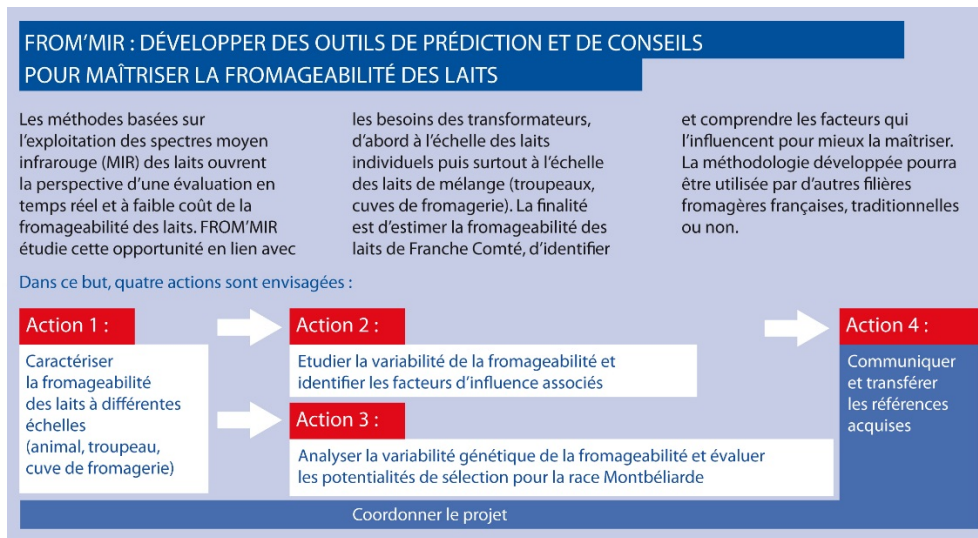


Newsletter FROM'MIR n° 2

Rappel des objectifs et de l'organisation de FROM'MIR



Le contenu de la newsletter en résumé

Une grande partie de la newsletter porte sur les variants des protéines du lait.

→ **Avant de détailler les actions, un point est effectué sur les protéines du lait et leur rôle important sur la fromageabilité.**

570 échantillons de lait de vaches Montbéliardes ont été prélevés en zone AOP et IGP de Franche-Comté afin d'identifier les variants génétiques des protéines du lait des animaux. Les laits ont été analysés par une méthode hautement résolutive (la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS)) par l'équipe « Lait, Génome et Santé » (LGS) de l'Unité Génétique Animales et Biologie Intégrative (GABI) de l'INRA de Jouy-en-Josas.

Les analyses ont mis en évidence la présence en faibles proportions de variants rares pour trois caséines et une protéine du lactosérum. Un nouveau variant de la caséine β a été détecté à une fréquence relativement élevée. L' α -lactalbumine est la seule des 6 lactoprotéines à ne pas être polymorphe (un seul variant recensé).

→ **La campagne d'échantillonnage et les résultats des analyses effectuées sont détaillés**

En 2015, des prélèvements et analyses de laits de troupeaux et de cuves de fromageries ont été réalisés. Avec ces prélèvements, plusieurs objectifs étaient visés :

- Estimer la composition en protéines du lait et minéraux sur ces laits de mélange à partir du spectre MIR. Cette méthode existe déjà sur lait individuel, l'objectif est de la valider sur lait de mélange.
- Réaliser des analyses de référence de fromageabilité sur laits de mélange afin de mettre au point une méthode d'estimation par le spectre MIR.
- Acquérir des données en grand nombre pour établir le lien entre la fromageabilité et la composition fine des laits

→ **Les critères de sélection des laits et le protocole de prélèvement des laits sont présentés**

→ **Cette newsletter présente les activités de l'équipe LGS de l'INRA de Jouy-en-Josas dont les travaux ont permis de faire l'inventaire des variants protéiques en race Montbéliarde dans les élevages AOP et IGP en Franche-Comté. La méthode LC-MS développée par cet organisme est explicitée.**

Les protéines du lait, composants clés pour la fromageabilité

Le lait de vache contient 34 g/kg de matières azotées totales dont 95% sous forme de protéines, soit approximativement 32 g/kg (Mahaut *et al.*, 2000).

Les protéines du lait sont constituées à 80% de protéines coagulables appelées caséines. On compte 4 principaux types de caséines : les caséines α_{s1} , α_{s2} , β , κ et la caséine γ issue de la dégradation de la caséine β (figure 1). Les 20% de protéines restantes sont des protéines solubles ou dites non coagulables : on les retrouve en majorité dans le lactosérum lors de la transformation fromagère, elles ne sont pas coagulées par les agents coagulants utilisés en fromagerie tels que la présure, contrairement aux caséines. Les protéines solubles dominantes sont la β -lactoglobuline (45% des protéines solubles) et l' α -lactalbumine (25% des protéines solubles).

Dans le lait frais, les caséines sont organisées en micelles. Ce sont des particules sphériques, formées par l'association des caséines et des composants salins dont le calcium et le phosphate inorganique. Du fait de leur caractère hydrophile (attraction pour l'eau), les caséines κ se retrouvent à la périphérie de la micelle et les caséines α et β sont groupées dans le centre. Les caséines β , α_{s1} et α_{s2} en association avec le phosphate de calcium assurent la cohésion des caséines au sein de chaque micelle tandis que la caséine κ assure la répulsion entre les différentes micelles dans le lait. A pH normal, les micelles sont donc dispersées dans le lait.

