

CASDAR RT 1726 BIOMARQ'LAIT

Identification dans le lait de biomarqueurs pour le monitoring du statut nutritionnel de la vache laitière

Rapport final du projet (2017-2022) – Volet technique



Collection

Résultats

Responsable de la rédaction :

Marine Gelé, Idele

Equipe de rédaction :

Marion Boutinaud, INRAE

Antoine Leduc, Idele / INRAE

Fabienne Le Provost, INRAE

Christine Leroux, INRAE

José Pires, INRAE

Jocelyne Guinard-Flament, Institut Agro Rennes-Angers

Marie-Pierre Jacqueroud, Idele

Mise en page :

Jenny Lefeuvre, Idele

1- Objectifs du projet

Le projet BIOMARQ'LAIT visait à identifier des molécules mesurables dans le lait permettant par une approche non-invasive de déterminer la capacité d'adaptation des vaches laitières à un déficit énergétique. Puis, de développer une méthode permettant d'utiliser ces biomarqueurs sur le terrain. Cet outil de monitoring du statut nutritionnel des vaches laitières devait constituer pour l'éleveur un levier lui permettant d'adapter au cas par cas l'alimentation de ses animaux afin d'éviter les troubles métaboliques classiquement observés au début de la lactation et de faire en sorte que celle-ci se poursuive dans les meilleures conditions. Les nouvelles références acquises dans ce projet visaient à être transmises à la filière par le biais des acteurs du conseil en élevage et via l'enseignement agronome et agricole.

Le projet était divisé en quatre Actions, elles-mêmes subdivisées en Tâches (figure 1) :

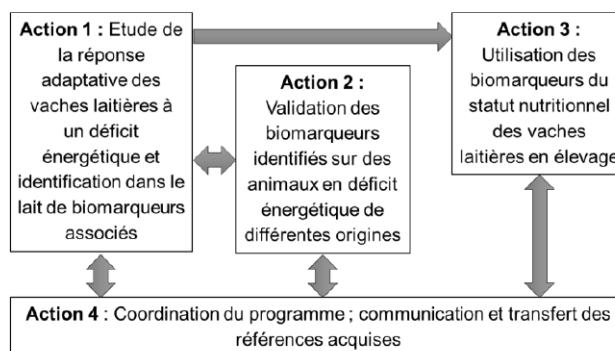


Figure 1 : Organisation générale du projet

- **Action 1 : Etude de la réponse adaptative des vaches laitières à un déficit énergétique et identification dans le lait de biomarqueurs associés**
 - Tâche 1.1 : Caractérisation de la réponse adaptative des animaux dans le lait et le sang
 - Tâche 1.2 : Recherche de biomarqueurs innovants dans différentes fractions du lait
 - Tâche 1.3 : Intégration des données pour identifier des nouveaux biomarqueurs potentiels de la réponse adaptative des vaches laitières à un déficit énergétique
- **Action 2 : Validation des biomarqueurs identifiés sur des animaux en déficit énergétique de différentes origines**
 - Tâche 2.1 : Evaluation des biomarqueurs sur des vaches en début de lactation
 - Tâche 2.2 : Validation des biomarqueurs sur des vaches subissant une réduction de l'apport énergétique
- **Action 3 : Utilisation des biomarqueurs du statut nutritionnel des vaches laitières en élevage**
 - Tâche 3.1 : Estimation du risque de déficit énergétique par les éleveurs et leurs techniciens
 - Tâche 3.2 : Développement d'un outil pour un monitoring à haut débit du statut nutritionnel et métabolique des vaches laitières via des analyses fines du lait
 - Tâche 3.3 : Elaboration d'outils d'aide à la décision et de supports de formation
- **Action 4 : Coordination du programme ; communication et transfert des références acquises**
 - Tâche 4.1 : Coordination du programme
 - Tâche 4.2 : Communication et transfert des références acquises

2- Méthodologie mise en œuvre

Action 1 : Etude de la réponse adaptative des vaches laitières à un déficit énergétique et identification dans le lait de biomarqueurs associés

L'Action 1 était centrale. Son but était **d'identifier des molécules pouvant être utilisées comme biomarqueurs de la réponse adaptative des vaches laitières à une réduction des apports énergétiques et d'évaluer l'impact de l'intensité et de la durée de ce challenge.** Elle a été conduite en 3 volets. La Tâche 1.1 avait pour objectif de caractériser la réponse adaptative des vaches laitières à un déficit énergétique au travers différents phénotypes. La Tâche 1.2 visait à quantifier les molécules pouvant être utilisées comme biomarqueurs de cette réponse. La Tâche 1.3 visait à intégrer l'ensemble des données pour évaluer l'impact du type de challenge sur la réponse des animaux.

L'Action 1 s'est appuyée sur deux protocoles expérimentaux réalisés en 2016 (Fig.2) :

- **Un protocole de restriction court et intense (protocole CI)** réalisé sur 20 vaches (10 Holstein et 10 Montbéliardes) en milieu de lactation à la ferme expérimentale de Marcenat (INRAE, Herbipôle, <https://doi.org/10.15454/1.5572318050509348E12>). En pré- et post-restriction, les vaches étaient alimentées à volonté avec une ration composée d'ensilage de maïs (66,3 %), de paille d'orge (8,0 %), de maïs en grain (7,6 %), de tourteau de soja (17,4 %) et d'un mélange de minéraux et de vitamines (0,7 %). En période expérimentale, ces vaches ont été alimentées à bas niveau pendant 6 jours (apports limités à 50% des besoins énergétiques estimés avant le début de la restriction). Une cinétique de prélèvements de lait et de sang a été réalisée pour étudier les réponses à la restriction (de J-2 à J+6), et à la réalimentation. (J+2 à J+8). La courte durée de la période de restriction a permis de considérer chaque vache comme son propre témoin.
- **Un protocole de restriction long et modéré (protocole LM)** réalisé à l'installation expérimentale de Méjusseume (INRAE UMR PEGASE, <https://doi.org/10.15454/yk9q-pf68>) sur 19 vaches Holstein (9 témoins et 10 restreintes) en milieu de lactation. En pré- et post-restriction, les vaches étaient alimentées à volonté avec une ration composée d'ensilage de maïs (60 %), de concentré énergétique (15 %), de tourteau de soja (15 %) et de luzerne déshydratée (10 %). En période expérimentale, les vaches ont été réparties en 2 groupes, et alimentées soit : 1) à haut niveau (même ration qu'en périodes pré et post-expérimentales), soit 2) à bas niveau (80% de leur capacité d'ingestion individuelle) pendant 4 semaines (période de restriction). Des prélèvements de lait et de sang (à J-5, J5, J9, J30, J+5, J+9 et J+30) ont été effectués.

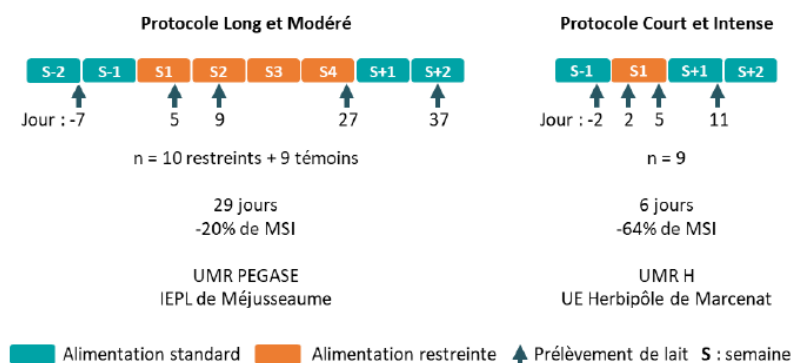


Figure 2 : Présentation des protocoles CI et LM

- **Tâche 1.1 : Caractérisation de la réponse adaptative des animaux dans le lait et le sang**

Dans cette Tâche, le premier objectif était de phénotyper les animaux sur la composition fine du lait en acides gras (AG) et lactoprotéines, en métabolites du lait, et en profil hormonal du sang. Afin de garantir une bonne cohérence des résultats entre les deux essais, il était prévu d'utiliser :

- 1 échantillon en période pré-expérimentale à J-2 (CI) et J-5 (LM) pour servir de témoin,
- 1 à 2 échantillons en période expérimentale selon la durée du protocole : à J6 pour le protocole CI et à J5 et J30 pour le protocole LM pour évaluer l'impact de la restriction,
- 1 échantillon en période post-expérimentale à J+8 (CI) et J+9 (LM) afin d'évaluer la dynamique de retour à l'état basal.

Au total, ce sont donc 60 échantillons (3 dates x 20 vaches) du protocole CI et 76 échantillons (4 dates x 19 vaches) du protocole LM qui ont été sélectionnés. Au total, cela représente 136 échantillons de lait pour l'analyse des AG et des protéines, et 136 échantillons de sang pour le dosage des métabolites et hormones.

Les dosages des **AG du lait** ont été réalisés en chromatographie phase gazeuse (CPG) à l'UMR H sur le protocole CI pour lequel nous avons finalement pu disposer de l'ensemble des résultats de l'essai pour les AG (20 vaches x 15 dates). En raison d'un manque de disponibilité du personnel technique due à un départ en mobilité de l'UMR H, les dosages des AG du lait n'ont pas pu être réalisés sur le protocole LM.

Les dosages de **lactoprotéines** ont été réalisés sur lait dégraissé en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) à l'UMR GABI mais en décalage temporel par rapport au prévisionnel en raison du départ en retraite de Patrice Martin qui a induit une réorganisation au sein de l'équipe en charge de ces analyses. Concernant l'essai CI, les profils en lactoprotéines ont été réalisés sur 8 vaches Holstein à 4 dates. Pour le protocole LM, ces dosages ont été réalisés sur 19 vaches à 5 dates au lieu de 80 car une vache du lot témoin a été sortie de l'essai pour raison de santé.

Les **métabolites plasmatiques** (acides gras non estérifiés (AGNE), Glucose, β -hydroxybutyrate (BHB) et urée) ont été mesurés en utilisant un automate (ARENA 20XT, Thermo Fisher Scientific) à l'UMR H. Pour l'essai CI, ces dosages ont concerné l'ensemble des échantillons de l'essai (20 vaches x 15 dates). Pour l'essai LM, les métabolites sanguins ont été dosés sur 76 échantillons (19 vaches x 4 dates). Il nous est apparu pertinent de compléter les mesures prévues dans le projet par les analyses plasmatiques de glutamine, de NH₂ et de glutamate sur l'ensemble de ces échantillons. Ces dosages des paramètres sanguins supplémentaires ont été réalisés par l'Université Aarhus au Danemark en concertation avec l'UMR H.

Les **hormones du sang** (insuline et IGF-1) ont bien été dosés sur les 76 échantillons (19 vaches x 4 dates) de l'essai LM par l'Université de Bern en Suisse mais n'ont pas été dosés pour le protocole CI car le kit utilisé pour l'analyse des laits du protocole LM n'est plus commercialisé.

Le deuxième objectif de cette Tâche était d'évaluer la réponse adaptative des vaches laitières à la restriction alimentaire à partir de l'ensemble des données collectées. Ces données ont été utilisées pour caractériser la dynamique de réponse des vaches aux deux

restrictions alimentaires de manière indépendante, par analyse des dynamiques d'évolution des phénotypes (niveau basal avant restriction, déviation pendant la restriction, capacité à retrouver le niveau basal après la fin de la restriction). Ces analyses ont permis de caractériser ces réponses en fonction de la durée et de l'intensité de la restriction subie. L'analyse approfondie des données de l'essai CI a été réalisée en 2019 par Pierre-Alexis Billa et a été valorisée par une publication (Billa et al., 2020). L'analyse des données de l'essai LM a été réalisée par Antoine Leduc qui a publié une revue de synthèse dans le Journal of Animal Science en 2021.

- **Tâche 1.2 : Recherche de biomarqueurs innovants dans différentes fractions du lait**

Cette Tâche consistait à rechercher dans le lait des biomarqueurs de la réponse adaptative des animaux et analyser leurs variations consécutives à une restriction alimentaire. Les constituants potentiellement biomarqueurs potentiels pressentis étaient les métabolites, les microARN et les protéines, ainsi que le nombre de cellules épithéliales mammaires (CEM). Un sous-objectif de cette Tâche consistait à rechercher les microARN dans le lait entier et dans différents compartiments du lait : le globule gras, les vésicules extracellulaires et les CEM.

L'analyse des teneurs en **métabolites du lait** (BHB, acide urique, isocitrate, glucose, glucose-6-phosphate, glutamate et NH₂) a été réalisée par des méthodes fluorométriques par l'Université Aarhus au Danemark, comme prévu dans le projet. Pour l'expérimentation CI, les mesures ont été réalisées sur plus d'échantillons que prévu : 380 échantillons collectés pour l'ensemble des vaches (20 vaches x 17 dates). Pour l'expérimentation LM, les mesures ont été réalisées sur 76 échantillons collectés pour l'ensemble des 19 vaches à 4 dates. Le lien entre la réponse adaptative et les teneurs du lait en métabolites a ensuite pu être évalué.

Le comptage des CEM du lait a été réalisé sur le protocole LM sur les 19 vaches aux 4 dates ciblées. Les CEM ont été tout d'abord purifiées par une méthode de séparation immunomagnétique (Boutinaud et al. 2008) puis leur concentration a été mesurée. Le taux d'exfoliation des CEM a ensuite été obtenu en multipliant la concentration en CEM dans le lait par le volume de lait produit par jour. Ces analyses ont été réalisées à l'UMR PEGASE. Ces analyses ont permis d'évaluer l'impact de la restriction sur le taux d'exfoliation.

