



Etat d'avancement du programme PhénoFinlait

Version validée suite au comité de Pilotage du 03/04/2012

Contact : phenofinlait@idele.fr

Sommaire

Enjeux et objectifs du programme	1
SP1 : Conditions d'utilisation en routine des données spectrales du moyen infra-rouge (MIR)	1
SP2 : Equations d'estimation de la composition en AG du lait – disponibles pour toutes les espèces.	2
SP3 : Une méthode de référence pour les protéines très prometteuse	3
SP4 : Une vaste campagne de collecte de données dans 1 500 élevages	3
SP5 : Génotypage et analyse des facteurs génétiques et environnementaux	4
SP6 : 2012, enrichissement du conseil en élevage	4

Enjeux et objectifs du programme

En se regroupant au sein du consortium PhénoFinlait, les acteurs des filières laitières des 3 espèces de ruminants (bovins, caprins et ovins) mettent en commun leurs moyens pour mieux qualifier, maîtriser et valoriser la composition fine du lait. L'objectif est de mettre en relation la composition fine du lait en acides gras (AG) et protéines avec le génotype des animaux d'une part, et la conduite d'élevage d'autre part. Pour cela, le programme s'organise autour de sous-projets (SP), pour couvrir les différents objectifs suivants : mesurer en routine, à grande échelle et à faible coût la composition fine du lait en AG et protéines, collecter massivement des données et échantillons biologiques, génotyper une partie des animaux, déterminer les effets génétiques et environnementaux impactant la composition fine du lait et enfin valoriser les résultats obtenus en particulier pour enrichir le conseil en élevage.

SP1 : Conditions d'utilisation en routine des données spectrales du moyen infra-rouge (MIR)

-Le recours à la congélation ou l'utilisation de bronopol ne remet pas en cause l'analyse du lait

Les travaux ont montré peu, voire pas, d'effet de la congélation ou de l'utilisation de conservateurs (Bronopol sous différentes formes) sur les analyses des laits bovins, caprins ou ovins en chromatographie en phase gazeuse (CPG, pour déterminer la composition en AG du lait) ou en chromatographie liquide à haute performance (HPLC, pour déterminer la composition en protéines du lait).

Il a été constaté un effet significatif du conservateur sur les spectres obtenus dans le moyen infra-rouge (MIR), mais il est compensable au niveau du calibrage sans adaptation particulière. L'effet de la congélation reste faible à -80°C mais génère à -20°C une plus forte proportion de laits altérés (huileux) que l'on peut minimiser par un refroidissement préalable des échantillons de lait avant congélation.

- Essais inter-laboratoires : un dispositif de recalage des analyseurs est nécessaire

Les essais inter-laboratoires ont mis en évidence la nécessité de mettre en place une procédure d'étalonnage (ou recalage) en raison d'un effet notable du spectromètre. Actilait a alors établi et mis en œuvre avec les laboratoires un dispositif de recalage s'appuyant sur l'analyse de laits témoins (analysés tous les 15 jours pendant la période de collecte PhénoFinlait). Pour l'analyse des données (SP5), la méthode utilisée a été un recalage des valeurs prédites pour les différents AG.



SP2 : Equations d'estimation de la composition en AG du lait – disponibles pour toutes les espèces.

- Des jeux d'équations utilisables en routine

Le SP2 a permis l'établissement de jeux d'équations d'estimation de la composition en AG du lait à partir des spectres obtenus par les spectromètres des constructeurs Foss® (laits bovin, caprin et ovin) et Bentley® (en bovin uniquement). Le tableau suivant résume la précision des équations.

