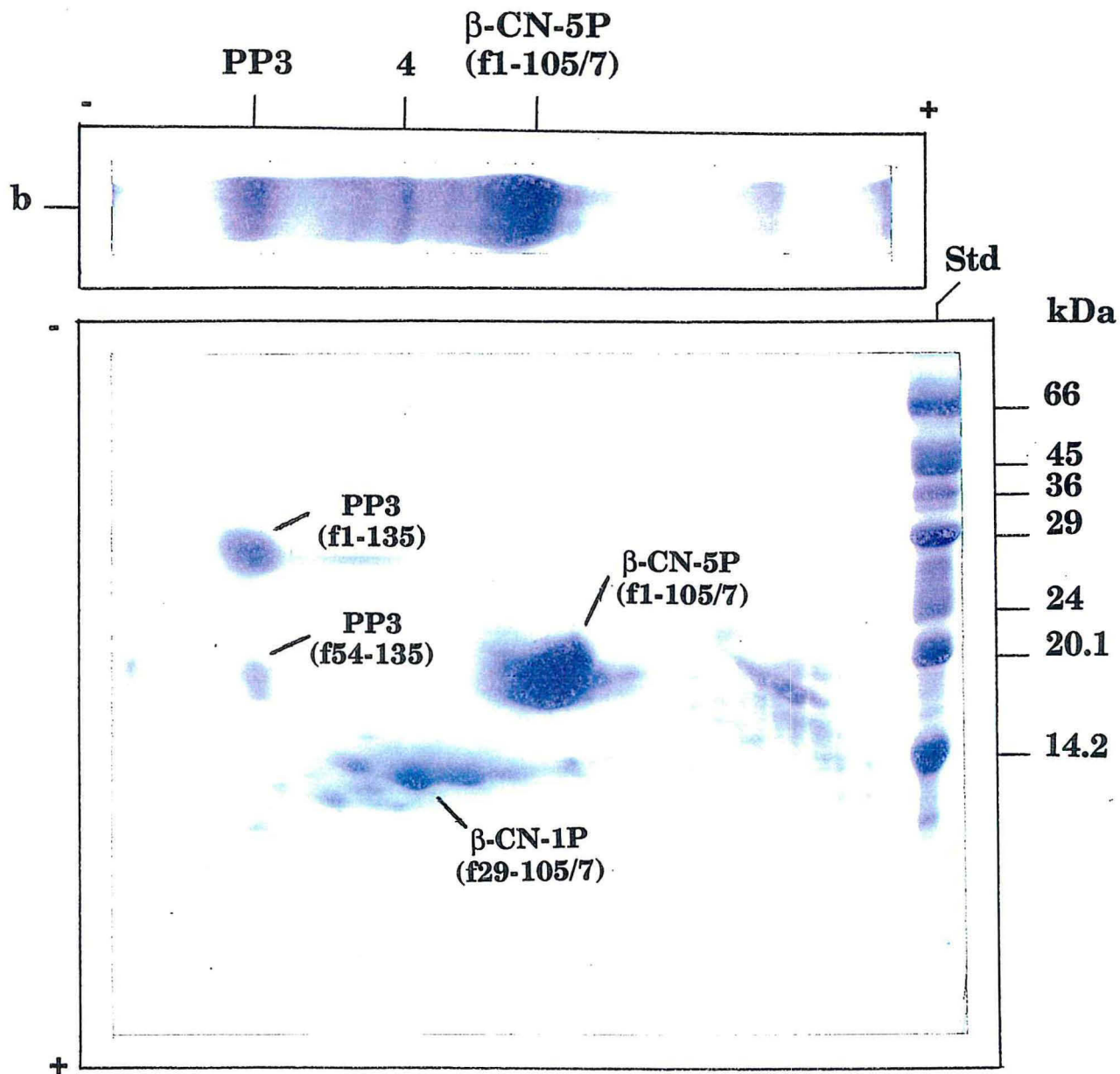


Tableau 25 : Composition<sup>1</sup> en acides aminés du peptide 4 et du composant 3 isolés par électrophorèse PAGE en conditions non dénaturantes; comparaison avec les séquences du  $\beta$ -CN-1P (f29/107) et du PP3 (f1-135)

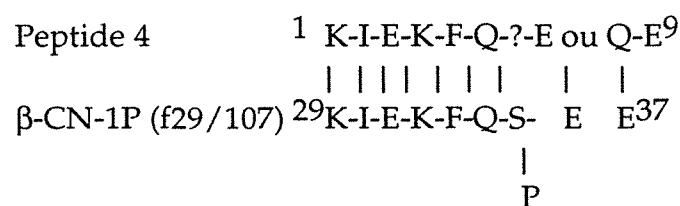
Acides aminés	Peptide 4	$\beta$ -CN-1P (f29/107) <sup>2</sup>	Composant PP3	PP3 (f1-135) <sup>3</sup>
Acide aspartique	4,9	4	9,8	12
Thréonine	4,2	4	10,6	11
Sérine	5,0	4	11,9	15
Acide glutamique	17,1	17	22,3	23
Proline	9,9	13	10,1	7
Glycine	4,7	2	8,1	3
Alanine	3,0	3	6,0	6
Valine	6,1	7	5,8	4
Méthionine	1,2	2	1,6	2
Isoleucine	3,9	4	7,1	10
Leucine	5,3	5	12,7	15
Tyrosine	1,4	1	2,1	1
Phénylalanine	4,5	4	4,2	3
Histidine	3,4	3	4,1	5
Lysine	5,2	7	9,7	12
Arginine	0	0	5,9	6

<sup>1</sup> Ratio molaire calculé sur la base de 3 résidus alanine pour le peptide et sur la base de 6 résidus alanine pour le composant 3

<sup>2</sup> De Ribadeau-Dumas et al. (1972)

<sup>3</sup> De Sorensen et Petersen (1993)

Figure 13 : Séquence N-terminale du peptide 4 comparée à la structure primaire du fragment  $\beta$ -CN-1P (f29-37) (Ribadeau-Dumas et al., 1972).



### 1.3 Etude des composants de la fraction protéose peptones

#### 1.3.1 Teneurs des composants de la fraction protéose peptones

Pour les 86 laits de quartier étudiés, les profils électrophorétiques (PAGE en conditions non dénaturantes) montrent des variations importantes de deux bandes en fonction de l'activité plasminique : une bande définie sans aucun doute comme le composant 3 du fait de sa position sur le gel et une seconde bande, non définie, appelée peptide 4 (correspondant à sa numérotation sur le gel d'électrophorèse ; figure 7).

L'évolution de la teneur relative (exprimée en % de la fraction protéose peptones) du peptide 4 et du composant 3 en fonction de l'activité de la plasmine suit une régression de type exponentielle (figures 8 et 9). La teneur relative du peptide 4 croît significativement avec l'augmentation de l'activité de la plasmine ( $r = 0,70$ ) alors que la teneur relative du composant 3 diminue ( $r = -0,72$ ).

La teneur du peptide 4 dans le lait (exprimée en g/l) est très fortement corrélée à l'activité de la plasmine ( $r = 0,87$ ) contrairement à la teneur du composant 3 qui ne présente qu'une faible corrélation ( $r = 0,52$ ) (Figures 10 et 11)

#### 1.3.2 Caractérisation du composant 3 et identification du peptide 4

La masse moléculaire apparente des composants est déterminée par une électrophorèse PAGE bidimensionnelle, couplant une électrophorèse PAGE en conditions non dénaturantes et une électrophorèse SDS-PAGE. Le peptide 4 avec un  $R_f$  (Referent Front) de 0,39 en PAGE donne par SDS-PAGE un simple spot avec un  $R_f$  de 0,62 et une masse moléculaire apparente de 11,8 kDa (droite de régression :  $\log[\text{masse moléculaire}] = 4,92 - 1,36 \times R_f$ ;  $r = .98$ ) (figure 12). Le composant 3, en SDS-PAGE, se sépare en deux spots de 30,2 kDa et 20,4 kDa correspondant aux fragments 1-135 et 54-135 respectivement (figure 12). Bien que le fragment (f54-135) soit de 53 acides aminés plus court que le composant 3 natif, ces deux molécules migrent ensemble en électrophorèse PAGE en conditions non-dénaturantes, traduisant ainsi la forte agrégation de ces deux protéines dans le lait frais.

La composition en acides aminés du composant 3 est en accord avec la structure primaire définie par Sorensen et Petersen (1993) (tableau 25). La forte teneur en glycine est due principalement à la difficulté de l'éliminer après la séparation préliminaire par PAGE.

La séquence N-terminale des 9 premiers résidus du peptide 4 est identique au  $\beta$ -CN-1P (f29-38) (Figure 13). La phosphosérine n'a pas été détectée au septième cycle car le dérivé phénylthiohydantoïne de la phosphosérine est élué dans le volume mort de la colonne en phase inverse. Au huitième cycle, l'acide glutamique et la glutamine sont détectés ensemble du fait d'une importante rémanence de la glutamine. La détermination de la composition en acide aminé confirme que le peptide 4 correspond sans aucun doute au  $\beta$ -CN-1P (f29-105/7) (tableau 25).

Le peptide 4 défini comme le fragment 29-105/7 de la  $\beta$ -caséine ne correspond pas au composant 8 slow défini par Eigel and Keenan (1979). En effet ces deux auteurs placent le fragment 29-105/7 entre le composant 5 et le front de migration sur

Tableau 26 : Résultats moyens des 3 semaines pour les 8 animaux prélevés (n=22; 2 valeurs manquantes)

	Cellules/ml (log 10)	pH	Chlorures ( g/l)	Lactose (g/l)	TP (g/l)	TPP (g/l)	Production (l/traite)
Moyenne	5,99	6,76	2,18	4,26	35,9	1,78	15,90
Ecart-type	0,59	0,15	0,63	0,54	4,5	1,04	9,30
Min	4,89	6,54	1,40	3,15	30,7	0,44	1,90
Max	6,94	7,05	3,71	4,93	51,9	5,24	29,90
C.V. (%)	9,80	2,20	29,10	12,60	12,5	58,50	58,70

Tableau 27 : Matrice de corrélation (n=22)

	pH	Chlorures	Lactose	Cellules (en log10)	Teneur en PP	TP	Production
pH	*						
Chlorures	0,92	*					
Lactose	-0,87	-0,83	*				
Cellules	0,57	0,53	-0,49	*			
T PP	0,83	0,83	-0,60	0,44	*		
TP				0,54	0,60	*	
Production	-0,85	-0,91	0,88	-0,48	0,73		*

Seules les corrélations significatives au seuil de 5% sont notées ( $r > 0,39$ ).



électrophorèse PAGE en conditions non dénaturantes, cette position n'étant pas confirmée dans nos travaux et ceux d'Andrews et Alichanidis (1983).

Comme le composant 3, le  $\beta$ -CN-1P (f29-105/7) comporte un nombre important de résidus lysine (6 pour le fragment 29-105 et 7 pour le fragment 29-107), cependant, ce fragment semble résistant à une protéolyse plasminique. La modélisation de la structure tridimensionnelle pourrait expliquer cette résistance. Ainsi, les sites de clivages 28-29, 105-106 et 107-108 apparaissent plus facilement accessibles à la surface de la molécule et, de plus, ces sites sont localisés sur une face hydrophile. Ces deux facteurs favorisent une hydrolyse par la plasmine (Kumosinski et al., 1993). Le composant  $\beta$ -CN-1P (f29-105/7) semble un produit terminal de l'hydrolyse plasminique.

#### 1.4 Conclusion

La protéolyse d'origine endogène peut avoir des conséquences très négatives même sur des laits issus d'animaux ne présentant pas de mammites cliniques. Cette protéolyse est déjà significative pour des laits à moins de 250 00 cellules/ml et semble augmenter avec le stade de lactation, quel que soit le dénombrement cellulaire. L'utilisation de laits de quartier a permis d'obtenir des plages de variation, pour les variables mesurées, plus importantes qu'avec des laits de mélange des quatre quartiers.

Le composant  $\beta$ -CN-1P (f29-105/7), contrairement au composant 3, s'est révélé un excellent indicateur du niveau de protéolyse endogène dans les laits de mammites subcliniques.

## **2. Relation entre le dénombrement cellulaire et des indicateurs directs ou indirects de la protéolyse endogène sur des laits de mélange des quatre quartiers**

### 2.1 Caractéristiques moyennes des laits analysés

Les laits des 8 animaux prélevés ne présentaient ni signes cliniques d'inflammation de la mamelle ni signes visuels de dégradation de la qualité du lait. Des écarts importants sont mesurés pour la plupart des variables, notamment la teneur en protéose peptones, indicateur potentiel de dégradation des protéines, et la teneur en chlorures, très liée à l'état sanitaire de la mamelle (tableau 26).

Figure 14 : Evolution de la flore psychrotrophe pour le lait témoin (■) et le lait + urokinase (▲)

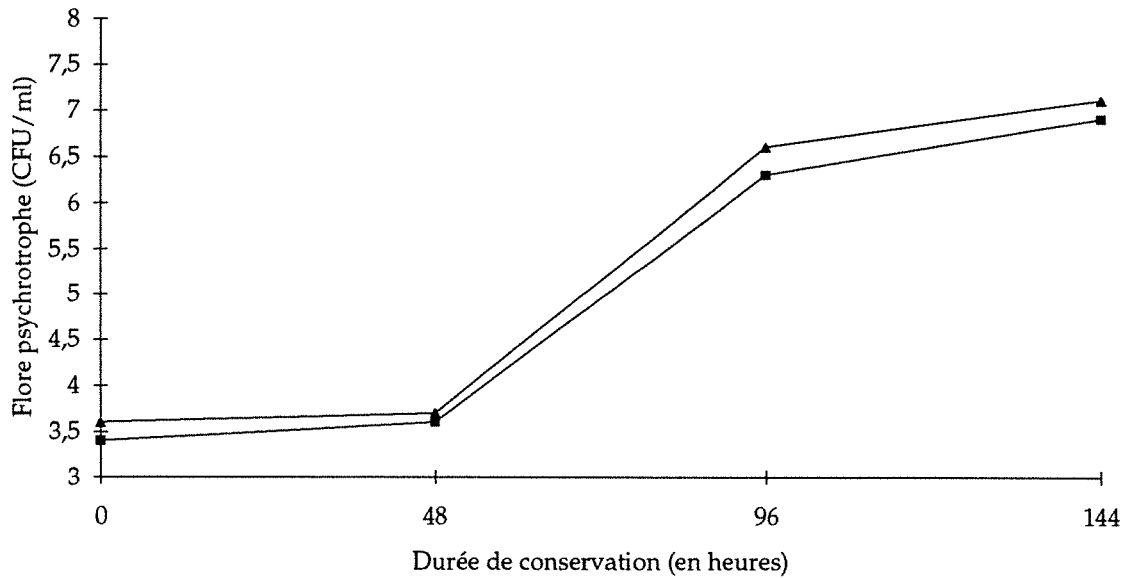
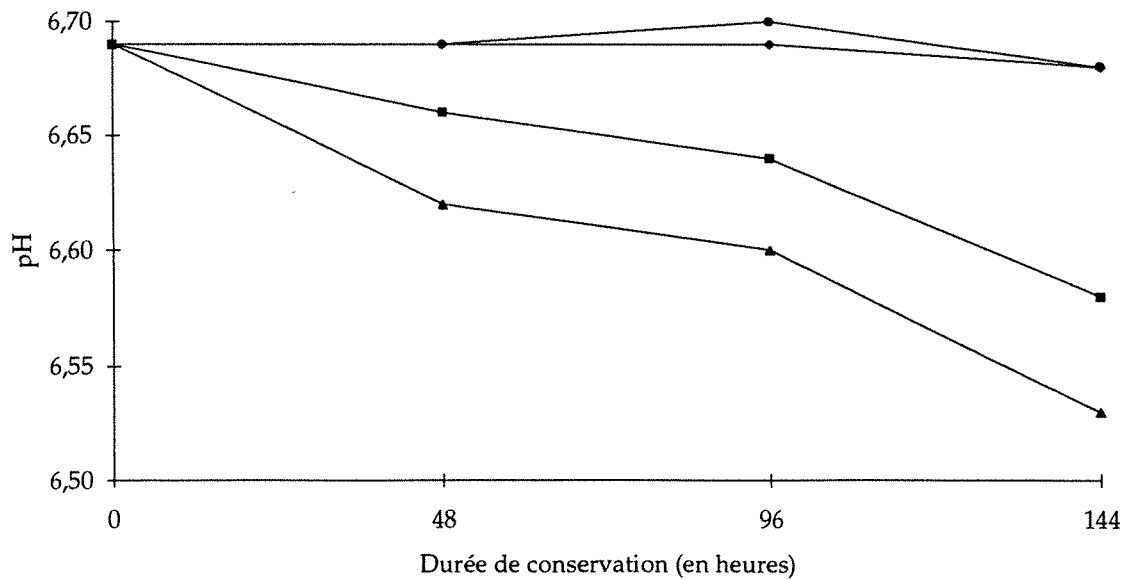


Figure 15 : Evolution du pH pour le lait Témoin (■), le lait + urokinase (▲), le lait + bactéricide (◆) et pour le lait + bactéricide + urokinase (●).



## 2.2 Liaisons entre les variables

Le dénombrement cellulaire présente des corrélations significatives avec toutes les variables, cependant celles-ci n'excèdent pas 0,57 et une corrélation de 0,44 est observée avec la teneur en protéose peptones (tableau 27).

Les corrélations mesurées entre la teneur en protéose peptones, la teneur en chlorures et le pH sont élevées (toutes supérieures à 0,73).

Ces résultats illustrent les limites du dénombrement cellulaire considéré en tant qu'indicateur de qualité des protéines des laits de mélange des quatre quartiers. Par contre, d'autres indicateurs, dont les variations ont aussi pour origine une dégradation de l'état sanitaire, semblent bien corrélés avec la qualité des protéines (teneur en chlorures et teneur en protéose peptones).

Le dénombrement cellulaire et la teneur en chlorures ne présentent pas une corrélation importante ( $r = 0,53$ ). Pour Deluyker (communication personnelle, 1994), les mammites se traduisent par un dénombrement cellulaire élevé. Associé à ce dénombrement cellulaire élevé, une augmentation de la teneur en chlorures traduirait les phases aiguës des mammites. Ce résultat pose le problème de la compréhension et de la définition objective des mammites subcliniques : doit-on se baser sur des indicateurs comme le dénombrement cellulaire ou la teneur en chlorures ou plutôt sur des indicateurs directs de la qualité des protéines, ou doit-on associer ces paramètres pour mieux définir la notion de mammites subcliniques ?

### **III INTERACTION PROTEOLYSE MICROBIENNE PROTEOLYSE ENDOGENE**

#### **1. Influence des protéases microbiennes sur l'activité de la plasmine**

##### 1.1 Evolution de la croissance microbienne

La contamination initiale des laits, pour les trois répétitions, est en moyenne de  $2 \cdot 10^4$  germes mésophiles/ml, la flore psychrotrophe représentant entre 20 et 50% de la flore mésophile. La phase exponentielle de croissance est atteinte après 96 h de stockage. La phase stationnaire commence après 144 h de stockage, la contamination étant proche de  $10^7$ /germes/ml. La flore est alors exclusivement composée de psychrotrophes. La croissance microbienne n'est pas différente entre les laits témoins et les laits contenant de l'urokinase (figure 14).