L'analyse des miRNomes devait être réalisée sur un sous-groupe de 20 échantillons (1 échantillon avant restriction et 1 échantillon après restriction pour 5 vaches de chaque essai) dans le lait entier ainsi que dans les globules gras, les vésicules extracellulaires et les CEM (soit 80 échantillons) par séquençage haut débit. Puis l'ensemble des 136 échantillons (60 de l'essai CI et 76 de l'essai LM) devait être analysé par RT qPCR pour valider les microARN candidats. La baisse des coûts a permis d'envisager plus d'analyses que prévu (8 individus par essai avec un échantillon avant et après restriction soit 32 échantillons pour chaque compartiment au lieu de 20). Après des discussions approfondies pour choisir et harmoniser le plus possible les protocoles d'extractions des ARN les plus adaptés selon les fractions du lait (lait entier avec le kit RNA Now, globules gras avec le kit Trizol LS, CEM avec le kit RNA Now, vésicules extracellulaires avec le kit miRVana), les laboratoires ont procédé aux extractions d'ARN totaux selon la répartition suivante : lait entier à l'UMR GABI, CEM à l'UMR PEGASE, globules gras à l'UMR H, et vésicules extracellulaires par le prestataire de service Excilone). Une grande variabilité de concentrations selon le compartiment a été observée. Certaines concentrations étaient faibles mais les échantillons ont pu être envoyés à la plateforme de

séquençage GenomEast de l'IGBMC à Illkirch (67). Finalement, 96 échantillons ont été analysés, ce qui correspond à 16 vaches et 3 compartiments par protocole, l'insuffisance de matériel biologique ne nous ayant pas permis de réaliser les analyses à partir des CEM pour le protocole CI et des vésicules extracellulaires pour le protocole LM. Les séquences brutes ont ensuite été analysées, et la réponse à la restriction évaluée. Les 5 microARN retenus comme candidats ont été vérifiés par RT-qPCR sur les mêmes échantillons. Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une publication récemment acceptée dans le journal BMC Genomics.

L'analyse des protéomes a été réalisée par la plateforme PAPPSO de Jouy-en-Josas sur le lait dégraissé de 32 échantillons parmi ceux choisis pour l'analyse des miRNomes, soit 8 vaches x 2 dates (avant et pendant restriction) par protocole. L'impact de la restriction sur les protéomes a ainsi pu être évalué dans les deux essais. Les résultats obtenus ont été valorisés par une publication (Leduc et al., 2022). Les protéines identifiées comme biomarqueurs potentiels n'ont pas pu être validés par ELISA car il n'existait pas de kit adapté.

- **Tâche 1.3 : Intégration des données pour identifier des nouveaux biomarqueurs potentiels de la réponse adaptative des vaches laitières à un déficit énergétique**

L'objectif de cette Tâche était d'analyser l'ensemble des données communes aux essais LM et CI (phénotypes collectés dans les Tâches 1 et 2 de l'Action 1) de façon intégrative. Différentes méthodes étaient mobilisables pour analyser les données. Il a fallu choisir les méthodes les plus adaptées compte tenu des contraintes liées aux données, notamment le fait que les données des deux essais n'ont pas le même pas de temps car les prélèvements n'ont pas été faits au même moment. Deux approches ont été menées, et pour chaque approche, plusieurs méthodes ont été testées.

La première approche était un **test en cinétique** pour lequel ont été testées l'analyse triadique partielle sur cubes de données, et l'analyse de redondance de l'effet jour. Ces méthodes permettent de marquer le passage d'un état *ad libitum* à un état restreint suivi d'un retour à l'état initial. L'analyse de redondance a été choisie car elle permet en sus d'identifier les marqueurs associés à ces passages d'état parmi les taux protéique (TP), butyreux (TB) et de lactose et les concentrations en métabolites du lait. Cette approche ne permet cependant pas de prendre en compte l'ensemble des biomarqueurs potentiels, en particulier les protéomes et miRNomes. La seconde approche, par **analyse multi-omique**, visait à identifier un panel de biomarqueurs potentiels du déficit énergétique, par l'intégration des données de taux, de métabolites, des protéines majeures, du miRNome et du protéome du lait provenant des deux essais avec les données avant et pendant restriction. Là encore deux méthodes ont été testées. La première est la multi level sparse PLS DA qui prédit le régime avec 1% des variables. La seconde, qui a été retenue, est la méthode DIABLO qui vise à prédire le régime alimentaire avec 10% des variables, les données étant séparées par blocs (miRNome du lait, miRNome des globules gras, protéomes, métabolites, autres (production laitière et taux)).

Ces analyses ont permis d'identifier les composants du lait qui constitueront un **panel de biomarqueurs** intéressants du déficit énergétique de la vache laitière. Ces résultats feront l'objet d'une publication prochainement soumise dans un journal de rang A.

Action 2 : Validation des biomarqueurs identifiés sur des animaux en déficit énergétique de différentes origines

L'objectif de l'Action 2 du projet était de compléter les deux dispositifs de l'Action 1 afin de tester la pertinence des biomarqueurs sur de nouveaux animaux soumis à un déficit énergétique spontané en début de lactation, ce qui n'avait pas été le cas dans les protocoles CI et LM, puis d'une réduction des apports dans la suite de la lactation. Les deux sous-objectifs sont d'évaluer la concordance entre la réponse adaptative des vaches lorsque le déficit énergétique est d'origine physiologique et lorsqu'il est dû à une restriction des apports (Tâche 2.1) et de valider les biomarqueurs identifiés dans l'Action 1 sur un nouvel essai de restriction alimentaire (Tâche 2.2).

Cette Action s'est appuyée sur un essai mis en place dans le programme ANR DEFFILAIT à la ferme expérimentale INRAE de l'UMR PEGASE (IEPL de Méjusseau). Nous avons utilisé les données d'une trentaine de vaches Holstein choisies pour être représentatives de la variabilité du troupeau. Ces vaches ont été alimentées *ad libitum* avec un régime constant (ration complète) durant les premiers mois de lactation. En milieu de lactation, les mêmes vaches ont toutes subi une restriction alimentaire pendant 5 semaines (Figure 3).

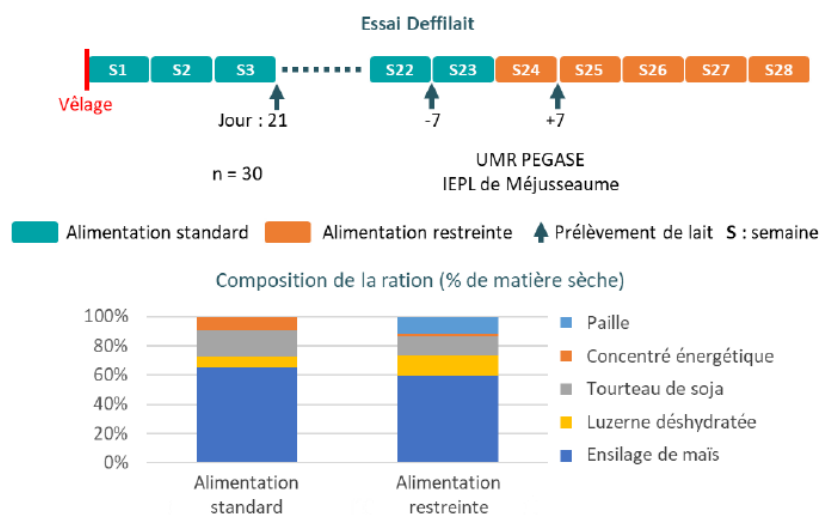


Figure 3 : Schéma expérimental et composition des rations de l'essai DEFFILAIT

- **Tâche 2.1 : Evaluation des biomarqueurs sur des vaches en début de lactation**

Cette Tâche concerne la première partie de la lactation. Les vaches ont vêlé à l'automne 2017. Parmi les vaches de l'essai, nous avons choisi 34 vaches afin d'anticiper d'éventuels aléas au cours de l'essai. Pour ces 34 vaches, nous avons réalisé des prélèvements de lait et de sang à 22 ± 1 jours de lactation. Les phénotypes permettant d'évaluer la réponse adaptative des vaches ont été mesurés, il s'agit de la production laitière, des TB et TP, le taux de lactose, les métabolites et minéraux du lait et du sang, les hormones plasmatiques, les lactoprotéines majeures, et les CEM. Les analyses ont été réalisées de manière conjointe et par les mêmes laboratoires que dans l'Action 1. Les laits ont été congelés pour réaliser des analyses de miRNomes et/ou de protéomes si l'intérêt était jugé pertinent au vu des résultats de l'Action 1. Les données obtenues à J21 ont ensuite été comparées avec les données de la Tâche 2.2 pour

déterminer si la réponse des vaches est différente selon le stade de lactation pour une même alimentation, et si la réponse des vaches en déficit énergétique de début de lactation est la même que pour un déficit énergétique induit par une restriction alimentaire.

- **Tâche 2.2 : Validation des biomarqueurs sur des vaches subissant une réduction de l'apport énergétique**

L'ensemble des vaches prélevées en Tâche 2.1 a subi un changement de régime en mars 2018. Les vaches étaient donc en milieu de lactation (5-6 mois). Pendant cette restriction alimentaire, toutes les vaches sont passées d'une alimentation témoin (2 semaines) à une alimentation restreinte (5 semaines) après une semaine de transition alimentaire. La ration témoin a été choisie de façon à couvrir les besoins énergétiques et azotés des animaux et a été distribuée du vêlage jusqu'à la semaine de transition alimentaire. La ration restreinte était diluée en énergie et protéine avec de la paille et visait à réduire de 20 % la production laitière tout en maintenant une ingestion *ad libitum*. Les quantités d'aliment offertes et refusées ont été mesurées pour déterminer les quantités de matière sèche ingérée (MSI). La production laitière a été enregistrée quotidiennement et les TB et TP du lait ont été mesurés 2 jours par semaine. Les prélèvements spécifiques au projet ont été réalisés à J-7 et J+7 par rapport à la transition alimentaire. Les mesures réalisées sont les mêmes que pour la Tâche 2.1. Une étude comparative de la réponse adaptative des vaches restreintes par rapports aux mêmes vaches nourries *ad libitum* a été réalisée.

Action 3 : Utilisation des biomarqueurs du statut nutritionnel des vaches laitières en élevage

Cette Action avait un triple objectif. Il s'agissait tout d'abord de **réaliser un état des lieux des pratiques des éleveurs** en termes de repérage des animaux subissant un stress nutritionnel (Tâche 3.1) puis de **développer un outil de monitoring du statut nutritionnel des vaches par spectrométrie moyen infrarouge** (Tâche 3.2), et enfin de **réaliser des supports pédagogiques** à destination des éleveurs et encadrants techniques et de l'enseignement agricole afin d'ancrer ce travail sur le terrain (Tâche 3.3). C'est donc l'Action qui fait le lien entre les 2 premières Actions (recherche) et le transfert des résultats.

- **Tâche 3.1 : Estimation du risque de déficit énergétique par les éleveurs et leurs techniciens**

Cette Tâche prévoyait le recensement via une enquête des pratiques des éleveurs pour repérer les animaux en situation de déficit énergétique, comprenant les moyens dont disposent l'éleveur (en matière d'équipements, mesures et observations effectuées), les moyens réellement utilisés et les actions qui en découlent. Des réunions préparatoires ont permis de définir la forme (enquêtes par téléphone voir de visu pour certaines), les cibles (éleveurs, encadrants techniques, dans plusieurs régions), et la préparation du travail. Ces réunions ont également permis de lister une série de question auxquelles l'enquête devait obligatoirement répondre. Puis l'élaboration du questionnaire, la réalisation des enquêtes, leur dépouillement et la restitution des résultats ont été confiés à un groupe de 20 élèves ingénieurs de la spécialisation « Sciences et Ingénierie en Productions Animales » (SIPA) de l'Institut Agro Rennes-Angers (anciennement Agrocampus Ouest). Ces étudiants ont également eu la charge de contacter par eux-mêmes d'autres éleveurs que ceux fournis par les coordinateurs

afin d'élargir le panel à des éleveurs hors réseaux habituels. Les enquêtes ont ainsi été réalisées par téléphone ou en présentiel, du 9 au 15 janvier 2019. Chaque public cible (éleveurs et professionnels de l'élevage) a été enquêté à l'aide de questionnaires distincts, composés de questions fermées et ouvertes. Au total, 67 des 229 éleveurs contactés (réseaux étudiants : n=26 ; liste Infogreffe : n=41) ont répondu au questionnaire. Les professionnels de l'élevage ont été contactés selon une liste fournie par IDELE : 14 personnes d'origines diverses (entreprises de conseil en élevage, chambres d'agriculture, cliniques vétérinaires, association d'éleveurs). 60 des 81 personnes enquêtées sont situées dans le Grand Ouest. Une première partie du travail recensait des informations générales sur les exploitations ou sur les entreprises des professionnels interrogés. La définition du déficit énergétique et les connaissances sur le sujet étaient abordées en deuxième partie, via des questions ouvertes, alors que les indicateurs et les solutions étaient abordées en fin de questionnaire. Ce travail a donné lieu à une soutenance orale à la fin du module, ainsi qu'un article dans la revue Terra et un poster présenté au congrès de l'EAAP 2019.

