

Caractérisation de la fraction protéique du lait produit par deux types génétiques de lapine de la région de Tizi Ouzou

T. AMROUN¹, L. BIANCHI², N. ZERROUKI-DAOUDI¹, G. BOLET³, F. LEBAS⁴,
M. CHARLIER², E. DEVINOY², P. MARTIN² et G. MIRANDA²

¹Laboratoire des Ressources Naturelles, Université Mouloud Mammeri, Tizi Ouzou, Algérie

²UMR1313, Génétique Animale et Biologie Intégrative, INRA, Jouy-en-Josas, France

³INRA, UMR1388, Génétique, Physiologie et Systèmes d'Elevage, BP52627, 31326 Castanet Tolosan Cédex

⁴Cuniculture, 87A Chemin de Lasserre, 31450 Corrèze, France

Résumé : Cette étude a pour objectif d'identifier et de caractériser la fraction protéique majeure du lait de deux types génétiques de lapines, élevées dans la région de Tizi Ouzou (Algérie) : la population blanche (PB n= 3 femelles) et la souche « synthétique » (SS n= 4 femelles). Les échantillons de lait collectés au 10^e jour de lactation dans les deux populations ont été analysés par chromatographie en phase liquide couplée à un spectromètre de masse (LC-MS). Nous avons ainsi pu identifier et caractériser les lactoprotéines majeures des deux types génétiques ainsi que leurs principales isoformes de modifications post-traductionnelles. Les caséines α_{s1} et β sont majoritaires (50% des protéines totales) ; la caséine α_{s2} -like représente 13,5% et les caséines α_{s2} et κ respectivement 4 et 2,7%. Parmi les protéines sériques, la WAP (Whey Acidic Protein) est majoritaire (14,5%) et la lactoferrine représente 10% des lactoprotéines. L'analyse des profils chromatographiques a permis d'observer une similarité de l'ensemble des pics correspondant aux lactoprotéines majeures. Les deux types génétiques ne présentent pas de différence significative lorsqu'on compare les moyennes des proportions relatives de chacune des lactoprotéines majeures. Une forte dispersion autour de la moyenne de la caséine α_{s2} et du mélange α -Lac + SA chez les individus du type génétique SS ($CV_{\alpha_{s2}} = 0,24$ pour PB vs. 0,46 pour SS et $CV_{\alpha\text{-Lac} + \text{SA}} = 0,19$ pour PB vs. 0,274 pour SS) est observée.

Abstract: Characterization of the protein fraction of milk produced by two genetic types of rabbits in the region of Tizi Ouzou The objective of the study was to analyze milk protein composition (major proteins) of two genetic types of rabbits bred in Tizi-Ouzou (Algeria): the white population and the "synthetic" strain. Differences in size and litter weight at weaning were observed amongst the two types, which might be due to qualitative and/or quantitative variations in milk composition. Milk samples from dams of the two genetic types were collected on day 10 of lactation and analyzed using liquid chromatography associated to a mass spectrometer (LC-MS). We were thus able to identify and characterize the major milk proteins in both types of rabbits and determine their post- translational modification isoforms. Alpha-s1 and β caseins represent 50% of the total milk proteins; α_{s2} -like-, α_{s2} - and κ - caseins represent respectively 13.5, 4 and 2.7%. Whey Acidic Protein is the main whey protein (14.5%) while lactoferrin represents 10% of the total lactoprotéins. Chromatographic profiles of milk proteins were similar between the two genetic types of rabbits. In the "synthetic" strain, a strong dispersal around the mean of the relative proportions of α_{s2} casein and the mix α -Lac + SA is observed ($CV_{\alpha_{s2}} = 0,24$ in PB vs. 0,46 in SS and $CV_{\alpha\text{-Lac} + \text{SA}} = 0,19$ in PB vs. 0,274 in SS).