##### 1.2 Evolution du pH

Parallèlement à la croissance microbienne, le pH des laits sans bactéricide diminue entre 96 h et 144 h, pour atteindre des valeurs proches de 6,50 à 144 h. Aucune variation significative n'a été observée pour les laits contenant le bactéricide (figure 15).

Tableau 28 : Evolution de l'activité du système Plasmine-plasminogène libre (après activation) du lait cru lors du stockage à 4°C : influence du traitement

Durée de stockage	Lait Témoin	Lait + urokinase	Lait + urokinase + bactéricide	Lait + bactéricide
0 H	A 11,0 b	A 15,8 a	A 16,2 a	A 10,9 b
48 H	AB 10,8 b	AB 15,1 a	AB 15,3 a	A 10,1 b
96 H	AB 9,9 b	AB 14,9 a	B 14,6 a	A 10,2 b
144 H	B 9,4 b	B 14,2 a	C 13,3 a	B 8,6 b

Activité du système plasmine-plasminogène exprimée en  $\mu\text{moles p Nitroanilide.h}^{-1}\text{L}^{-1}$

a, b ou A, B : moyennes significativement différentes ( $P < 0,05$ ) dans la même colonne (lettres majuscules) ou dans la même ligne (lettres minuscules)

Tableau 29 : Variations de la teneur en azote caséique du lait cru lors du stockage à 4°C : influence du traitement

Durée de stockage	Lait Témoin	Lait + urokinase	Lait + urokinase + bactéricide	Lait + bactéricide
0 H	A 3,94 a	A 3,96 a	A 3,99 a	A 3,99 a
48 H	A 3,90 a	A 3,86 a	A 3,92 a	A 3,98 a
96 H	A 3,82 a	A 3,78 a	A 3,90 a	A 3,86 a
144 H	B 3,44 b	B 3,32 b	A 3,80 a	A 3,88 a

Teneur exprimée en g N / l de lait

a, b ou A, B : moyennes significativement différentes ( $P < 0,05$ ) dans la même colonne (lettres majuscules) ou dans la même ligne (lettres minuscules)

### 1.3- Activité de la plasmine, activation du plasminogène

L'activité de la plasmine est maximale à 0 h puis diminue régulièrement (tableau 28). Suite à l'activation par l'urokinase, une augmentation de l'activité plasminique de 40% est mesurée (la littérature donne des rapports plasminogène/plasmine de 3 à 30, nettement supérieurs à ceux mesurés dans cette étude). Cette apparente différence est due à la méthodologie employée qui n'utilise pas l'acide  $\epsilon$ -amino caproïque pour dissocier la totalité de la plasmine et du plasminogène associés aux micelles de caséines. La méthode mise au point par Humbert (1986) a pour objectif de mesurer l'activité réelle de la plasmine observée dans un lait, et non pas la totalité de cette activité.

Aucune différence significative d'activité plasminique à 144 h n'est mesurée entre le lait témoin et le lait contenant du bactéricide, les protéases microbiennes ne semblent pas interagir avec l'activité de la plasmine en activant ou en inhibant la conversion du plasminogène. Ces conclusions sont en accord avec celles de Verdi et Barbano (1991) et contredisent celles de Leytus et al. (1981) qui montrent une activation du plasminogène par des protéases associées à la membrane d'E. coli.

### 1.4 Evolution des indicateurs de protéolyse

L'interaction entre les deux facteurs étudiés (traitement et durée de stockage) est significative pour toutes les variables mesurées.

#### 1.4.1 Teneur en azote caséique et en azote non protéique

Pour les laits sans bactéricide, la teneur en azote caséique diminue significativement entre 96 h et 144 h (-13 % pour le lait témoin, -16 % pour le lait avec urokinase) (tableau 29).

Une augmentation de la teneur en azote non protéique est notée à 144 h de stockage pour les laits sans bactéricide (tableau 30).

Pour les laits avec bactéricide, aucune variation significative n'est notée pour les deux paramètres.

L'évolution significative de ces indicateurs, pourtant peu sensibles, montre l'importance des phénomènes protéolytiques se déroulant dans les laits ne contenant pas de bactéricide.

#### 1.4.2 Mesure des groupements $\alpha$ -aminés libres par la technique TNBS

Quel que soit le traitement, aucune variation n'est mesurée jusqu'à 96 h (tableau 31). A 144 h la teneur en groupements  $\alpha$ -aminés libres des laits sans bactéricide augmente significativement alors que les variations ne sont pas significatives pour les laits avec bactéricide.

Tableau 30 : Variations de la teneur en azote non protéique du lait cru lors du stockage à 4°C : influence du traitement

Durée de stockage	Lait Témoin	Lait + urokinase	Lait + urokinase + bactéricide	Lait + bactéricide
0 H	B 0,380 a	BC 0,352 ab	A 0,349 b	A 0,369 a
48 H	B 0,364 a	C 0,334 b	A 0,334 b	A 0,358 ab
96 H	B 0,378 a	B 0,367 a	A 0,369 a	A 0,364 a
144 H	A 0,459 a	A 0,460 a	A 0,348 b	A 0,351 b

Teneur exprimée en g N / l de lait

a, b ou A, B : moyennes significativement différentes ( $P < 0,05$ ) dans la même colonne (lettres majuscules) ou dans la même ligne (lettres minuscules)

Tableau 31 : Variations de la teneur en groupement  $\alpha$ -aminés du lait cru lors du stockage à 4°C : influence du traitement

Durée de stockage	Lait Témoin	Lait + urokinase	Lait + urokinase + bactéricide	Lait + bactéricide
0 H	B 0,794 a	B 0,790 a	A 0,776 a	A 0,774 a
48 H	B 0,803 a	B 0,826 a	A 0,822 a	A 0,798 a
96 H	B 0,787 a	B 0,821 a	A 0,805 a	A 0,764 a
144 H	A 0,950 a	A 1,016 a	A 0,835 b	A 0,800 b

Teneur exprimée en mmole eq. glycine/g of casein/h

a, b ou A, B : moyennes significativement différentes ( $P < 0,05$ ) dans la même colonne (lettres majuscules) ou dans la même ligne (lettres minuscules)

Tableau 32 : Variations du pourcentage en  $\kappa$ -caséines dans le lait cru lors du stockage à 4°C : influence du traitement

Durée de stockage	Lait Témoin	Lait + urokinase	Lait + urokinase + bactéricide	Lait + bactéricide
0 H	A 6,8 a	A 7,8 a	A 8,6 a	A 6,7 a
48 H	A 7,3 a	A 8,6 a	A 9,6 a	A 8,4 a
96 H	A 7,3 b	A 8,9 ab	A 10,3 a	A 7,1 b
144 H	B 3,2 c	B 5,4 bc	A 9,1 a	A 6,3 b

Valeurs exprimées en % des caséines totales

a, b, c ou A, B : moyennes significativement différentes ( $P < 0,05$ ) dans la même colonne (lettres majuscules) ou dans la même ligne (lettres minuscules)

Tableau 33 : Variations du pourcentage en  $\beta$ -caséines dans le lait cru lors du stockage à 4°C: influence du traitement

Durée de stockage	Lait Témoin	Lait + urokinase	Lait + urokinase + bactéricide	Lait + bactéricide
0 H	A 39,1 a	A 36,7 ab	A 34,8 b	A 39,4 a
48 H	A 38,8 a	A 34,5 b	AB 33,3 b	A 39,5 a
96 H	A 39,2 a	B 30,0 c	AB 33,2 b	A 38,3 a
144 H	B 30,9 b	C 21,3 c	B 30,3 b	A 39,7 a

Valeurs exprimées en % des caséines totales

a, b ou A, B, C : moyennes significativement différentes ( $P < 0,05$ ) dans la même colonne (lettres majuscules) ou dans la même ligne (lettres minuscules)

Tableau 34 : Variations du pourcentage en  $\gamma$ -caséines dans le lait cru lors du stockage à 4°C : influence du traitement

Durée de stockage	Lait Témoin	Lait + urokinase	Lait + urokinase + bactéricide	Lait + bactéricide
0 H	B 4,6 a	D 6,6 a	C 7,4 a	A 3,7 a
48 H	B 5,0 b	C 11,8 a	B 12,4 a	A 5,5 b
96 H	B 5,8 b	B 15,2 a	A 15,6 a	A 5,7 b
144 H	A 9,1 b	A 19,2 a	A 17,9 a	A 6,3 b

Valeurs exprimées en % des caséines totales

a, b ou A, B, C, D: moyennes significativement différentes ( $P < 0,05$ ) dans la même colonne (lettres majuscules) ou dans la même ligne (lettres minuscules)

Tableau 35 : Variations du pourcentage en  $\alpha_s$ -caséines dans le lait cru lors du stockage à 4°C : influence du traitement

Durée de stockage	Lait Témoin	Lait + urokinase	Lait + urokinase + bactéricide	Lait + bactéricide
0 H	B 49,5 a	AB 48,9 a	A 49,3 a	A 50,2 a
48 H	B 48,9 a	A 45,0 a	AB 44,7 a	A 46,6 a
96 H	B 47,7 a	A 45,9 ab	B 40,9 b	A 48,9 a
144 H	A 56,8 a	B 54,0 a	B 42,7 b	A 47,7 b

Valeurs exprimées en % des caséines totales

a, b ou A, B: moyennes significativement différentes ( $P < 0,05$ ) dans la même colonne (lettres majuscules) ou dans la même ligne (lettres minuscules)



### 1.4.3 Pourcentage des différentes caséines

-  $\kappa$ -caséines : une baisse importante (environ 50%) de la teneur en  $\kappa$ -caséine est observée après 144 h de stockage pour les laits sans bactéricide (tableau 32). Pour les laits avec bactéricide, les écarts sont variables et non significatifs.

-  $\beta$ -caséines : une diminution du pourcentage des  $\beta$ -caséines est observée dans le lait avec urokinase à partir de 96 h (tableau 33). L'activation du plasminogène pourrait expliquer cette évolution, cependant cette diminution n'est que partiellement retrouvée dans le lait contenant l'urokinase et le bactéricide.

-  $\gamma$ -caséines (assimilable à l'indice de protéolyse): une augmentation importante du pourcentage des  $\gamma$ -caséines est mesurée pour les laits contenant l'urokinase (tableau 34). Dans le lait témoin un accroissement significatif du pourcentage de  $\gamma$ -caséines est noté alors que l'augmentation observée dans le lait contenant le bactéricide est non significative. Ces deux résultats montrent que l'activité des protéases endogènes présentes initialement dans le lait entraînent "un bruit de fond" protéolytique significatif.

-  $\alpha_S$ -caséines : les évolutions du pourcentage des  $\alpha_S$ -caséines sont beaucoup plus variables. Le pourcentage relatif des  $\alpha_S$ -caséines augmente dans les laits sans bactéricide, cette caséine plus résistante que les  $\kappa$ -caséines et les  $\beta$ -caséines voit sa teneur initiale diminuer moins vite. L'ajout d'urokinase ne semble pas provoquer une diminution notable du pourcentage des  $\alpha_S$ -caséines (tableau 35).

### 1.4.4 Teneur et nature de la fraction protéose peptones

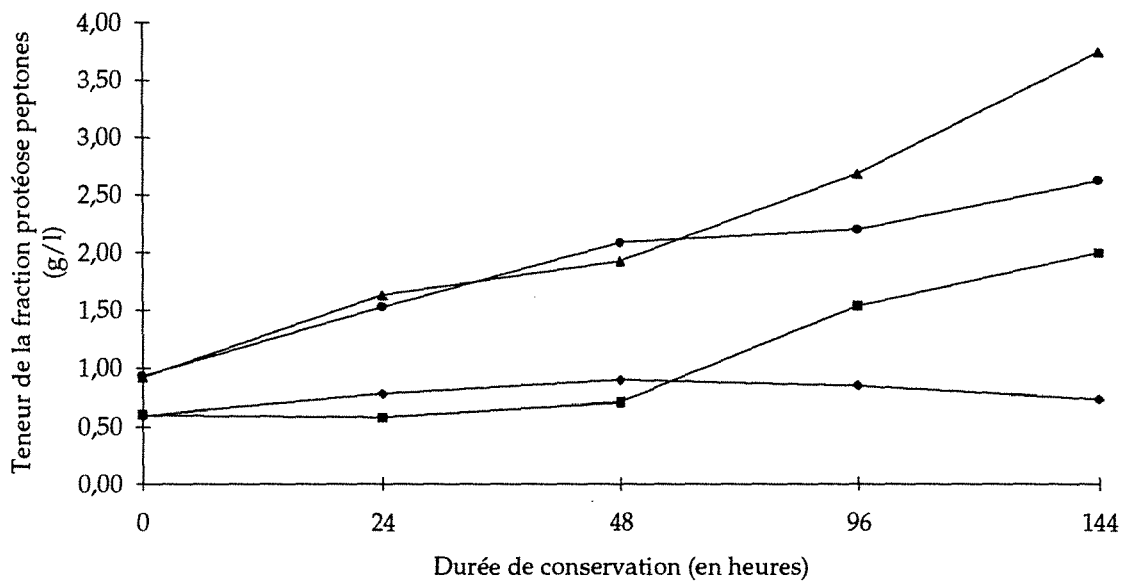
#### - Teneur

L'inhibition ou l'activation dans le lait d'activité protéolytique spécifique, est le seul moyen d'étudier l'importance relative des protéases impliquées dans le système protéolytiques. Cependant, le fait d'inhiber ou d'activer une protéase peut rompre l'ensemble de l'équilibre du système protéolytique. C'est pourquoi tous les résultats liés à l'activation ou l'inhibition de protéases sont à considérer avec attention. Ils permettent de dégager des idées générales quant aux effets de chacune des protéases mais interdit une quantification précise in vivo de l'action des protéases du fait des conditions particulières d'obtention des résultats.

La teneur en protéose peptones du lait témoin et du lait contenant le bactéricide reste stable durant les 96 premières heures (figure 16). Cette teneur augmente ensuite rapidement dans le lait témoin entre 96 et 144 h, cette évolution est parallèle à l'accroissement de la flore psychrotrophe.

La teneur en protéose peptones des laits contenant de l'urokinase augmente régulièrement entre 0 h et 144 h. A 144 h, le lait contenant simplement de l'urokinase présente une teneur en protéose peptones supérieure au lait contenant de l'urokinase et du bactéricide. Cette différence paraît donc imputable aux protéases bactériennes. La teneur de la fraction protéose peptones serait donc sensible à la fois à la protéolyse microbienne et endogène.

Figure 16.: Evolution de la teneur en protéose peptones pour le lait Témoin (■), le lait + urokinase (▲), le lait + bactéricide (◆) et pour le lait + bactéricide + urokinase (●).



#### - Nature

L'analyse du profil du lait montre que le composant 5 n'est pas, ou peu, affecté par la conservation (figure 17). Par contre, l'intensité de la coloration du composant 3 diminue entre 0 h et 144 h pour le lait contenant de l'urokinase.

Pour le lait témoin, les composants 3 et 5 disparaissent complètement à partir de 144 h, traduisant leur sensibilité à la protéolyse microbienne.

#### 1.4.5 Conclusion

##### - Protéolyse microbienne

Tous les indicateurs de protéolyse testés présentent des variations significatives après 144 h de conservation à 4°C, mais ce résultat ne permet pas d'apprécier objectivement la sensibilité et l'intérêt de chacun des indicateurs testés. En effet, dans cette étude, la protéolyse microbienne a été très marquée : même des indicateurs peu sensibles (teneur en azote non protéique et en azote caséique) ont varié significativement. Les phénomènes protéolytiques d'origine microbiens semblent présenter un caractère de type "tout ou rien". La protéolyse imputable aux bactéries est à mettre en relation avec la phase de croissance exponentielle des micro-organismes, c'est-à-dire, rapide et de forte intensité.

##### - Protéolyse endogène

L'incidence de la protéolyse endogène semble significative. Pourtant, les laits utilisés présentaient un dénombrement cellulaire moyen de 250 000/ml qui, témoin d'un bon état sanitaire du troupeau, ne favorisait pas une activité importante des protéases endogènes. Des études complémentaires portant sur l'incidence du dénombrement cellulaire sur la qualité des protéines lors du stockage du lait au froid devront être entreprises.

Les indicateurs testés (% $\gamma$ -caséines, teneur et nature de la fraction protéose peptones) ont montré des variations importantes pour les laits contenant l'urokinase. Des laits présentant *in vivo* une activité plasminique importante devraient montrer aussi ce type de variation.

Aucune interaction significative n'a été mesurée entre les protéases microbiennes et l'activité de la plasmine, montrant ainsi une absence d'activation du plasminogène par les protéases microbiennes.

Figure 18 : Evolution de la teneur en calcium colloïdal (en % du calcium total), moyenne du lait Témoin et du lait + urokinase (■), moyenne du lait + bactéricide et du le lait + bactéricide + urokinase (◆)

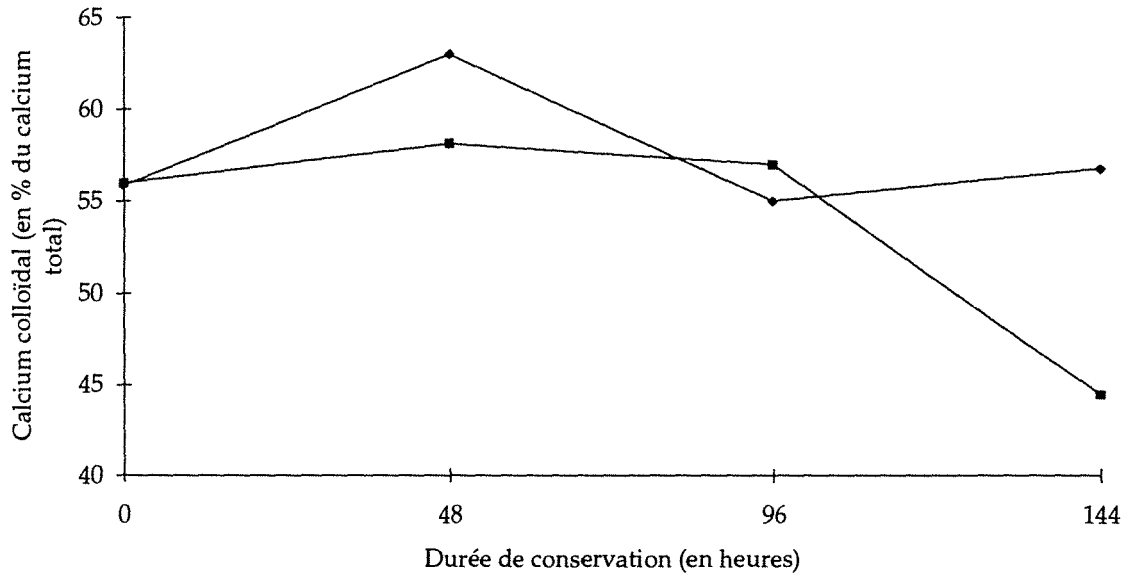


Figure 19 : Evolution de la flore mésophile (◆) et psychrotrophe (●) pour le lait témoin (◇; ○) et le lait contenant de l'acide ε-amino caproïque (◆; ●).