A la suite de ce travail, et suivant la suggestion des étudiants, nous avons décidé de confier une autre enquête à mener à un groupe de 5 étudiants du Master 1 Sciences de l'animal pour l'élevage de demain (SAED) de l'Institut Agro Rennes-Angers. **Il s'agissait d'enquêter les enseignants en lycées agricoles, CFA et CFPPA afin de comprendre comment le déficit énergétique est abordé dans les formations Bac technologique Sciences et Technologies de l'Agronomie et du Vivant (STAV), Brevet Professionnel Responsable d'Entreprise Agricole (BP REA) et Brevet de Technicien Supérieur Productions Animales (BTS PA).** Ces formations ont été choisies car ce sont les formations les plus couramment suivies par les futurs éleveurs et conseillers. Un deuxième objectif était de recueillir la perception des enseignants sur l'enseignement de cette thématique afin d'orienter le contenu des kits pédagogiques prévus dans la Tâche 3.3. Les étudiants ont contacté 55 enseignants, et ont pu en enquêter 21. Cette enquête a permis de mieux identifier les motivations et freins à l'enseignement du déficit énergétique dans les formations ciblées, et de comprendre les besoins des enseignants en termes de supports pédagogiques. Ce travail a donné lieu à une restitution orale et à un rapport écrit.

- **Tâche 3.2 : Développement d'un outil pour un monitoring à haut débit du statut nutritionnel et métabolique des vaches laitières via des analyses fines du lait**

L'objectif de cette Tâche était de développer un outil de monitoring du statut nutritionnel et métabolique des vaches laitières en utilisant les biomarqueurs identifiés et validés dans les Actions 1 et 2. Le choix a été fait d'utiliser la spectrométrie moyen infrarouge (MIR). Pour réaliser ce travail, il était nécessaire que les biomarqueurs d'intérêt soient identifiés et donc que les Actions 1 et 2 soient terminées. A la suite de ces Actions, nous avons fait le choix de ne pas travailler sur les biomarqueurs pour lesquels une équation MIR existe déjà (ex : lactose, BHB du lait) ou pour lesquels un travail similaire est en cours dans d'autres projets (ex : AG à longues chaînes, citrate). Nous nous sommes concentrés sur trois métabolites du lait : le glutamate, l'acide urique et l'isocitrate. Il était également nécessaire de disposer de spectres MIR ainsi que des analyses des composants ciblés en quantité suffisante. Nous disposions de 3 essais : CI, LM et DEFFILAIT. Les spectres MIR ont été collectés uniquement pour les essais CI et DEFFILAIT. Cela représente un total de 728 couples de données spectres MIR – métabolites du lait, dont 644 données de l'essai CI et 84 données de l'essai DEFFILAIT.

Une convention de partage de données a permis d'utiliser les spectres MIR des essais CI et DEFFILAIT pour valider les équations développées dans le projet Interreg Happy Moo.

- **Tâche 3.3 : Elaboration d'outils d'aide à la décision et de supports de formation**

L'objectif de cette Tâche était d'élaborer des outils et des supports de formation à destination de plusieurs publics cibles : éleveurs, techniciens, étudiants. Parmi les livrables envisagés se trouvaient :

- Des fiches techniques expliquant les conséquences d'une carence nutritionnelle sur la production et la composition du lait, mais également sur la santé et le métabolisme des animaux, et présentant les différents leviers à disposition des éleveurs pour gérer efficacement les déficits énergétiques dans leurs troupeaux. Ces fiches avaient vocation à être mises à disposition des éleveurs et techniciens par le biais du réseau de conseil en élevage.
- Des kits pédagogiques à destination des lycées agricoles
- Des interventions dans les modules de formation des étudiants ingénieurs de l'Institut Agro Rennes-Angers
- L'enrichissement du contenu de certaines formations proposées par IDELE.

Il était au départ prévu de faire réaliser les fiches techniques par les étudiants mobilisés dans la Tâche 3.1. C'est finalement lors du module Enquêtes et Typologie (2 semaines) et non pendant un projet d'ingénieur (4 mois) que la Tâche 3.1 a été réalisée, il n'était ainsi pas possible de faire réaliser les fiches par les étudiants. Il a donc été décidé de scinder le travail et de réaliser les fiches plus tard dans le projet, soit en même temps que la réalisation des supports de formation et kits pédagogiques, et de prendre du recul sur les résultats dans leur globalité avant de réaliser les supports.

Les enquêtes réalisées dans la Tâche 3.1, ainsi qu'un échange avec le groupe expert Alimentation de FCEL, ont finalement montré que les attentes concernant les supports pédagogiques étaient assez partagées entre les publics techniciens et enseignants. Par ailleurs, les enquêtes ont aussi fait remonter que cibler le public éleveurs directement n'était pas forcément pertinent, et qu'il était préférable de proposer un support aux techniciens qui pourraient alors à leur tour sensibiliser leurs éleveurs suivis.

Aussi, il a été finalement décidé de réaliser un **kit pédagogique unique** permettant de répondre à l'ensemble des attentes des cibles. Ce kit devait donc comprendre :

- 1 vidéo courte expliquant de manière brève et vulgarisée ce qu'est le déficit énergétique, quelles sont ses conséquences et comment le prévenir et le détecter,
- 3 fiches techniques reprenant les mêmes thèmes mais plus détaillées, permettant aux publics plus techniques d'approfondir les connaissances,
- 1 quiz d'évaluation adapté à la fois aux enseignants pour évaluer le niveau de connaissance des étudiants mais aussi aux techniciens pour une première sensibilisation des éleveurs.

Ce kit pédagogique sera mis à disposition gratuitement sur le site web d'IDELE et pourra être relayé aux techniciens conseil par le réseau FCEL, aux lycées agricoles par la DGER et aux écoles d'ingénieurs directement par IDELE.

Enfin, les connaissances acquises durant le projet **BIOMARQ'LAIT** seront capitalisées pour enrichir les sessions de formation proposées par IDELE et pourront venir alimenter de nouvelles formations.

Action 4 : Coordination du programme ; communication et transfert des références acquises

Cette Action transversale a pour objectif d'assurer le bon déroulement du projet entre les partenaires et dans le temps, la prise de décisions d'orientation nécessaires en cours de programme (Tâche 4.1) **et la valorisation des acquis** en cours de projet (Tâche 4.2).

- **Tâche 4.1 : Coordination du programme**

L'objectif de cette Tâche était essentiellement d'assurer la coordination technique et administrative du projet. La coordination générale du projet a été assurée par Marine Gelé (IDELE, chef de file) et de Marion Boutinaud (INRAE UMR PEGASE).

Selon les objectifs, différentes modalités d'organisation et outils ont été mis en place :

- Un comité de pilotage a été mis en place pour s'assurer du bon déroulement et du respect de la bonne chronologie des différentes Actions du projet ; prendre les décisions d'orientation nécessaires en cours de programme en tenant compte des contraintes des différentes Actions. Ce comité était constitué des représentants des différentes structures partenaires, s'est réuni 1 à 2 fois par an et a été ouvert à trois reprises sur la durée du projet à des structures extérieures dans le but de valider les orientations du projet et d'en assurer le transfert des résultats.
- Des réunions organisées par les responsables d'Actions ont permis de coordonner les Actions et activités des différents partenaires et prestataires pour s'assurer de la méthodologie mise en œuvre pour atteindre les objectifs.
- Un espace collaboratif a été ouvert sur l'outil SharePoint afin de centraliser l'ensemble des données nécessaires à la réalisation de chaque Action.

- **Tâche 4.2 : Communication et transfert des références acquises**

L'objectif de cette Tâche était de faire connaître le projet et vérifier la pleine valorisation des résultats obtenus, notamment leur diffusion la plus large possible, au fur et à mesure du programme.

Pour cela, une campagne de communication a été réalisée dès la première année du projet avec :

- La création d'une identité graphique avec un logo du projet
- La rédaction d'une fiche de présentation institutionnelle des objectifs du projet
- Un poster de présentation du projet aux Rencontres recherche ruminants en décembre 2018
- Une brève dans la presse agricole (Réussir Lait)
- Des présentations des objectifs du projet dans des séminaires organisés par les partenaires
- La création d'une page dédiée au projet sur le site web de l'UMT RIEL et d'un espace dédié au projet sur le site web d'IDELE

Par ailleurs, il a été demandé aux partenaires de placer une phrase de remerciements citant le projet et le financeur dans toute publication relative au projet.

Ensuite, tout au long du projet, nous avons eu à cœur de valoriser et rendre accessible aux différents publics cibles (éleveurs, techniciens, scientifiques, enseignants, financeurs) les résultats au fur et à mesure de leur acquisition. Cette communication a été réalisée par le moyen de communications orales et posters dans divers congrès et séminaires, par des articles scientifiques dans des revues à comité de relecture, par des articles dans la presse agricole, etc. Enfin, une conférence finale a été donnée au SPACE 2022 afin de restituer les principaux résultats obtenus durant le projet.

3- Synthèse des résultats obtenus par Action

Action 1 : Etude de la réponse adaptative des vaches laitières à un déficit énergétique et identification dans le lait de biomarqueurs associés

- **Tâche 1.1 : Caractérisation de la réponse adaptative des animaux dans le lait et le sang**

La réponse adaptative des animaux a été évaluée par l'analyse des phénotypes (niveau basal avant restriction, déviation pendant la restriction, capacité à retrouver le niveau basal après la fin de la restriction) collectés dans les deux essais CI et LM : les données zootechniques, la composition fine du lait en AG et protéines et les hormones et métabolites du plasma. **La dynamique de réponse des vaches a été caractérisée de manière indépendante sur chacun des protocoles (Figure 4).**

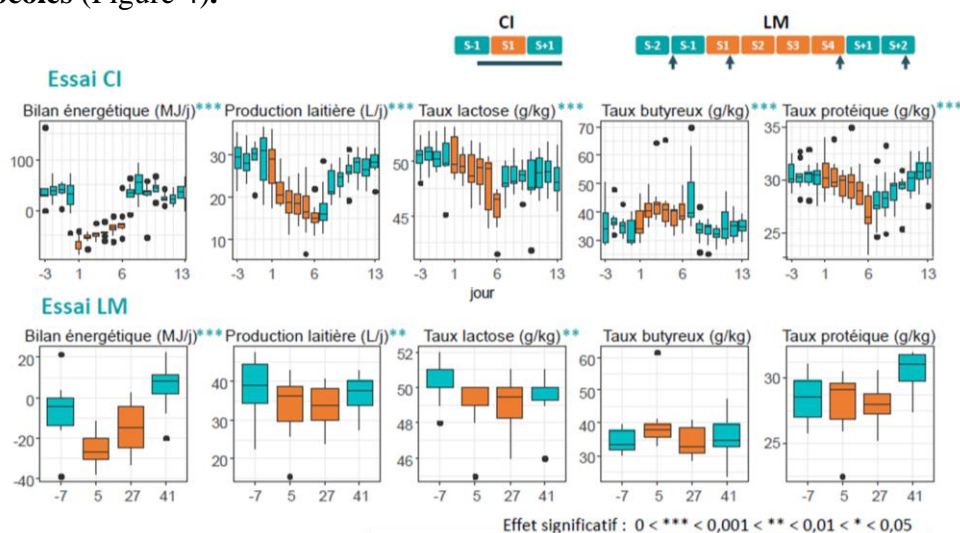


Figure 4 : Réponse des vaches à la restriction dans les protocoles CI et LM

Pour rappel, le **protocole CI** était une restriction courte et intense pendant 6 jours où les vaches recevaient 50% de leur ingestion *ad libitum*. Chaque vache était son propre témoin.

Cette restriction a conduit à une diminution de l'ingestion de 64% et une chute de la production laitière de 34%. La production de matières a chuté de manière importante : -25% pour la matière grasse, -36% pour la matière protéique et -34% pour le lactose. Les résultats montrent une cinétique de mise en place de la réponse plasmatique sur la durée de la restriction puis un retour au niveau basal lors de la réalimentation : augmentation des AGNE de plus de 600%, et du BHB, indicateurs d'une mobilisation accrue des réserves énergétiques. Les concentrations plasmatiques en glutamate ont également augmenté lors de la restriction alors que celles du glucose, de la glutamine, de l'urée, du NH₂ et de l'insuline ont diminué. Les effets observés sont un peu plus marqués en race Montbéliarde qu'en race Holstein.

Concernant les AG du lait, une baisse de la synthèse de novo et une hausse des teneurs en AG à chaîne longue (notamment C18:0, C18:1c9 et C16:0) ont été observées pendant la phase de restriction, ce qui suggère une lipomobilisation. La corrélation avec le bilan énergétique est assez élevée. La restriction a également affecté le profil en lactoprotéines : les concentrations en caséines α 1, α 2 et β ont diminué de façon significative lors de la restriction alimentaire et la concentration en α -lactalbumine a eu tendance à diminuer.

L'essai LM était quant à lui un protocole de restriction longue et modérée de 4 semaines où la moitié des vaches recevaient 80% de l'ingéré *ad libitum* tandis que l'autre moitié constituait un lot témoin. La restriction LM a conduit à des tendances similaires au protocole CI dans une moindre mesure.

Les résultats ont montré chez les vaches du lot Restreint une baisse de 20% de l'ingestion et de 7.6% de la production laitière par rapport au lot Témoin pendant la phase expérimentale. Cet écart n'est plus significatif dans la phase de réalimentation *ad libitum*. De la même manière ont été observées une hausse du TB (+5%), et une baisse du TP (-13%) et du taux de lactose (-13%) pendant la phase de restriction. La réponse plasmatique montre une hausse de 355% des AGNE chez les vaches restreintes. A l'inverse les IGF-1 et l'insuline diminuent chez ces mêmes vaches. Ces valeurs reviennent à leur niveau basal en période post expérimentale. Cependant, aucun effet n'a été observé sur les concentrations en glucose plasmatique. Au cours de cet essai, aucune concentration en protéines majeures du lait n'a été significativement affectée par la restriction alimentaire, à l'exception d'une plus faible concentration en caséine α_2 .