Introduction

Chez les mammifères, l'alimentation du jeune dépend exclusivement du lait, liquide complexe dont les effets vont au-delà de sa valeur nutritionnelle. Le lait confère en effet au nouveau-né des avantages d'ordre protecteur et adaptatif, à travers des molécules bioactives qui sont transférées de la mère au jeune pendant la période d'allaitement. Dans ce contexte, les rôles joués par les composés bioactifs du lait (incluant des hormones, des cytokines et des microARN) dans le développement néonatal sont d'une importance capitale. Dans le cas du lapin, le lait constitue le seul aliment des lapereaux durant les dix sept premiers jours de vie. En quantité suffisante, il permet une croissance harmonieuse du lapereau au cours de la période de lactation (Fortun-Lamothe et Gidenne, 2003). En Algérie, bien que les populations locales de lapins existent et soient bien adaptées aux conditions climatiques, leur prolificité et leur poids sont trop

faibles. Une collaboration entre l'INRA et l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, ayant comme finalité l'amélioration de la cuniculture, existe depuis de nombreuses années. Dans ce cadre, une souche « synthétique » (SS) issue de l'insémination de femelles d'une de ces populations locales par de la semence de mâles de la souche INRA 2666 a été développée (Gacem et Bolet, 2005 ; Gacem *et al.*, 2008). Une comparaison des performances de reproduction des lapines appartenant aux deux types génétiques élevés dans la région de Tizirt, à savoir le lapin de population blanche (PB) et la souche SS a montré une supériorité de cette dernière pour les caractères « prolificité à la naissance » et « poids des lapines et des portées nées » (Zerrouki *et al.*, 2014 ; Lebas *et al.*, 2010). Cependant la productivité au sevrage dans la SS, exprimée en nombre de lapereaux sevrés par femelle et par portée et/ou par an s'avère très faible surtout en période estivale. Ces faibles productivités sont liées à une forte mortalité durant la

phase d'allaitement (Zerrouki *et al*, 2014 ; Chibah-Aït Bouziad *et al*, 2014).

Afin d'identifier les causes de cette forte mortalité, des études portant sur l'évaluation quantitative de la fonction lactée des lapines ont été réalisées. Elles ont essentiellement porté sur l'évaluation quantitative de la fonction lactée des lapines (Zerrouki *et al*, 2012 ; Chibah-Aït Bouziad *et al*, 2014). L'aspect qualitatif (analyse fine de la composition du lait) n'a en revanche jamais été exploré.

Des travaux sur les protéines du lait de lapines ont déjà été réalisés (Dawson *et al*, 1993; Baranyi *et al*, 1996; Pak *et al*, 1999). Ces études portent essentiellement sur la caractérisation des séquences primaires des lactoprotéines. L'objectif de notre étude a été d'identifier et de caractériser la fraction protéique majeure du lait de lapines appartenant aux deux types génétiques algériens au moyen d'une technique analytique faisant appel au couplage de la chromatographie en phase liquide et de la spectrométrie de masse de type ESI-ToF (LC-MS). Cette technique hautement résolutive, fiable et robuste permet une identification et une quantification des lactoprotéines majeures et de leurs principales isoformes résultant de modifications post-traductionnelles : glycosylation et phosphorylation (Miranda *et al*, 2013). Nos analyses constitueront un solide référentiel pour mieux comprendre la physiologie de la lactation dans les populations étudiées et potentiellement apporter des éléments d'interprétation sur le taux de mortalité élevé, observé pendant la période d'allaitement, dans la souche SS.

1. Matériel et méthodes

L'expérimentation s'est déroulée sur une période allant de juin 2013 à février 2014 dans une exploitation cunicole située dans la région de Tizirt (Tizi Ouzou, Nord Algérien).

1.1. Animaux et échantillonnage

Sept lapines multipares appartenant aux deux types génétiques ; 3 femelles issues de la population blanche (PB) et 4 femelles de la souche synthétique (SS) ont été accouplées avec des mâles de mêmes types génétiques et suivies pendant un cycle de lactation (21 jours). A la mise-bas, les portées ont été dénombrées, pesées et équilibrées à 8 lapereaux par femelle. Des échantillons de lait ont été prélevés manuellement deux fois/semaine, durant les trois semaines de lactation. Les laits collectés en période estivale ont été additionnés de thiomersal (5%) avant d'être congelés à -20°C .

