



# **LACTOSCAN,** *une composante majeure du projet* **PhénoFinLait**

**pour la détermination et la maîtrise  
de la composition du lait  
en acides gras et en protéines**

[www.phenofinlait.fr](http://www.phenofinlait.fr)

[phenofinlait@inst-elevage.asso.fr](mailto:phenofinlait@inst-elevage.asso.fr)

**PhénoFinlait**



# Contexte et problématique

**Le lait : une ressource alimentaire essentielle**, riche en acides gras, protéines, sucres divers, minéraux, microéléments

**L'image d'un produit naturel, mais qui tend à se dégrader** : allergie, acides gras saturés

**La demande des consommateurs évolue** vers plus de valeur santé

**Un besoin** : qualifier les composants fins du lait, maîtriser leur teneur

**=> Comment maîtriser la composition fine du lait, à grande échelle?**



# **Idée centrale** : le phénotypage MIR

Les laboratoires d'analyse du lait réalisent environ **25 millions d'analyses Moyen Infra Rouge** d'échantillons individuels par an pour estimer quelques **composants globaux (Taux Butyreux, Taux Protéique...)**

**Peut-on extraire plus d'information de ces données spectrales ?**  
Travaux précurseurs de l'Université de Gembloux

⇒ **Construire un système pour disposer des profils en AG et protéines à large échelle**

Un exemple de stratégie de **phénotypage à haut débit** :

- Grand nombre d'animaux
- Caractères variés : composition, état physiologique et santé des animaux

# Contexte : Sélection génomique

Etape 1 : établir les références  
pour traduire un génotype en index

Population de référence



Phénotypes + Génotypes  
et  
Enregistrements en élevage  
Qualité et Précision

Programmes de Phénotypage

Etape 2 : APPLICATION  
sur le terrain



Génotypage (sang, poils...)



INDEX (Lait, Cel, MO, Fer...)

dès la Naissance  
sans performance



# Les grandes étapes

- **Développement d'une méthode de mesure de référence pour les protéines**
- **Etablissement d'équations de prédiction des acides gras et protéines à partir de spectres MIR**
- **Collecte de données en ferme, complétant les SNIG**
  - Spectres MIR
  - Echantillons de sang et de lait
  - Enquêtes sur le système de production et l'alimentation
- **Génotypage des animaux**
- **Analyse statistique, génétique et phénotypique**

# Méthode de référence protéique

" profiling protéique « (Miranda, Martin)

## Cahier des charges:

- hautement **résolutive**, fiable et robuste
- **identifier et quantifier** principales lactoprotéines,  
6 lactoprotéines majeures: caséine  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\beta$ ,  $\kappa$ ,  $\beta$ -lactoglobuline et  $\alpha$ -lactalbumine  
4 lactoprotéines « secondaires »: lactoferrine, lactoperoxidase, sérum albumine (SA) et sérum amyloïde A3 (SAA3)
- distinguer les différentes isoformes  
Variants génétiques et variants d'épissage (caprins, ovins)  
Modifications post-traductionnelles (glycosylation-phosphorylation)  
Produits de protéolyse de la caséine  $\beta$  par la plasmine (essentiellement caséines  $\gamma$ )
- éventuellement adaptable à des analyses à grande échelle

## Choix technologique

RP-HPLC couplée à la Masse (LC-MS)

Ultimate 3000  
(Dionex)