En conclusion, l'ensemble des résultats obtenus ont permis de valider les 2 modèles et de caractériser la réponse à la restriction alimentaire en tenant compte de l'intensité de la restriction subie. Les résultats obtenus ont été valorisés par des communications en congrès et des publications scientifiques (Billa et al., 2020 pour le protocole CI, et Leduc et al., 2019 et 2021 pour le protocole LM).

- **Tâche 1.2 : Recherche de biomarqueurs innovants dans différentes fractions du lait**

Les constituants du lait presentis pour être des biomarqueurs de la réponse adaptative des vaches laitières à une restriction alimentaire ont été mesurés dans le lait. **L'analyse comparative des concentrations de ces molécules avant et pendant la phase de restriction alimentaire a permis de confirmer leur intérêt en tant que biomarqueur.** Cette analyse a été réalisée de manière indépendante sur chacun des protocoles CI et LM, afin d'évaluer l'impact de la sévérité de la restriction.

Analyse du nombre de cellules

La réponse adaptative des animaux en matière d'évolution du nombre de CEM exfoliées a été observée sur le protocole LM et a fait l'objet d'un article scientifique dans le *Journal of Dairy Science* (Hervé et al., 2019). L'hypothèse était une baisse de la production laitière chez les vaches restreintes associée à une hausse de l'exfoliation des CEM. Nous avons observé une augmentation significative de l'exfoliation des CEM dans le lait et une hausse de la viabilité des CEM exfoliées pendant la phase de restriction. L'effet de la restriction alimentaire ne semble pas rémanent sur l'exfoliation des CEM donc les CEM pourraient être un bon indicateur de l'adaptation des vaches à la restriction alimentaire. La seconde hypothèse était que l'augmentation du taux d'exfoliation des CEM serait liée à une perte d'intégrité de l'épithélium mammaire. Les teneurs en K^+ et Na^+ du lait, ainsi que le lactose sanguin ont également été dosés car ils sont spécifiques de l'intégrité de l'épithélium mammaire. La teneur en Na^+ est plus élevée chez les animaux témoins ce qui suggère une rupture des jonctions serrées pendant la restriction. Cependant ce résultat ne suffit pas à confirmer l'hypothèse car aucun effet sur la lactosémie, la teneur en K^+ et le rapport Na/K n'a été observé. L'analyse des CEM sur le protocole CI n'a pas pu être réalisée et n'a donc pas permis de compléter les observations susmentionnées.

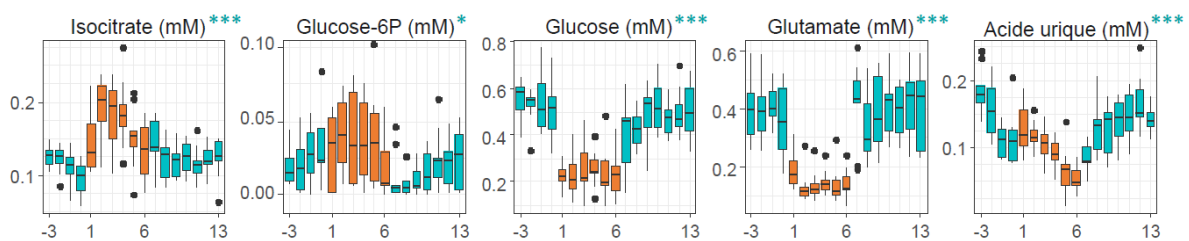
Analyse des métabolites du lait

Les métabolites sanguins sont déjà utilisés comme marqueurs du déficit énergétique, mais les métabolites du lait, plus facile d'accès, n'ont été étudiés que récemment. L'analyse de la littérature a permis d'identifier le BHB, le glucose, le glucose-6-phosphate, l'acide urique, le citrate et l'isocitrate comme candidats potentiels. En revanche, aucune étude comparant l'effet de restrictions alimentaires de différentes intensités sur les métabolites du lait n'a été recensée. **Le lien entre les teneurs du lait en métabolites et la réponse adaptative des vaches a été évaluée de manière séparée sur chacun des deux protocoles de restriction CI et LM afin de caractériser l'impact de la sévérité de la restriction.**

Sur le **protocole CI**, on observe une forte baisse du glucose, du glutamate, et plus faible pour le BHB, l'acide urique, et le NH₂, ainsi qu'une hausse de l'isocitrate et du glucose-6-phosphate pendant la restriction alimentaire (Figure 5). La cinétique est plus ou moins rapide selon les métabolites. Les concentrations en glutamate, isocitrate et NH₂ sont revenues aux valeurs de pré challenge la semaine suivant la période de restriction alors que celles de BHB, glucose et acide urique ne sont revenues à leur valeur pré challenge qu'en seconde semaine post-restriction.

Essai CI

S-1 S1 S+1



Effet significatif : 0 < *** < 0,001 < ** < 0,01 < * < 0,05

Figure 5 : Evolution des teneurs en métabolites du lait en réponse à la restriction (essai CI)

Une matrice des corrélations a montré de fortes corrélations entre le bilan énergétique et le glucose (0,62) et le glutamate (0,59) du lait, lesquels sont bien corrélés avec les métabolites plasmatiques et les AG du lait. Les autres métabolites du lait étudiés étaient également significativement corrélés avec le bilan énergétique (0,46, -0,25, -0,41 pour le BHB, le glucose-6-phosphate, et l'isocitrate, respectivement).

Les analyses de corrélations et régressions obtenues sur le protocole CI suggèrent donc que le glucose et le glutamate du lait pourraient être deux biomarqueurs potentiels non invasifs d'un bilan énergétique négatif dû à une restriction courte et intense en milieu de lactation chez les vaches laitières Holstein et Montbéliarde. Les résultats obtenus sur le protocole CI ont fait l'objet notamment d'un poster aux Rencontres Recherche Ruminants (3R) (Billa et al., 2018), d'un poster au congrès de l'ADSA (Billa et al., 2019), et d'une publication scientifique dans le Journal of Dairy Science (Billa et al., 2020).

Sur le **protocole LM** (Tableau 1) on observe une hausse du glutamate, du galactose et de l'isocitrate, une baisse de la créatinine (ce qui suggère une mobilisation des protéines musculaires) et du glucose-6-phosphate ; avec un retour à la normale après la restriction. Les variations de BHB, glucose et NAGase ne sont pas significatives. Les variations de glutamate ne sont pas significatives non plus. En revanche le glutamate équivalent (fonctions amines) est

en hausse à la fin de la restriction. L'acide urique diminue tout au long de la restriction avant retour au niveau basal à la réalimentation. Sur ce protocole le déficit énergétique observé était moindre que celui observé dans le protocole CI. Les résultats obtenus sont cohérents concernant l'isocitrate, le galactose et l'acide urique, qui répondent de la même manière que dans le protocole CI. Cependant la réponse observée sur le glucose-6-phosphate est plus faible. En revanche les résultats observés sur le glutamate dans le protocole LM vont à l'encontre de ceux observés sur le protocole CI. **Cela suggère un effet de l'intensité de la restriction sur la réponse adaptative, et en particulier un possible blocage de la voie des pentoses phosphates lors d'une restriction intense.**

Tableau 1 : Evolution des teneurs en métabolites du lait en réponse à la restriction dans l'essai LM

	Période de Restriction							
	J -7		J 5		J 27		J 36	
	Témoin	Restreint	Témoin	Restreint	Témoin	Restreint	Témoin	Restreint
glutamate	505	477	443	402	385	440	352	386
glutamate eqv.	1138	1141	1109 ^{ab}	1132 ^{ab}	1069^a	1177^b	1023	1062
β-hydroxybutyrate	72,2	87,9	69,7	64,9	70,3	62,2	65,9	65,0
creatinine	127	138	144^b	125^a	130 ^{ab}	117 ^a	119	112
glucose	0,58	0,58	0,64	0,56	0,61	0,66	0,56	0,60
glucose 6P	0,04	0,04	0,04^c	0,03^b	0,03^b	0,02^a	0,03	0,03
acide urique	119	124	123^c	104^{ab}	118^{bc}	98^a	109	118
NAGase	1,19	1,22	1,25	1,26	1,26	1,14	1,34	1,46
galactose	0,51	0,59	0,55^a	0,66^b	0,59 ^{ab}	0,58 ^{ab}	0,64	0,63
isocitrate	0,11	0,13	0,12^a	0,16^b	0,12 ^{ab}	0,13 ^{ab}	0,12	0,11

Les résultats obtenus sur ce protocole ont été valorisés par un poster aux Rencontres Recherche Ruminants (Leduc et al., 2020) et une présentation orale au congrès de l'ADSA (Leduc et al., 2021).

Analyse des protéomes

L'étude menée dans le projet BIOMARQ'LAIT sur l'impact d'une restriction alimentaire sur les protéomes du lait est la première du genre. L'analyse a été réalisée de manière séparée sur chacun des deux protocoles CI et LM puis les résultats ont été comparés afin de déterminer si l'intensité de la restriction avait un effet.

Parmi les 232 protéines trouvées dans le protéome du lait de l'essai CI, l'abondance de 160 a varié avec la restriction alimentaire : 43 ont été retrouvées dans le lait uniquement pendant la restriction alimentaire, une seulement avant le début de la restriction alimentaire, et l'abondance de 77 et 39 protéines a respectivement augmenté ou diminué pendant la restriction alimentaire (Figure 6).

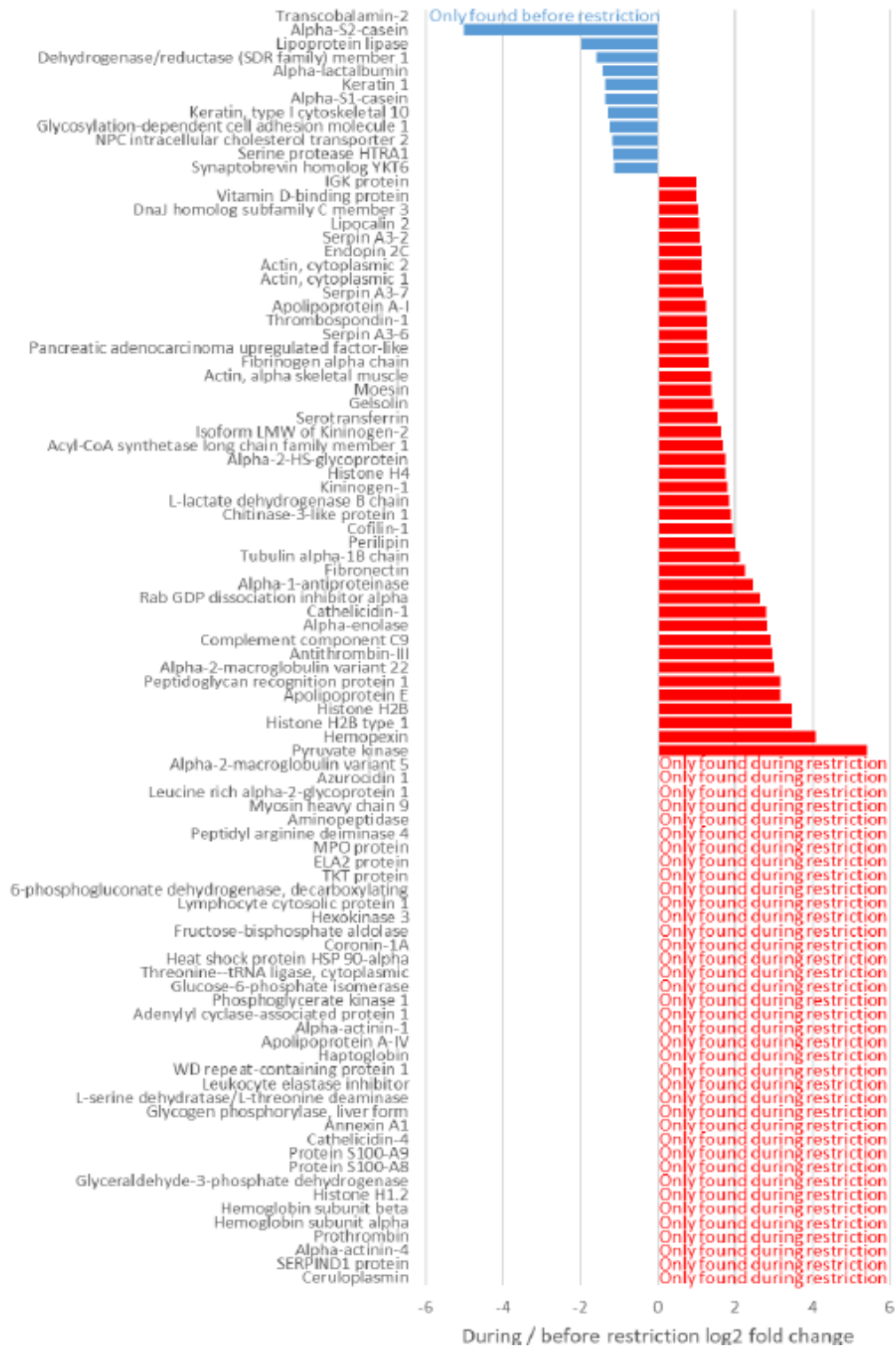


Figure 6 : Variation de l'abondance des protéines dans le lait dans l'essai CI

Parmi les 194 protéines trouvées dans le protéome de lait de l'essai LM, l'abondance de 8 protéines a varié avec la restriction alimentaire : 2 protéines ont été trouvées seulement dans le lait pendant la restriction alimentaire, l'abondance de 5 protéines a augmenté et celle d'1 a diminué pendant la restriction alimentaire (Figure 7).

