

ÉTUDE DE LA FRACTION PROTEIQUE DU LAIT DE LAPINE DE LA POPULATION BLANCHE ALGERIENNE AU COURS DE LA PERIODE NEONATALE : LIEN AVEC LA MORTALITE PRECOCE DES LAPEREUX

Amroun T. T^{1*}, Zerrouki-Daoudi N², Martin P³,
Miranda G³, Charlier M³.

¹Laboratoire Biochimie Analytique et Biotechnologie, Université Mouloud Mammeri, Tizi Ouzou, Algérie.

²Laboratoire Ressources Naturelles, Université Mouloud Mammeri, Tizi Ouzou, Algérie.

³Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, GABI, 78350 Jouy-en-Josas, France.

*Auteur correspondant : thilali_amroun@yahoo.fr

Résumé : Cette étude est basée sur l'hypothèse selon laquelle la qualité du lait ingéré durant la période critique qu'est la période colostrale, notamment au niveau de la fraction protéique, aurait un effet sur la viabilité des lapereaux. Des échantillons de lait collectés sur les animaux de la population blanche algérienne PB (n = 30) à deux stades de lactation, à la mise bas (L1) et au 10^{ème} jour de lactation (L10) ont été collectés en vue d'une analyse fine de la fraction protéique. Ces échantillons ont été analysés par chromatographie en phase liquide couplée à un spectromètre de masse (LC-MS). Sur le plan quantitatif, 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 whey acidic protein (WAP) est majoritaire (14,5%) et la lactoferrine est abondamment représentée (10%). Sur le plan qualitatif, trois variants de masses différentes ont été mis en évidence pour la caséine α_{s2} (Var Nat, Var B et C) et deux pour la caséine α_{s1} (Var Nat et Var B). La quantité relative des variants (B + C) de la caséine α_{s2} est toujours supérieure à celle du Variant Naturel (Var Nat) aux différents stades de lactation et principalement au stade L1 et sont associés à de forts taux de mortalité, ils sont donc considérés délétères. Il en est de même pour le variant B de la caséine α_{s1} . Cette étude révèle des effets significatifs de l'origine génétique du lait sur la viabilité des lapereaux, en particulier la présence de nouveaux variants génétiques des caséines α_{s1} et α_{s2} et ce, dès la période colostrale.

Abstract: Study of the protein fraction of rabbit milk from the white population during the colostrum period: relationship with early mortality of kits. This study is based on the hypothesis that the quality of the milk ingested during the critical period of colostrum, especially the protein fraction, would have an effect on the viability of the young rabbits. Milk samples collected from animals of the Algerian white PB population (n = 30) at two stages of lactation, at parturition (L1) and at the 10th day of lactation (L10) were collected for a fine analysis of the protein fraction. These samples were analyzed by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). Quantitatively, α_{s1} and β caseins are in the majority (50% of total caseins between them). The α_{s2} -like casein is three to four times more abundant (13.5%) than α_{s2} and κ caseins (4 and 2.7%, respectively, on average). Among serum proteins, whey acidic protein (WAP) is in the majority (14.5%) and lactoferrin is abundantly represented (10%). Qualitatively, three variants of different masses were identified for casein α_{s2} (Var Nat, Var B and C) and two for casein α_{s1} (Var Nat and Var B). The relative amount of variants (B + C) of α_{s2} casein is always higher than that of the Natural Variant (Var Nat) at different stages of lactation and mainly at L1 stage and are associated with high mortality rates, so they can be considered as deleterious as Var B of α_{s1} casein. The same is true for the B variant of α_{s1} casein.

This study reveals significant effects of the genetic origin of the milk on the viability of the rabbits, in particular the presence of new genetic variants of caseins α_{s1} and α_{s2} and this, from the colostrum period.

Introduction

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.

L'étude des performances de reproduction des lapines de la population blanche algérienne (PB) élevées dans la région de Tizirt, a permis leur caractérisation (Amroun et al 2015 ; 2018 ; Zerrouki et al 2014 ; Lebas 2010).

La productivité au sevrage, 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) précisément au cours de la période colostrale.

Afin d'identifier les causes de cette forte mortalité, des études portant sur l'évaluation quantitative de la

production laitière ont été réalisées (Zerrouki et al 2012 ; Chibah-Aït Bouziad et al 2014).