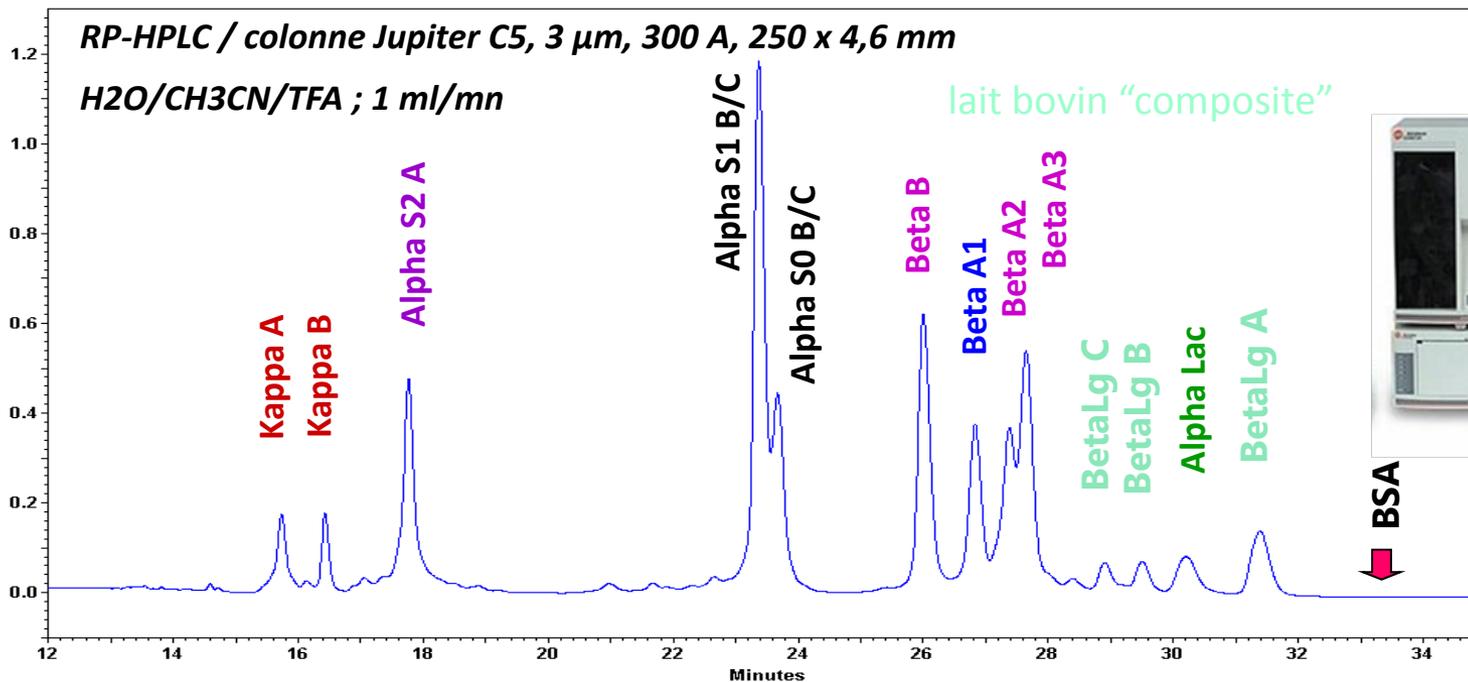
MicroTOF focus  
(Bruker)



# Analyse Quantitative

## Lactoprotéines majeures

**RP-HPLC** : quantification par intégration de la surface des pics UV à 214 nm (en % de la surface totale des pics du chromatogramme)



# Analyse Qualitative :

## Lactoprotéines majeures et leurs isoformes (variants génétiques et d'épissage, MPT, produits d'hydrolyse)

- Identification par confrontation des masses observées à des masses théoriques contenues dans une database.
- Création d'une base de données de masse des « lactoprotéines » pour chaque espèce : bovins et ovins

Ultimate 3000  
(Dionex)



MicroTOF focus  
(Bruker)

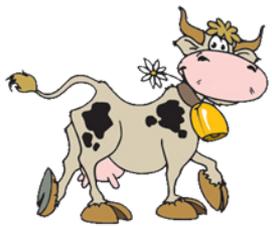
### Database bovine: (3000 masses indexées non redondantes)

- ✓ 9 protéines : caséines ( $\kappa$ ,  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$ ),  $\beta$ -Lg,  $\alpha$ -la, SA, lactoferrine et lactoperoxydase
- ✓ variants génétiques connus et rapportés dans la littérature
- ✓ isoformes de phosphorylation et de glycosylation (cas  $\kappa$ )
- ✓ principaux produits de dégradation (caséines  $\gamma$ ).