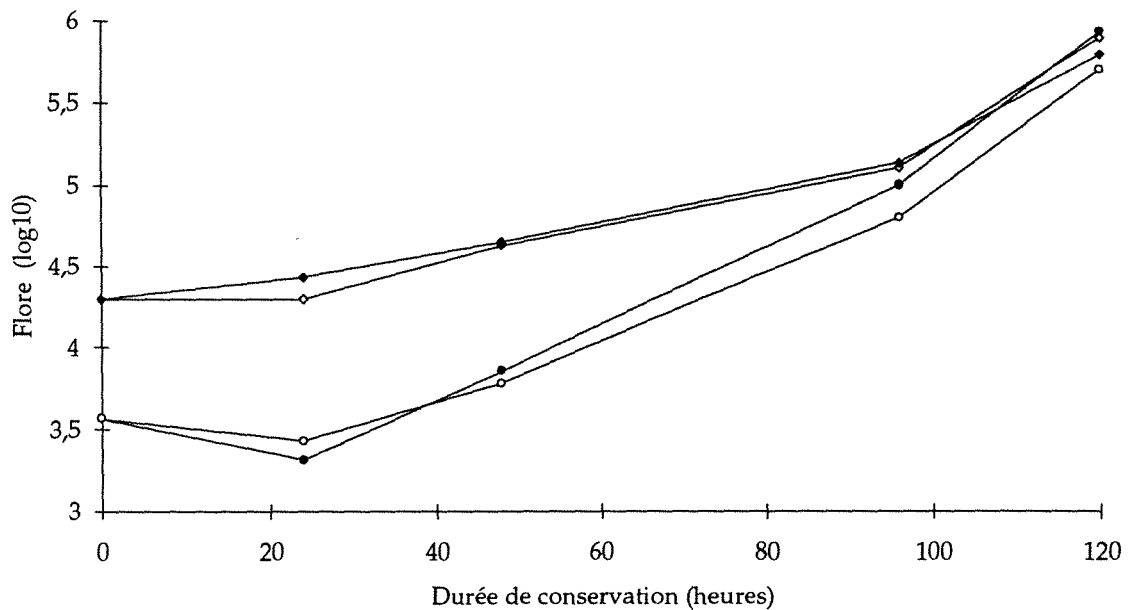
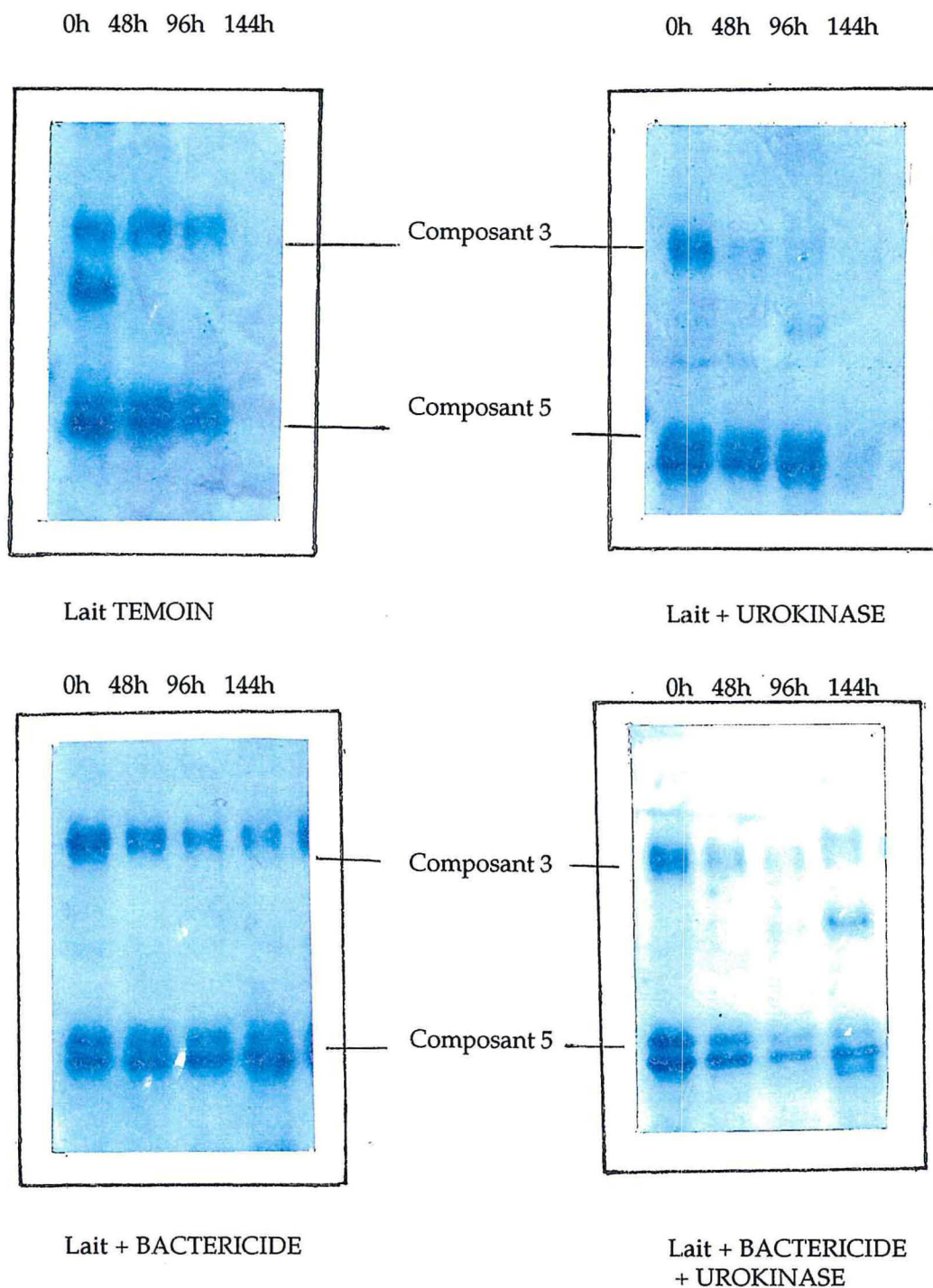


Figure 17 : Evolution en PAGE native des différents composants de la fraction protéose peptones en fonction du traitement et de la durée de stockage.



### 1.5 Teneur en calcium colloïdal

Aucune diminution significative du pourcentage du calcium colloïdal n'est mesurée pendant les 96 premières heures de stockage (figure 18). Les données bibliographiques montrent pourtant une augmentation du calcium soluble lors du stockage du lait au froid. De plus, les évolutions physico-chimiques, dues à l'action du froid, atteignent pratiquement leur maximum d'amplitude au bout de 24 h. Le maintien du lait à la même température pendant un ou deux jours supplémentaires ne se traduit pas par une évolution véritablement significative (Remeuf, 1991). Ces observations ne sont pas retrouvées dans nos essais.

Une diminution du pourcentage du calcium colloïdal est observée à 144 h dans les laits ne contenant pas de bactéricide. L'hydrolyse des caséines par les protéases microbiennes doit provoquer une destabilisation des micelles de caséines et un passage de calcium colloïdal dans la phase soluble.

## **2. Influence du dénombrement cellulaire, de la contamination microbienne et de la durée de stockage sur la protéolyse du lait.**

### 2.1 Evolution de la croissance microbienne

La contamination initiale des laits à 0 h est en moyenne de  $2 \cdot 10^4$  germes mésophiles/ml, 20% de la flore étant de type psychrotrophe (figure 19). La phase de latence dure 96 h, les seuils microbiens atteints sont alors de moins de 100 000 germes/ml. Après 120 h de conservation, la contamination est proche de  $10^6$  germes/ml dans les trois essais, la flore mésophile étant composée exclusivement de germes psychrotrophes. Aucune différence n'est mesurée dans la croissance microbienne entre les laits témoins et les laits contenant l'inhibiteur de l'activité plasminique (acide  $\epsilon$ -amino caproïque).

### 2.2 Evolution du pH

Les pH initiaux moyens sont de 6,70 ( $\pm 0,02$ ) et atteignent 6,72 ( $\pm 0,03$ ) après 72 h de stockage. Ces évolutions sont non significatives.

### 2.3 Activité de la plasmine

Quels que soient les traitements et les dénombrements cellulaires initiaux, l'activité plasminique décroît lors du stockage du lait au froid (figure 20).

La classe 3 de dénombrement cellulaire (500 000 cellules/ml) présente une activité plasminique très supérieure aux classes 2 (150 000 cellules/ml) et 1 (50 000 cellules/ml) (respectivement  $23 \mu\text{mol p-NA/h}^{-1}/\text{l}^{-1}$ ,  $13 \mu\text{mol p-NA/h}^{-1}/\text{l}^{-1}$  et  $15 \mu\text{mol p-NA/h}^{-1}/\text{l}^{-1}$ ). L'activité plasminique la plus faible est retrouvée pour la classe 2 de dénombrement cellulaire.

Figure 20 : Evolution de l'activité plasminique au cours du temps pour les trois classes de dénombrement cellulaire (■ : classe 3; ● : classe 2; ▲ : classe 1) dans les laits sans inhibiteur de l'activité plasminique (■; ●; ▲) et dans les laits avec inhibiteurs (□; ○; △).

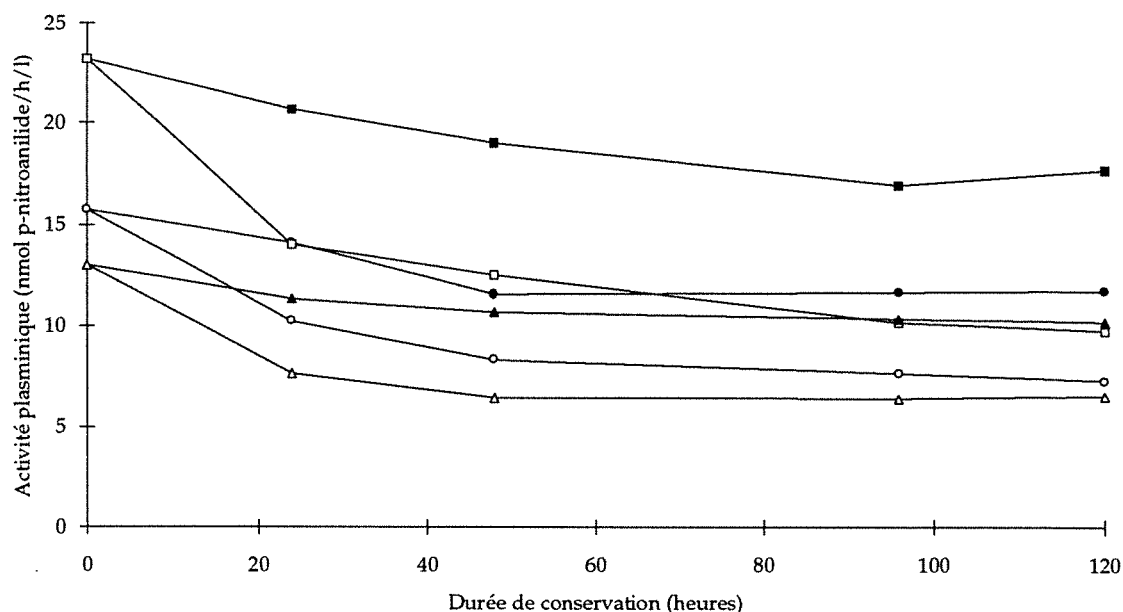
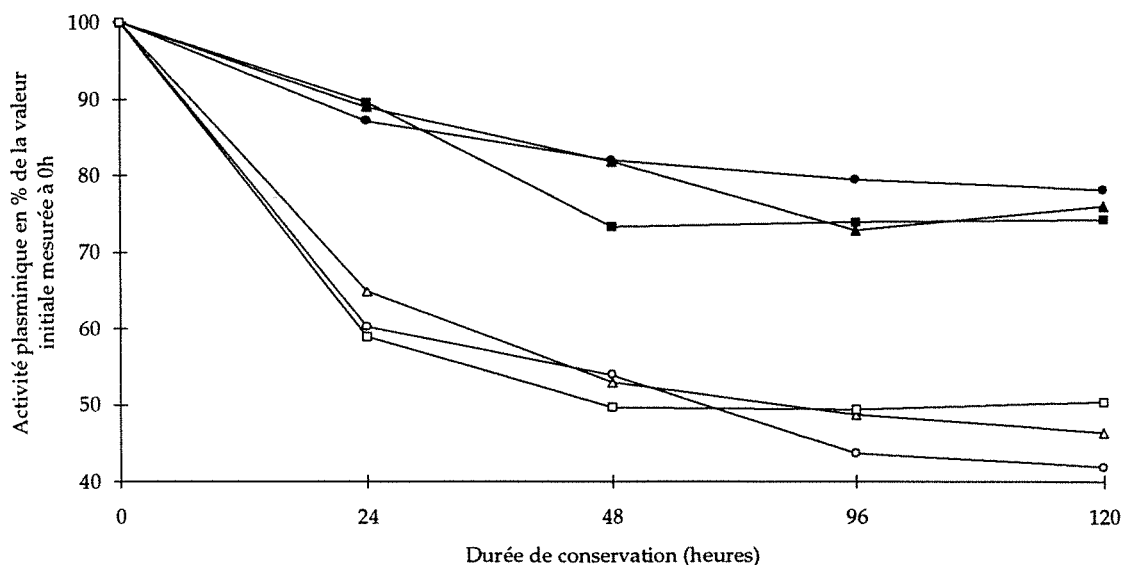


Figure 21 : Evolution en valeur relative de l'activité plasminique au cours du temps pour les trois classes de dénombrement cellulaire (■ : classe 3; ● : classe 2; ▲ : classe 1) dans les laits sans inhibiteur de l'activité plasminique (■; ●; ▲) et dans les laits avec inhibiteurs (□; ○; △).



Les évolutions relatives pour les trois classes de dénombrement cellulaire sont parallèles (figure 21). Ceci indiquerait que, quel que soit le dénombrement cellulaire, l'activité de la plasmine diminue de manière égale au cours du temps.

Pour de nombreux auteurs, l'activité protéolytique dans les laits à faible dénombrement cellulaire est principalement d'origine plasminique (Saemans et al., 1988; De Rham et Andrews, 1982). Pourtant, dans notre étude, une activité importante de type plasmine est notée même après ajout d'acide  $\epsilon$ -amino caproïque dans les laits à faible dénombrement cellulaire (40 à 50% de l'activité initiale dans les laits de classe 1 et 2). L'activité plasminique, après inhibition, aurait donc dû être très faible dans les laits de classe 1 et 2. Deux hypothèses peuvent expliquer cette évolution

- L'inhibition entraînée par l'acide  $\epsilon$ -amino caproïque ne serait pas totale. Cette hypothèse semble à exclure au vu des travaux de Bastian et al. (1991) qui montrent une inhibition complète de l'activité de la plasmine aux concentrations d'acide  $\epsilon$ -amino caproïque utilisées.

- La spécificité des protéases cellulaires est proche de celle de la plasmine (Verdi et Barbano, 1991) et pourrait donc expliquer en partie l'activité importante mesurée après inhibition de la plasmine. Cette activité de type plasmine est maximum pour la classe 3 de dénombrement cellulaire. Les protéases endogènes d'origine cellulaire semblent présenter une activité de type plasmine d'autant plus importante que l'activité plasminique totale est importante, cependant même dans les laits à faible dénombrement cellulaire, leur activité est significative.

#### 2.4 Teneur en protéose peptones

Aucune mesure fiable de la teneur en protéose peptones n'a pu être effectuée sur les laits contenant de l'acide  $\epsilon$ -amino caproïque. En effet, cet inhibiteur de l'activité de la plasmine contient de l'azote qui a perturbé la mesure de la teneur en protéose peptones.

Quelle que soit la classe de dénombrement cellulaire, la teneur en protéose peptones augmente dans les laits témoins lors du stockage. Cette augmentation semble maximum dans les 48 premières heures de stockage (tableau 36), mais l'interaction dénombrement cellulaire \*durée de stockage n'est pas significative. Cette cinétique est à mettre en relation avec l'activité de la plasmine, maximale pendant les premiers jours de stockage.

Le dénombrement cellulaire influe significativement sur la teneur en protéose peptones (tableau 37) mais dans les laits à faible dénombrement cellulaire, la relation entre dénombrement cellulaire et teneur en protéose peptones n'est pas vérifiée.

#### 2.5 Pourcentages des différentes caséines

Seules les caséines des laits des classes de dénombrement cellulaire 1 et 3 (respectivement 50 000 cellules et 500 000 cellules/ml) ont pu être analysées.



Tableau 36 : Evolution au cours du temps de la teneur en protéose peptones dans le lait témoin

	Durée de stockage (en heures)				
	0 H	24 H	48 H	72 H	120 H
Lait témoin (n=9)	0,92 c	1,01 b	1,06 ab	1,07 ab	1,11 a

Teneur exprimée en g/l

a, b, c : moyennes significativement différentes ( $P < 0,05$ )

Tableau 37 : Evolution de la teneur en protéose peptones dans le lait témoin en fonction de la classe de dénombrement cellulaire

	Classe de dénombrement cellulaire		
	1	2	3
Lait témoin (n=15)	1,03 b	0,97 c	1,08 a

Teneur exprimée en g/l

a, b, c : moyennes significativement différentes ( $P < 0,05$ )

Tableau 38 : Evolution du pourcentage des  $\gamma$ -caséines au cours du temps pour les quatre traitements

Traitement	Durée de stockage (en heures)				
	0 H	24 H	48 H	72 H	120 H
Lait Témoin	A 5,7 c	A 6,2 b	A 7,0 ab	A 7,7 a	A 7,6 a
Lait + bactéricide	A 5,7 c	A 6,2 b	A 6,9 ab	A 7,6 a	A 7,1 a
Lait + inhibiteur	A 5,7 b	B 5,7 b	B 5,7 b	B 6,2 a	B 6,1 a
Lait+inhibiteur+bactéricide	A 5,7 b	B 5,6 b	B 5,8 b	B 6,0 ab	B 6,3 a

Valeurs exprimées en % des caséines totales

a, b ou A, B: moyennes significativement différentes ( $P < 0,05$ ) dans la même colonne (lettres majuscules) ou dans la même ligne (lettres minuscules)

Tableau 39 : Evolution du pourcentage des  $\gamma$ -caséines en fonction de la classe du dénombrement cellulaire pour les quatre traitements

Traitement	Classe de dénombrement cellulaire	
	1	3
Lait Témoin	5,9 bcd	7,7 a
Lait + bactéricide	6,0 bc	7,4 a
Lait + inhibiteur	5,6 d	6,2 b
Lait+inhibiteur+bactéricide	5,5 d	6,2 b

Valeurs exprimées en % des caséines totales

a, b, c, d : moyennes significativement différentes ( $P < 0,05$ )

Tableau 40 : Evolution du pourcentage des  $\beta$ -caséines en fonction de la classe du dénombrement cellulaire

	Classe de dénombrement cellulaire	
	1	3
n = 60	24,55 a	22,76 b

Valeurs exprimées en % des caséines totales

a, b : moyennes significativement différentes ( $P < 0,05$ )

### 2.5.1 Pourcentage des $\gamma$ -caséines (indice de protéolyse)

L'interaction traitements\*durée de stockage\*dénombrement cellulaire n'est pas significative.