L'aspect qualitatif du lait produit a été peu exploré, bien que des travaux sur les protéines du lait de lapine aient déjà été menés (Dawson et al 1993 ; Baranyi et al 1995 ; Pak et al 1999). En revanche, la relation entre la qualité du lait et la viabilité des lapereaux n'a jamais été abordée. L'objectif de cette étude est de mettre en relation la composition fine de la fraction protéique du lait de lapines de population blanche avec la viabilité des lapereaux dans les 10 premiers jours d'allaitement.

1. Matériel et méthodes

L'expérimentation s'est déroulée sur une période allant du mois de Mai 2015 au mois de Janvier 2016 dans une exploitation cunicole située dans la région de Tizirt (Tizi Ouzou, Nord Algérien).

1.1. Animaux et échantillonnage

Trente lapines de la population blanche (PB) ont été suivies pendant trois cycles de lactation (21 jours) au cours desquels le taux de mortalité a été évalué spécifiquement durant la période néonatale. A la mise-bas, les portées ont été dénombrées, pesées et équilibrées à 8 lapereaux par femelle.

Des échantillons ($n = 30$) de lait sont collectés manuellement à deux stades différents : d'une part, à la mise bas (L1) et d'autre part, au 10^{ème} jour de lactation (L10).

1.2. Analyses

1.2.1. Analyses par LC-MS

Sur les plans qualitatif et quantitatif, les échantillons de lait ont été analysés 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) ainsi que de nouveaux variants génétiques (Miranda et al 2020).

Les profils chromatographiques en UV 214nm ont été analysés à l'aide du logiciel Chromeleon (Chromeleon 7.0.0, Dionex, Thermo Fisher Scientific).

Les variants génétiques ainsi que les isoformes des lactoprotéines majeures ont été identifiés par comparaison des masses moléculaires observées aux masses moléculaires théoriques des lactoprotéines de lapine, répertoriées dans une base de données construite au laboratoire.

1.2.3. Analyses statistiques

Les données sont exprimées en moyennes \pm SEM.

La mortalité néonatale a été évaluée par le test t-Student. L'effet de la composition protéique sur la mortalité des lapereaux a été évalué à l'aide du test non paramétrique de Mann-Whitney U. Les différences sont estimées significatives quand $P < 0,05$.

2. Résultats et discussion

2.1. Mortalité des lapereaux

Sur les trois cycles de lactation, la période péri-mise bas, notamment la période colostrale est marquée par de forts taux de mortalité avec une perte moyenne de 4 lapereaux/portée soit 50%. La seconde et troisième semaine de lactation sont caractérisées par une stabilité des effectifs au sein des portées, la perte moyenne est de 1 lapereau/portée soit 12,50%.

2.2. Identification et quantification des lactoprotéines Majeures aux stades L1 et L10

La séparation, l'identification des protéines majeures a été effectuée, sur une colonne en phase inverse (RP-HPLC) en utilisant un gradient croissant d'acétone comme décrit précédemment par Amroun et al (2015). La quantification des lactoprotéines majeures a été réalisée après intégration de la surface des pics du chromatogramme à 214nm.

Les valeurs ont été exprimées en pourcentage de la surface totale des pics.

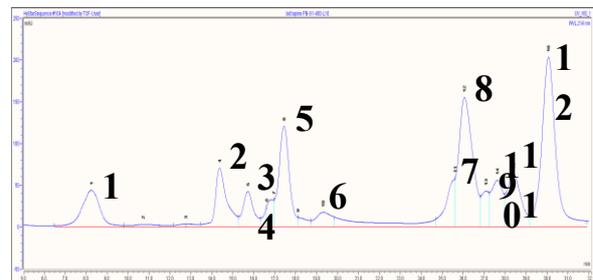


Figure 1 : Identification des lactoprotéines majeures du lait PB.

Pics 1: glycosylated κ -cas, 2: Lactoferrin, 3: α_{S2} -cas, 4-5: WAP (Whey Acidic Protein), 6: α -lactalbumin + Serumalbumin, 7-8: α_{S2} -like cas, 9- 11: α_{S1} -cas, 12: β -cas

Aux stades L1 et L10, 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 whey acidic protein (WAP) est majoritaire (14,5%) et la lactoferrine est abondamment représentée (10%) comparativement au lait d'autres espèces (environ 1% chez les caprins et les bovins).

La lactoferrine 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 le lait de lapine (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).

Tableau 1 : Quantification relative (% du total des pics du chromatogramme) des protéines majeures du lait de lapines PB à deux stades de lactation (L1 et L10).