Dépôt auprès de l'APP 17 novembre 2011

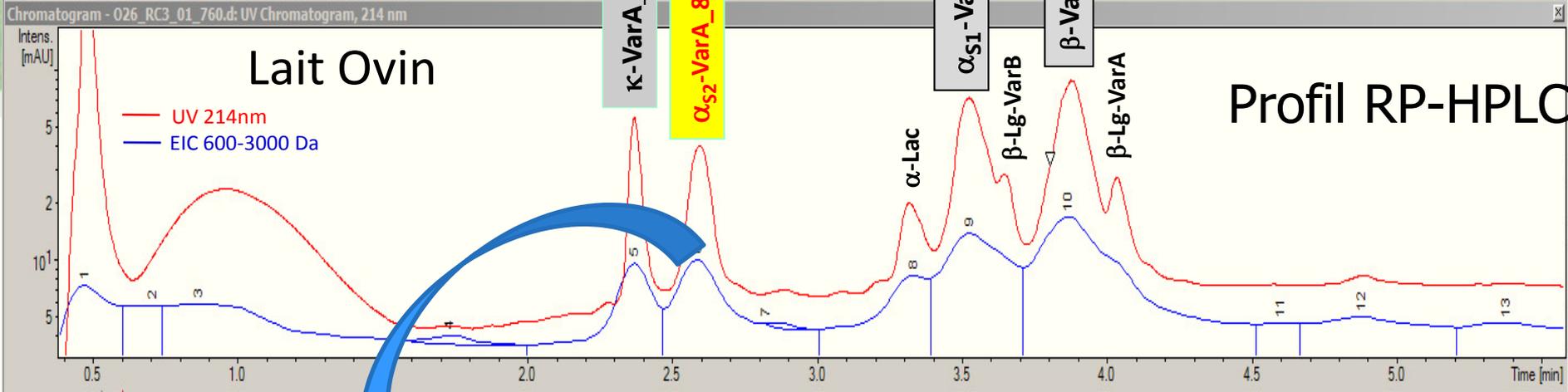
### Databases ovine : 1700 masses indexées non redondantes

Moins complète que la database bovine (dépôt auprès de l'APP courant 2012)