	Nb éq.	Qualité de la prédiction			
		Très bonne (R ² >95% et RSE<5%)	Bonne (R ² >80% et RSE<10%)	Correcte (R ² >80% et RSE<15%)	Utilisables plutôt en classe
Foss®					
Bovin	96	MG, C4:0, C6:0, C8:0, C14:0, C16:0, C18:1 cis9, AGS, AGMI, sommes d'AG	C10:0, C12:0, C18:0, AGPI, AG oméga 6, AG oméga 7	total C18 :1 trans et des omégas 3	C18:2 cis9 trans11, C18:3 n-3, C24:0, LA/ALA, oméga6/oméga3, C18:1 trans10/C18:1 trans11
Caprin	91	MG, C4:0, C6:0, C8:0, C10:0, C14:0, C16:0, C18:1 cis9, total C18:1, AGS, AGI, AGMI, AGPI, total oméga 6 et les sommes d'AG		C18:2 cis9 cis12, C18:2 cis9 trans12, AG trans, oméga 3, oméga 7	
Ovin	91	MG, C4:0, C6:0, C8:0, C10:0, C12:0, C14:0, C16:0, C18:1 cis9, AGS, AGMI, AGPI, total C18:1, total C18:2		C15:0, C18:0, total C18:1trans, total C18:3, AG trans, AG oméga 3, AG oméga 6	
Bentley®					
Bovin	96	MG, C6:0, C8:0, C14:0, AGS, AGI, sommes d'AG	C4:0, C10:0, C12:0, C16:0, C18:1 cis9, AGMI		

R² : coefficient de détermination, RSE : erreur résiduelle

Comme on peut le constater dans le tableau récapitulatif, quelles que soient l'espèce et la marque de l'analyseur, de nombreuses équations d'estimation à partir des spectres MIR sont disponibles avec une précision élevée (bonne ou très bonne). Plusieurs autres AG sont prédictibles et utilisables pour étudier le déterminisme du caractère concerné, mais sont prédits avec trop d'imprécision pour être utilisable en routine sauf à envisager un regroupement en classes.

Il apparaît, en bovin, que les équations portant sur les spectres des analyseurs de marque Bentley® sont moins précises en raison d'une base de données de référence plus réduite. La précision est également en moyenne plus faible en caprin. La collecte et l'analyse de 150 échantillons de référence supplémentaires est en cours.

- Un recalage possible dans presque tous les cas

Pour l'analyse du déterminisme de la composition du lait en AG (SP5), le recalage des estimations des différents AG a été réalisé à partir des laits témoins (dont la composition en AG était connue en CPG). Ce recalage fonctionne bien pour les échantillons de laits bovins et ovins passés sur des analyseurs de marque Foss®. En raison d'une mauvaise application du protocole de passage des échantillons témoins, le recalage n'est pas satisfaisant pour les laits caprins. Les travaux SP5 intégreront donc un effet analyseur dans les modèles d'analyse de données. Pour les échantillons de lait bovin passés sur les analyseurs de marque Bentley® nous avons choisi de ne pas appliquer de recalage des estimations pour des raisons similaires aux analyses caprines et parce que les estimations non recalées sont cohérentes entre analyseurs.

- Equations validées sur laits de tank en bovin dans le cadre d'AgraMir

La répétabilité et la justesse de 18 équations établies sur laits individuels enrichis de 75 laits de tanks ont été évaluées dans le cadre d'AgraMir (porté par le Cniel). 7 équations (AGS, AGMI, AGPI, AGI, C16:0, C18:0 et C18:1 c9) ont été jugées de qualité équivalente voire meilleure que les équations des constructeurs Foss® et Bentley®, également évaluées dans ce programme. 9 autres équations portant sur le C4:0, C6:0, C8:0, C10:0, C12:0, C14:0, somme AG pairs du C4 au C10, C16:0/total AGS, somme des AGS pairs ≤ C16:0 ont été jugées de bonne qualité. Les équations pour le C18:3 n-3 et les AG trans sont nettement moins précises.

Notons pour conclure que les partenaires du consortium sous le pilotage du Cniel travaillent au déploiement des équations PhénoFinlait au sein des laboratoires interprofessionnels. Une 1^{ère} utilisation de ces équations, en dehors du programme PhénoFinlait, est la collaboration avec le programme OptiMir.



SP3 : Une méthode de référence pour les protéines très prometteuse

Ce sous-projet se compose de deux parties : le développement d'une méthode de référence pour l'analyse de la fraction protéique des laits et le développement d'équations permettant d'estimer la quantité des lactoprotéines majeures à partir des spectres MIR.