#### - Interaction durée de stockage \* traitements

Quel que soit le traitement, le pourcentage des  $\gamma$ -caséines augmente avec la durée de stockage du lait. Aucune différence significative n'est observée entre les laits témoins et les laits contenant le bactéricide (tableau 38). Par contre, dans les laits avec inhibiteur de plasmine, le pourcentage des  $\gamma$ -caséines augmente moins rapidement que dans les laits sans inhibiteur.

L'augmentation globale du pourcentage des  $\gamma$ -caséines après 120 h de stockage est de l'ordre de 30% pour les laits ne contenant pas d'inhibiteur et de 10% pour les laits contenant de l'acide  $\epsilon$ -amino caproïque.

#### - Interaction dénombrement cellulaire \* traitements

Les laits sans inhibiteur issus de la classe 1 de dénombrement cellulaire présentent un pourcentage moyen de  $\gamma$ -caséines inférieur de 30% à la classe 3 (tableau 39). Cette différence est expliquée, comme la variation de la teneur en protéose peptones, par l'activité plasminique de ces laits. Cette différence de 30% passe à environ 10% pour les laits avec un inhibiteur de plasmine. Il se confirme que l'activité des protéases d'origine somatique est plus importante dans les laits à dénombrement cellulaire élevé.

### 2.5.2 Pourcentage des $\beta$ -caséines

Une différence de 8 % entre les laits issus des classes de dénombrement cellulaire 1 et 3 étant enregistrée, seul le facteur dénombrement cellulaire influence significativement le pourcentage des  $\beta$ -caséines (tableau 40). Ce résultat s'explique par les évolutions de l'activité de la plasmine qui en hydrolysant les  $\beta$ -caséines entraîne une formation accrue des  $\gamma$ -caséines.

### 2.5.3 Autres caséines

Les  $\kappa$ -caséines, résistantes à la protéolyse endogène et notamment plasminique, n'ont pas présenté de variation avec la durée de stockage, même après 120 h, confirmant ainsi l'absence de protéolyse microbienne. Les niveaux de contamination atteints (proches de  $10^6$  germes/ml) restent insuffisants pour entraîner une protéolyse microbienne détectable par cette méthode.

Les  $\alpha_s$ -caséines n'ont pas montré de variation significative. La sensibilité moindre de cette caséine à la protéolyse plasminique pourrait expliquer ce résultat.

#### 2.5.4 Conclusion

Le pourcentage des  $\gamma$ -caséines augmente lors du stockage du lait au froid et cela surtout dans les 2 premiers jours pour les laits sans inhibiteur.

L'indice de protéolyse (assimilable au pourcentage des  $\gamma$ -caséines) varie avec le dénombrement cellulaire et cela même pour des laits de troupeaux. Les effets de moyenne sont insuffisants pour éviter des variations de niveaux protéolytiques et donc de qualité protéique

Les protéases cellulaires entraînent une production de  $\gamma$ -caséines et cela d'autant plus que le niveau initial de cellules somatiques est important.

La relation entre le dénombrement cellulaire et l'intensité de la protéolyse n'est pas vérifiée pour des dénombrements cellulaires faibles (moins de 150 000 cellules/ml).

# **DISCUSSION GENERALE**

## DISCUSSION GENERALE

### 1 PROTEOLYSE MICROBIENNE

#### 1.1 Indicateurs et facteurs de variation de la protéolyse microbienne

##### 1.1.1 Niveaux microbiens et protéolyse

L'ensemble des expériences menées dans cette étude montre que la mise en évidence de la protéolyse microbienne a nécessité une conservation du lait pendant 144 h à 4°C, les niveaux microbiens atteints étant alors de  $10^7$  psychrotrophes/ml (tableau 41). Pour des durées de conservation plus courtes, aucune protéolyse microbienne n'a été mise en évidence, même pour des laits contenant  $10^6$  germes/ml

La teneur en  $\kappa$ -caséines, du fait de sa grande sensibilité aux protéases microbiennes, semble l'indicateur le plus représentatif. Cependant, la difficulté de sa mesure nous a conduit à rechercher d'autres indicateurs (teneur en protéose peptones, teneur des groupements  $\alpha$ -aminés libres).

Tous les indicateurs testés se sont révélés efficaces pour estimer la dégradation des protéines pour des niveaux de contamination microbiens de  $10^7$  psychrotrophes/ml. Même la teneur en azote non protéique (méthode de détection très peu sensible) augmente significativement. Ces résultats traduisent ainsi des phénomènes protéolytiques très marqués.

Les mêmes indicateurs n'ont pas permis de détecter de protéolyse pour des seuils bactériens proches de  $10^6$  psychrotrophes/ml.

La protéolyse microbienne apparaît donc un phénomène rapide, débutant en fin de phase exponentielle ou au début de la phase stationnaire de croissance. Les micro-organismes, après une adaptation aux conditions du milieu (phase de latence), se multiplient rapidement et excrètent leurs protéases exocellulaires lorsque le milieu s'appauvrit en nutriments. Cette dynamique de la production de protéases induit des phénomènes protéolytiques toujours très marqués.

Plusieurs auteurs n'ont pas noté de corrélation significative entre la contamination microbienne et l'activité protéolytique (Christen et Senika, 1987; Picard, communication personnelle, 1994), et d'après nos essais, il semble qu'une flore moyenne (non sélectionnée pour ses caractères psychrotrophes et protéolytiques) ne puisse pas développer, dans les conditions de stockage actuelles, une activité protéolytique pour des niveaux microbiens de  $10^6$  germes/ml. Ce seuil de  $10^6$  germes/ml est d'ailleurs repris par de nombreux auteurs (Rowe, 1990; Guamis et al., 1987; Pâquet, 1987; Stead, 1987 b; Cliff et Law, 1982). Beaucoup d'autres montrent que ce seuil est de plus de  $10^7$  germes/ml (Fernandez et al., 1992; Humbert et al., 1990; Reinheimer et al., 1990; Griffiths, 1987). Dans une revue bibliographique très récente, Champagne et al. (1994) confirment que les populations de germes psychrotrophes nécessaires à des dégradations de la qualité protéique des laits sont supérieures à  $10^6$  germes/ml. Les différences entre auteurs s'expliquent en partie par

Tableau 41 : Influence de la charge initiale, de la température et de la durée de stockage sur les phénomènes protéolytiques mesurés pour des contaminations finales d'au moins  $10^6$  germes/ml

Charge initiale (/ml)	Température (°C)	Durée (h)	Contamination (/ml)	Phénomènes protéolytiques
> 100 000	4	72	$10^7$	Négatif (baisse du temps de coagulation par Formagraph)
> 100 000	3	96	$10^6$	Négatif
> 100 000	2	96	$10^6$	Négatif
20 000	4	144	$>10^7$	Disparition de plus de 50% de la $\kappa$ -caséine
20 000	4	120	$10^6$	Négatif

les méthodes utilisées pour la détection de la protéolyse mais aussi par le type de flore étudiée. Cependant, globalement, très peu d'auteurs ont noté des phénomènes protéolytiques pour des contaminations inférieures à  $10^6$  germes/ml.

### 1.1.2 Influence de la température, de la durée de stockage et de la charge initiale

Les trois facteurs étudiés, température, durée de stockage et charge initiale en bactéries, ont montré une influence sur la croissance microbienne. Une augmentation de la température de stockage du lait (passage de 2 à 4°C) favorise la croissance bactérienne au cours du temps et cela d'autant plus que la charge initiale en bactéries est importante. Pour atteindre et dépasser  $10^6$  germes/ml, 72 h de stockage à 4°C sont nécessaires pour des laits initialement très contaminés (> 100 000 germes/ml) et 120 h pour des laits initialement peu contaminés (< 50 000 germes/ml) (tableau 41). Le pourcentage de la flore psychrotrophe sur la flore mésophile initiale semble avoir une incidence sur la croissance bactérienne et notamment sur la durée de la phase de latence. Cependant, il semble que si les études faites en laboratoire montrent une augmentation rapide du pourcentage de la flore psychrotrophe au cours du stockage du lait au froid, ces observations ne sont que partiellement retrouvées sur les laits conservés à la ferme. Aucun mécanisme explicatif ne peut être apporté.

### 1.1.3 Conclusion

La détection précoce des phénomènes protéolytiques par les méthodes directes utilisées dans nos essais semble difficilement réalisable. En effet, les contraintes de temps et méthodologiques imposées par les techniques utilisées, ne permettent pas une utilisation en routine. De plus un suivi régulier de la qualité du lait est nécessaire pour la détection des premiers signes de protéolyse du fait de la dynamique de la production des protéases.

Pourtant, la qualité du lait doit pouvoir être contrôlée rapidement à tous les stades de la filière, c'est-à-dire de la production à la transformation en passant par la collecte. C'est pourquoi, plutôt que de mesurer le niveau de dégradation des protéines par des méthodes directes, l'estimation du potentiel protéolytique microbien des laits semble plus adapté. Cette mesure est nécessaire pour assurer une qualité microbiologique compatible avec la transformation du lait.

La mesure de la dégradation des protéines par des méthodes directes peut cependant s'avérer nécessaire pour permettre un tri du lait notamment pour les fabrications sensibles (U.H.T, fromages).



## 1.2 Protéolyse microbienne : applications

### 1.2.1 Niveaux microbiens, durée et température de stockage

La simulation des conditions de conservation ainsi que l'étude sur le terrain ont montré que des laits à moins de 50 000 germes/ml après la première traite et conservés à 4°C, ne présentaient pas de risque de dépasser  $10^5$  psychrotrophes/ml après 48 et même 72 h de stockage. **Pour ces niveaux de contamination microbiens le stockage du lait à 2°C ou 3°C ne se justifie pas** (le coût énergétique est plus important et la destructuration des micelles de caséines est amplifiée).

**Pour des contaminations microbiennes, proches de 50 000 germes/ml, la collecte toutes les 6 traites (72 h) n'augmente pas significativement, à la production, le risque de protéolyse par rapport à une collecte toutes les 4 traites (48 h).** Le seuil de 50 000 germes/ml apparaît adapté à une bonne maîtrise de la qualité microbiologique des laits. Ces seuils et ces durées de stockage n'ont de sens que lorsque la collecte et le stockage transitoire avant transformation sont assurés sans rupture de la chaîne du froid. Des seuils bactériens plus contraignants ne se justifient pas tant d'un point de vue hygiénique qu'économique. En effet, certains transformateurs observent des difficultés de transformation pour les laits très faiblement chargés en germes. Des études complémentaires sur les capacités de transformation des laits paucimicrobiens devront être entreprises.

A la production, la flore mesurée après 48 ou 72 h de stockage dépend, en grande partie, de la contamination après la première traite et cela quel que soit le niveau de contamination. Cette observation montre ainsi que les laits fortement contaminés à 48 h ou 72 h ( $> 100\ 000$  germes/ml) l'étaient déjà à la première traite. De nombreuses études ont montré que la phase de latence des bactéries est d'autant plus courte que la contamination initiale est élevée. Le risque protéolytique inhérent à un allongement de la durée de stockage pour ce type de lait est donc augmenté. **Il serait préférable, chez les producteurs présentant des niveaux de contamination régulièrement élevés, de conseiller, tout en recherchant les causes de ces contaminations, un abaissement de la température de stockage à 2°C.** Cet abaissement de température permettrait de ralentir de manière significative la croissance microbienne en augmentant la durée de la phase de latence et le temps de génération moyen des bactéries.

### 1.2.2 Interférences avec "l'âge moyen du lait"

Les études réalisées sur le terrain, contrairement à l'essai portant sur la simulation des conditions de conservation, n'ont pas montré d'évolution de la flore pendant 72 h, même pour les laits fortement contaminés (plus de 100 000 germes/ml). Cette différence peut-être expliquée par l'absence d'apport biquotidien de lait chaud dans la simulation. A la ferme, cet apport de lait chaud a deux effets principaux agissant de manière opposée sur la croissance bactérienne.

- Une remontée de la température du lait est notée après l'apport de lait chaud (annexe 9). Celle-ci entraîne une diminution de la durée de la phase de latence des bactéries et favorise donc la croissance microbienne.

- Un apport de lait entraîne un phénomène de dilution qui induit une diminution de l'âge moyen du lait, celui-ci ne correspondant plus à la durée totale de stockage. L'âge moyen théorique du lait correspond en fait à la moitié de la durée totale de stockage. Ainsi, l'âge moyen théorique du lait stocké collecté toutes les 6 traites n'est qu'environ de 30 h (annexe 10).

De plus, le lait à la sortie de la mamelle possède un pouvoir bactériostatique pendant quelques heures. Cet effet, souvent ignoré, doit jouer un rôle important, notamment lors des premières traites.

Même s'il paraît abusif d'affirmer que la croissance microbienne dans les laits à la ferme est in extenso liée à l'âge moyen théorique calculé (les phénomènes de croissance bactérienne ne sont pas additifs et linéaires), il semble que l'ajout biquotidien de lait chaud ne favorise pas la croissance microbienne. Les effets de dilution, bactériostatiques et de diminution de l'âge moyen semblent annuler les effets de remontée de température du lait.

### 1.2.3 Incidences sur le paiement du lait

L'étude de la grille CIREL de paiement du lait montre qu'un producteur peut être classé en qualité A<sup>+</sup> (moyenne mensuelle de moins de 50 000 germes/ml, moyennes effectuées sur les trois prélèvements mensuels) et pourtant présenter un résultat sur les trois proche de 150 000 germes/ml, seuil pouvant induire un risque de protéolyse. La notion de qualité A<sup>+</sup> devrait donc être précisée car si le seuil de 50 000 germes/ml paraît tout à fait adapté à une maîtrise de la qualité microbiologique des laits, la notion de qualité A<sup>+</sup> n'est pas la garantie absolue d'un lait ne présentant pas de risque de dégradation.

De plus en plus, des méthodes rapides de mesure de la flore sont utilisées par les laboratoires interprofessionnels pour les contrôles microbiologiques (notamment la DEFT). Le prix du lait payé au producteur n'est pas le même si sa moyenne mensuelle est strictement supérieure ou inférieure à 50 000 germes/ml. Ce seuil microbien, justifié par les besoins de qualité de la filière, ne l'est pas par la précision des méthodes utilisées. En effet, la répétabilité d'une méthode dépend de son coefficient de variation. Les laboratoires, en mesurant cet écart-type pour les seuils 50 000 et 100 000 germes/ml, pourraient ainsi définir un intervalle de confiance à 95% (40 000-60 000 germes pour un coefficient de variation de 10% au seuil de 50 000 germes/ml). Cette méthode de calcul, loin d'augmenter le risque de protéolyse du lait, permettrait d'assurer au producteur une rémunération plus juste. Cette démarche pourrait aussi être entreprise dans le calcul du dénombrement cellulaire.

## 2 PROTEOLYSE ENDOGENE

### 2.1 Indicateurs et facteurs de variation de la protéolyse endogène

La protéolyse endogène se différencie de la protéolyse microbienne par son caractère inévitable. Cette protéolyse, liée à l'évolution de la physiologie des animaux, peut être limitée mais pas totalement supprimée.

La dégradation de l'état sanitaire de la mamelle semble le principal facteur de dégradation des protéines. Le stade de lactation, indépendamment de l'état sanitaire, est également un facteur favorisant une augmentation de la protéolyse endogène. Les phénomènes physiologiques liés à l'augmentation de la protéolyse endogène sont encore mal connus : ils semblent cependant liés à une augmentation de la perméabilité des cellules épithéliales mammaires aux constituants sanguins (notamment les enzymes protéolytiques de type plasmine).

La mesure de la protéolyse sur des laits de quartier a permis de s'affranchir d'éventuelles interactions consécutives au mélange des laits des 4 quartiers et d'obtenir une plage de variation plus importante pour l'ensemble des variables mesurées. L'unité expérimentale de base (en termes statistiques) n'est plus l'ensemble de la traite d'un animal mais la traite complète d'un quartier. Ainsi, chaque animal possède son propre témoin, deux quartiers du même animal, à dénombrements cellulaires différents, ne se différenciant que par leur état sanitaire.

#### 2.1.1 Intérêt des indicateurs directs de protéolyse endogène

##### 2.1.1.1 Indice de protéolyse, activité plasminique, teneur en protéose peptones

Pour les laits de quartier, les variations de l'indice de protéolyse sont fortement expliquées par les variations de la teneur en protéose peptones et de l'activité plasminique (respectivement 72 et 67%) (équations (1) et (2))

$$(1) \quad \text{Indice de protéolyse} = 9,2 * \text{TPP} - 0,63$$

$$(r = 0,85; \text{ETR} = 3,8; n = 86)$$

$$(2) \quad \text{Indice de protéolyse} = 14,45 * \text{Activité plasminique} - 0,63$$

$$(r = 0,82; \text{ETR} = 4,2; n=86)$$

Ces trois indicateurs directs de la protéolyse endogène sont précis et sensibles. Pourtant la difficulté de leur mesure rend leur utilisation impossible en routine. D'autres indicateurs de la protéolyse endogène doivent être recherchés.

La séparation des différents composants de la fraction protéose peptones a permis de séparer deux composants, indicateurs potentiels de la qualité des protéines : le composant 3 et le composant  $\beta$ -CN-1P (f29-105/7).

### 2.1.1.2 Composant 3

La teneur du composant 3 dans le lait n'est pas fortement corrélée avec l'activité de la plasmine ( $r = 0,52$ ) et l'indice de protéolyse ( $r = 0,39$ ). La teneur du composant 3 ne semble pas un indicateur fiable et précis de la protéolyse endogène. Des études sur la mise au point de méthodes rapides de mesure de ce composant ne se justifient plus.

Deux hypothèses pourraient expliquer les évolutions différentielles de teneur relative du composant 3 et de la teneur du composant 3 dans le lait.

- Le composant 3 ne serait pas sensible à la protéolyse de type plasminique. La diminution relative du composant 3 s'expliquerait alors simplement par une augmentation de la teneur de la fraction protéose peptones.

- Les laits issus de mammites cliniques et subcliniques présentent une activité lipolytique importante. Le composant 3, qui aurait pour origine la membrane des globules gras (Girardet, 1992), pourrait être produit et aussitôt dégradé par les enzymes de type plasmine. Un équilibre s'établirait entre l'apparition et la dégradation du composant 3.

La deuxième hypothèse apparaît la plus crédible, Kanno et Ogawa (1989) ayant observé la dégradation du composant 3 par la plasmine dans un lait écrémé, après incubation à 37°C pendant 6 jours.

### 2.1.1.3 Composant $\beta$ -CN-1P (f29-105/7)

La teneur du  $\beta$ -CN-1P (f29-105/7) dans le lait présente des corrélations importantes avec l'activité de la plasmine ( $r = 0,87$ ) et l'indice de protéolyse ( $r = 0,85$ ). Ce composant serait un produit terminal de la protéolyse plasminique. Sa teneur dans le lait varie de moins de 0,03 g/l pour les laits les moins protéolysés à plus de 0,3 g/l pour les laits présentant l'activité plasminique la plus élevée.

Des mesures par des méthodes immunologiques pourraient être entreprises. El Bari (1992), en utilisant l'immunonéphélogométrie particulière, a déjà montré l'intérêt de mesurer la teneur des  $\beta$ -caséines ou d'un de ses produits de dégradation pour estimer la protéolyse d'origine endogène dans le lait. Il conviendrait d'étudier la possibilité de mesurer par cette technique le composant  $\beta$ -CN-1P (f29-105/7).