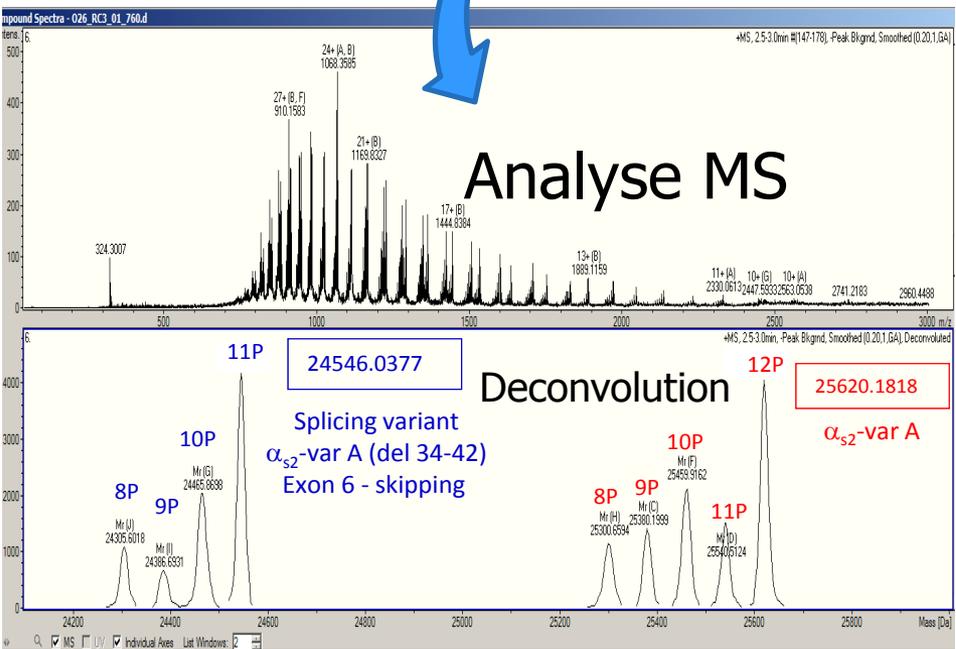




# LC-MS milk proteins profiling



Profil RP-HPLC

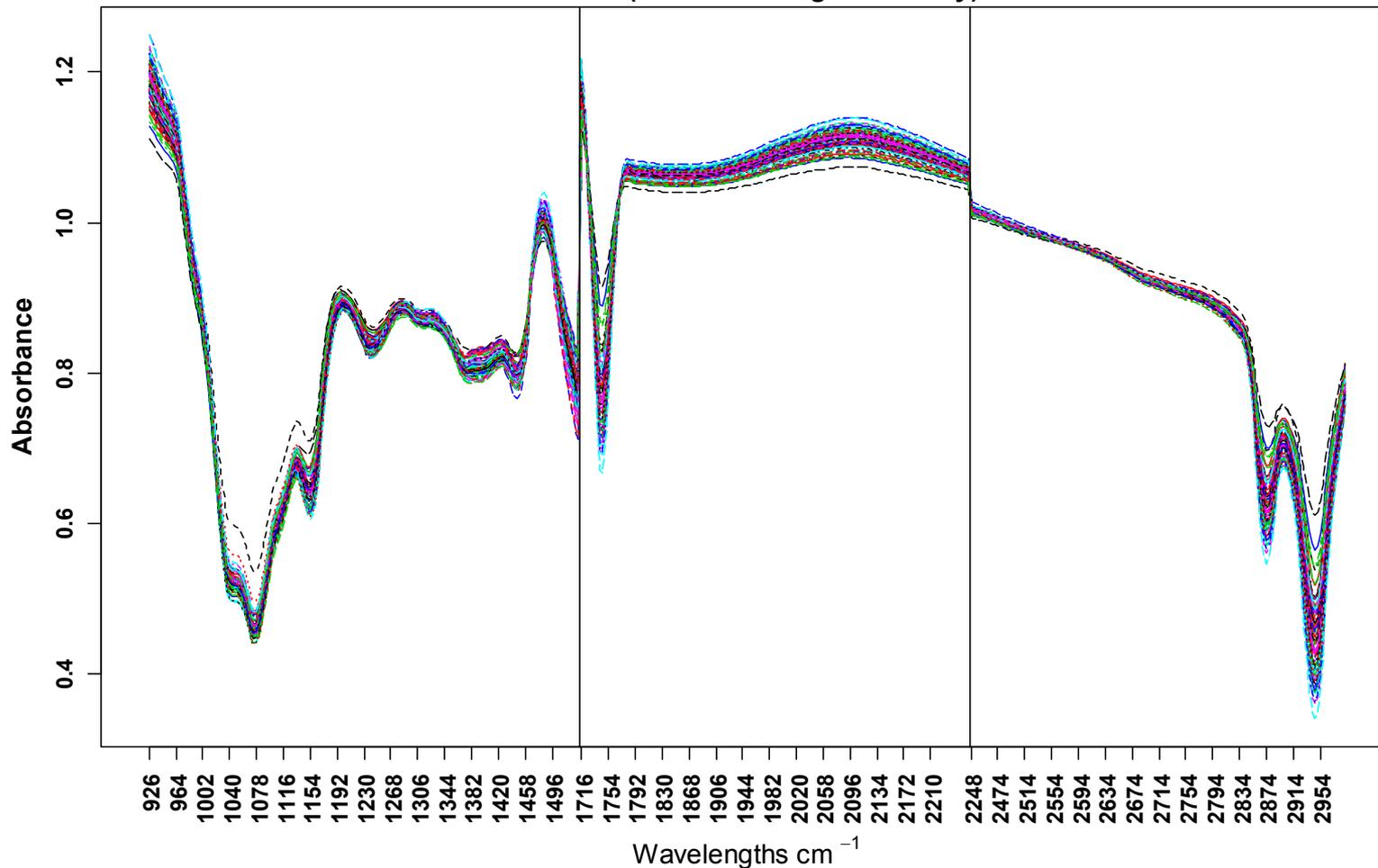


Lait Bovin: 25 molécules identifiées

- 5 isoformes  $\kappa$ -Cn (1 à 3 glycosylations)
- 2 isoformes  $\kappa$ -Cn (niveau de phosphorylation)
- 5 isoformes  $\alpha_{s2}$ -Cn (phosphorylation)
- 2 isoformes  $\alpha_{s1}$  et  $\beta$ -Cn (phosphorylation)
- 1 variant d'épissage  $\alpha_{s1}$ -Cn ( $\Delta Q78$ )
- 2 variants génétiques  $\beta$ -Lactoglobuline
- 1 variant génétique  $\alpha$ -Lactalbumine
- 5 fragments  $\beta$ -Cn ( $\gamma$ -Cn et fragments complémentaires issus de la protéolyse de la plasmine)

# Prédiction de la composition du lait

Spectrum from 75 cow milk samples (UE INRA Mirecourt + Domaine du Pin)  
MilkoScan FT6000 (Foss Electric, Hillerod, Denmark)  
LILANO (Milk recording laboratory)





# Echantillons de référence et analyses

- Choisis pour leur grande variabilité
- Analysés en CPG pour les AG, en RP-HPLC + LC-MS pour les protéines
- 354 échantillons bovins (le Pin, Mirecourt)
- 200 échantillons ovins (la Fage, élevages commerciaux)
- 300 échantillons caprins (Bourges, élevages commerciaux)
  
- Analyse par PLS avec sélection de variable (algorithme génétique)  
(Ferrand et al)