- Développement d'une méthode de référence hautement résolutive

La méthode de référence retenue pour le programme PhénoFinlait et développée au laboratoire Inra Gabi-LGS, repose sur la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS). Cette méthode est actuellement la plus résolutive. Les données issues de l'analyse d'un lait écrémé se présentent sous la forme d'un chromatogramme UV (LC) et de l'enregistrement d'un courant ionique, définissant des composés dont on extrait le spectre de masse. Cette méthode d'analyse permet de déterminer avec une grande précision les masses de toutes les molécules en mélange dans le composé. Les masses ainsi mesurées sont confrontées à des masses théoriques consignées dans une base de données construite par l'équipe de recherche Gabi-LGS, pour chaque espèce.

De cette façon il est possible d'identifier au sein d'un composé les protéines présentes (généralement une famille de protéines ; e.g. la caséine beta ou la caséine alpha-s1) et d'identifier également leurs variant(s) génétique(s), les isoformes d'épissage, les modifications post-traductionnelles (phosphorylation, glycosylation) et éventuellement leur degré de protéolyse. Ainsi, dans cette base de données, sont référencées pour les 4 caséines, l'alpha-lactalbumine, la beta-lactoglobuline et la séralbumine plus de 3 000 masses pour l'espèce bovine, 2 100 pour l'espèce caprine et environ 1 100 pour l'espèce ovine. Cette analyse qualitative est actuellement couplée à une analyse quantitative qui porte essentiellement sur les classes de protéine et la plupart des variants génétiques. L'analyse quantitative de toutes les isoformes fait actuellement l'objet d'un développement en partenariat avec la société Brüker qui commercialise le spectromètre de masse.

- Des équations permettant d'utiliser le spectre MIR pour déterminer les teneurs en caséines du lait

Les premiers travaux de développement d'équations d'estimation des principales protéines du lait à partir des données spectrales MIR montrent que les caséines prises individuellement par rapport aux protéines sériques sont relativement bien prédites. Le degré de protéolyse est en revanche très mal estimé par cette méthode. L'identification des variants génétiques et de leur concentration est également difficile dans l'ensemble. Les équations sont finalisées en ovine et sont en cours d'amélioration en bovine (grâce à l'ajout de 150 nouveaux échantillons) et en caprine.

SP4 : Une vaste campagne de collecte de données dans 1 500 élevages

Le phénotypage à grande échelle et la collecte des données et échantillons en fermes commerciales a été possible grâce à la mise en place d'un vaste dispositif de collecte impliquant largement les acteurs de terrain (Organismes de Conseil en Elevage, Laboratoires et Entreprises de Sélection et de Mise en Place), la formation des agents, la création d'un outil d'enquête en élevage, la création d'une base de données nationale permettant de stocker pour chaque élevage et chaque animal toutes les informations enregistrées, adossée à un serveur de données ouvert 24h/24h, 7j/7j, la mise en place d'une LactoBanque (CRB-GADIE, INRA) et d'une équipe de coordination nationale.

La collecte des données s'est effectuée entre novembre 2009 et novembre 2010 dans 1 528 élevages (1 157 en bovine, 209 en caprine et 162 en ovine) sélectionnés à partir du nombre de femelles d'intérêt qu'ils comportaient. Ces femelles d'intérêt, appelées « femelles PhénoFinlait », ont été choisies selon leurs pères (jeunes mâles d'insémination animale représentatifs de la diversité des races holstein, montbéliarde, normande, alpine, saanen, lacaune et manech tête rousse) pour permettre l'analyse du déterminisme génétique des caractères de composition fine du lait. La collecte des informations d'alimentation (collective, et pour les vaches PhénoFinlait, également individuelle) et des spectres MIR a concerné l'ensemble des femelles de l'élevage. Des échantillonnages de sang et de lait ont été réalisés et stockés pour les femelles PhénoFinlait.

En bilan, la base de données PhénoFinlait contient 862 769 spectres MIR (dont 93 147 concernant des femelles PhénoFinlait), associés à 8 508 enquêtes d'alimentation. En parallèle, ont été stockés 18 005



échantillons de sang (9 901 en bovin, 4 364 en caprin et 3 654 en ovin), 40 647 aliquotes de lait conservés en LactoBanque à -80°C (correspondant à 9 180 prélèvements en bovin, 1 075 en caprin et 3 294 en ovin) et 2 787 échantillons de lait de tank (2 149 en bovin, 308 en caprin et 330 en ovin).