1.2. Analyses

Les analyses ont été effectuées sur les échantillons de lait prélevés pendant la 2^e semaine de lactation. Les laits individuels ont été dilués avec de l'eau distillée (1/5 v/v) et écrémés par centrifugation à 2 500 g durant 20 minutes. Les laits écrémés ont ensuite été analysés par LC-MS.

La séparation des protéines a été effectuée sur colonne de phase inverse (RP-HPLC) en utilisant un gradient croissant d'acétonitrile dans l'eau tel que décrit préalablement par Saadaoui *et al*, (2014).

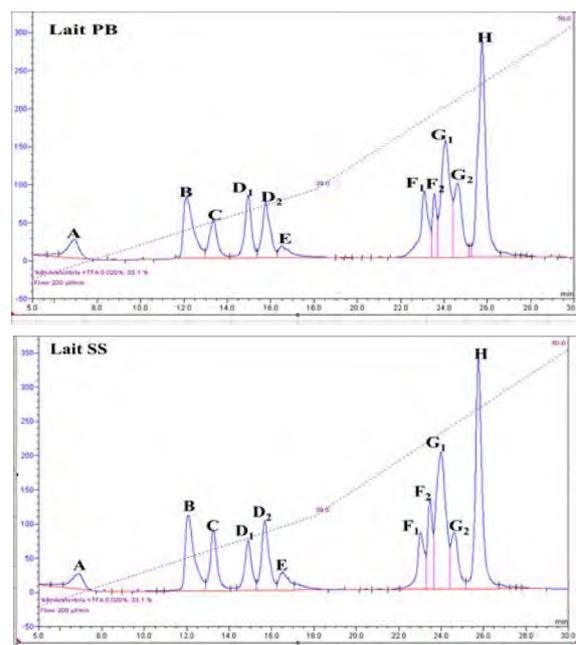
L'identification des protéines du lait, sur la base de leur masse moléculaire, a nécessité au préalable la constitution d'une base de données des masses moléculaires théoriques des lactoprotéines de lapine réalisée à partir d'une recherche bibliographique exhaustive. Elle a servi de référence pour l'identification des protéines à partir des masses observées en LC-MS. La quantification relative des familles majoritaires des protéines du lait (caséines et protéines sériques) a été effectuée par intégration des surfaces des pics du chromatogramme (DO à 214 nm). Les valeurs sont exprimées en % de la surface totale des pics du chromatogramme.

2. Résultats

2.1. Identification des protéines majeures des laits de lapines de types génétiques PB et SS

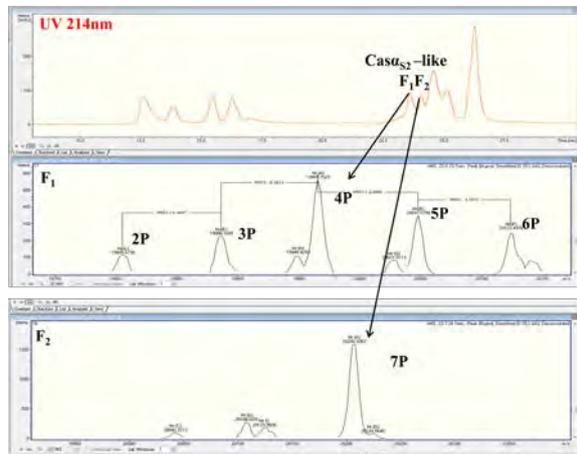
L'analyse par LC-MS de chaque lait individuel a permis d'identifier les caséines κ , α_{s2} , α_{s2} -like, α_{s1} et β correspondant respectivement aux pics A, C, (F1 et F2), (G1 et G2) et H ainsi que les protéines sériques lactoferrine, WAP (Whey Acidic Protein), α -lactalbumine et sérumalbumine correspondant respectivement aux pics B, (D1 et D2) et E.