# Résultats de prédiction (vache)

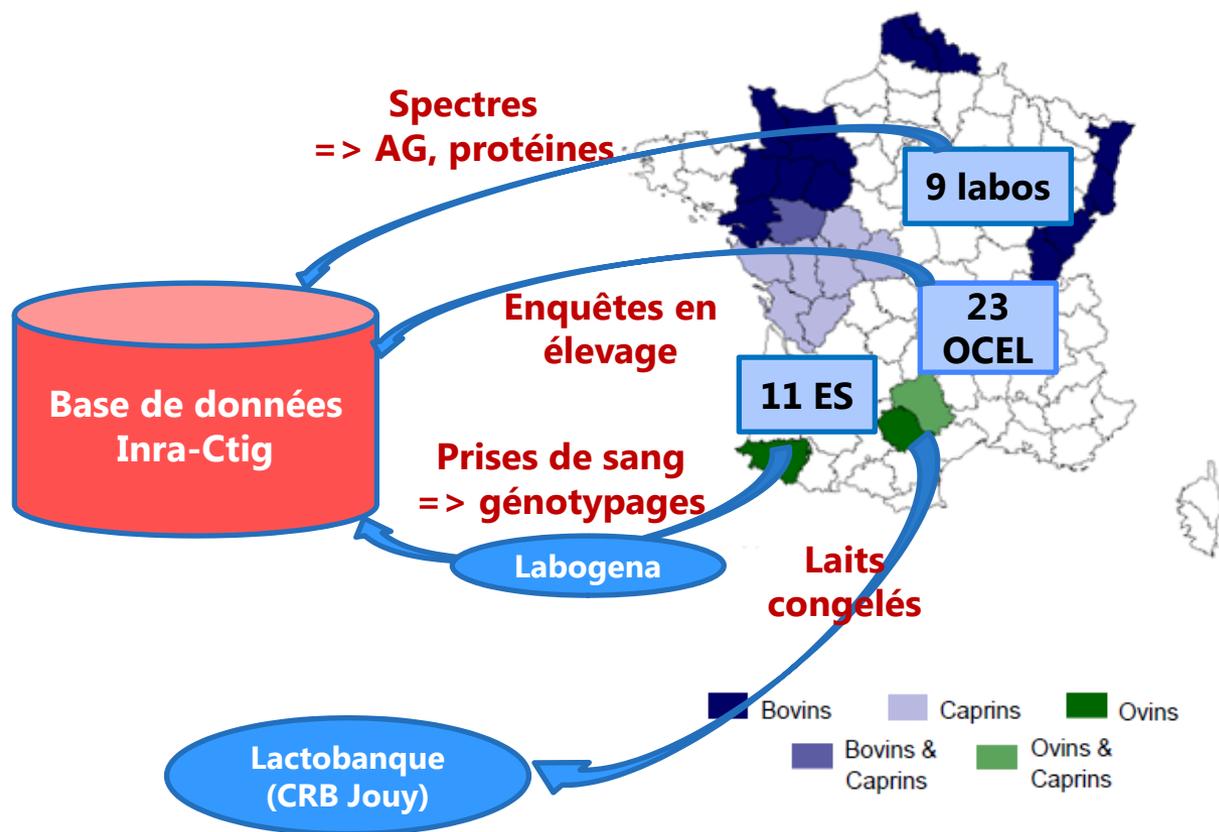
	Moy	Ec Type	Erreur relative(%)	R <sup>2</sup>
<b>Taux butyreux</b>	<b>3,816</b>	<b>0,637</b>	<b>0,32</b>	<b>1,00</b>
<b>C4:0</b>	<b>0,149</b>	<b>0,025</b>	<b>5,71</b>	<b>0,88</b>
<b>C6:0</b>	<b>0,087</b>	<b>0,015</b>	<b>3,97</b>	<b>0,95</b>
<b>C8:0</b>	<b>0,050</b>	<b>0,010</b>	<b>5,00</b>	<b>0,94</b>
<b>C10:0</b>	<b>0,111</b>	<b>0,029</b>	<b>6,92</b>	<b>0,93</b>
<b>C12:0</b>	<b>0,126</b>	<b>0,037</b>	<b>11,12</b>	<b>0,86</b>
<b>C14:0</b>	<b>0,435</b>	<b>0,088</b>	<b>6,10</b>	<b>0,91</b>
<b>C16:0</b>	<b>1,271</b>	<b>0,282</b>	<b>6,41</b>	<b>0,92</b>
<b>C18:0</b>	<b>0,342</b>	<b>0,099</b>	<b>12,58</b>	<b>0,81</b>
<b>Total 18:1</b>	<b>0,780</b>	<b>0,203</b>	<b>6,70</b>	<b>0,93</b>
<b>Saturatés</b>	<b>2,766</b>	<b>0,510</b>	<b>2,09</b>	<b>0,99</b>
<b>Monoinsaturés</b>	<b>0,889</b>	<b>0,220</b>	<b>5,80</b>	<b>0,95</b>
<b>Polyinsaturés</b>	<b>0,107</b>	<b>0,019</b>	<b>8,06</b>	<b>0,80</b>
<b>Omega 3</b>	<b>0,029</b>	<b>0,010</b>	<b>16,24</b>	<b>0,77</b>
<b>Omega 6</b>	<b>0,075</b>	<b>0,016</b>	<b>11,23</b>	<b>0,72</b>