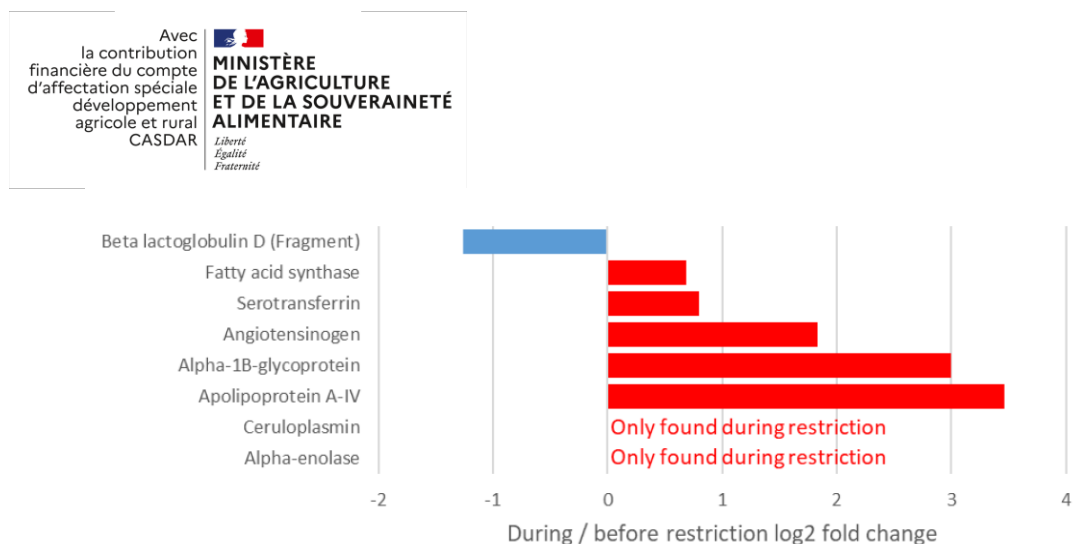


Figure 7 : Variation de l'abondance des protéines dans le lait dans l'essai LM

Six protéines ont été impactées de façon similaire par des restrictions LM et CI, dont cinq sont normalement présentes dans le plasma. Globalement les effets observés sont plus importants dans l'essai CI, ce qui démontre un fort impact de l'intensité de la restriction.

Une analyse in silico a permis d'identifier les voies métaboliques dans lesquelles les protéines différemment abondantes lors de la restriction sont impliquées. 66 protéines sont impliquées dans le métabolisme protéique, 14 dans le métabolisme lipidique, 13 dans le métabolisme glucidique, et 49 dans la réponse immunitaire. **Ces variations de protéome reflètent l'adaptation du métabolisme mammaire au stress énergétique ainsi qu'une perte d'intégrité de la barrière épithéliale mammaire et une altération de la fonction immunitaire.**

Il était envisagé de valider l'intérêt de protéines identifiées comme biomarqueurs potentiels de restriction grâce à des kits ELISA pour les protéines dont les anticorps étaient disponibles. Cependant il n'existait pas de kit pour les protéines identifiées.

Les résultats originaux obtenus sur l'analyse des protéomes ont fait l'objet d'une communication orale au congrès de l'EAAP (Leduc et al., 2021) d'un article scientifique publié dans Scientific reports (Leduc et al., 2022).

Analyse des miRNomes

Les miRNA sont des petits ARN non codants d'environ 22 nucléotides qui jouent un rôle important dans l'expression génique. L'effet de la restriction alimentaire sur les miRNomes ont été très peu étudiés jusqu'à présent et ne concernent que la glande mammaire. **BIOMARQ'LAIT est le premier projet à caractériser cet impact sur les miRNA du lait.**

La répartition des microARN dans les différents compartiments du lait étant peu connus, nous avons séquencé les microARN dans le lait entier et les globules gras pour les deux protocoles, ainsi que dans les vésicules extracellulaires pour l'essai CI et les CEM pour l'essai LM, avant et pendant la restriction. Malgré une grande variabilité de concentration selon les compartiments, tous les échantillons ont pu être séquencés. L'analyse a révélé une moyenne de 21 millions de lectures par échantillon, avec une forte hétérogénéité entre échantillons mais une homogénéité entre les différents compartiments du lait étudiés. Aucun lien n'a pu être établi entre le faible nombre de lectures et le protocole d'extraction, ni avec les quantités d'ARN fournies au laboratoire de séquençage. La lecture des séquences est de bonne qualité. 2896 microARN ont été détectés dont 1493 déjà connus dans l'espèce bovine. Parmi les 1096 miRNA

assez abondants pour être informatifs, 10 % étaient exclusifs à un compartiment du lait et l'abondance de 1027 a varié entre les compartiments, révélant un miRNome spécifique pour chaque fraction du lait. **La restriction alimentaire a affecté l'abondance de 159 microARN** (Figure 8), **les compartiments des vésicules extracellulaires et du lait entier étant les plus touchés, tandis que les globules gras et les CEM exfoliées ont été peu ou pas affectés.**

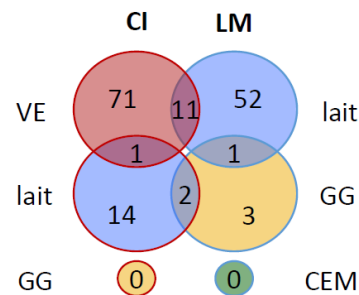


Figure 8 : Répartition des 159 microARN dont l'abondance varie avec le régime alimentaire selon le protocole de restriction et le compartiment du lait

Aucun microARN différentiellement présent en fonction de l'alimentation n'a été détecté en commun entre le même compartiment dans les deux protocoles, ce qui démontre **un effet fort de l'intensité de la restriction**. Pour les microARN connus qui ont varié lors des restrictions, une analyse *in silico* a permis la prédiction de leurs cibles et l'étude des voies métaboliques dans lesquelles elles sont impliquées. Les 17 microARN variables, connus et en quantité suffisante ont permis de prédire 1378 gènes cibles dont 14 codants pour des protéines affectées dans l'essai CI. Les 41 voies métaboliques impliquées reflètent la modification de certaines voies clés de la lactation liées aux métabolismes lipidique et protéique, au cycle cellulaire et à la réponse aux stress. **5 microARN ont finalement été identifiés comme biomarqueurs potentiels, essentiellement dans le lait total car l'utilisation potentielle est plus aisée.**

Une vérification des données microARN avait été envisagée par une approche plus ciblée. Les variations d'abondance de certains microARN, biomarqueurs potentiels du déficit énergétique, devaient être évaluées dans des échantillons par qPCR. À la suite des analyses de variation des miRNome du lait lors des essais CI et LM, cinq microARN, potentiels biomarqueurs, ont été sélectionnés (*bta-miR-26b*, *bta-miR-486*, *bta-let-7g*, *bta-miR-423-5p* et *bta-miR-25*) pour leur assez forte abondance dans le lait (18000 ± 7900 reads) couplée à un facteur de variation significatif et relativement important ($|FC| = 3,1 \pm 0,89$). L'abondance de ces microARN a été quantifiée par qPCR à partir des mêmes échantillons de lait des essais LM et CI, afin de vérifier que leur variation, observée par séquençage, se retrouvait par qPCR. Ces qPCR ont été réalisées à l'aide de kits miRCury (Qiagen) avec trois microARN de ménage (*bta-miR-99a-5p*, *bta-miR-92a* et *bta-let-7c*), dont la stabilité dans le lait avait été établie lors de précédentes expérimentations (Lai et al., 2017a). Seule la variation de *bta-miR-26b* dans les vésicules extracellulaires des échantillons de l'essai CI était concordante avec celle observée par séquençage, les autres microARN candidats ne montrant pas de variation significative liée à la restriction alimentaire par qPCR. Cette non-concordance entre les résultats de séquençage et de qPCR était potentiellement liée au fait que les isoformes d'un même microARN, dont les séquences présentent des variations par rapport à la séquence de référence, ne sont pas tous amplifiées par qPCR, ainsi qu'aux différences de normalisation des données entre qPCR et séquençage.

Ces résultats originaux ont été présentés au congrès de l'EAAP (Leduc et al., 2021) et ont fait l'objet d'un article scientifique accepté dans le journal BMC Genomics (Leduc et al., 2023). Cet article rapporte pour la première fois des modifications du miRNome dans plusieurs compartiments du lait lors de déficit énergétique, et ouvre ainsi la voie vers leur utilisation comme biomarqueurs de cet état chez les vaches laitières.

- **Tâche 1.3 : Intégration des données pour identifier des nouveaux biomarqueurs potentiels de la réponse adaptative des vaches laitières à un déficit énergétique**

L'objectif de cette Tâche était d'analyser l'ensemble des données communes aux essais LM et CI de façon intégrative.

La première approche, par analyse de redondances, décrit les modifications cinétiques de la composition du lait *via* l'exploration des taux protéique, butyreux et de lactose et des concentrations en métabolites du lait avant, pendant et après les restrictions alimentaires CI et LM.

Dans l'essai CI, cette analyse montre le passage entre un état *ad libitum* et un état restreint (Figure 9A). Le graphe B de la figure 9 ajoute le poids des variables sur le même plan. On distingue nettement l'importance des variations d'isocitrate dans le passage à l'état restreint, et des variations de glucose et glutamate dans le retour à un état *ad libitum*.

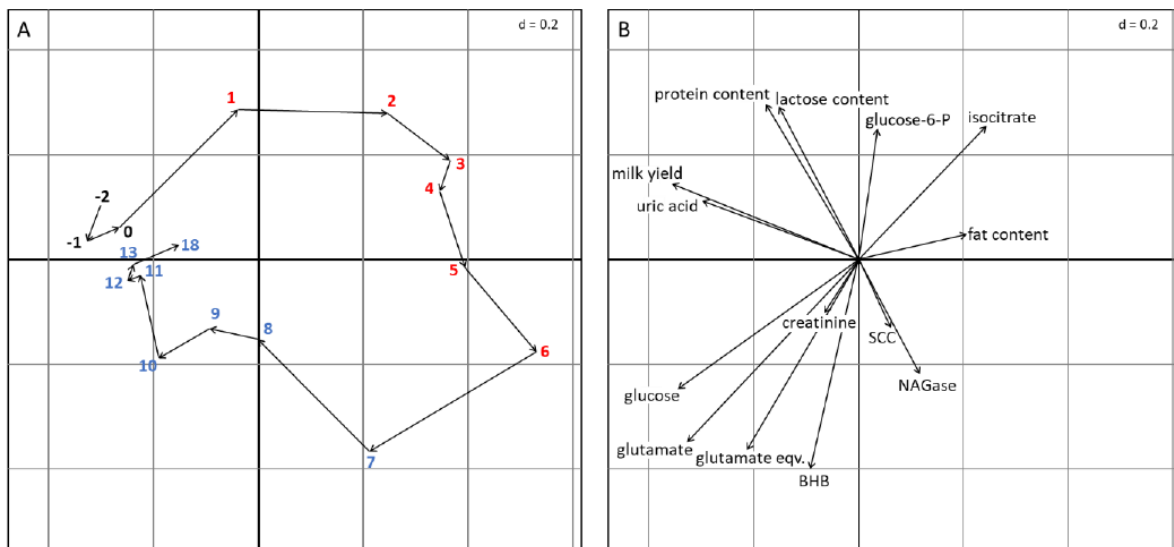


Figure 9 : Analyse de redondances réalisée sur les données du protocole CI. A : Variation au cours de l'essai avec les échantillons prélevés en phase pré-expérimentale en noir, au cours de la restriction en rouge et à la réalimentation *ad libitum* en bleu. B : Graphe des variables explicatives.

Dans l'essai LM, la Figure 10 illustre de la même manière le passage d'un état *ad libitum* à un état restreint et le retour à un état *ad libitum*, malgré le plus faible nombre de prélèvements sur ce protocole. On retrouve de la même manière que pour le protocole CI un impact important des variations de concentrations en isocitrate lors de l'état restreint. Cependant le glutamate n'est pas été identifié dans cet essai comme marqueur de l'état *ad libitum* contrairement à l'essai CI.