Figure 1 : Identification des protéines majeures des laits des lapines PB et SS. Pic A : Cas κ + κ glycosylée, pic B : Lactoferrine, pic C : Cas α_{s2} , pics D1 et D2 : WAP, pic E : α -lactalbumine + Sérumalbumine, pics F1 et F2 : Cas α_{s2} -like, pics G1 et G2 : Cas α_{s1} , pic H : Cas β



La WAP ainsi que les caséines α_{s2} -like et α_{s1} sont présentes sous formes de 2 pics correspondant à différentes isoformes de phosphorylation : D1 (WAP 1P), D2 (WAP-2P), F1 (Cas α_{s2} -like-2 à 6P), F2 (Cas α_{s2} -like-7P), G1 (Cas α_{s1} -6P), G2 (Cas α_{s1} -7P).

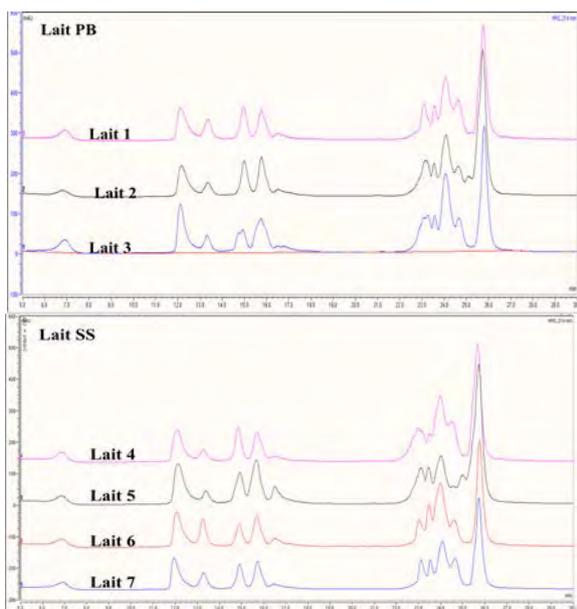
Figure 2 : Isoformes de phosphorylation de la caséine α_{s2} -like dans le lait de type PB



L' α -lactalbumine et la sérulalbumine sont quant à elles co-éluées (pic E). Il est à noter par ailleurs que les masses moléculaires observées pour les différentes lactoprotéines sur les deux types de lait ne présentent pas de différence et correspondent à celles référencées dans les bases de données protéiques (Uniprot, <http://www.expasy.org/>).

2.2. Analyse des profils chromatographiques des laits de type PB et SS

Figure 3 : Profils chromatographiques des laits de type PB (laits 1, 2, 3) et SS (laits 4, 5, 6, 7)



L'analyse des profils chromatographiques LC-MS permet d'observer une relative homogénéité des profils au sein d'une même population et entre populations avec toutefois quelques différences

d'intensité pour certains pics. Ces différences, notamment visibles au niveau de la caséine α_{s2} (pic C) et du mélange α -Lac + SA (pic E), laissent supposer l'existence d'une plus forte variabilité des proportions relatives de certaines lactoprotéines dans le groupe SS.

2.3. Quantification des protéines majeures des laits de lapines de types génétiques PB et SS

Tableau 1 : Quantification relative (% du total des pics du chromatogramme) des lactoprotéines majeures des laits de lapines. Les valeurs indiquées correspondent à la moyenne \pm SEM (erreur standard à la moyenne)

	Type PB (n=3)	Type SS (n=4)	
Caséines	κ	2,9 \pm 0,25	2,4 \pm 0,29
	α_{s2}	3,8 \pm 0,17	4,2 \pm 1,12
	α_{s2} -like	13,8 \pm 0,06	13,3 \pm 0,58
	α_{s1}	23,3 \pm 0,09	24,1 \pm 2,25
	β	26,9 \pm 0,12	26,4 \pm 2,22
Total caséines	70,6 \pm 0,01	70,4 \pm 1,36	
Protéines sériques	Lactoferrine	9,6 \pm 0,08	10,4 \pm 0,50
	WAP	14,7 \pm 0,73	14,4 \pm 0,80
	α -Lac + SA	2,2 \pm 0,13	2,8 \pm 0,45
Total PS	26,5 \pm 0,06	27,6 \pm 1,61	
Autres pics	2,9 \pm 0,28	2,0 \pm 0,44	
Total	100	100	