# Résultats de prédiction (vache)

Protéines	Moy	Ec type	Ec Type résiduel relatif	R <sup>2</sup>
<b>Caséines</b>	<b>2.457</b>	<b>0.269</b>	<b>3.72</b>	<b>0.89</b>
<b>κ-CN</b>	<b>0.316</b>	<b>0.052</b>	<b>10.89</b>	<b>0.60</b>
<b>αS2-CN</b>	<b>0.237</b>	<b>0.041</b>	<b>10.29</b>	<b>0.65</b>
<b>αS1-CN</b>	<b>0.861</b>	<b>0.099</b>	<b>6.32</b>	<b>0.71</b>
<b>β-CN</b>	<b>1.041</b>	<b>0.132</b>	<b>6.04</b>	<b>0.77</b>
<b>Protéines sériques</b>	<b>0.387</b>	<b>0.06</b>	<b>9.35</b>	<b>0.63</b>
<b>α-LA</b>	<b>0.123</b>	<b>0.018</b>	<b>10.9</b>	<b>0.48</b>
<b>β-LG</b>	<b>0.263</b>	<b>0.054</b>	<b>15.29</b>	<b>0.45</b>

# Collecte de données en élevage





# Bilan de la Collecte en élevage

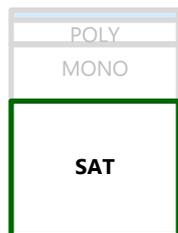
(automne 2009 – automne 2010)

- Elevages et effectifs selon les espèces

Espèce	Bovine	Ovine
Elevages	1 000	160
Enquêtes	7 900	960
Femelles avec spectres	88 000	20 000
Spectres	425 000	119 000
Femelles prélevées	12 000	3 400
Echantillons de lait	30 000	10 000

NB : les caprins sont hors Lactoscan

# Estimation d'héritabilité par contrôle



Total Fat

$h^2 = 0.18$  à  $0.39$

1	g/100g lait	MO	NO	HO
	C14:0	0.35	0.38	0.29
	C16:0	0.32	0.34	0.28
	C18:0	0.20	0.18	0.21
	<b>Total SAT</b>	<b>0.32</b>	<b>0.34</b>	<b>0.28</b>



Total Fat

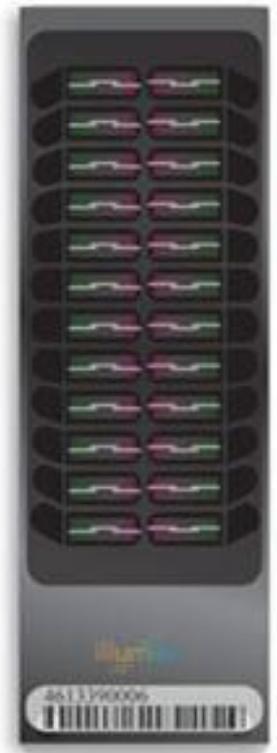
$h^2 = 0.10$  à  $0.24$

2	g/100g lait	MO	NO	HO
	C18:1c9	0.13	0.16	0.11
	C18:2c9t11	0.17	0.14	0.11
	<b>MONO</b>	<b>0.13</b>	<b>0.18</b>	<b>0.15</b>
	<b>POLY</b>	<b>0.21</b>	<b>0.24</b>	<b>0.22</b>