Les anticorps disponibles actuellement contre les  $\beta$ -caséines sont de type polyclonal, ils pourraient donc présenter des réactions croisées avec le composant  $\beta$ -CN-1P (f29-105/7). En effet, Otani et al. (1984 et 1987) ont montré qu'une proportion importante des sites antigéniques de la  $\beta$ -caséine étaient situés dans la région N-terminale 1-139. La production d'anticorps monoclonaux contre le composant  $\beta$ -CN-1P (f29-105/7) pourrait être une alternative intéressante à d'éventuelles réactions croisées.

#### 2.1.1.4 Conclusion

La détection en routine de la protéolyse endogène par des méthodes directes est précise et fiable. Cependant, aucune méthode de mesure rapide n'a été développée.

### 2.1.2 Relations entre indicateurs indirects et indicateurs directs de la protéolyse endogène

#### 2.1.2.1 Dénombrement cellulaire

La première hypothèse de ce travail a été de mesurer la capacité du dénombrement cellulaire à traduire l'intensité des phénomènes protéolytiques. Les corrélations existant entre le dénombrement cellulaire et des indicateurs directs de protéolyse endogène (teneur en protéose peptones, indice de protéolyse, activité de la plasmine) sont significatives mais restent insuffisantes pour considérer le dénombrement cellulaire comme un indicateur précis et fiable de la dégradation des protéines.

Une amélioration de ces relations pourrait peut-être être observée par un comptage réel du nombre des cellules leucocytaires. En effet, actuellement, la méthodologie employée pour le comptage cellulaire tient compte de l'ensemble des cellules du lait et notamment des cellules épithéliales desquamées.

#### 2.1.2.2 pH, teneur en chlorures

Dans l'étude portant sur les laits de quartier, les variations du dénombrement cellulaire permettent d'expliquer 41% des variations de l'indice de protéolyse (équation 3). Après la prise en compte du pH et de la teneur en chlorures, qui augmentent fortement dans les laits mammites (Schultz, 1977), l'estimation des variations de cet indice est très significativement améliorée ( $r^2 = 78\%$ ) (équation 4). Une utilisation en routine de l'équation 4 sur des laits individuels semble tout aussi possible. Par contre, la mise en pratique de ce type d'équation sur des laits de petits mélanges (laits de troupeau) ou des laits de grands mélanges (laits de citerne) semble délicate, les effets de moyenne induits par le mélange des laits diminuant considérablement les plages de variation de chaque mesure.

$$(3) \text{ Indice de protéolyse} = 8,86 * \text{dénombrement cellulaire} - 35,02$$

$$(r = 0,64; \text{ETR} = 5,7; n = 86)$$

$$(4) \text{ Indice de protéolyse} = 23,81 * \text{pH} + 10,32 \text{ Chlorures} +$$

$$2,08 * \log_{10} (\text{dénombrement cellulaire}) - 173,17$$

$$(r = 0,88; \text{ETR} = 3,48 ; n = 86)$$

### 2.1.3 Effet de la durée de conservation du lait sur la protéolyse endogène

Si la protéolyse endogène a des effets très négatifs sur des laits individuels fraîchement traités, des phénomènes protéolytiques identiques ont été mesurés pour des laits de petits mélanges, au cours du stockage. Ces phénomènes sont d'autant plus marqués que les laits présentent des dénombrements cellulaires initiaux importants.

Si le froid, surtout pendant les 48 premières heures de stockage, entraîne une destructuration des micelles de caséines et favorise l'hydrolyse des  $\beta$ -caséines par la plasmine, l'activité résiduelle de celle-ci (et des autres enzymes protéolytiques endogènes) est suffisamment importante pour provoquer une dégradation pendant au moins 5 jours de stockage. Cette dégradation, peu marquée pour les laits de petits mélanges à faible dénombrement cellulaire (< 100 000 cellules/ml), devient très significative pour des laits à plus de 500 000 cellules/ml. Pour ces laits, en plus de l'activité plasminique élevée, celle des protéases d'origine cellulaire est significative et participe à la dégradation des caséines.

### 2.1.4 Conclusion

La dégradation de l'état sanitaire de la mamelle et l'augmentation du stade de lactation, sont deux facteurs inhérents à l'animal induisant une augmentation de la protéolyse. Si l'effet des protéases endogènes est mieux illustré, les mécanismes biologiques de contrôle de l'activité des protéases endogènes sont encore peu connus.

L'allongement de la durée de stockage du lait entraîne également une augmentation significative de la protéolyse endogène.

Ces trois facteurs apparaissent essentiels dans la dégradation des protéines par les protéases endogènes. D'autres facteurs doivent sans doute intervenir mais dans une moindre mesure (numéro de lactation, race, niveau de production etc.). Le simple contrôle de ces trois facteurs devrait permettre de limiter en grande partie les conséquences de la protéolyse endogène.

## 2.2 Protéolyse endogène : applications

### 2.2.1 Méthodes indirectes

La détection de la qualité protéique des laits de quartier et des laits individuels par des méthodes indirectes (teneur en chlorures, pH, dénombrement cellulaire, production) peut s'envisager par l'utilisation de capteurs intégrés dans le système de traite. Des systèmes expérimentaux ont été développés pour la détection des mammites subcliniques. Actuellement seul le dénombrement cellulaire, la présence de germes dans le lait, la baisse de production et la conductivité électrique sont utilisés dans les modèles servant au développement de ces matériels. L'intégration de la qualité protéique, comme facteur explicatif supplémentaire des mammites subcliniques se justifie au vu des corrélations observées entre indicateurs directs et indirects de la protéolyse endogène.

### 2.5.2 Paiement du lait

Les seuils de dénombrement cellulaire utilisés actuellement dans les grilles de paiement du lait ne sont basés sur aucune justification tant de qualité protéique que d'état sanitaire.

**Dans un lait de quartier, le seuil de 250 000 cellules/ml et même de 100 000 cellules/ml n'est pas la garantie d'une absence de problèmes de qualité des protéines.** Il n'est pas envisageable d'imposer des seuils de 100 000 cellules/ml sur un lait de troupeau, cependant, les seuils actuels autorisent la livraison de laits de mélange supérieurs à 400 000 cellules/ml (moyenne mensuelle arithmétique basée sur les trois mesures mensuelles). A ce niveau, les problèmes sanitaires au sein du troupeau sont nombreux et induisent une dégradation de la qualité protéique du lait. De plus, pour de tels niveaux cellulaires, des mammites subcliniques à germes pathogènes (*Staphylococcus aureus*) sont à suspecter.

**Les bonifications assurées aux producteurs livrant un lait à niveau cellulaire faible sont très insuffisantes pour encourager l'ensemble des producteurs à améliorer l'état sanitaire des troupeaux.**

### 2.2.3 Gestion du troupeau

La détection de la protéolyse endogène doit être réfléchi à plusieurs niveaux. Pour des laits de quartier et des laits individuels, des mesures indirectes semblent les plus adaptées. En effet, la détection doit être continue tout au long de la lactation et des systèmes de capteurs apparaissent les plus appropriés. Si ce type de surveillance n'est pas possible, la détection devra se faire ponctuellement sur des animaux "suspects" et l'utilisation de tests ELISA basés sur le dosage d'un indicateur précis et fiable (composant  $\beta$ -CN-1P (29-105/7)) pourrait s'avérer efficace dans le tri du lait à la production.

Les producteurs qui favorisent le vêlage groupé d'automne-hiver voient leur potentiel protéolytique d'origine endogène être au maximum en fin de printemps et surtout en été. Si des études mettent en évidence une réelle incidence de ces vêlages groupés sur la qualité des laits, ces techniques de production devront être repensées.

## 3 INDICATEURS DE PROTEOLYSE MICROBIENNE ET ENDOGENE

La mesure de la teneur des groupements  $\alpha$ -aminés libres en utilisant le TNBS n'a permis de détecter des phénomènes protéolytiques que dans des laits très fortement chargés en germes (tous les autres indicateurs de protéolyse microbienne testés, azote non protéique, teneur en protéose peptones, ont réagi de même façon du fait de la dynamique de ce type de protéolyse). L'utilisation de la teneur en groupement  $\alpha$ -aminés libres s'est révélée inefficace dans la détection de protéolyse peu intense consécutive à la conservation du lait de petits mélanges au froid, mais aussi dans des laits de quartier où les dégradations protéiques sont importantes.

La teneur en protéose peptones, comme la méthode utilisant le TNBS, augmente lorsque le lait atteint des contaminations microbiennes de  $10^7$  germes/ml. Par contre contrairement à la méthode utilisant le TNBS, la teneur en protéose peptones détecte la protéolyse consécutive à la conservation du lait au froid. Même si la teneur en protéose peptones est a priori un indicateur global de protéolyse, il semble en fait que ce soit des composants protéiques différents qui réagissent à la protéolyse endogène et microbienne.

**L'utilisation de méthodes globales de détection de la protéolyse du lait a montré ses limites.** Les spécificités et les propriétés différentes des enzymes microbiennes et endogènes obligent à utiliser des indicateurs à spectre d'action très large donc moins précis. Plutôt que d'essayer de trouver une méthode de mesure de la protéolyse globale, il serait préférable de profiter de ces différences de propriétés et de spécificités pour développer des outils de détection adaptés au niveau d'étude considéré : détection de la protéolyse au niveau du lait de quartier, du lait individuel, du lait de petits mélanges (tank), du lait de grands mélanges (citernes) ou bien du lait à l'usine (mélange de plusieurs citernes).



## **CONCLUSION GENERALE**

## CONCLUSION GENERALE

L'étude des différentes origines de la protéolyse a permis de mieux comprendre l'incidence réelle de la protéolyse microbienne et endogène sur les protéines du lait. Face aux interrogations de la filière laitière, les études entreprises permettent d'apporter des éléments significatifs de réponse.

La dégradation des protéines par les micro-organismes n'est significative que pour des niveaux très élevés de contamination (supérieurs à  $10^7$  germes/ml). Les progrès de l'hygiène dans les exploitations laitières, ces vingt dernières années, permettent de maintenir la croissance microbienne bien en-deçà de ces niveaux. Dans les conditions actuelles de stockage, six jours sont nécessaires pour observer des phénomènes protéolytiques microbiens significatifs. Ces durées de stockage sont très supérieures à celles rencontrées en exploitation.

Il semble donc que les éventuels problèmes de dégradation protéique par les micro-organismes se situent en aval de la production. La durée et la température de stockage entre la collecte et la transformation sont deux facteurs à étudier plus précisément afin de connaître leur influence sur la qualité des protéines.

Les indicateurs du potentiel protéolytique microbien, disponibles actuellement (DEFT, test Limulus), sont adaptés à la filière laitière. Cependant, ils devraient être utilisés comme critères de qualité du lait avant sa transformation et non comme critères de paiement, ce qui est le cas actuellement. Si le dosage (par ELISA) des produits de dégradation des k-caséines, en cours de développement à l'INRA, s'avérait sensible rapide et peu coûteux, la filière laitière disposerait alors d'outils performants d'estimation de la protéolyse d'origine microbienne.

Paradoxalement, les progrès de l'hygiène à la production, ont permis la livraison aux industriels laitiers de laits très faiblement chargés en germes. Il semblerait que ces laits dits "paucimicrobiens" soient plus difficilement transformables, car moins "préparés" à recevoir les ferments lactiques. Des études complémentaires sur ces laits "ultra-propres", comprenant notamment un volet sur les germes pathogènes, permettraient de mieux comprendre les problèmes observés en transformation.

La protéolyse d'origine endogène, peu ou pas étudiée et le plus souvent ignorée, peut être quantitativement et qualitativement très dommageable pour la qualité des protéines du lait.

La dégradation de l'état sanitaire de la mamelle est le facteur principal de cette protéolyse. Notre travail a montré que la protéolyse endogène est significative pour des laits à faibles dénombrements cellulaires (inférieurs à 250 000 cellules/ml), ces niveaux ne traduisant pas la présence de mammites cliniques ou subcliniques. L'avancée dans le stade de lactation induit aussi une augmentation de la protéolyse endogène.

Le stockage du lait au froid provoque des phénomènes protéolytiques d'autant plus importants que la durée de conservation augmente et que le dénombrement cellulaire initial est plus élevé.

Contrairement à la protéolyse microbienne, la protéolyse endogène se rencontre dans tous les élevages. Bien qu'inévitable, elle peut être contrôlée et en partie supprimée. La mesure d'indicateurs comme la teneur en chlorures, le pH et le dénombrement cellulaire permettent d'expliquer près de 3/4 des variations de la protéolyse endogène dans des laits individuels. Un premier contrôle par la simple mesure de ces indicateurs, dès la traite, pourrait permettre de s'affranchir d'une grande partie des effets de cette protéolyse. De même, le développement de méthodes de mesure des produits de dégradation de la protéolyse endogène (composant  $\beta$ -CN 1P (f29-105/7) par exemple) pourrait aussi répondre à ces besoins.

Si des méthodes précises sont en cours de développement pour la mesure directe ou indirecte de la protéolyse microbienne, les travaux portant sur la protéolyse endogène sont encore peu avancés. Il semble que la méthode basée sur l'immunonéphélogétrie particulière peut permettre de progresser très rapidement dans la détection rapide des laits protéolysés.

Les outils de mesure de la protéolyse développés actuellement devraient permettre un tri du lait à la ferme, un tri du lait avant transformation mais aussi des circuits de collecte adaptés, l'objectif étant de fournir une matière première optimale conforme aux besoins de la filière laitière.

# ANNEXES

## ANNEXE 1

### Dosage des acides gras libres du lait (Indice de lipolyse du lait)

Les matières grasses sont extraites après action d'une solution détergente, après chauffage à 100°C, les acides gras libres sont titrés à partir d'une fraction aliquote de la phase grasse surnageante.

#### \* Prélèvement de la phase grasse

Sont versés, dans un tube de 30 ml, 16 ml de lait et 4,5 ml d'une solution détergente (70 g d'hexamétaphosphate de Na puis progressivement 30 g de Triton X-100 sont dissout dans 700 ml d'eau distillée, le pH est ajusté à 5-5,5 avec de l'acide orthophosphorique pur, on complète à 1 l dans une fiole jaugée). Le mélange est retourné 12 fois, placé le tube au bain-marie à 95-100°C pendant 20 min. Le bain-marie est refroidi à 45°C en prenant soin de vérifier que le niveau d'eau atteigne toujours le haut de la colonne de graisse.

Dans un tube à col rodé de 15 ml est pesé exactement 250 mg de la phase grasse surnageante prélevée avec une pipette Pasteur à large embout, 5 ml d'un mélange éther éthylique-éthanol à 96 %; (1 - 1 (V/V)) sont ajoutés. Le tube est conservé bouché jusqu'au moment du dosage titrimétrique.

#### \* Titration

L'acidité de la phase grasse est titrée par Na OH N/100 dans l'isopropanol à l'aide d'une microburette de précision. L'indicateur coloré est le bleu de Thymol dans l'isopropanol. La gamme étalon a été préparée à partir de 5 ml de solution de C16 : 0 dans le mélange éther éthylique-éthanol à 96 % 1-1 (V/V). Le taux de matière grasse a été déterminé par spectrométrie Infra Rouge (contrôle laitier CILAL), de façon à pouvoir exprimer le résultat soit en mEg/l de lait (BDIL), soit en mEq/100 g de matière grasse (BDIG).

## ANNEXE 2

### I Principe du dosage automatique de des différentes fractions azotées du lait et du fromage par la méthode de Kjeldhal sur VAPODEST 6 GEHRARDT

Après minéralisation en présence d'acide sulfurique concentré et de catalyseur, distillation de l'échantillon en ajoutant de la soude en excès afin de libérer sous forme d'ammoniaque l'azote piégé dans H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. L'ammoniaque sera piégé dans une solution d'acide borique à 3 % de pH connu. Le dosage de l'azote est réalisé par retour du pH de l'acide borique à son pH initial par ajout d'acide sulfurique 0,02N.

#### 1 Fractions azotées du lait

##### \* azote total (NT) :

Le lait est réchauffé à environ 37°C et agité afin d'homogénéiser toute la matière grasse. Le lait entier est dilué 1/10<sup>ème</sup> avec de l'eau distillée. 10 ml de lait dilué au 1/10<sup>ème</sup> sont dosés par la technique de Kjeldhal.

##### \* azote soluble (Nsol) :

Le lait est écrémé par centrifugation (3000 t/min, 45 min) précipité à pH 4,6 (acide acétique 1 N) et centrifugé (6000 t/min, 15 min). Le surnageant est récupéré et dilué 2 fois et filtré, le filtrat est dosé par la méthode de Kjeldhal.

##### \* azote non protéique (ANP) :

Précipitation des protéines dans une solution de TCA (12%, concentration finale), dosage du filtrat par la méthode de Kjeldhal.

#### 2 Fractions azotées du fromage

##### \* Préparation de l'échantillon

Après homogénéisation manuelle de l'échantillon, prélever environ 5 g de fromage puis le broyer dans 50 ml de tri-sodium citrate 0,5 M et compléter à 100 ml par rinçages successifs.

##### \* Séparation des fractions azotées

###### - azote total

5 ml de solution de fromage sont mesurés directement par la méthode de Kjeldhal.

- azote non protéique (ANP)

Dans un bêcher placer 45 ml acide trichloroacétique 20 % et 30 ml de solution de fromage, agiter, attendre 15 min, filtrer. Le filtrat est dosé par la méthode de Kjeldhal.

détermination de la teneur en azote total du lactosérum

La teneur en azote total du lactosérum est dosée directement, après filtration du lactosérum, par la méthode de Kjeldhal

II détermination de la teneur en matière sèche du lait, du lactosérum et du fromage.

Des coupelles remplies d'environ 60g de sable de Fontainebleau sont mis 24 h à 103°C pour avoir du matériel sec. Après refroidissement dans un dessiccateur les coupelles sont pesées (P1). Ajouter environ 10 ml de lait ou de lactosérum ou 10 g de fromage, la coupelle est pesée immédiatement (P2). Le lait ou le lactosérum sont bien mélangé au sable, le fromage est broyé finement manuellement dans le sable. Placer la coupelle 24 h à 103°C et peser pesée (P3) après refroidissement dans un dessiccateur.

Matière sèche (%)	$\frac{(P3 - P1)}{(P2 - P1)} \times 100$
-------------------	--

## ANNEXE 3

### Teneur en azote et nature de la fraction protéose peptones (TPP)

#### 1 Teneur en azote de la fraction protéose peptones

L'extraction est effectuée selon le fractionnement préconisé par Rowland (1938) adapté par Andrews (1978 a, b) : le surnageant S1 de thermocoagulation, obtenu par centrifugation d'un échantillon de lait préalablement chauffé (95°C, 30 minutes) et acidifié (pH = 4,6, acide acétique 1M) est précipité au TCA (concentration finale 12%). Après centrifugation, le surnageant S2 est lavé plusieurs fois à l'éthanol-éther (v:v) puis congelé à -20°C. La teneur en azote de la fraction protéose peptones est obtenue par différence entre la teneur en azote des surnageant S1 et S2; ces teneurs sont mesurées par la méthode de Kjeldahl (dosage automatique sur Vapodest 6). Le facteur de conversion utilisé pour obtenir la teneur en protéines est 6,54 (cité par Ribadeau-Dumas et Grappin, 1989).