Les deux types génétiques ne présentent pas de différence significative lorsqu'on compare les moyennes des proportions relatives de chacune des lactoprotéines majeures (test statistique de Mann-Whitney). On note toutefois une plus forte dispersion autour de la moyenne dans le cas de la caséine α_{s2} et du mélange α -Lac + SA chez les individus du type génétique SS ($CV_{\alpha_{s2}} = 0,239$ pour PB vs. 0,457 pour SS et $CV_{\alpha\text{-Lac} + \text{SA}} = 0,190$ pour PB vs. 0,274 pour SS).

3. Discussion

Les lactoprotéines majeures ont des masses moléculaires identiques dans les laits des deux types génétiques d'animaux et correspondent à celles décrites dans la littérature. Sur les chromatogrammes obtenus par RP-HPLC, les caséines α_{s1} et α_{s2} -like, tout comme la WAP sont présentes sous forme de deux pics correspondant à deux degrés de phosphorylation différents. Baranyi *et al* (1995) avaient déjà rapporté la présence d'isoformes multiples de phosphorylation pour les différentes caséines et pour la WAP. Par notre approche méthodologique (LC-MS), nous avons non seulement confirmé ces résultats mais aussi établi avec précision le degré de phosphorylation des différentes isoformes.

Les caséines α_{s1} et β sont majoritaires (50% des caséines totales à elles deux). La caséine α_{s2} -like est trois à quatre fois plus abondante (13,5%) que les caséines α_{s2} et κ (respectivement 4 et 2,7 % en moyenne). Parmi les protéines sériques la WAP est majoritaire (14,5%), comme décrit par Baranyi *et al* (1995). La lactoferrine est abondamment représentée dans le lait de lapine (10%), comparativement au lait d'autres espèces (environ 1% chez les caprins et les bovins). Cette molécule est également présente en quantité importante dans le lait de femme (15% ; Martin et Grosclaude, 1993) et de camélidés (22% ; Kappeler, 1998). Il est intéressant de noter que le rapport caséines/protéines solubles dans les laits de lapines (70/30) est différent de celui observé chez les ruminants (80/20 chez les bovins) ou chez la femme (40/60) (Martin et Grosclaude, 1993).

Conclusion

Les résultats préliminaires présentés ici sur l'analyse du lait de lapines de deux types génétiques différents (PB et SS) par chromatographie en phase liquide couplée à un spectromètre de masse de type ESI-Tof, démontrent le potentiel de cette méthode qui permet d'accéder à une description détaillée de la composition de la fraction « protéines majeures » du lait de lapine. Les lactoprotéines majeures ainsi que leurs principales isoformes résultant de modifications post-traductionnelles ont été mises en évidence. Ces analyses suggèrent une variabilité importante des proportions relatives des lactoprotéines au sein de la population SS. Ces résultats sont à confirmer et une étude est en cours pour les valider sur un échantillonnage plus important. Des analyses plus approfondies s'avèrent néanmoins indispensables. Dans un premier temps, les fractions protéiques aussi bien majoritaires et que minoritaires de ces laits seront étudiées à différents stades de lactation. De même, les constituants autres que protéiques des laits feront l'objet d'investigations. L'ensemble de ces analyses pourrait, en effet, apporter des informations permettant d'expliquer la différence de prolificité (en faveur de la SS) observée entre les deux types génétiques.