**$h^2$  SAT >  $h^2$  UNSAT**

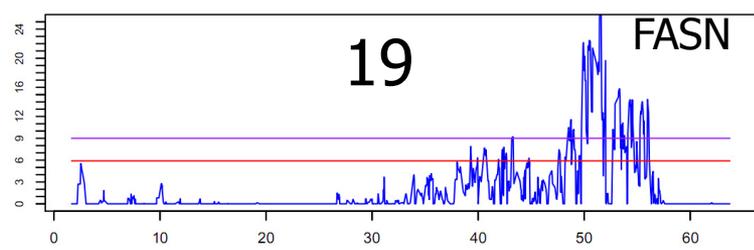
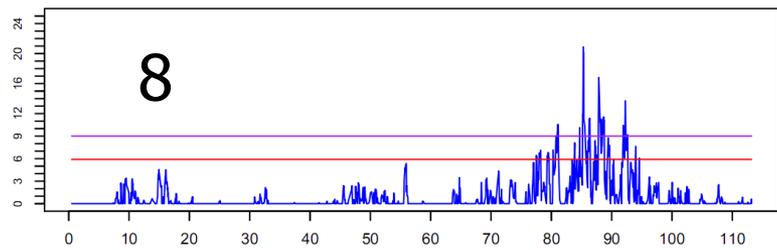
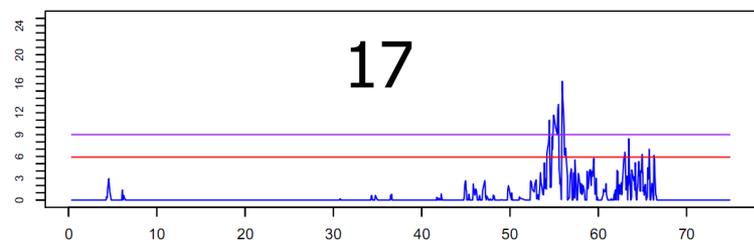
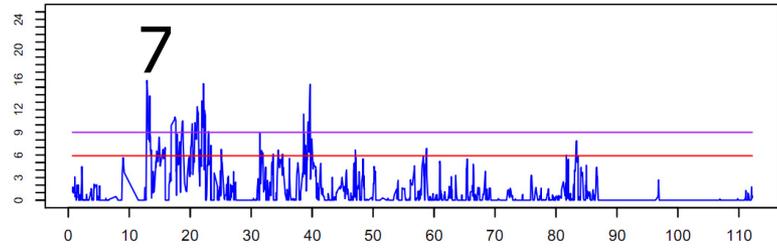
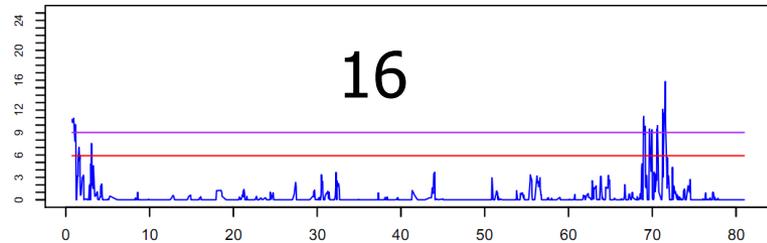
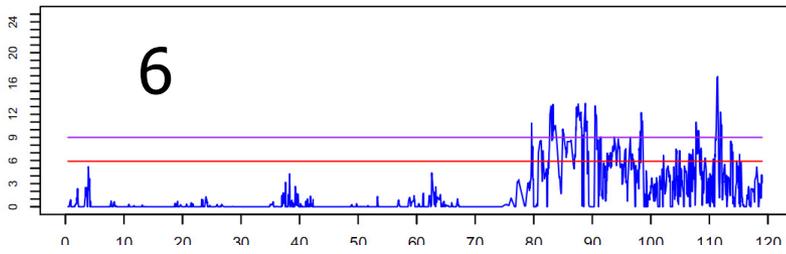
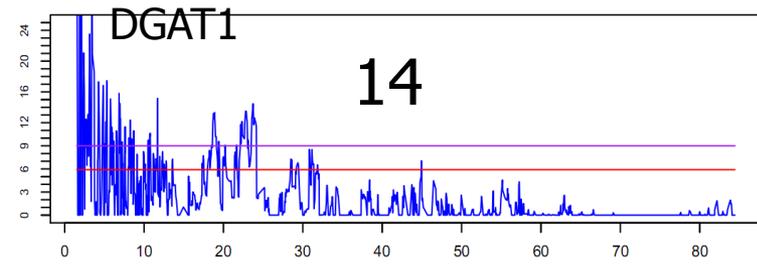
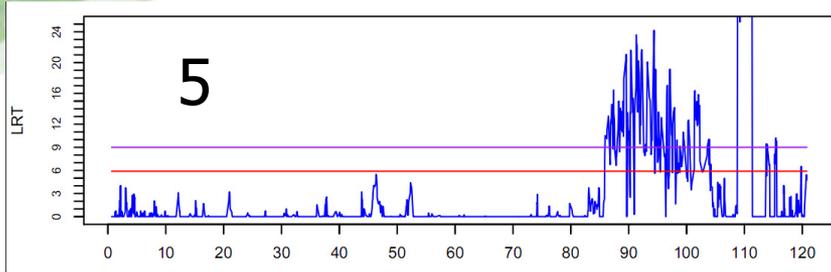
# Génotypage (réalisé par Labogena)