#### 2 Nature de la fraction protéose peptones

Les constituants de la fraction protéose peptones sont séparés par électrophorèse PAGE-NATIVE. La teneur relative des constituants de la fraction protéose peptones est obtenues, en divisant les valeurs trouvées par densitométrie pour chacun des constituants, par la valeurs totale densitométrique de la fraction protéose peptones. La concentration des composants de la fraction protéose peptones dans le lait est obtenue en multipliant la valeur relative de chaque composant par la teneur en protéines de la fraction protéose peptones mesurée par la méthode de Kjeldhal.



## ANNEXE 4

### Mesure de la concentration en calcium colloïdal

Un échantillon de lait (5 ml) est dialysée pendant 24h à 4°C pour éliminer les minéraux solubles. 1 ml de rétentat est mélangé avec 10 ml de  $\text{LaCl}_3$  et dilué dans 100 ml d'eau distillée (Maraval, 1978). La teneur en calcium est mesurée par spectrométrie d'absorption atomique (Perkin Elmer, modèle 305, Überlingen, Germany).

## ANNEXE 5

### Mesure par Formagraph du temps de coagulation (R) et temps d'obtention de la fermeté standard (K20)

Le temps de coagulation (R) et temps d'obtention de la fermeté standard (K20) sont mesurés à partir d'un échantillon de lait écrémé emprésuré est soumis à des oscillations linéaires périodiques, un pendule solidaire d'un miroir étant plongé dans l'échantillon (Formagraph, Foss Electric, Hillerød, Danemark). Un flash lumineux régulier permet d'enregistrer les mouvements du pendules sur un papier photosensible. Le diagramme obtenu indique l'évolution de la fermeté du caillé (Mac Mahon et Brown, 1982). Il s'agit d'une méthode destructive.

Les échantillons, constitués par 10 ml de lait écrémé, sont portés à la température de 35°C (30 minutes environ) puis emprésurés avec 200 µl d'une solution de présure à 7,8 mg de chymosine active par litre

Le temps de coagulation (R) est le temps s'écoulant entre l'emprésurage et la formation du gel. Le temps d'obtention de la fermeté standard (K20) est le temps s'écoulant entre le début de la coagulation et une fermeté correspondant à un écartement de 20 mm entre les 2 branches du formagramme.

## ANNEXE 6

### Dosage des groupements $\alpha$ -aminés par l'acide 2, 4, 6 trinitrobenzène sulfonique (TNBS)

Cette méthode est basée sur le dosage, par spectrométrie d'absorption moléculaire, du complexe coloré (jaune, absorption à 420 nm) trinitrophénylé formé entre l'acide 2, 4, 6 trinitrobenzène sulfonique (TNBS) et les groupements  $\text{NH}_2$  libres des acides aminés, des peptides ou des protéines (Humbert et al., 1990).

Introduire dans un tube à essai 1,5 ml de solution aqueuse de bicarbonate de sodium à 4 % (pH = 8,5), 0,5 ml de solution à doser (lait), 1 ml de solution aqueuse d'acide 2,4,6 trinitrobenzène sulfonique à 0,1 %. Bien agiter et laisser en incubation à 37°C pendant 1 heure. Pour stopper la réaction, ajouter 0,5 ml de solution d'acide acétique à 1,8 N et agiter vigoureusement. Ajouter 1,5 ml de transpirant et agiter et laisser réagir 2 à 3 minutes à 37°C. Lire l'extinction de la solution à 420 nm dans les 20 à 30 minutes.

Les résultats sont transcrits en équivalent glycine à l'aide d'une gamme étalon établie dans les mêmes conditions avec une solution mère à 1 mmol/l de glycine (prise d'essai : 0 à 0.5 ml)

Pour le lait, la prise d'essai est de 0.2 à 0.4 ml d'une dilution de l'échantillon au 1/20e ou 1/40e

## ANNEXE 7

### Dosage de l'activité de la plasmine et de la teneur en plasminogène

L'activité protéolytique de la plasmine peut être mise en évidence par l'emploi de différents substrats de synthèse, appartenant à la série des 4-p-Nitroanilides, qui sont hydrolysés au cours de l'incubation par les protéases de type plasmine. La mesure se fait par spectrométrie après transparisation totale du milieu réactionnel par le mélange dissolvant (méthode adaptée de Humbert et al., 1982).

Introduire dans un tube essai 0.5 ml de lait, 1.5 ml de solution contenant le substrat (diluer dans une solution tampon pH = 8, thimérosal (0.1 %, w/v) et imidazole (0,1%, w/v), le dérivés 4-nitroanilide (D-Val-Leu-Lys P-nitroanilide dihydrochloride) de manière à obtenir une concentration finale en substrat de  $5.10^{-3}$  M). Laisser incuber à 37°C pendant 6 heures. Ajouter 2 ml de transparisant, agiter et laisser quelques minutes à 37°C. Lire l'absorbance de la solution à 410 nm à 37°C dans les 15 minutes qui suivent.

Un témoin est dosé selon le même mode opératoire en incubant séparément lait et le tampon-substrat.

Les résultats sont obtenus par différence entre la densité optique du lait+substrat et du substrat seul. Ils sont exprimés en micromoles de 4-nitroanilide libérées par unité de temps et de volume de solution à doser.

L'activation du plasminogène en plasmine se fait par ajout de 380 UI d'urokinase/ml de solution à doser. Le mélange est ensuite placé 30 minutes à 37°C pour permettre une activation complète du plasminogène libre contenue dans le lait.

Le dosage de l'activité de la plasmine+plasminogène correspond à la méthode de mesure de l'activité de la plasmine.

ANNEXE 8**GRILLE DE DEGUSTATION "PATE MOLLE"**

Date de transformation : .....

Traitement (1 ou 2) : .....

Date de dégustation : .....

Dégustateur : ..... Signature :

.....

Pour tous les critères, vous donnerez une note comprise entre 0 (optimum) et 4 (le plus de défauts)

	Fromage 1	Fromage 2	Fromage 3
<b>Pâte et texture</b>			
- Tenue des angles	.....	.....	.....
Trous ou anfractuosités	.....	.....	.....
- Résidus de sérum dans les trous	.....	.....	.....
- Pâte à la coupe et au toucher :			
homogène	.....	.....	.....
granuleuse	.....	.....	.....
collante	.....	.....	.....
dure	.....	.....	.....
molle	.....	.....	.....

**Qualité organoleptique**

- Odeur			
rance	.....	.....	.....
piquante	.....	.....	.....
ammoniaque	.....	.....	.....
champignon	.....	.....	.....
- Goût			
fade	.....	.....	.....
amer	.....	.....	.....
piquant	.....	.....	.....
salé	.....	.....	.....
acide	.....	.....	.....
moisi	.....	.....	.....
putride	.....	.....	.....
mauvais goût	.....	.....	.....
(préciser : poisson, suif, métal, ensilage, produits chimiques...)			
- Pâte en bouche			
granuleuse	.....	.....	.....
collante	.....	.....	.....
sableuse	.....	.....	.....
crayeuse	.....	.....	.....

ANNEXE 9

Température du lait mesurée en fin de traite,  
mesurée sur 6 traites.

numéro de la traite	Température du lait mesurée en fin de traite
1	26-32°C
2	12-17°C
3	10-12°C
4	7-10°C
5	6-8°C
6	5-7°C

ANNEXE 10

Age moyen théorique du lait pour une durée de 12 heures entre 2 traites et pour une traite équilibrée entre traite du soir et du matin.

numéro de la traite	Durée de stockage	Age moyen théorique calculé
1	0	0
2	12	6
3	24	12
4	36	18
5	48	24
6	60	30
7	72	36

## ANNEXE 11

### 1 MATERIEL

#### 1.1 Appareils

- Unité d'électrophorèse verticale 2001, cryostat Multitemp II, alimentation Macrodrive 5 (L.K.B. Bromma, Suède);
- Unité de transfert de gel Transphor TE 50 (Hoefer Scientific Instrument, San Francisco, USA) et membrane Immobilon-P (Millipore Corporation, Bedford, USA);
- Unité FPLC et colonnes MonoQ HR 5/5, Densitomètre Ultrosan XL (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala Suède);
- Analyseur d'acides aminés Biotronik LC 3000 (Braun Sciencetec, Melsugen, Allemagne);
- Séquenceur d'acides aminés Applied Biosystems 476A (Applied Biosystems, Foster city, USA);
- Sécheur de gel 543 (Biorad, Richmond, USA);
- Spectrophotomètre DU<sup>®</sup>-70 (Beckman, Fullerton, USA);
- Logiciel d'intégration Maxima (Waters, Milford, USA);
- Formagraph, (Foss Electric, Hillerød, Danemark)
- spectromètre d'absorption atomique, modèle 305 (Perkin Elmer, Uberlingen, Germany)
- pH-mètre/ionomètre, Orion, 920A, Boston, Ma, USA

#### 1.2 Réactifs

- Présure (Boll, Arpajon, France);
- Acrylamide et N,N'-méthylène bisacrylamide (B.D.H. Chemicals, Poole, Grande Bretagne);
- Bleu de Coomassie R250 et G250 (Serva, Feinbiochemica, Heidelberg, Allemagne);
- 2,4,6 trinitro benzenesulfonic acid, Urokinase, D-VAL-LEU-LYS-p-nitroanilide dihydrochloride , coffret de protéines étalons (Sigma Chemical Compagny, Saint Louis, USA);
- Réactif de transparence des milieux biologiques (Prolabo, France)





---

	* Durée de stockage : 120 h	
	* 4 traitements :	
Microbienne et	- témoin	
Endogène	- Inhibiteur plasmine	- % caséines
	- Inhibiteur plasmine	Laits de mélange - Protéose peptones
	+ bactéricide	- Plasmine
	- bactéricide	
	* Dénombrement cellulaire	
	- < 100 000/ml	
	- < 200 000/ml	
	- > 500 000/ml	

---

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- Aaltonen, M.J., M. Lehtonen, T. Lehdonkivi, and V. Antila. 1988. Plasmin activity in milk. *Milchwissenschaft*. 43:573.
- Adams, D.M., J.T. Barach, and L. Speck. 1976. Effect of psychrotrophic bacteria from raw milk on milk proteins and stability of milk proteins to ultra high temperature treatment. *J. Dairy Sci.* 59:821.
- Aimutis, W.R., and W.N. Eigel. 1982. Identification of  $\lambda$ -casein as plasmin-derived fragments of bovine  $\alpha_{s1}$ -Casein. *J. Dairy Sci.* 65:175.
- Alichanidis, E., J.H.M. Wrathall, and A. Andrews. 1986. Heat stability of plasmin (milk proteinase) and plasminogen. *J. Dairy Res.* 53:259.
- Alichanidis, E., and A.T. Andrews. 1977. Some properties of the extracellular protease produced by the psychrotrophic bacterium *Pseudomonas fluorescens* AR11. *Biochim. Biophys. Acta.* 485:424.
- Amram, Y., G. Delespaul, J. Vandeweghe, N. Schneid, et J. Lenoir. 1981. Le refroidissement du lait et son comportement en fromagerie. II. Efficacité de divers traitements de correction. *R.L.F.* 404:53.
- Andrews, A.T., and E. Alichanidis. 1983. Proteolysis of caseins and the proteose-peptone fraction of milk. *J. Dairy Res.* 50:275.
- Andrews, A.T. 1978 a. The composition, structure and origin of proteose-peptone component 5 of bovine milk. *Eur. J. Biochem.* 90:59.
- Andrews, A.T. 1978 b. The composition, structure and origin of proteose-peptone component 8 F of bovine milk. *Eur. J. Biochem.* 90:67.
- Azcona, J.I., R. Martin, P.E. Hernandez and B. Sanz. 1989. Partial immunological characterisation of heat-stable proteinases from *Pseudomonas* spp. of dairy origin. *J. Applied Bacterio.* 66:227.
- Barbano, D.M., R.R. Rasmussen, and J.M. Lynch. 1991. Influence of milk somatic cell count and milk age on cheese yield. *J. Dairy Sci.* 74:369.
- Bastian, E.D., K.G. Hansen, and R.J. Brown. 1993. Inhibition of plasmin by  $\beta$ -lactoglobulin using casein and a synthetic substrate. *J. Dairy Sci.* 76:3354.
- Bastian, E.D., R.J. Brown, and C.A. Ernstrom. 1991 a. Casein interference in bovine plasmin assays using synthetic substrate. 74:4119.
- Bastian, E.D., R.J. Brown, and C.A. Ernstrom. 1991 b. Plasmin activity and milk coagulation. *J. Dairy Sci.* 74:3677.

Beeby, R. 1980. The use of fluorecamine at pH 6.0 to follow the action of chymosin on  $\kappa$ -casein and to estimate this protein in milk. *New Zealand J. Dairy Sci. Technol.* 15:99.

Benslimane, S., M.J. Dognin-Bergeret, J.L. Berdague, and Y. Gaudemer. 1990. Variation with season and lactation of plasmin and plasminogen concentrations in Montbeliard cows' milk. *J. Dairy Res.* 57:423.

Bishop, J.R., and C.H. White. 1985. Estimation of potential shelf-life of pasteurized fluid milk utilizing bacterial numbers and metabolites. *J. Food Protec.* 8:663.

Bucky, A.R., P.R. Hayes, and D.S. Robinson. 1988. Enhanced inactivation of bacterial lipases and proteinases in whole milk by a modified ultra high temperature treatment. *J. Dairy Res.* 55:373.

Champagne, C.P., R.R. Laing, D. Roy, A. A. Mafu, and M.W. Griffiths. 1994. Psychrotrophs in dairy products: their effects and their control. *Critical Reviews in food science and nutrition.* 34:1.

Chatelin, Y.M., et J. Richard. 1981. Comparaison dans des conditions courantes de l'efficacité de quatre méthodes de nettoyage des machines à traire. *Lait.* 63:87.

Chen, J.H., and R.A. Ledford. 1971. Purification and characterisation of milk protease. *J. Dairy Sci.* 54:763.

Chism, G.W., A.E. Huang, and J.A. Marshall. 1978. Sensitive assay for proteases in sterile milk. *J. Dairy Sci.* 62:1799.

Christen, G.L., and M. Senica. 1987. Casein, fluorescein isothiocyanate as a substrate for measuring protease production by psychrotrophic bacteria. *J. Food Protec.* 50:744.

Christen, G. L. 1987. A new method for measuring protease activity in milk using radiolabeled casein. *J. Dairy Sci.* 70:1807.

Christen, G.L. , and R.T. Marshall. 1984. Thermostability of lipase and protease of *Pseudomonas fluorescens* 27 produced in various broths. *J. Dairy Sci.* 67:1688.

Church, F.C., H.E. Swaisgood, D.H. Porter, and G.L. Catignani. 1983. Spectrophotometric assay using *o*-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *J. Dairy Sci.* 66:1219.

Cliffe, A.J., and B. A. Law. 1982. A new method for the detection of microbial proteolytic enzymes in milk. *J. Dairy Res.* 49: 209.

Colin, O., F. Laurent, and B. Vignon. 1992. Variations du rendement fromager en pâte molle. Relations avec la composition du lait et les paramètres de la coagulation. *Lait.* 72:307.

- Collard-Bovy, C, E. Marchal, G. Humbert, G. Linden, P. Montagne, N. El Bari, J. Duheille, and P. Varcin. 1991. Microparticle-enhanced nephelometric immunoassay. 1. Measurement of  $\alpha_s$ -casein and  $\kappa$ -casein. *J. Dairy Sci.* 74:3695.
- Collin, J.C., A. Kokelaar, O. Rollet-Repecaud, and A. Delacroix-Buchet. 1991. Dosage des caséines du lait de vache par électrophorèse et par chromatographie liquide rapide d'échange d'ions (FPLC®) : comparaison des résultats. *Lait.* 71:339.
- Collin, J.C., P. Compagnone, I. Ryba, et A. Baer. 1988. Determination of plasmin (alkaline milk proteinase) and chymosin in milk products by the ELISA assay. *Lait.* 68:235.
- Cousin, M.A. 1982. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: A review. *J. Food. Protec.* 45:172.
- Cousin, M.A., and E.H. Marth. 1976. Cheddar cheese made from milk that was precultured with psychrotrophic bacteria. *J. Dairy Sci.* 60:1048.
- Dasen, A., R.M. Olid, C. Piton-Malleret, et R. Grappin. 1991. Evaluation du BactoScan 8000 pour la numération automatique et rapide de la flore microbienne du lait cru. *Lait.* 71:661.
- De Rham, O., and A. T. Andrews T. 1982 a. The role of native milk proteinase and its zymogen during proteolysis in normal bovine milk. *J. Dairy Res.* 49:577.
- De Rham, O., and A.T. Andrews. 1982 b. Qualitative and quantitative determination of proteolysis in mastitic milks. *J. Dairy Res.* 49:587.
- Deharveng, G., and S. Nielsen. 1991. Partial purification and characterization of native plasminogen activators from bovine milk. *J. Dairy Sci.* 74:2060.
- Deluyker, H.A., J.M. Gay, and L.D. Weaver. 1993 a. Interrelationships of somatic cell count, mastitis, and milk yield in a low somatic cell count herd. *J. Dairy Sci.* 76:3445.
- Deluyker, H.A., J.M. Gay, and L.D. Weaver., and A.S. Azari. 1993 b. Change of milk yield with clinical diseases for a high producing dairy herd. *J. Dairy Sci.* 74:436.
- Diermayr, P., Kroll P., Klostermeyer H. 1987. Mechanisms of heat inactivation of a proteinase from *Pseudomonas fluorescens* biotype I. *J. Dairy Res.* 54:51.
- Donnelly, W.J., and D.S. Horne. 1986. Relationship between ethanol stability of bovine milk and natural variations in milk composition. *J. Dairy Res.* 53:23.
- Donnelly, W.J., and J.G. Barry. 1983. Casein compositional studies. III. Changes in Irish milk for manufacturing and role of milk proteinase. *J. Dairy Res.* 50:433.

- Dousset, X., M. Demaimay, C. Ravaud, A. Levesque, X. Pinet, et Y. Kergo. 1988. Influence de la température de réfrigération du lait sur la protéolyse et la protéolyse du lait U.H.T. au cours de son stockage. *Lait*. 68:143.
- Driessen, F.M., and C.B. Van der Waals. 1978. Inactivation of native milk protease by heat treatment. *Neth. Milk Dairy J.* 32:245.
- Dumont, J.P., G. Delespaul, B. Miguot, et J. Adda. 1977. Influence des bactéries psychrotrophes sur les qualités organoleptiques de fromages à pâte molle. *Lait*. 569:619.
- Durr, R. 1974. Le développement des bactéries psychrotrophes dans le lait cru réfrigéré dans les conditions des exploitations laitières françaises. *R.L.F.* 326:913.
- Eddy, B.P. 1960. The use and meaning of the term "psychrophilic". *J. Appl. Bacteriol.* 23:189.
- Eigel, W.N., and T.W. Keenan. 1979. Identification of proteose-peptone component 8-Slow as a plasmin derived fragment of bovine  $\beta$ -casein. *Int. J. Biochem.* 10:529.
- Eigel, W.N. 1977. Effect of bovine plasmin on  $\alpha_s1$ -B and  $\kappa$ -A caseins. *J. Dairy Sci.* 60:1399.
- El Bari, N., P. Montagne, G. Humbert, M.L. Cuillère, P. Varcin, G. Linden, and J. Duheille. 1991. Development of a microparticle-enhanced nephelometric immunoassay for the quantification of beta-casein in milk. *Food Agricul. Immuno.* 3:63.
- El Bari, N., P. Montagne, M.L. Cuillère, G. Humbert, G. Linden and J. Duheille. 1992. Study of  $\beta$ -casein denaturation by microparticle-enhanced nephelometric immunoassay. *Food agricul. Immuno.* 4:229.
- Fairbairn, D.J., and B.A. Law. 1986. Proteinases of psychrotrophic bacteria : their production, properties, effects and control. *J. Dairy Res.* 53:139.
- Farkye, N., and P.F. Fox. 1992. Contribution of plasmin to cheddar cheese ripening: effect of added plasmin. *J. Dairy Sci.* 59:209.
- Fernandez, L., A. Jaspe, A. Alvarez, P. Palacios, and C. Sanjose. 1992. Proteolytic and lipolytic activities of *Pseudomonas fluorescens* grown in raw milk with variable iron content. *Milchwissenschaft.* 47:160.
- Feuillat, M., S. Le Guennec, et A. Olson. 1976. Contribution à l'étude de la protéolyse des laits réfrigérés et incidences sur le rendement d'une fabrication de fromages à pâte molle. *Lait*. 558:521.
- FIL. 1991 a. Dénombrement des micro-organismes; comptage des colonies à 30°C. Norme FIL 100B.