	κ	2,9 ± 0,3
Caséines	α_{s2}	3,8 ± 0,2
	α_{s2} -like	13,8 ± 0,1
	α_{s1}	23,3 ± 0,1
	β	26,9 ± 0,1
Total caséines		70,6 ± 0,0
Protéines sériques	Lactoferrine	9,6 ± 0,1
	WAP	14,7 ± 0,7
	α -Lac + SA	2,2 ± 0,1
Total protéines sériques		26,5 ± 0,1
Autres pics		2,9 ± 0,3
Total		100

Les valeurs indiquées correspondent à la moyenne ± SEM
 α -Lac : α Lactalbumine ; SA : Sérum Albumine

La séparation, l'identification et la quantification des lactoprotéines majeures aux stades L1 et L10 par LC-MS ne mettent en évidence aucune différence quantitative au niveau des caséines et des protéines sériques totales.

2.3. Identification des variants génétiques des lactoprotéines majeures du lait PB

L'analyse des profils chromatographiques ont permis l'identification de trois nouveaux variants génétiques ainsi que les isoformes (Tableau 1).

Cette identification a été réalisée par comparaison des masses moléculaires observées aux masses moléculaires théoriques des lactoprotéines de lapines répertoriées dans une base de données construite au laboratoire. Ainsi, trois variants de masses différentes ont été mis en évidence pour la caséine α_{s2} (Var Nat, Var B et C) et deux pour la caséine α_{s1} (Var Nat et Var B) (Tableau 2).

Tableau 2 : Détermination des variants génétiques des lactoprotéines du lait de la lapine PB.

	Variants	Masse théorique (Da)	Masse observée (Da)
Cas κ	Variant Nat	18019	
	Variant Nat	19927	
Cas α_{s2}	Variant B		20813
	Variant C		20887
WAP	Variant Nat	11681	
Cas α_{s2}-like	Variant Nat	19646	
Cas α_{s1}	Variant Nat	23972	
	Variant B		23857
Cas β	Variant Nat	24536	

2.3.1. Quantification des variants génétiques des caséines α_{s1} et α_{s2} aux stades L1 et L10

Dans la lignée PB, la quantité relative des variants (B + C) de la caséine α_{s2} est toujours significativement supérieure à celle du Variant Naturel aux deux stades de lactation et principalement au stade L1 (colostrum) où ils représentent un ratio de 4 (Tableau 3).

Le VN quant à lui augmente d'un facteur 7 entre les stades L1 et L10.

En revanche, le nouveau variant de la caséine α_{s1} (Variant B) est toujours en quantité relative inférieure à celle du variant naturel aussi bien en L1 qu'en L10. On note cependant une diminution du Variant B au stade L10.

Tableau 3 : Quantification relative (% du total des pics du chromatogramme) des protéines majeures et génétiques des caséines α_{s1} et α_{s2} du lait de lapines PB à deux stades de lactation (L1 et L10).

Laits PB (n=30)	L1		L10		
	Moyenne	SEM	Moyenne	SEM	
α_{s2}	Var Nat	0,2	0,1	1,6	0,4
	Var B	0,5	0,1	1,4	0,4
	Var C	0,4	0,1	1,0	0,2
	Var B + Var C	0,8**	0,2	2,4***	0,4
α_{s1}	Var Nat	17,8***	2,4	17,4***	1,7
	Var B	8,0	2,0	5,8	1,6

Var Nat : Variant Naturel ; Var B : nouveau Variant B ; Var C : nouveau Variant C ; Var B + Var C : somme des 2 nouveaux Variants

2.3.23. Corrélation entre la nature des variants génétiques et la mortalité néonatale

2.2.3.1. Caséine α_{s2}

Les résultats des tests statistiques montrent une corrélation significative (test Mann-Whitney) entre la présence des allèles B ou C au locus de la caséine α_{s2} et la mortalité néonatale chez les lapereaux de la lignée PB (Tableau 4).

Tableau 4: Relation entre la mortalité néonatale et la présence des variants de la caséine α_{s2} chez les individus PB.

Génotypes	Taux de mortalité	Test Man-Whitney	Test Student
B/B	54,1 ± 3,0%	S	-
VN/B	15,4 ± 1,8 %	S	NS
VN/VN	11,7 ± 1,3 %	S	-
B/C	38,4 ± 4,5%	S	-

VN : Variant Naturel ; B : nouveau Variant B ; C : nouveau Variant C ; S : différence significative ; NS : différence non significative ;

Cette mortalité est plus forte chez les individus homozygotes (B/B) au locus de la caséine α_{s2} , que chez les individus hétérozygotes (B/VN) et (B/C).