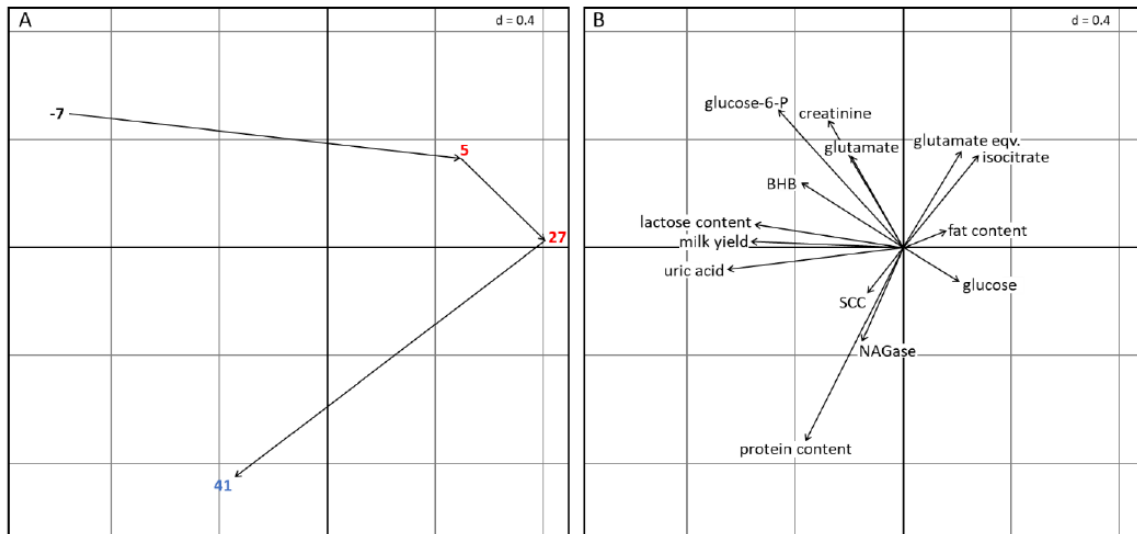


Figure 10 : Analyse de redondances réalisée sur les données du protocole CI. A : Variation au cours de l'essai avec les échantillons prélevés en phase pré-expérimentale en noir, au cours de la restriction en rouge et à la réalimentation ad libitum en bleu. B : Graphe des variables explicatives.

La seconde approche, par analyse multi-omique, vise à identifier un panel de biomarqueurs potentiels du déficit énergétique, par l'intégration des données de taux, de métabolites, des protéines majeures, du miRNome et du protéome du lait provenant des deux essais de restriction alimentaire.

Cette approche permet de prédire le bilan énergétique des vaches avec 10% des variables, séparées par bloc : un bloc de miRNomes des globules gras, un bloc de miRNomes du lait, un bloc de protéomes et un bloc autres constitué de la PL, des composants du lait et des métabolites du lait. L'analyse a d'abord été menée de manière séparée sur chacun des deux essais CI et LM, ce qui a permis de mettre en évidence **16 marqueurs communs aux deux essais** (Figure 11), parmi lesquels le taux de lactose, la serotransferrine déjà identifiée dans l'analyse des protéomes, la production laitière, auxquels on peut ajouter le glutamate et l'acide urique si on descend le seuil à 20% des variables pour le bloc « autres ».

DIABLO : 16 communs aux 2 essais à 10 %

Marqueur	Variation CI	Variation LM
Taux lactose	-0,58	-0,72
Serotransferrine	0,55	0,61
Production laitière	-0,47	-0,55
cgr-miR-25-5p_g	0,23	0,3
bta-chr14_9283_mt_g	-0,1	-0,22
bta-chr9_43846_mt_g	-0,14	-0,17
bta-chr25_26350_st_g	-0,1	-0,11
bta-chr6_38228_mt_g	-0,21	-0,1
bta-chr1_563_mt_g	-0,05	-0,1
hsa-miR-1277-5p_g	-0,06	0,1
bta-chr7_40722_mt_g	-0,1	-0,08
bta-miR-151-5p_l	-0,01	-0,08
bta-chr16_12378_mt_l	-0,03	-0,03
bta-chr2_20240_mt_l	-0,03	-0,03
bta-chr9_43183_mt_l	-0,03	-0,03
bta-miR-6529a_l	-0,08	0,02
Plus 2 métabolites à 20 %		
Glutamate	-0,04	-0,3
Acide urique	-0,09	-0,22

Figure 11 : Panel de biomarqueurs identifiés avec l'analyse multi-omique DIABLO.

En conclusion, ces approches ont révélé que les diminutions de la **production laitière**, du **taux de lactose** et de la concentration en **acide urique**, l'augmentation des concentrations en **isocitrate** et **sérotransferrine** et les variations d'abondance de **microARN** dans le lait entier et les globules gras étaient systématiques lors des essais de restriction alimentaire LM et CI. Ces biomarqueurs candidats s'ajoutent à la **caséine α S2**, meilleur candidat parmi les lactoprotéines dosées par HP-LC, aux **protéines communes aux 2 essais** mesurées par LC-MC/MS, et au **glutamate** du lait. **Ces résultats ouvrent la voie au développement d'un panel de biomarqueurs non invasifs du déficit énergétique.**

La méthode utilisée pour cette étude d'intégration a fait l'objet d'une publication méthodologique dans la revue BMC Bioinformatics. Un article scientifique intitulé "*Identifying biomarkers of negative energy balance in dairy cow through integrative analysis of milk composition and multi-omic data*" est en cours de rédaction pour valoriser les résultats obtenus.

Action 2 : Validation des biomarqueurs identifiés sur des animaux en déficit énergétique de différentes origines

La confrontation des biomarqueurs pressentis avec les données issues des échantillons de DEFFILAIT devait permettre une première validation des biomarqueurs sur un plus grand nombre d'animaux et lors de déficits énergétiques d'origines différentes : l'une physiologique, en début de lactation, et l'autre environnementale, induite par une dilution de la valeur énergétique de la ration. Aucune donnée omique n'ayant été générée lors de cet essai, la validation des biomarqueurs s'est donc limitée dans cet essai aux données de production (PL, taux), AG, protéines majeures et métabolites du lait. L'étude des microARN issus de cette expérimentation avait tout de même été envisagée, mais cette vérification n'a pas pu être réalisée car les variations d'abondance qui avaient été observées par séquençage lors des essais CI et LM n'ont cependant pas été retrouvées lors des analyses par qPCR.

Les analyses de la variance ont été effectuées à l'aide d'un modèle linéaire mixte qui comprenait le jour d'échantillonnage comme effet fixe et la vache comme effet aléatoire. Les effets du déficit énergétique de début de lactation (Tâche 2.1) et de la restriction alimentaire (Tâche 2.2) ont été évalués par comparaison aux valeurs mesurées avant la restriction. Les différences entre chaque jour d'échantillonnage ont été obtenues à l'aide d'une comparaison par paires de moyennes marginales estimées sur le même modèle linéaire mixte.

- **Tâche 2.1 : Evaluation des biomarqueurs sur des vaches en début de lactation**

En début de lactation, les vaches présentaient un bilan énergétique négatif comme attendu (Figure 12). Les teneurs en AGNE et BHB sanguins étaient supérieures à celles en période témoin et en période restreinte, ce qui suggère une mobilisation des réserves corporelles. La glycémie en revanche n'était pas différente. La production laitière n'était pas significativement différente de la période avant restriction.

Parmi les métabolites biomarqueurs candidats, la teneur en glucose-6-phosphate était supérieure à 21 jours qu'en périodes témoin et restreinte, tandis que les teneurs en glucose et galactose étaient inférieures. Les teneurs en glutamate et isocitrate étaient semblables à J21 et en période témoin mais supérieures à celles mesurées en période restreinte. La teneur en acide urique et en lactose était significativement supérieure à J21 par rapport aux deux autres périodes.

Concernant les protéines majeures, en début de lactation, à J21, les concentrations du lait en caséine α S2, α -LA et β -LG étaient inférieures à celles mesurées en milieu de lactation, à J-7. **Ces résultats suggèrent une réponse différente selon que le déficit énergétique soit d'origine physiologique (début de lactation) ou alimentaire. En effet, Seule la concentration en glucose-6P a augmenté que ce soit en cas déficit énergétique en début en lactation ou avec un déficit énergétique induit par une restriction alimentaire sévère.** Cependant, les résultats obtenus en début de lactation sont difficilement interprétables au regard d'un éloignement temporel important (5 mois) avec les autres périodes de mesure. En effet, au déficit énergétique s'est ajouté l'effet de l'avancée de la lactation. Or, dans les premiers mois de lactation la composition du lait est connue pour évoluer significativement et cet essai ne permettait pas de différencier l'effet du déficit énergétique sur la composition du lait de celui de l'avancée de la lactation.

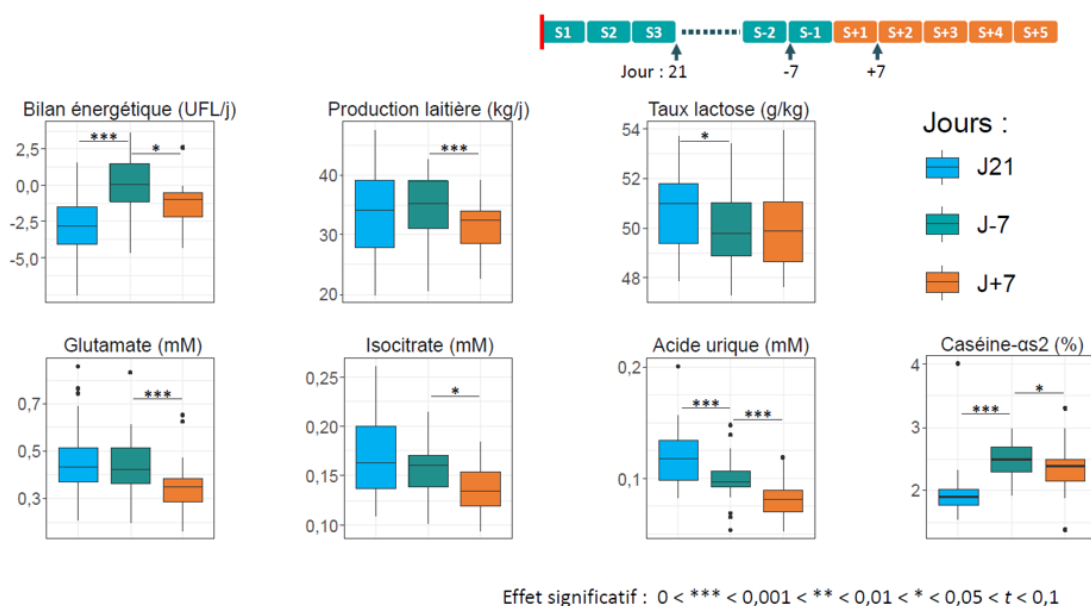


Figure 12 : Variation du bilan énergétique, de la production laitière et des biomarqueurs candidats dans l'essai DEFFILAIT.

- **Tâche 2.2 : Validation des biomarqueurs sur des vaches subissant une réduction de l'apport énergétique**

La restriction alimentaire découlant du changement de régime a été de faible intensité. Cela a été mis en évidence par le fait que les vaches n'ont pas exprimé de déficit énergétique (Figure 12). La production laitière a diminué de 9 % (contre une baisse de 20% des apports attendue) entre avant et après changement de régime et s'est accompagnée d'une augmentation significative de 48 % du taux d'exfoliation des CEM dans le lait. Les résultats obtenus dans cette Tâche sont cohérents avec ceux obtenus sur le protocole LM et suggèrent une adaptation du tissu mammaire des vaches laitières en réponse à la restriction. Les taux (TB, TP, taux de lactose) ont très légèrement diminué. Les teneurs en BHB, glucose et urée du sang ont diminué. Aucune variation de note d'état corporel ni de teneur en AG non estérifié du sang n'a été observée chez les vaches après changement de régime, ce qui suggère qu'elles n'ont pas eu besoin de mobiliser leurs réserves corporelles.

Des variations des teneurs en métabolites du lait ont été observées mais de manière différente par rapport au début de lactation. Dans cet essai une diminution de l'ensemble des concentrations en métabolites du lait (galactose, glucose, glucose-6P, glutamate, isocitrate) avec le changement de régime a été observée, alors que les résultats de l'Action 1 (protocole CI) montraient une hausse des concentrations en isocitrate et glucose-6P et une baisse de la concentration en glutamate.

Lors de la restriction alimentaire de milieu de lactation, à J+7, les concentrations en caséine α S2 et α -LA ont diminué alors que celle en caséine κ a augmenté. **Ces résultats suggèrent une réponse différente selon l'intensité de la restriction subie (mobilisation des réserves ou non).**

Les résultats obtenus sur les métabolites du lait ont fait l'objet d'un poster aux Rencontres Recherche Ruminants (Leduc et al., 2020).

Action 3 : Utilisation des biomarqueurs du statut nutritionnel des vaches laitières en élevage

- **Tâche 3.1 : Estimation du risque de déficit énergétique par les éleveurs et leurs techniciens**

Les enquêtes ont été réalisées en janvier 2019 auprès de 67 éleveurs laitiers et 14 accompagnants techniques afin de comprendre la perception du déficit énergétique chez la vache laitière, recenser les indicateurs utilisés et faire un état des lieux des pratiques mises en place pour le gérer. **Cette enquête a montré que l'appropriation de la notion de déficit énergétique et sa gestion en élevage par les éleveurs laitiers et leurs accompagnants techniques restent peu connues.** Cette étude a permis de mettre en évidence un paradoxe entre l'incapacité de certains éleveurs à définir le déficit énergétique, et leur très bonne connaissance pratique du phénomène, des périodes sensibles et des moyens existants pour le reconnaître. En effet, les notions qu'ils y relient sont dans l'ordre décroissant : le manque d'énergie, les indicateurs de détection (note d'état corporel (NEC), composition du lait...), la mauvaise valorisation de la ration, la mobilisation des réserves corporelles, l'acétonémie et la difficulté de faire face à certaines périodes critiques. Les périodes identifiées comme étant à risques sont le début de lactation, les difficultés saisonnières (ex : sécheresse) et les transitions alimentaires. **Plus de la moitié des éleveurs ont déjà constaté des situations de déficit énergétique dans leur troupeau.** La NEC est l'indicateur qu'ils utilisent le plus tandis que les accompagnants techniques favorisent les données de production et de composition du lait. Les actions mises en place afin de limiter le déficit énergétique concernent principalement l'amélioration de la ration, que ce soit de manière globale ou en augmentant spécifiquement l'apport d'énergie. **Environ 20% des éleveurs souhaiteraient disposer d'indicateurs ou d'équipements facilement accessibles permettant de mieux anticiper les risques de déficit énergétique.** Ces résultats ont été valorisés par les étudiants dans un article pour la revue Terra parue en mai 2019, puis repris dans un poster présenté à l'EAAP en août 2019. Ils ont fait l'objet d'une présentation flash aux Rencontres Recherche Ruminants (Gelé et al., 2020).