- Le projet prévoyait d'utiliser la meilleure technique du moment, avec au minimum 1500 SNP
- baisse des prix, apport de financement complémentaire, et synergie avec Amasgen
- ⇒ Pour l'essentiel, utilisation de puces Illumina 50k (>50 000 SNP) pour les ovins comme pour les bovins
- ⇒ Complément fin 2011 de 500 analyses bovines avec la nouvelle puce LD (7k) et imputation
- Analyse (d'association et LDLA) en cours



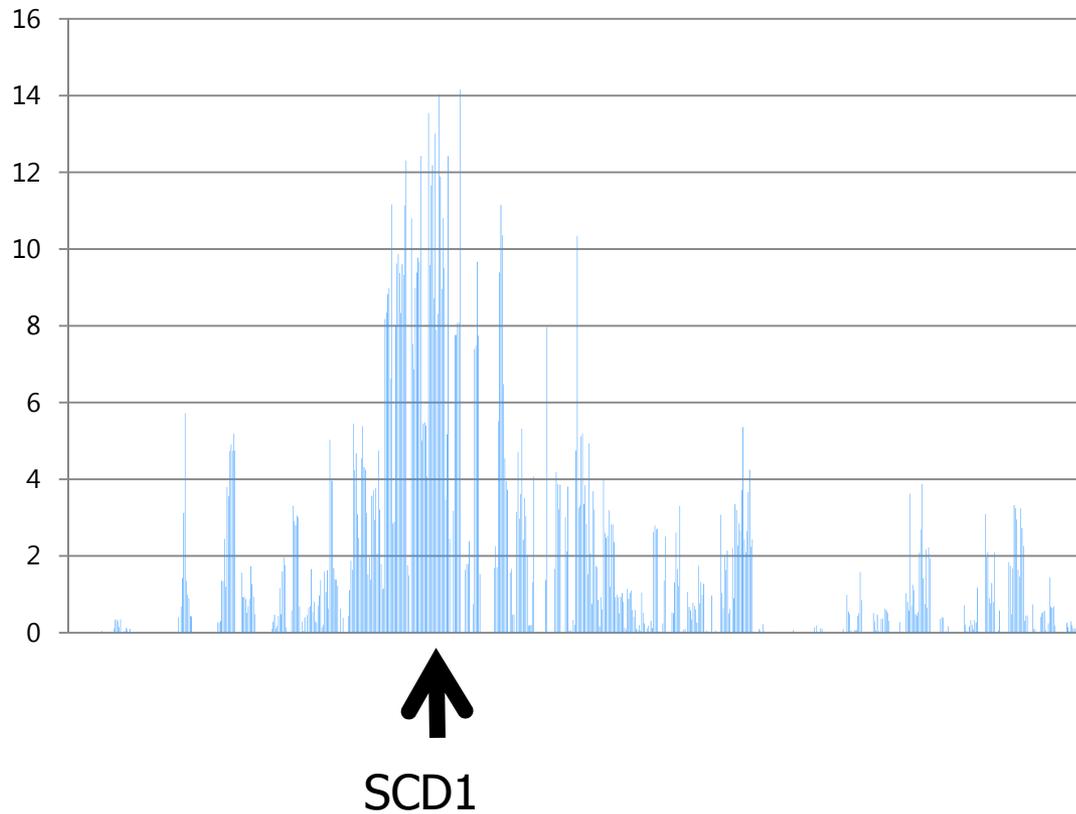


# Taux d'insaturés, race Normande





## Taux d'AG insaturés, Race Normande, Chromosome 26





# Conclusion

- **Un programme ambitieux mais complexe dans son organisation**
- Difficile à présenter en 15 mn
- Tout n'est pas encore fini, gros travail durant 2012
  - Améliorer la précision des mesures de protéines
  - Finaliser les analyses génétiques

=> Année de prolongation
- Méthodes de référence et méthodes opérationnelles à grande échelle
- Bases d'une connaissance précise de la composition fine du lait et de sa maîtrise/amélioration
- Base de données et d'échantillons riche pour l'avenir
- Première population de référence pour la composition fine du lait



# PARTENAIRES



# FINANCEMENTS