Chez les individus hétérozygotes (B/C) le taux de mortalité reste élevé (38,4%), mais moins important

toutefois que chez les individus homozygotes (B/B, 15,4%).

Ces résultats suggèrent que la présence de l'allèle B de la caséine α_{s2} est associé à un taux de mortalité élevé, et l'allèle C de la caséine α_{s2} , entraîne également un effet délétère, mais toutefois moins marqué que celui de l'allèle B. L'allèle VN de la caséine α_{s2} , pour sa part, n'est pas associé à un caractère délétère puisque le taux de mortalité (11,7%) des individus homozygotes (VN/VN) correspond à un taux normal de mortalité dans une population d'élevage standard.

En revanche il est à noter que la présence de l'allèle VN associé à l'allèle B, entraîne une forte diminution de l'effet délétère de ce dernier (15,3 %).

2.2.3.2. Caséine α_{s1}

Les résultats des tests statistiques montrent également qu'il existe une corrélation positive, entre la mortalité néonatale des lapereaux PB et la présence de l'allèle B au locus de la caséine α_{s1} (Tableau 5). L'effet délétère de l'allèle B au locus de la caséine α_{s1} , semble toutefois moins marqué que celui de l'allèle B au locus de la caséine α_{s2} (respectivement $31,9 \pm 6,2\%$ et $54,1 \pm 3,0\%$).

Tableau 5 : Relation entre la mortalité néonatale et la présence du variant B de la caséine α_{s1} chez les individus PB.

Génotypes	Taux de mortalité	Test de Student
VN/B	$31,9 \pm 6,2\%$	S
VN/VN	$12,3 \pm 1,1\%$	NS

VN : Variant Naturel ; B : nouveau Variant B S : différence significative ; NS : différence non significative ;

Conclusion

Les résultats obtenus au cours de ce travail ont permis d'améliorer nos connaissances sur la relation entre la composition du lait et la viabilité précoce des lapereaux élevés par des lapines de la population blanche algérienne.

L'analyse de la fraction protéique du lait par LC-MS a permis de révéler l'existence de nouveaux variants génétiques des caséines α_{s2} et α_{s1} corrélés avec un fort taux de mortalité au cours de la période colostrale.

L'analyse des taux de mortalité au cours de cette période, suggère que les laits contenant le variant B de l' α_{s2} -caséine, sous forme homozygote (B/B), et le variant B de l' α_{s1} -caséine, même sous forme hétérozygote (VN/B) pourraient constituer l'un des éléments qui seraient responsables la mortalité précoce des lapereaux des portées PB.

Références bibliographiques

Amroun, T. ; Bianchi, L. ; Zerrouki-Daoudi, N. ; Bolet, G. ; Lebas, F. ; Charlier, M. ; Devinoy, E. ; Martin, P. ; Miranda, G. 2015. Caractérisation de la fraction protéique du lait produit par deux types génétiques de lapine de la région de Tizi Ouzou. *Journées de la Recherche Cunicole Le Mans (FRA)*. In : 16èmes Journées de la

Recherche Cunicole. Paris (FRA) : ITAVI-Institut Technique de l'Aviculture (Cuniculture Magazine).

Amroun T. T., Zerrouki-Daoudi N. et Charlier M. 2018. Mortalité de lapereaux de population blanche et de souche synthétique : effets des variations saisonnières et de la production laitière des lapines. *Livestock Research for Rural Development. Vol 30, Article 14*. Retrieved January 12, 2018, from <http://www.lrrd.org/lrrd30/1/thi130014.html>.

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.

Chibah-Ait-Bouziad 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 la 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.

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.

Lebas F., Gacem M., Meftah I., 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.

Martin P., Grosclaude F. 1993. Improvement of milk protein quality by gene technology. *Livestock Pro. Sci.*, 35: 95-115. *adrid*, VI, 481.

Miranda G., Bianchi L., Krupova Z., Trossat P., Martin P. 2020. An improved LC-MS method to profile molecular diversity and quantify the six main bovine milk proteins, including genetic and splicing variants as well as post-translationally modified isoforms. *Food Chemistry (under press)*.

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*.

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, September 3-6, Sharm-El-Sheikh, Egypt. ISSN: http://wordrabbitscience*.

Zerrouki N., Lebas F., Gacem M., Meftah I., Bolet G., 2014. Reproduction performances of a synthetic rabbit line and rabbits of local populations in Algeria, in 2 breeding locations. *World Rabbit Science*, 2014, 22: 269-278.