Le travail du second groupe d'étudiants a été mené de février à juin 2019. Il a permis de montrer l'intérêt des enseignants pour cette thématique mais également leurs difficultés pour l'enseigner, notamment en raison d'un manque de temps dans les modules. En fait, le déficit énergétique et ses conséquences pourraient être abordés en beaucoup d'occasions car c'est un élément à surveiller dans de nombreux cas (amaigrissement des vaches, problèmes de fertilité,

boiteries...). Les enseignants se sont dit intéressés par des contenus pédagogiques, majoritairement sous forme de fiches qu'ils pourraient reprendre à leur guise dans différents cours.

- **Tâche 3.2 : Développement d'un outil pour un monitoring à haut débit du statut nutritionnel et métabolique des vaches laitières via des analyses fines du lait**

Les données générées dans le projet sur les protocoles CI et DEFFILAIT ont fait l'objet d'une convention de partage avec le consortium du projet Interreg Happymoo. Dans ce projet, auquel Marine Gelé a contribué pour IDELE, ont été développées trois séries d'équations relatives au bilan énergétique. La première série concerne le bilan énergétique, l'ingestion de matière sèche et l'efficacité alimentaire. Le deuxième prédit les composants fins du lait (acide oléique C18:1c9, BHB, acétone, citrate), et le troisième concerne le poids vif et la NEC. Tous les modèles ont été développés à partir de bases de données européennes, incluant différents pays, races et systèmes. Une validation externe a été effectuée à l'aide d'essais de restriction alimentaire afin de s'assurer de la capacité de ces modèles à détecter un déficit énergétique en cas de restriction alimentaire : l'essai DEFFILAIT et l'essai CI. Les échantillons de lait de ces deux ensembles de données ont été analysés pour les AG et certains métabolites, et les spectres MIR ont été enregistrés et standardisés avant d'appliquer les équations Happymoo. Les meilleures performances ont été obtenues pour l'acide oléique ($R^2 = 0,94$ et $0,91$ pour DEFFILAIT et CI, respectivement), puis pour le bilan énergétique et l'ingestion de matière sèche ($R^2 \geq 0,55$), mais avec une forte corrélation avec l'acide oléique. Pour la NEC et le poids vif, la forme des courbes prédites coïncidait avec les valeurs observées. Pour le BHB, le manque de variabilité dans l'ensemble des données de validation n'a pas permis de tester les équations. Dans cette étude, l'acide oléique semble être le meilleur indicateur pour déterminer l'état nutritionnel de la vache, présentant une bonne réponse aux variations de l'apport nutritionnel, même en milieu de lactation. Ces résultats ont fait l'objet d'une présentation orale au congrès de l'EAAP en août 2023 (Calmels et al., 2023).

Dans le projet BIOMARQ'LAIT, nous avons choisi de travailler sur trois métabolites qui n'étaient pas prédits dans Happymoo. Il s'agit du glutamate, de l'acide urique et de l'isocitrate du lait.

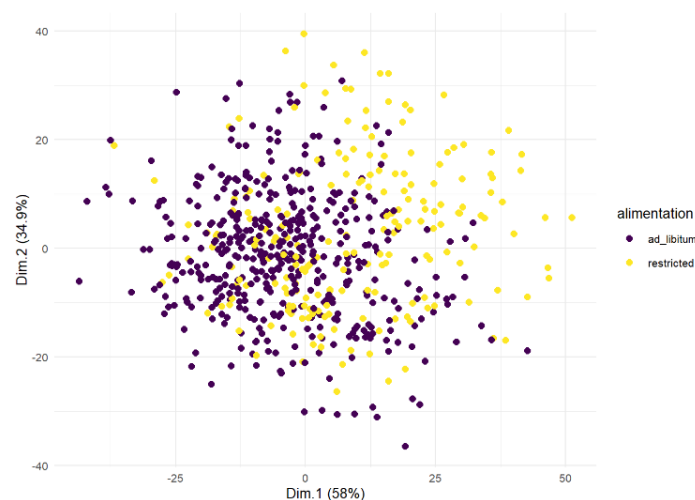


Figure 13 : Représentation des spectres MIR par analyse en composantes principales

Une Analyse en composantes principales (ACP) a d'abord été réalisée sur les 728 spectres MIR. La figure 13 ci-dessous montre que les spectres correspondant aux vaches en restriction (en jaune) ne sont pas représentés au même endroit que les spectres des vaches nourries ad libitum (en violet). Cela suggère qu'il est possible de discriminer les vaches selon leur alimentation à l'aide des spectres MIR.

Pour développer les équations, deux jeux de données ont été constitués :

- **Un jeu de calibration** comprenant 70% des données et sur lequel les équations ont été développées par régression des moindres carrés partiels (sparse partial least square regression – SPLS). Pour le glutamate, deux équations ont été développées : la première sans transformation des données, et la seconde après transformation Log des données.
- **Un jeu de validation** comprenant 30% des données et sur lequel les équations développées ont été appliquées pour calculer leurs performances.

Le tableau 2 présente les résultats obtenus.

Tableau 2 : Performances des équations développées sur le jeu de calibration et testées sur le jeu de validation

Métabolite	Jeu de données	N	Moyenne	Ecart-type	Moyenne prédite	Ecart-type prédit	R2	RPD	RMSEP
Glutamate	Calibration	439	319.85	183.23	325.11	163.28	0.80	2.21	82.89
Glutamate	Validation	185	326.15	150.53	328.46	138.29	0.67	1.74	87.53
Log_glutamate	Calibration	438	324.29	189.63	316.99	166.35	0.81	2.31	82.60
Log_glutamate	Validation	185	328.02	148.87	322.82	139.84	0.68	1.77	85.98
Isocitrate	Calibration	439	146.67	44.94	146.61	35.13	0.67	1.74	25.90
Isocitrate	Validation	187	136.80	36.82	139.26	33.36	0.59	1.55	24.38
Acide urique	Calibration	441	100.97	41.29	100.55	26.45	0.46	1.36	30.31
Acide urique	Validation	188	109.52	41.31	107.36	23.19	0.31	1.20	34.35

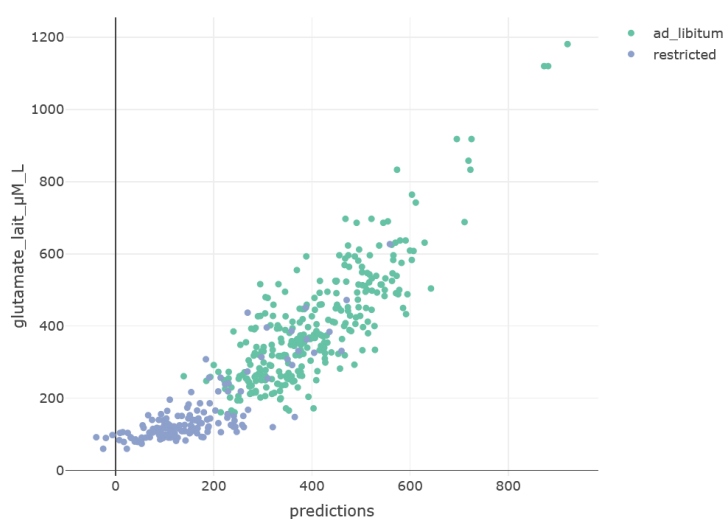


Figure 14 : Valeurs prédites du glutamate (en abscisses) par rapport aux valeurs mesurées (en ordonnées) en fonction de l'alimentation à volonté (en vert) et restreinte (en bleu), obtenues sur le jeu de calibration

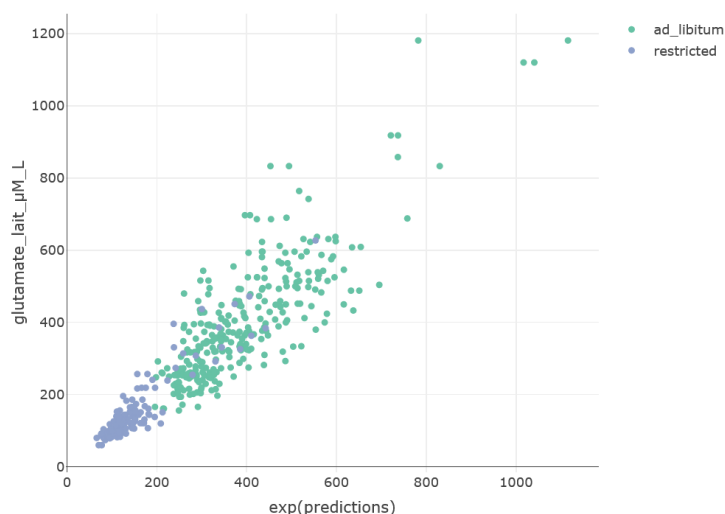


Figure 15 : Valeurs prédites du glutamate (en abscisses) par rapport aux valeurs mesurées (en ordonnées) en fonction de l'alimentation à volonté (en vert) et restreinte (en bleu), obtenues sur le jeu de calibration et après transformation log.

Le glutamate est assez bien prédit par le spectre MIR, que ce soit avec ou sans transformation logarithmique. D'après les représentations graphiques ci-dessus (figures 14 et 15), il semble possible d'envisager une discrimination des animaux restreints versus les animaux ad libitum en fixant un seuil autour de 200 à 250 µmol/L.

L'isocitrate est un peu moins bien prédit, avec un R^2 autour de 0,60, tandis que la prédiction de l'acide urique n'est pas satisfaisante.

Les équations développées pourront être utilisées conjointement aux équations déjà existantes (lactose, C18:1c9, BHB, citrate...) afin de constituer un panel de biomarqueur de manière simple et peu coûteuse pour une utilisation en routine.

- **Tâche 3.3 : Elaboration d'outils d'aide à la décision et de supports de formation**

Pour répondre aux attentes des différents publics cibles, il a été décidé de réaliser un kit pédagogique « clé en main ». Ce kit a pour vocation d'être utilisé en autonomie par les enseignants auprès de leurs classes, mais aussi par les techniciens auprès des éleveurs. Ce kit comprend des éléments de connaissances basiques et d'autres plus complexes, permettant d'adapter le niveau souhaité, de la sensibilisation (dans des groupes d'éleveurs par exemple), à l'apprentissage plus ou moins poussé (classes de BTS ou d'ingénieurs agronomes).

Il a été décidé de composer ce kit de trois différents supports : une vidéo, un quiz et des fiches de synthèse. Pour chaque support, un objectif principal a été défini :

- **Vidéo** : expliquer de façon illustrée les éléments de base à connaître sur le déficit énergétique.
- **Fiches de synthèse** : 3 fiches techniques pour développer les notions abordées dans la vidéo.
- **Quiz** : tester les connaissances sur le déficit énergétique.

Ces trois supports peuvent être utilisés de manière indépendante et dans l'ordre souhaité. Par exemple, les fiches de synthèse peuvent être utilisées en support de cours ou bien en document annexe. La vidéo peut être diffusée en classe, avant ou après le quiz. Le quiz peut servir à

évaluer les connaissances en début de module ou à évaluer les acquis en fin de module. Elle peut aussi servir de support d'échange entre le conseiller et l'éleveur.

L'enchaînement de ces trois supports permet d'introduire aux étudiants / éleveurs les principales connaissances à avoir sur le déficit énergétique, puis de vérifier par le quiz si ces connaissances ont bien été acquises et de les mettre en pratique par des exercices, et enfin de d'avoir la possibilité de conserver une trace écrite de ces connaissances via des fiches illustrées. Ces dernières peuvent ensuite être consultées par les étudiants ou les éleveurs quand ils le souhaitent.

Les trois fiches de synthèse sont présentées ci-dessous (Figure 16). Le quiz a été réalisé sur l'application Plickers qui permet une utilisation facile et ludique en groupe. L'ensemble du kit est disponible sur le site web d'IDELE.



Figure 16 : Fiches synthèse du kit pédagogique

Action 4 : Coordination du programme ; communication et transfert des références acquises

- **Tâche 4.1 : Coordination du programme**

La coanimation du projet entre Marine Gelé et Marion Boutinaud a été un point positif du projet. Cette organisation en binôme a permis une animation efficace du projet, permettant d'assurer sa continuité en cas d'absence de l'une ou de l'autre.

La réunion de lancement du projet a permis aux partenaires de se connaître et au chef de file de préciser les modalités administratives et financières du projet.

Les réunions du comité de pilotage ont permis d'organiser le travail entre les différentes parties, et de valider collectivement les décisions prises concernant les réorientations du projet. Cette dynamique collective a permis l'obtention d'un financement pour le recrutement d'un doctorant partagé entre deux structures partenaires (INRAE UMR PEGASE et UMR GABI) en cofinancement avec IDELE. La concertation entre les partenaires a permis de commencer à communiquer sur le projet dès le début du projet, puis au fil de l'eau.

- **Tâche 4.2 : Communication et transfert des références acquises**

Un site collaboratif SharePoint a été mis en place dès le début du projet afin de faciliter la communication interne entre les partenaires.