FIL. 1991 b. Dénombrement des micro-organismes psychrotrophes; technique par comptage des colonies à 6,5°C. Norme FIL 101A.

FIL 256. 1990. Methods for assessing the bacteriological quality of raw milk from the farm.

Frias, J.D., A. Villafafila, P. Abad, and C. Rodriguez-Fernandez. 1994. Characterization of a thermoresistant metallo-proteinase from *Pseudomonas* Biovar 1. *Milchwissenschaft*. 49:81.

Frister, H., H. Meisel, and E; Schlimme. 1986. Modifizierte OPA-methode zur charakterisierung von proteolyse-produkten. *Milchwissenschaft*. 41:483.

Garcia, M.L., B. Sanz, P. Garcia-Collia, J.A. Ordonez. 1989. Activity and thermostability of the extracellular lipases and proteinases from *Pseudomonads* isolated from raw milk. *Milchwissenschaft*. 44:547.

Gebre-Egziaber, A, E.S. Humbert, and G. Blankenagel. 1980. Heat-stable proteases from psychrotrophs in milk. *J. Food Protec.* 43:197.

Girardet, J.M. 1992. Le composant-3 des protéose-peptones du lait bovin : obtention, origine, étude de sa partie glyconique, rôle de la lipolyse. Thèse de l'Université de Nancy I. France.

Grandison, A.S., and G.D. Ford. 1986. Effects of variations in somatic cell count on the rennet coagulation properties of milk and on the yield, composition and quality of cheddar cheese. *J. Dairy Res.* 53:645.

Grappin, R., T.C. Rank, and N.F. Olson. 1985. Primary proteolysis of cheese proteins during ripening. A review. *J. Dairy Sci.* 68:531.

Grieve, P.A., and B.J. Kitchen. 1985. Proteolysis in milk: the significance of proteinases originating from milk leucocytes and a comparison of the action of leucocyte, bacterial and natural milk proteinases on casein. *J. Dairy. Res.* 52:101.

Griffiths, M.W. 1989. Effect of temperature and milk fat on extracellular enzymes synthesis by psychrotrophic bacteria during growth in milk. *Milchwissenschaft*. 44:539.

Gripon, J.C. 1991. Protéases bactériennes et protéines du lait Colloque " Protéines et rendements en industries laitières " ENSAIA-Nancy, 2-3 Octobre 1991. 102.

Grover, S., V.K. Batish, and R.A. Srinivasan. 1989. Studies on factors affecting growth, proteolytic activity, and enterotoxin production by *Pseudomonas Aeruginosa* CTM-3. *Austral. J. Dairy. Technol.* 65.



- Grufferty, M.B., and P.F. Fox. 1988 a. Heat stability of the plasmin system in milk and casein systems. *New Zealand J. Dairy Sci. Technol.* 23:143.
- Grufferty, M.B., and P.F. Fox. 1988 b. Review article: Milk alkaline proteinase. *J. Dairy Res.* 55:609.
- Guamis, B., T. Huerta, and E. Garay. 1987. SDS-PAGE study of milk proteolysis by selected psychrotrophs from raw milk. *Milchwissenschaft.* 42:89.
- Guillou, H., G. Miranda, and J.P. Pelissier. 1986. Analyse quantitative des caséines dans le lait de vache par chromatographie liquide rapide d'échanges d'ions (FPLC). *Lait.* 67:135.
- Haenlein, G.F.W., L.H. Schultz, and J.P. Zikakis. 1973. Composition of proteins in milk with varying leucocyte contents. *J. Dairy Sci.* 56:1017.
- Hartley, B.C. 1960. Proteolytic enzymes. *Annula Rev. Biochem.* 29:45.
- Hedkvist, L., S. Hoglund, S. Persson and O. Holmberg. 1989. Plasminogen activation in the bovine udder. *Acta Veteri. Scandi.* 30:103.
- Hicks, C.L., C. Onuorah, J. O'Leary, and B.E. Langlois. 1986. Effect of milk quality and low temperature storage on cheese yield-a summation. *J. Dairy. Sci.* 69:649.
- Hicks, C.L., M. Allaudin, B.E. Langlois, and J. O'Leary. 1982. Psychrotrophic bacteria reduce cheese yield. *J. Food Protec.* 45:331.
- Hillier, R.M. 1976. The quantitative measurement of whey proteins using polyacrylamidegel electrophoresis. *J. Dairy Res.* 43:259.
- Hockney L.J., and M.A. Cousin. 1985. Detection of heat-resistant proteases produced by psychrotrophs in refrigerated milk. *J. Dairy Sci.* 68:610.
- Hull, M.E. 1947. Studies on milk proteins. II. Colorimetric determination of the partial hydrolysis of the proteins in milk. *J. Dairy Sci.* 30:881.
- Humbert, G. 1991. Activités et implications technologiques de la plasmine. Colloque "Protéines et rendements en industries laitières" ENSAIA-Nancy, 2-3 octobre 1991. 118.
- Humbert, G., M.F. Guigamp, R. Kouomegne, and G. Linden. 1990. Measurement of proteolysis in milk and cheese using trinitrobenzene sulphonic acid and a new dissolving reagent. *J. Dairy Res.* 57:143.
- Humbert, G. 1986. La protéase alcaline (plasmine) du lait : dosage, purification et implications en technologie laitière. Thèse de Doctorat es-Sciences, Université de Nancy I, France.

- Humbert, G., J. Brun-Bellut, T. Mora, and C. Alais. 1983. Proteinases activity in bovine raw milk. *J. Dairy Sci.* 66:2271.
- Humbert, G., R. Desnouveaux, et G. Linden. 1982. Applications de la dissolution totale des constituants colloïdaux du lait à la détermination de son activité protéinase. *lait.* 62:427.
- Ichilczyk-Leone, J. Y. Amram, N. Schneid, and J. Lenoir. 1981. Le refroidissement du lait et son comportement en fromagerie. I. Incidences du refroidissement du lait sur ces caractères physico-chimiques et son comportement vis-à-vis de la présure. *R.L.F.* 401:7.
- Igarashi, Y. 1989. A method for determination of  $\gamma$ -casein and its use for investigating proteolysis in bovine milk. *J. Dairy Sci.* 56:619.
- ITG. 1989. Conservation du lait au froid, conséquences en fromagerie. Rapport d'activités
- Jensen, N. E., and K. Knudsen. 1991. Interquarter comparison of markers of subclinical mastitis: somatic cell count, electrical conductivity, N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase and antitrypsin. *J. Dairy Res.* 58:389.
- Juffs, H.S. 1973. Proteolysis detection in milk. I. Interpretation of tyrosine value data for raw milk supplies in relation to natural variation, bacterial counts and other factors. *J. Dairy Res.* 40:371.
- Kaartinen, L., E.M. Salonen, A. Vaheri, and M. Sandholm. 1988. Activation of plasmin in mastitic milk. *Acta Veteri. Scandi.* 29:3.
- Kalogridou-Vassiliadou, D., and E. Alichanidis. 1984. Effect of refrigerated storage of milk on the manufacture and quality of teleme cheese. *J. Dairy Res.* 51:629.
- Kaminogawa, S., and K. Yamauchi. 1972. Acid protease of bovine milk. *Agricul. Biol. Chem.* 36:2351.
- Kanno, C., and H. Ogawa. 1989. Proteolytic degradation of lactophorin from bovine milk by plasmin and trypsin. *Jpn. J. Zootech. Sci.* 60:865.
- Kitchen, B. J. 1981. Review of the progress of dairy science: Bovine mastitis: milk compositional changes and related diagnostic tests. *J. Dairy Res.* 48:167.
- Kohlmann, K.L., S.S. Nielsen, and M.R. Ladisch. 1991 a. Effects of a low concentration of added plasmin on ultra-high temperature processed milk. *J. Dairy Sci.* 74:1151.
- Kohlmann, K.L., S.S. Nielsen, and M.R. Ladisch. 1991 b. Purification and characterisation of an extracellular protease produced by *Pseudomonas fluorescens* M3/6. *J. Dairy Sci.* 74:4125.

- Kohlmann, K.L., S.S. Nielsen, L.R. Steenson, and M.R. Ladisch. 1991. Production of proteases by psychrotrophic microorganisms. *J. Dairy Sci.* 74:3275.
- Kohlmann, K.L., S.S. Nielsen, and M.R. Ladisch. 1988. Effect of serine proteolytic enzymes (trypsin and plasmin), trypsin inhibitor, and plasminogen activator addition to ultra-high temperature processed milk. *J. Dairy Sci.* 71:1728.
- Korycka-dahl, M., B. Ribadeau-Dumas, N. Chene, and J. Martal. 1983. Plasmin activity in milk. *J. Dairy Sci.* 66:704.
- Kumosinski, T.F., E.M. Brown, and H.M. Farrel Jr. 1993. Three dimensional molecular modeling of  $\beta$ -casein structure. *J. Dairy Sci.* 76:931.
- Kumura, H., K. Mikawa, and Z. Saito. 1993. Purification and some properties of proteinase from *Pseudomonas fluorescens* No. 33. *J. Dairy Res.* 60:229.
- Kumura, H., K. Mikawa, and Z. Saito. 1991. Influence of concomitant protease on the thermostability of lipase of psychrotrophic bacteria. *Milchwissenschaft.* 46:144.
- Kwan, K.K.H., S. Nakai, and B.J. Skura. 1983. Comparison of four methods for determining protease activity in milk. 48:1418.
- Laemmli, U.K., and M. Favre. 1973. Maturation of the head of bacteriophage T4. I. DNA packaging events. *J. Mol. Biol.* 80:575.
- Lansbergen, L.M.T.E., M. Nielsen, T.G.M. Lam; A. Pengov, and Y.H. Schukken. 1994. Evaluation of a prototype on-line electrical conductivity system for detection of subclinical mastitis. *J. Dairy Sci.* 77:1132.
- Law, B.A. 1979. Reviews of the progress of dairy science : enzymes of psychrotrophic bacteria and their effect on milk and milk products. *J. Dairy Res.* 46:573.
- Law, B.A., A.T. Andrews, and M.E. Sharpe. 1977. Gelation of ultra-high temperature-sterilized milk by proteases from a strain of *Pseudomonas fluorescens* isolated from raw milk. *J. Dairy Res.* 44:145.
- Lawrence, R.C., L.K. Creamer, and J. Gilles. 1987. Texture development during cheese ripening. *J. Dairy Sci.* 70:1748.
- Le Bars, D., and J.C. Gripon. 1989. Specificity of plasmin towards bovine  $\alpha_{s2}$ -casein. *J. Dairy Res.* 56:817.
- Lenoir, J., R. Veisseyre, and C. Choisy. 1974. Le lait réfrigéré, matière première de la fromagerie moderne. *R.L.F.* 322:453.

- Leytus, S.P., L.K. Bowles, J. Konisky, and W.F. Mangel. 1981. Activation of plasminogen to plasmin by a protease associated with the outer membrane of *E. coli*. *Biochem.* 78:1485.
- Lopez-Fandino, R., A. Olano, C. San Jose, and M. Ramos. 1993. Application of reversed-phase HPLC to the study in U.H.T. milk. *J. Dairy Res.* 60:111.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough., A.L. Farr., R.J. and Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265.
- Lu, D.D., and S.S. Nielsen. 1993. Assays for native plasminogen activators in bovine milk. *J. Dairy Sci.* 76:3362.
- Maatje, K., P.J.M. Huijsmans, W. Roosing, and P.H. Hogewerf. 1994. The efficacy of in-line measurement of quarter milk electrical conductivity, milk yield and milk temperature for the detection of clinical and subclinical mastitis. *Liv. Prod. Sci.* 30:239.
- Manji, B., Y. Kakuda, and D.R. Arnott. 1986. Effect of storage temperature on age gelation of ultra-high temperature milk processed by direct and indirect systems. *J. Dairy Sci.* 69:2994.
- Maraval, B. 1978. Variations de la composition minérale du lait de chèvre. Aspects particuliers des teneurs en calcium, en magnésium, en potassium, en sodium et en phosphore. Thèse de 3<sup>ème</sup> cycle, INPL-ENSAIA, Nancy.
- Marchal, E., P. Montagne, G. Humbert, J. Duheille and G. Linden. 1989. Rapid measurement of the cow milk alkaline proteinase by a new microparticulate immunonephelometric inhibition assay. In "Agriculture food chemistry and the consumer". Proceedings of Eurofood Chem V. 1:346.
- Marin, C., et A. Guyot. 1993. Applicabilité du COBRA 2024 L à la détermination de la flore totale du lait cru. *Lait.* 73:311.
- Mati, A. 1992. Les protéose-peptones dans les laits bovin, ovin et caprin : isolement, caractérisation, origine et évolution de la fraction à caractère hydrophobe contenant le composant 3. Thèse de l'Université de Nancy I. France.
- Matta, H., V. Punj., and M.S. Kalra. 1994. Isolation and partial characterisation of heat-stable extracellular protease from *Pseudomonas* sp. AFT.36. *Milchwissenschaft.* 49:186.
- Maubois, J.L., G. Ricordeau, et G. Mocquot. 1970. Etude des rendements en fromagerie de Camembert et de Saint Paulin. *Lait, Juillet-Aout,* 351.
- Maubois, J.L., et G. Mocquot. 1967. Comment ramener à la même teneur en substance sèche des fabrications de fromage en vue de comparer les rendements respectifs du lait en fromage. *Lait.* 27:576.

- McKellar, R.C. 1984 a. Comparison of the Hide Powder Azur and casein-trinitrobenzene sulfonic acid methods for determining proteolysis in skim milk. *J. Food Protec.* 47:477.
- McKellar, R.C., and H. Cholette. 1984 b. Synthesis of extracellular proteinase by *Pseudomonas fluorescens* under conditions of limiting carbon, nitrogen, and phosphate. *Applied Env. Microbiol.* 47:1224.
- McKellar, R.C. 1981. Developement of off-flavors in ultra-high temperature and pasteurized milk as a function of proteolysis. *J. Dairy Sci.* 64:2138.
- McMahon, D.J., Brown R.J. 1982 Evaluation of formagraph for comparing rennet solutions. *J. Dairy. Sci.* 65:1639.
- Medina Hernandez M.J., E. Bonet Domingo, R.M. Villanueva Camanas , and M.C. Garcia Alvarez-Coque. 1991. Use of the *o*-phthaldialdehyde and N-acetyl-L-cysteine reagent in the evaluation of milk proteins. *J. Dairy Sci.* 74:1779.
- Metro, F., M.J. Desmazeaud, et O. cerf. 1979. Facteurs influant sur la validité de l'épreuve à l'alcool utilisé pour la sélection des laits stables à la chaleur. *Lait.* 58:431.
- Mietton, B., S. Le Guennec, et P. Tinguely. 1977. Conséquences technologiques de la réfrigération prolongée d'un lait. Résultat expérimentaux sur la fabrication en cru d'un fromage à pâte molle. *Revue des ENIL.* 16:17.
- Millière, J.B. et L. Veillet-Poncet. 1979. Caractérisation des systèmes enzymatiques protéolytiques de deux souches psychrotrophes isolées de laits crus réfrigérés. *Lait* 58:269.
- Miranda, G., and J.C. Gripon. 1986. Origine, nature et incidences technologiques de la protéolyse dans le lait. *Lait.* 66:1.
- Moore, S., and W.H. Stein. 1954. A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds. *J. Biol. Chem.* 211:907.
- Moskowitz, G.J., and S.S. Noelck. 1987. Enzyme-modified cheese technology. *J. Dairy Sci.* 70:1761.
- Mottar, J., J. Block, M. Merchiers, K. Vantomme, and R. Moermans. 1993. Routine Limulus Amoebocyte Lysate (LAL) test for endotoxin determination in milk using a toxinometer ET-201. *J. Dairy Res.* 60:223.
- Mottar, J. 1987. A colorometric endotoxin assay for the determination of the bacteriological quality of milk. *Neth. Milk Dairy J.* 41:137.
- Mottar, J. 1984 a. Influence de la durée de conservation sous réfrigération du lait cru sur la conservabilité du lait U.H.T. *Lait.* 64:29.

Mottar, J. 1984 b. Thermoresistance des bactéries psychrotrophes du lait cru et de leur protéinases. *Lait*. 64: 365.

Mottar, J. 1981. Heat Resistant enzymes in UHT milk and their influence on sensoric changes during uncooled storage. *Milchwissenschaft*. 36:87.

Mourgues, R., N. Deschamps, et J. Auclair. 1983. Influence de la flore thermorésistante du lait cru sur la qualité de conservation du lait pasteurisé exempt de recontaminations post-pasteurisation. *Lait*. 63:391.

Mourgues, R., L. Vassal, et J. Auclair. 1967. Influence de la vitesse de refroidissement et de la température de conservation en tanks de ferme sur le développement de la flore microbienne du lait cru. *Cong. Int. Froid, Madrid*.

Muir, D.D., and J.D. Phillips. 1984. Prediction of the shelf life of raw milk during refrigerated storage. *Milchwissenschaft*. 39:7.

Mulvihill, D.M., and A. McCarthy. 1993. Relationships between plasmin levels in rennet caseins and proteolytic and rheological changes on storage of cheese analogues made from these caseins. *J. Dairy Res.* 60:431.

Nielen, M., Y.H. Schukken, J. Van De Broek, and A. Brand. 1993. Relations between on-line electrical conductivity and daily milk production on a low somatic cell count farm. *J. Dairy. Sci.* 76:2589.

Nielen, M., H. Deluyker, Y.H. Schukken, and Brand. 1992. Electrical conductivity of milk : measurement, modifiers, and meta analysis of mastitis detection performance. *J. Dairy Sci.* 75:606.

Noomen, A. 1975. Proteolytic activity of milk protease in raw and pasteurized cow's milk. *Neth. Milk Dairy J.* 29:153.

Obara, Y., M. Komatsu M. 1984. Relationship between N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase activity and cell count, lactose, chloride, or lactoferrin in cow milk. *J. Dairy Sci.* 67:1043.

Ollikainen, P., and N. Nyberg. 1988. A study of plasmin activity during ripening of Swiss-type cheese. *Milchwissenschaft*. 43: 497.