Remerciements

Ce travail a été effectué dans le cadre d'un projet soutenu par le Ministère des Affaires Etrangères et Européennes français et le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique algérien, dans le cadre du Partenariat Hubert Curien TASSILI

Références

- BARANYI M., BRIGNON G., ANGLADE P., RIBADEAU-DUMAS B. 1995. New data on the proteins of rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) milk. *Comp. Biochem. Physiol.* 111, 407-415.
- BARANYI M., ASZODI A., DEVINOY E., FONTAINE M.L., HOUBEINE L.M., BOSZE Z. 1996. Structure of the rabbit kappa-casein encoding gene: expression of the cloned gene in the mammary gland of transgenic mice. *Gene* 174:27-34.
- CHIBAH-AIT-BOUZAD K., ZERROUKI-DAOUDI N., AMROUN-LAGA T., LEBAS F. 2014. Effet de la taille de portée née ou allaitée sur la production laitière de lapines de deux types génétiques élevées dans des conditions d'élevage rationnelles. 7èmes Journées de Recherche sur les Productions Animales. 10-11 novembre, Tizi-Ouzou Algérie.
- DAWSON S.P., WILDE C.J., TIGHE P.J., MAYER R.J. 1993. Characterization of two novel casein transcripts in rabbit mammary gland. *Biochem. J.* 296:777-784.
- FORTUN-LAMOTHE L., GIDENNE T. 2003. Besoins nutritionnels du lapereau et stratégie alimentaire autour du sevrage. *INRA Prod. Anim.* 16:41-50.
- GACEM M. et BOLET G. 2005. Création d'une lignée issue du croisement entre une population locale et une souche européenne pour améliorer la production cunicole en Algérie. 11èmes Journées de la Recherche Cunicole, Paris, France, 29-30 Novembre, 15-18.
- GACEM M., ZERROUKI N., LEBAS F., BOLET G. 2008. Strategy of developing rabbit meat in Algeria: creation and selection of a synthetic strain. 9th World Rabbit Congress. Verona, Italy, 10-13 June 2008, 85-89.
- KAPPELER S. 1998. Compositional and structural analysis of camel milk proteins with emphasis on protective proteins. Thèse d'Université. Swiss Federal Institute of Technology, Zurich.
- MARTIN P., GROSCLAUDE F. 1993. Improvement of milk protein quality by gene technology. *Livestock Production Science.* 35: 95-115.
- LEBAS F., GACEM M., MEFTA H., ZERROUKI N., BOLET G. 2010. Comparison of reproduction performances of a rabbit synthetic line and of rabbits of local populations in Algeria, in 2 breeding locations - First results. 6th Conference on Rabbit Production in Hot Climates, Assiut (Egypt). 6pp.
- McCLELLAN H.L., MILLER S.J., HARTMANN P.E. 2008. Evolution of lactation: nutrition v. protection with special reference to five mammalian species. *Nutr Res Rev.* 21: 97-116.
- MIRANDA G., KRUPOVA Z., BIANCHI L., MARTIN P. 2013. A novel LC-MS protein profiling method to characterize and quantify individual milk proteins and multiple isoforms. The 10th International Symposium on Milk Genomics and Human Health. October 13th, 2013, Davis, California.
- PAK K.W., KIM S.J., MIN W.K., PAK I.Y., HUANG H., KIM S. W., LEE K.K. 1999. Cloning of the rabbit alpha-lactalbumin gene and characterization of its promoter in cultured mammary-cells. Submitted to the EMBL/DBJ databases.
- SAADAOU B., BIANCHI L., HENRY C., MIRANDA G., MARTIN P., CEBO C. 2014. Combining proteomic tools to characterize the protein fraction of lama (*Lama glama*) milk. *Electrophoresis.* 35:1406-18.
- ZERROUKI N., CHIBAH K., AMROUN T., LEBAS F. 2012. Effect of the average kits birth weight and of the number of born alive per litter on the milk production of Algerian white population rabbit does. In Proceedings 10th World Rabbit Congress, Septembre 3-6, Sharm-El-Sheikh, Egypt. ISSN: <http://wordrabbitscience.com/WRSAProceeding/Congress-2012-Egypt>.
- ZERROUKI N., BOLET G., GACEM M., LEBAS F. 2014. Ressources génétiques cunicoles en Algérie : Analyse des performances de production de la souche synthétique en station et sur le terrain, en comparaison avec les deux types génétiques locaux : population Blanche et Population locale. 7èmes Journées de Recherche sur les Productions Animales 10-11 novembre 2014, Tizi-Ouzou, Algérie.