SP5 : Génotypage et analyse des facteurs génétiques et environnementaux

Le génotypage des femelles PhénoFinlait à partir des échantillons de sang collectés est terminé pour les bovins (7 500 génotypages réalisés sur puce 54k SNP Illumina et 500 sur puce LD (low density, 7k SNP Illumina)), pour les ovins (1 651 génotypages et 500 pour lesquels il reste à trouver des financements) et pour les caprins (2 274 génotypages).

Les analyses des données génétiques en bovin et caprin montrent que la composition en AG du lait est un caractère héritable, confirmant l'intérêt des leviers génétiques pour maîtriser la composition fine du lait en AG. Les héritabilités sont majoritairement de 0,20-0,30 ce qui est conforme à la littérature. Chez les bovins, les héritabilités sont plus élevées lorsque la composition en AG du lait est exprimée en g/100g de lait, alors que chez les caprins elles sont un peu plus élevées lorsqu'elles sont exprimées en g/100g de MG. L'analyse du déterminisme génétique selon le stade de lactation révèle que les mécanismes en jeux varient peu au cours de la lactation à l'exception du tout début de lactation en lien avec les aspects de mobilisation des réserves corporelles.

L'analyse du jeu de données « alimentation » a consisté en une phase de consolidation des données, une phase de typologie pour identifier les systèmes d'élevage et une phase d'identification des facteurs impactant la composition en AG du lait. Après consolidation, les analyses ont porté sur une sélection de 4 825 enquêtes d'alimentation dans 945 élevages bovins, 590 enquêtes provenant de 194 élevages caprins et 727 enquêtes issues de 160 élevages ovins.

La typologie a permis de définir 15 classes de systèmes d'élevage chez les bovins, 11 chez les caprins et 7 chez les ovins. Ces classes se distinguent par la dominance dans les régimes alimentaires de certains fourrages : foin, ensilage de maïs, ensilage d'herbe, paille, pâturage, etc. L'analyse des données confirme pour les 3 espèces l'effet de l'alimentation sur les teneurs en AG du lait. Néanmoins, les écarts observés entre régimes sont plus modérés que dans la littérature (souvent obtenues en fermes expérimentales, c'est-à-dire dans des systèmes très contrôlés et standardisés), ce qui met en évidence la diversité des rations distribuées pour un type de régime donné. En plus de l'alimentation, cette étude a également permis de mettre en évidence des effets stade de lactation, rang de lactation, mois de mise bas et mois de contrôle sur les teneurs en AG du lait individuel en bovin et caprin, et du lait de tank en ovin.

Parmi les laits de tank, collectés deux fois dans l'année (en hiver et en été), 2 102 échantillons bovins, 305 échantillons caprins et 329 échantillons ovins ont été à la fois analysés en MIR (laboratoires d'analyse du SP4) et en proche infra-rouge (SPIR) à l'INRA de Theix. Ces échantillons sont caractérisés par leurs conditions de production. Si le fourrage représente 65% de la ration, les premières analyses en bovin montrent que la spectrométrie MIR permet de mieux discriminer les échantillons que la SPIR dans les comparaisons « herbe pâturée *versus* foin » et « herbe pâturée *versus* ensilage de maïs ». Les 2 méthodes d'analyses sont comparables dans la discrimination des échantillons suivant l'altitude, et suivant la race dans la comparaison « holstein *versus* montbéliarde ». Un travail comparable est en cours sur les laits de tank ovins et caprins.

SP6 : 2012, enrichissement du conseil en élevage

Ce sous-projet valorisera les résultats qui viennent d'être produits sur la partie « analyse des facteurs non génétiques, alimentaires en particulier » du SP5, pour déterminer les voies d'enrichissement du conseil en élevage avec l'exploitation d'analyses en routine au niveau individuel de la composition fine du lait. Ces travaux sont prévus en 2012.

Un document de synthèse par filière est en cours d'élaboration avec pour échéance la journée de restitution PhénoFinlait du 28 novembre 2012.