Ossowski, L., D. Biegel, and E. Reich. 1979. Mammary plasminogen activator: correlation with involution, hormonal modulation and comparison between normal and neoplastic tissue. *Cell* 16:929.

Otani, H., Y. Mine, and A. Hosono. 1987. Studies on the antigenic structure of bovine  $\beta$ -casein. V. Antigenic activities of some peptides derived from residues 1-93. *Milchwissenschaft*. 42:505.

Otani, H., S. Iwasaki, and F. Tokita. 1984. Studies on the antigenic structure of bovine  $\beta$ -casein. I. Antigenic reactivity of  $\beta$ -III with antiserum to  $\beta$ -casein. *Milchwissenschaft*. 39:211.

Pâquet, D. 1989. Revue bibliographique : la fraction protéose-peptone du lait. *Lait*. 69:1.

Pâquet, D., A. Driou, P. Bracquart, and G. Linden. 1987. Effect of refrigerated storage of milk on proteolysis. Relationship to the proteose-peptone content. *Neth. Milk Dairy J.* 41:81.

Pâquet, D. 1986. Comportement des protéose-peptones du lait de vache : isolement, purification et propriétés d'une fraction à caractère hydrophobe. Thèse de l'Université de Nancy I, France

Patel, T.R., F.M. Bartlett, and J. Hamid. 1983. Extracellular heat-resisitant proteases of psychrotrophic *Pseudomonads*. *J. Food Protec.* 46:90.

Pearse, M.J., P.M. Linklater, R.J. Hall, and A.G. Mc Kinlay. 1986. Extensive degradation of casein by plasmin does not impede subsequent curd formation and syneresis. *J. Dairy Res.* 53:477.

Philippeau, G. 1989. In : *Théorie des plans d'expériences*, ed. ITCF, G. Philippeau France, 205 p.

Piton, C., et D. Rongvaux-Gaïda. 1990. Estimation par conductimétrie de la flore aérobie mésophile, des bactéries coliformes et de la flore psychrotrophe du lait cru. *Lait*. 70:293.

Poffé, R., and W. Mertens. 1988. Rapid estimation of psychrotrophic and proteolytic bacterial counts from total bacterial counts in cooled raw milk. *Int. J. Food Sci. Technol.* 23:379.

Politis, I., B. Zazivion, D.M. Barbano, and R.C. Gorewit. 1993. Enzymatic assay for the combined determination of plasmin plus plasminogen in milk: revisited. *J. Dairy Sci.* 76:1260.

Politis, I., D.M. Barbano, and R.C. Gorewit. 1992. Distribution of plasminogen and plasmin in fractions of bovine milk. *J. Dairy Sci.* 75:1402.

Politis, I., E. Block., J.D. Turner. 1990. Effect of somatotropin on the plasminogen and plasmin system in the mammary gland: proposed mechanism of action for somatotropin on the mammary gland. *J. Dairy Sci.* 73:1494.

Politis, I., E. Lachance, E. Block, and J.D. Turner. 1989 a. Plasmin and plasminogen in bovine milk: a relationship with involution ? *J. Dairy Sci.* 72:900.

- Politis, I., K.F. Ng-Kwai-Hang, and R.N. Giroux, 1989 b. Environmental factors affecting plasmin activity in milk. *J. Dairy Sci.* 72:1713.
- Reimerdes, E.H. 1983. New aspects of naturally occurring proteases in bovine milk. *J. Dairy Sci.* 66:1591.
- Reimerdes, E.H., and Herlitz. 1979. The formation of  $\gamma$ -caseins during colling of raw milk. *J. Dairy Res.* 46:219.
- Reimerdes, E.H. and H. Klostermeyer. 1976. Determination of proteolytic activities on casein substrates. In *Methods in enzymologie*. Vol 45. L. Lorand, ed Academic Press, New York, NY.
- Reinheimer, J.A., M.R. Demkow, and L.A. Calabresse. 1990. Characteristics of psychrotrophic microflora of bulk-collected raw milk from the Santa Fe area (Argentina). *Austra. J. Dairy Technol.* 41.
- Remeuf, F. 1991. Conséquences des actions de la chaleur et du froid sur les protéines. Colloque "Protéines et rendements en industries laitières" ENSAIA-Nancy, 2-3 octobre 1991. 87.
- Ren, T.J., R.T. Toledo, and J.F. Franck. 1987. Kinetic parameters for thermal inactivation of plasmin. *J. Food Biochem.* 13:475.
- Ribadeau-Dumas, B., and R. Grappin. 1989. Milk protein analysis. *Lait.* 69:357.
- Ribadeau-Dumas, B., G. Brignon, F. Grosclaude, and J.C. Mercier, 1972. Primary structure of bovine  $\beta$ -casein. *Euro. J. Biochem.* 25:505.
- Richard, J. 1992. Les bactéries psychrotrophes. In "Les groupes microbiens d'intérêt laitier". CEPIL. France.
- Richard, J., Piton C., and J.J. Gratadoux. 1988. Nature des colonies se développant à la surface du milieu Violet Rouge Bile Lactose Agar (VRB) ensemencé avec du lait cru. Validité des dénombrements des colonies lactose-positives et des colonies lactose-négatives se développant sur ce milieu. *Lait.* 68:311.
- Richard, J. 1981. Influence de diverses méthodes de nettoyage des machines à traire sur la "qualité de conservation" du lait cru à basse température. *Lait.* 61:354.
- Richardson, B.C. 1983 a. The proteinases of bovine milk and the effect of pasteurization on their activity. *New Zeal. J. Dairy. Sci. Technol.* 18:233.
- Richardson, B.C. 1983 b. Variation of the concentration of plasmin and plasminogen in bovine milk with lactation. *New Zeal. J. Dairy. Sci. Technol.* 18:247.
- Richardson, B.C., and K.N. Pearce. 1982. The determination of plasmin in dairy products. *New Zeal. J. Dairy. Sci. Technol.* 16:209.



- Richardson, B.C., and D.F. Newstead. 1979. Effect of heat-stable proteases on the storage life of UHT milk. *New Zeal. J. Dairy. Sci. Technol.* 14:273.
- Robitaille, G., K. F. Ng-Kwai-Hang, and H.G. Monardes. 1991. Variation in the N-acetyl neuraminic acid content of bovine  $\kappa$ -casein. *J. Dairy Res.* 58:107.
- Rollema, H.S., R.C. McKellar, T. Sorhaug, G. Suhren, J.G. Zadow, B.A. Law, J.K. Poll, L. Stepaniak, and G. Vagias. 1987. Comparison of different methods for the detection of bacterial proteolytic enzymes in milk. *Milchwissenschaft.* 44:491.
- Rollema, H.S., and J.K. Poll. 1986. The alkaline milk proteinase system: Kinetics and mechanism of heat-inactivation. *Milchwissenschaft.* 41:536.
- Rollema, H.S., S. Visser, and J.K. Poll. 1983. Spectrometric assay of plasmin and plasminogene in bovine milk. *Milchwissenschaft.* 38:214.
- Rongvaux-Gaïda, D., et C. Piton-Malleret. 1992. Intérêt du dosage de l'activité cytochrome oxydase pour l'évaluation de la flore psychrotrophe du lait cru à l'arrivée à l'usine. *Lait.* 72:221.
- Rongvaux-Gaïda, D., C. Piton., et A. Dasen. 1991. Dosage de l'ATP bactérien du lait cru par l'appareil BactoFoss. *Lait.* 71:575.
- Rongvaux-Gaïda, D., et C. Piton-Malleret. 1991. Application d'une variante turbidimétrique du test *Limulus* à l'évaluation de la flore Gram négatif du lait cru. *Lait.* 71:565.
- Rongvaux-Gaïda, D., et C. Piton. 1991. Comparaison de trois méthodes de dosage de l'ATP par bioluminescence pour l'estimation de la qualité bactériologique du lait cru. *Lait.* 71:483.
- Rongvaux-Gaïda, D., A. Peroz, B. Verdier, et C. Piton. 1990. Estimation de la qualité bactériologique du lait cru par microrespirométrie. *Lait.* 70:23.
- Rowe, M.T., D.E. Johnston, D.J. Kilpatrick, G. Dunstall, and R.J. Murphy. 1990. Growth and extracellular enzyme production by psychrotrophic bacteria in raw milk stored at low temperature. *Milchwissenschaft.* 45:495.
- Rowe, M.T., and A. Gilmour. 1983. Nutritional factors affecting extracellular enzyme production by *Pseudomonas fluorescens* B 52. *Milchwissenschaft.* 38:705.
- Rowland, S.J. 1937. The soluble protein fraction of milk. *J. Dairy Res.* 8:6.
- Rowland, S.J. 1938. The precipitation of the proteins in milk, I Caseins, II Total proteins, III Globulin, IV Albumin and proteose-peptone. *J. Dairy Res.* 9:30.

Saeman, A.I., R.J. Verdi, D.M. Galton, and D.M. Barbano. 1988. Effect of mastitis on proteolytic activity in bovine milk. *J. Dairy Sci.* 71:505.

Sanjose, C., L. Fernandez, and P. Palacios. 1987. Compositional changes in cold raw milk supporting growth of *Pseudomonas fluorescens* NCDO 2085 before production of extracellular proteinase. *J. Food Protect.* 50:1004.

Schaar, J. 1985. Plasmin activity and proteose-peptone content of individual milks. *J. Dairy Res.* 52:369.

Schaar, J., and H. Funke. 1986. Effect of subclinical mastitis on milk plasminogen and plasmin compared with that on sodium, antitrypsin and *N*-Acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase. *J. Dairy Res.* 53: 515.

Schultz, L.H. 1977. Somatic cells in milk-physiological aspects and relationship to amount and composition of milk. *J. Food Protect.* 40:125.

Senyk, G.F., D.M. Barbano, and W.F. Shipe W.F. 1985. Proteolysis in milk associated with increasing somatic cell counts. *J. Dairy Sci.* 68:2189.

Shamsuzzaman, K. and R. McKellar. 1977. Peptidases from two strains of *Pseudomonas fluorescens*: partial purification, properties and action on milk. *J. Dairy Res.* 54:283.

Snoeren, T.M.H., B. Van Markwijk, and R. Montfort. 1980. Some physicochemical properties of bovine  $\alpha$ 2-casein. *Biochem.* 622:268.

So, M.H., S.S. Yoon, and Y.B. Kim. 1992. Psychrotrophic microflora in raw milk and their proteolytic and lipolytic ability. *Korean J. of Dairy Sci.* 14:43.

Sorensen, E.S., and T.E. Petersen. 1993. Phosphorylation, glycosylation and amino acid sequence of component PP3 from the proteose peptone fraction of bovine milk. *J. Dairy Sci.* 60:535.

Stead, D. 1987 a. Production of extracellular lipases and proteinases during prolonged growth of strains of psychrotrophic bacteria in whole milk. *J. Dairy Res.* 54:535.

Stead, D. 1987 b. Assay of proteinases of psychrotrophic bacteria in milk using Hide Powder Azure and a simple procedure for clarification of milk. *J. Dairy Res.* 54:295.

Stepaniak, L., S.E. Birkeland, G. Vagias, and T. Sorhaug. 1987. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for monitoring the production of heat stable proteinases and lipase from *Pseudomonas*. *Milchwissenschaft.* 42:169.

Stepaniak, L., and P.F. Fox. 1985. Isolation and characterization of heat stable proteinases from *Pseudomonas* isolate AFT12. *J. Dairy Res.* 52:77.

- Stepaniak, L., P.F. Fox, and C. Daly. 1982. Isolation and general characterisation of the heat stable proteinase from *Pseudomonas fluorescens* AFT36. *Biochim. Biophys. Acta.* 717:376.
- Svensson, A., and B. Hahn-Hägerdal. 1987. Comparison of a gelation and a chromogenic *Limulus* (LAL) assay for the detection of gram-negative bacteria, and the application of the latter assay of milk. *J. Dairy Res.* 54:267.
- Tatini, S.R., P. Mekala, A. El-Habaz, and M.W. Griffiths. 1991. Rapid detection of psychrotrophic bacteria in manufacturing grade raw milks. *J. Food Protec.* 54:861.
- Thomas, S.B., and B.F. Thomas. 1973. Psychrotrophic bacteria in refrigerated bulk-collected raw milk. Part I et II. *Dairy Ind.* 38:11.; 38:61.
- Trieu-Cuot, P., and J.C. Gripon. 1981. Electrofocusing and two-dimensional electrophoresis of bovine caseins. *J. Dairy Res.* 48:303.
- Valles, E., R. Mourgues, J. Vandeweghe et L. Thiebaut. 1986. Une méthode rapide pour évaluer la protéolyse du lait causée par les bactéries psychrotrophes. *Techn. Lait. et Mark.* 1015:33.
- Verdi, R.J., and D.M. Barbano. 1991 a. Effects of coagulants, somatic cells and extracellular bacterial enzymes on plasminogen activation. *J. Dairy Sci.*, 74:772.
- Verdi, R.J., and D.M. Barbano. 1991 b. Properties from somatic cells and blood leukocytes. *J. dairy Sci.* 74:2077.
- Villafafila, A. J.D. Frias, P. Abad, and C. Rodriguez-fernandez. 1993. Extracellular proteinase activity from psychrotrophic *Pseudomonas fluorescens* biovar 1 (*Ps. fluorescens* NC1). *Milchwissenschaft.* 48:435.
- Visser, S. 1993. Proteolytic enzymes and their relation to cheese ripening and flavor : an overview. *J. Dairy Sci.* 76:351.
- Visser, S. 1981. Proteolytic enzymes and their action on milk proteins. A review. *Neth. Milk Dairy J.* 35:65.
- Washam, C.J., H.C. Olson, and E.R. Vedamuthu. 1977. Heat-resistant psychrotrophic bacteria isolated from pasteurized milk. *J. Food Protec.* 40:101.
- Weatherup, W., and W.M.A. Mullan. 1994. Effect of low temperature storage of milk on the quality and yield of cheese. "Cheese yield and factors affecting its control", IDF Seminar, Cork, 1993.
- Yan, L., B.E. Langlois, J. O'leary, and C. Hicks. 1983. Effect of storage conditions of grade A raw milk on proteolysis and cheese yield. *Milchwissenschaft.* 38:715.

Zachos, T., I. Politis, R.C. Gorewit, and D.M. Barbano. 1992. Effect of mastitis on plasminogen activator activity of milk somatic cells. *J. Dairy Res.* 59:461.

Zalazar C.A., C.A. Meinardi, S. Palma, V.B. Suarez, and J.A. Reinheimer. 1993. Increase in soluble sialic acid during bacterial growth in milk. *Austr. J. Dairy Technol.* 48:1.

**PUBLICATIONS et COMMUNICATION**

**Ces travaux ont fait l'objet des publications et communications suivantes :**

**1) Articles dans des revues internationales**

- Guinot-Thomas P., M. Al Ammoury, Y. Le Roux and F. Laurent. Study of proteolysis during storage of raw milk at 4°C : effect of plasmin and microbial proteases. *Accepté le 10.08.94 dans "International Dairy Journal"*

- Le Roux Y., O. Colin, and F. Laurent. Proteolysis in quarter milk as a function of subclinical mastitis intensity 1. Comparison of some indicators of endogenous proteolysis in milk. *Soumis au "Journal of Dairy Science" en Juillet 1994.*

- Le Roux Y., J.M. Girardet, G. Humbert, F. Laurent, and G. Linden. Proteolysis in quarter milk as a function of subclinical mastitis intensity. 2. Two components of interest of the proteose-peptone fraction : component PP3 and  $\beta$ -CN-1P (f29-105 and f29-107). *Soumis au "Journal of Dairy Science" en Juillet 1994.*

**2) Communication avec acte :**

- Le Roux Y., O. Colin, et F. Laurent. 1994. Influence des variations intra-individuelles de l'état sanitaire de la mamelle sur la qualité protéique des laits. 9ème Journée Elevage et Nutrition des Herbivores, INRA 16-17 mars 1994.



**Service Commun de la Documentation**  
**INPL**  
**Nancy-Brabois**

**AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE  
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE  
DE LORRAINE**

o o o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

**Monsieur BRULE Gérard, Professeur, ENSAR Rennes,**  
**Monsieur DELUYKER Hubert, Professeur, UPJOHN SA Bruxelles,**  
**(Belgique).**

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

**Monsieur LE ROUX Yves**

à soutenir devant l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,  
une thèse intitulée :

**"Qualité protéique des laits à la production : facteurs de variation et  
recherche d'indicateurs de protéolyse".**

en vue de l'obtention du titre de :

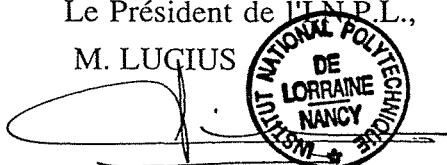
**DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE  
LORRAINE**

Spécialité : **"SCIENCES AGRONOMIQUES"**

Fait à Vandoeuvre le, **13 Octobre 1994**

Le Président de l'IN.P.L.,

M. LUGIUS



NANCY BRABOIS  
2, AVENUE DE LA  
FORET-DE-HAYE  
BOITE POSTALE 3  
F - 5 4 5 0 1  
VANDOEUVRE CEDEX





## RESUME

Une meilleure connaissance des réelles incidences des types de protéolyse dans le lait, associée à la recherche d'indicateurs pourrait permettre de diminuer le risque de dégradation des protéines et d'effectuer un tri du lait pour les fabrications sensibles.

Les objectifs du travail sont :

- Mesurer l'incidence de la protéolyse microbienne en fonction de différents niveaux de contamination,
- Etudier les facteurs de variation de la protéolyse endogène,
- Etudier les interactions entre ces deux types de protéolyse,
- Caractériser un ou des indicateurs de protéolyse, témoins de la dégradation des protéines du lait.

Des contaminations de  $10^6$  germes/ml n'induisent pas de baisses des rendements fromagers, ni des défauts de goût en transformation de type pâte molle. La protéolyse microbienne, mesurée par une diminution du pourcentage en k-caséines, n'est significative que pour des contaminations supérieures à  $10^7$  germes/ml, niveau obtenu après 144 heures de stockage à 4°C.

Le stockage du lait au froid pendant plusieurs jours induit des phénomènes protéolytiques endogènes d'autant plus intenses que le dénombrement cellulaire initial est important.

La protéolyse endogène, mesurée par augmentation du pourcentage des  $\gamma$ -caséines ou de la teneur en protéose peptones, est significative pour des laits de quartier à faibles dénombrements cellulaires ( $< 250\ 000$  cellules/ml).

Aucune interaction entre protéolyse endogène et microbienne n'a été observée.

Le dénombrement cellulaire n'est pas un indicateur précis de l'intensité de la protéolyse dans les laits de quartier ou individuels, par contre, les variations de cette protéolyse peuvent être expliquées par la mesure combinée de la teneur en chlorures, du pH et du nombre de cellule ( $r^2 = 0,77$ ).

La teneur en protéose peptone, contrairement à la mesure de la teneur en acides  $\alpha$ -aminés libres par l'acide 2,4,6 trinitrobenzène sulfonique, est une mesure sensible de la protéolyse microbienne et endogène.

Le composant  $\beta$ -caséine-1P (f 29-105/107) de la fraction protéose peptones s'avère un très bon indicateur de la protéolyse endogène dans les laits de quartier.