L'architecture proposée comprenait :

- 1 dossier Administratif comprenant les CR des réunions du comité de pilotage, les éléments sur le budget, rapports intermédiaires...

- 1 dossier par Action technique dans lequel les documents relatifs au déroulement des Actions, et aux résultats étaient mis à disposition de tous
- 1 dossier Communication où étaient archivées l'ensemble des productions du projet
- 1 calendrier où étaient indiquées les dates des différentes réunions.

Un logo a été créé afin de donner une identité visuelle au projet. Ce logo a été ensuite repris dans les différents supports de communication internes et externes.



Figure 17 : Logo du projet **BIOMARQ'LAIT** (version couleur et version noir et blanc)

En ce qui concerne la communication externe, le projet a donné lieu à de nombreuses communications sur divers supports et à destination de différents publics. **La liste des productions est la suivante :**

Plaquette institutionnelle :

- Gelé M., Boutinaud M., Flament J. 2018. BIOMARQ'LAIT – Identification dans le lait de biomarqueurs pour le monitoring du statut nutritionnel de la vache laitière. *Collection Focus*. Réf n° 0018302009.

Presse agricole :

- Bignon E. 2018. Le projet BIOMARQ'LAIT vise à identifier des biomarqueurs dans le lait. *Réussir Lait*, 321, 43.
- Bleuse A., Gerard C., Guevellou P.-A., Pype E., Payen R., Le Nouvel M. 2019. Déficit énergétique chez la vache laitière : "quand le taux va, tout va !". *Terra*, 10 mai 2019, 14-15.
- Peucelle A. 2022. Identifier le déficit énergétique des vaches laitières. *La France Agricole*, 3986, 16 décembre 2022, p.35

Conférence en salon professionnel :

- Gelé M., Leduc A. 2022. Prévenir et identifier le déficit énergétique de la vache laitière. Résultats du programme BIOMARQ'LAIT. *Conférence au SPACE*, 13 septembre 2022

Articles scientifiques :

- Hervé L, Quesnel H, Veron M, Portanguen J, Gross JJ, Bruckmaier RM, Boutinaud M. 2019. Milk yield loss in response to feed restriction is associated with mammary epithelial cell exfoliation in dairy cows. *J Dairy Sci.*,102 (3), 2670-2685.
- Billa P.A., Faulconnier Y., Larsen T., Leroux C., Pires J. 2020. Milk metabolites as noninvasive indicators of nutritional status of mid-lactation Holstein and Montbéliarde cows. *J Dairy Sci.*,103 (4), 3133-3146.

- Hulot A., Laloë D., Jaffrezic F. 2021. A unified framework for the integration of multiple hierarchical clusterings or networks from multi-source data. *BMC Bioinformatics*, 22 (392)
- Leduc A., Souchet S., Gelé M., Le Provost F., Boutinaud M. 2021. Effect of feed restriction on dairy cow milk production: a review. *Journal of Animal Science*, 99 (7), 1–12
- Leduc A., Le Guillou S., Bianchi L., Oliveira Correia L., Gelé M., Pires J. Martin P., Leroux C., Le Provost F., Boutinaud M. 2022. Milk proteins as a feed restriction signature indicating the metabolic adaptation of dairy cows. *Scientific Reports*, 12 (18886)
- Leduc A., Le Guillou S., Laloe D., Hervé L., Laubier J., Debournoux-Poton P., Faulconnier Y., Martin P., Gelé M., Pires J., Leroux C., Boutinaud M., Le Provost F. (2023). MiRNome variations in milk Fractions during feed restrictions of different intensities in dairy cows. *BMC Genomics*, 24(680).

Posters :

- Billa P.A., Faulconnier Y., Larsen T., Leroux C., Pires J. 2018. Les métabolites du lait comme indicateurs non invasifs du statut nutritionnel chez les vaches Holstein et Montbéliarde en milieu de lactation. *Rencontres Recherche Ruminants*, Décembre 2018, Paris (France).
- Gelé M., Le Provost F., Pires J., Flament J., Martin P., Billa P.A., Le Guillou S., Le Cozler Y., Faulconnier Y., Laloe D., Jacqueroud M.P., Leroux C., Boutinaud M., 2018. Projet BIOMARQ'LAIT : Identification dans le lait de biomarqueurs pour le monitoring du statut nutritionnel de la vache laitière. *Rencontres Recherche Ruminants*, Décembre 2018, Paris (France).
- Billa P.A., Faulconnier Y., Larsen T., Leroux C., Pires J. 2019. Milk metabolites as noninvasive indicators status of mid-lactation Holstein and Montbéliarde cows. *2019 American Dairy Science Association Annual Meeting*, Juin 2019, Cincinnati (USA).
- Pénasse Y., Devriendt N., Gotti V., Le Cozler Y., Gelé M., Jurquet J., Guinard-Flament J. 2019.. *70th Annual meeting of the European Federation of Animal Science*, Août 2019, Gand (Belgique).
- Boutinaud M., Hervé L., Souchet S., Arnaud E., Debournoux P., Faverdin P., Guinard-Flament J., Quesnel H., Gelé M. 2019. L'exfoliation des cellules épithéliales mammaires chez la vache laitière comme biomarqueur de l'adaptation à la restriction alimentaire. *Séminaire Défis Scientifiques du Département Physiologie Animale et Systèmes d'Élevage*, Novembre 2019, Rennes (France).
- Leduc A., Souchet S., Le Provost F., Fischer A., Faverdin P., Gelé M., Boutinaud M. 2020. Les métabolites du lait, nouvelle piste non invasive pour détecter le déficit énergétique de la vache laitière. *Rencontres Recherche Ruminants*, Décembre 2020, Paris (France).
- Gelé M., Boutinaud M., Bouqueau A., Marguerit M., Jurquet J., Le Cozler Y., Guinard-Flament J. 2023. An educational kit for effective prevention and management of energy deficit in dairy cows. *74th Annual meeting of the European Federation of Animal Science*, Août 2023, Lyon (France)

Présentations orales en congrès :

- Le Guillou S., Mobuchon L., Marthey S., Laloe D., Bourdon C., Boussaha M., Tossier-Klopp G., Gelé M., Boutinaud M., Leroux C., Le Provost F. 2018. Les microARN de la glande mammaire et du lait – convergence vers la définition d’une signature multi-espèces spécifique de la fonction de lactation. *Journées Scientifiques du Département de Génétique Animale*, Octobre 2018, Dienné (France)
- Billa P.A., Faulconnier Y., Ye T., Bes S., Pires J., Leroux C. 2019. Deep RNA-Seq reveals genetics and nutritional regulation of miRNomes in mammary gland of lactating Holstein and Montbéliarde cows. *2019 American Dairy Science Association Annual Meeting*, Juin 2019, Cincinnati (USA).
- Billa P.A., Faulconnier Y., Larsen T., Leroux C., Pires J. 2019. Les métabolites du lait comme indicateurs non invasifs du statut nutritionnel chez les vaches Holstein et Montbéliarde en milieu de lactation. *Séminaire Défis Scientifiques du Département Physiologie Animale et Systèmes d'Élevage*, Novembre 2019, Rennes (France).
- Billa P.A., Pires J., Faulconnier Y., Leroux C. 2019. Identification de biomarqueurs d’un bilan énergétique négatif. *XVIIIe journée transversalité Glande Mammaire Lait*, Novembre 2019, Paris (France).
- Leduc A., Souchet S., Gelé M., Le Provost F., Boutinaud M. 2019. Répercussions d’un stress alimentaire sur la lactation chez les ruminants laitiers. *XVIIIe journée transversalité Glande Mammaire Lait*, Novembre 2019, Paris (France).
- Gelé M., Blanchet M., Laigle A., Woiltock A., Jurquet J., Le Cozler Y., Guinard-Flament J. 2020. Déficit énergétique chez la vache laitière : indicateurs utilisés et niveau de sensibilisation des éleveurs et accompagnants techniques. *Rencontres Recherche Ruminants*, Décembre 2020, Paris (France).
- Leduc A., Souchet S., Le Provost F., Fischer A., Faverdin P., Pires J. A. A., Gele M., Boutinaud M. 2021. Milk metabolites, a novel noninvasive approach to assess energy balance in dairy cattle. *2021 American Dairy Science Association Annual Meeting*, Juillet 2021, visioconférence.
- Leduc A., Le Guillou S., Bianchi L., Gelé M., Hervé L., Martin P., Pires J., Faulconnier Y., Leroux C., Boutinaud M., Le Provost F. 2021. Feed restriction affects protein and microRNA levels in dairy cows’ milk. *72th Annual meeting of the European Federation of Animal Science*, Septembre 2021, Davos (Suisse)
- Leduc A., Le Guillou S., Bianchi L., Oliveira Correia L., Rau A., Laloë D., Faulconnier Y., Pires J., Leroux C., Boutinaud M., Le Provost F. 2021. Impact d’une restriction alimentaire sur les miRNome et protéome du lait chez la vache laitière. *XXe journée transversalité Glande Mammaire Lait*, Novembre 2021, Paris (France).
- Calmels M., Pires J., Boutinaud M., Leduc., Leroux C., Chelotti J., Dale L., Grelet C., Tedde A., Leblois J. Gelé M. 2023. Validation of HappyMoo MIR energy balance models on external datasets with feeding restriction. *EAAP Annual Meeting*, Lyon, 31/08/2023

Kit pédagogique :

- 3 fiches pratiques, 1 quiz et une vidéo à retrouver sur www.IDELE.fr

4- Conclusion et perspectives

Le projet **BIOMARQ'LAIT** a abouti à des **avancées scientifiques significatives concernant la caractérisation des effets de différents types de restrictions alimentaires sur la composition fine du lait**. Les résultats obtenus sur les miRNomes des différents compartiments du lait, et sur les protéomes constituent des acquis originaux. L'ensemble de ces résultats permet de mieux appréhender les voies métaboliques affectées par la restriction alimentaire dans la glande mammaire. Ceux-ci concernent les métabolismes protéique, lipidique et glucidique liés à la production laitière, le remodelage de l'épithélium mammaire *via* l'apoptose et l'exfoliation, et la réponse immunitaire.

Un **panel de molécules identifiées comme étant des biomarqueurs du statut nutritionnel des vaches** a été identifié et comprend :

- Des macro composants et métabolites : lactose, isocitrate, glutamate et acide urique
- Des protéines : caséine- α S2, apolipoprotéine A-IV, α -1B-glycoprotéine, angiotensinogène, et sérotransferrine
- 5 microARN du lait entier et 8 microARN des globules gras

Les résultats obtenus ont été largement valorisés auprès des différents publics cibles au moyen :

- De communications auprès du public technique (éleveurs et conseillers) ***via* la presse spécialisée et les salons professionnels**,
- De nombreuses communications scientifiques dont **six articles publiés dans des revues à comité de lecture** ainsi qu'un septième en cours de rédaction,
- D'un **kit pédagogique** permettant le transfert des connaissances auprès des professionnels et de l'enseignement agricole et agronome.

L'utilisation sur le terrain de ces résultats requiert des méthodes de mesure des biomarqueurs identifiés qui soient simples, rapides, et peu coûteuses à mettre en œuvre. Pour les métabolites du lait, des équations basées sur la spectrométrie MIR sont en cours de développement et pourront être utilisées conjointement aux équations déjà existantes (lactose, AG du lait, BHB, citrate). Pour les protéines et en particulier la sérotransferrine, le développement de dosages immunochimiques de type ELISA spécifiques est en réflexion. En ce qui concerne les microARN, une puce de type microfluidique permettant leur détection directe dans les fluides est en cours de développement sur du lait de souris (Horny et al., 2021) et est en cours d'adaptation sur le lait bovin.

Collection
Résultats

Edité par :
l'Institut de l'Élevage
149 rue de Bercy
75595 Paris Cedex 12
www.idele.fr
Novembre 2022

Dépôt légal :
4e trimestre 2022
© Tous droits réservés
à l'Institut de l'Élevage
Réf. 0022 302 074
ISSN 1773-4738



CASDAR RT 1726 BIOMARQ'LAIT

Identification dans le lait de biomarqueurs pour le monitoring du statut nutritionnel de la vache laitière Rapport final du projet (2017-2022) – Volet technique

Le projet BIOMARQ'LAIT visait à identifier des molécules mesurables dans le lait permettant par une approche non-invasive de déterminer la capacité d'adaptation des vaches laitières à un déficit énergétique. Au cours du projet, l'intérêt de nombreux composants du lait a été étudiés dans le lait écrémé, les globules gras, les vésicules extracellulaires et les cellules épithéliales mammaires. Un panel de biomarqueurs candidats constitué de métabolites, protéines, et micro-ARN a ainsi été constitué.

Le développement d'une méthode permettant d'utiliser ces biomarqueurs sur le terrain et d'adapter au cas par cas l'alimentation des vaches laitières constituait le deuxième objectif du projet. Le projet a donc permis le développement d'équations de prédiction des concentrations en trois métabolites d'intérêt à partir des spectres moyen-infrarouge du lait.

Enfin, les nouvelles références acquises dans ce projet ont été largement transmises aux acteurs de la filière par le biais de communications institutionnelles, techniques, et scientifiques. Un kit pédagogique a également été produit pour permettre aux éleveurs et apprenants d'avoir une meilleure connaissance du déficit énergétique chez la vache laitière.

Avec le soutien financier :

Contact :

Novembre 2022
Réf. 0022 302 074
ISSN 1773-4738

Marine.gele@idele.fr

www.idele.fr