Les protéines et la coagulation du lait

La coagulation du lait consiste à modifier voire déstructurer les micelles avec une ré-organisation des protéines en réseau.

La coagulation du lait à la base de la fabrication du fromage est la résultante de deux phénomènes conjugués : une coagulation dite enzymatique sous l'action de la présure (déstabilisation des micelles par action sur la caséine κ) et une coagulation dite lactique sous l'action de l'acide lactique produit par les bactéries lactiques (déstructuration des micelles liée à la baisse du pH du lait). L'importance relative de chaque type de coagulation dans les procédés de fabrication est à l'origine de la diversité des pâtes molles et pâtes pressées.

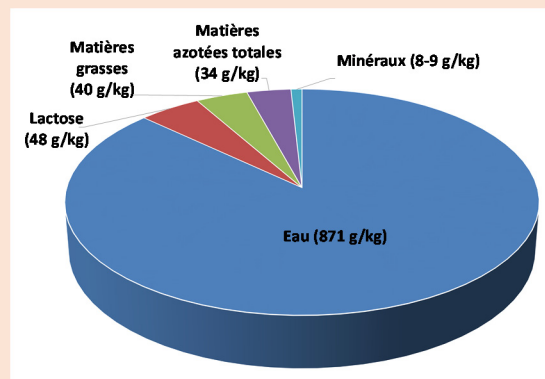
L'impact important des variants protéiques sur la fromageabilité

Les protéines du lait peuvent être retrouvées sous différentes formes. Le type de protéines retrouvées dans le lait est dépendant :

- des gènes de chaque animal codant pour chacune des protéines. Des différences au niveau des gènes (modifications subtiles (mutations)) peuvent impacter la structure de la protéine et donc ses propriétés, mais aussi son niveau d'expression. On parle alors de **variants génétiques**. Un animal produira un lait qui sera toujours composé des mêmes variants génétiques mais des différences pourront être observées entre individus.
- de modifications plus profondes intervenant spécifiquement à certaines étapes de la synthèse des protéines (**variants d'épissage, isoformes de glycosylation et de phosphorylation**).
- de facteurs dégradant les protéines (protéolyse) et conduisant à des formes dérivées telles que les **caséines gamma**, issues de la dégradation de la caséine β .

Les variants génétiques ont un impact important sur la fromageabilité. Il existe, par exemple, plusieurs variants génétiques de la caséine κ : A, B et E. Le variant E est moins fréquent mais il est associé à une dégradation de l'aptitude à la coagulation du lait (Jensen *et al.*, 2012).

Composition du lait (g/kg de lait)



Composition de la matière azotée totale (g/kg de lait)

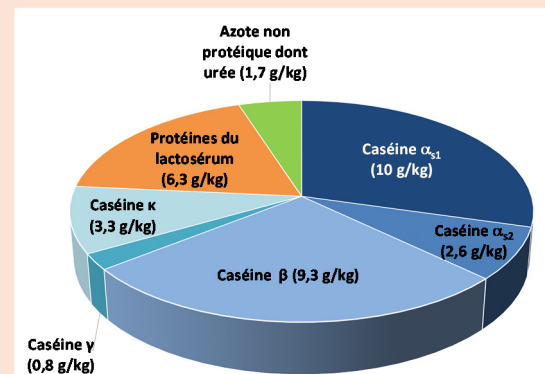


Figure 1 : Composition du lait et composition de la matière azotée totale du lait

Quels sont les variants génétiques en race Montbéliarde dans la région Franche-Comté ?

Cette question s'inscrit dans le cadre de l'action 1 de FROM'MIR. L'objectif est de faire l'inventaire et d'estimer la fréquence des variants des 6 protéines majeures du lait en race Montbéliarde dans la zone AOP et IGP de Franche-Comté.

Sélection, prélèvements et analyse de 570 laits individuels

Les laits individuels ont été prélevés et analysés par une méthode hautement résolutive (« LC-MS » : chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse) qui permet d'identifier et de quantifier la plupart des variants protéiques - dont les variants génétiques - (détail dans la rubrique « ZOOM sur les activités d'un partenaire »).

La base de recrutement était constituée de 750 vaches des élevages adhérents au contrôle laitier de performance, en zone AOP/IGP de Franche-Comté. Seules les 67 022 vaches ayant au maximum 3 lactations ont été retenues. Le recrutement des animaux a alors été établi de façon à maximiser la diversité génétique (sélection basée sur les grands-pères paternels : taureaux d'entreprises de sélection différentes et de monte naturelle) et la variabilité de la composition physico-chimique du lait (données taux protéique et calcium issues des contrôles de performances réalisés entre le 01/01/2014 et le 31/05/2014), tout en prenant en compte la répartition des animaux entre les 3 départements de Franche-Comté.

La collecte des échantillons a été effectuée entre octobre et décembre 2014 puis entre avril et juillet 2015. Les prélèvements ont été réalisés à la traite du matin en même temps que le contrôle de performances et avec les mêmes conditions de prélèvement (tru-test).

Lors des premières collectes, les échantillons devaient être au maximum stockés deux jours à 4°C avant congélation en vue des analyses LC-MS réalisées par l'équipe LGS de l'INRA de Jouy. Les premières analyses ont montré une protéolyse importante entraînant des difficultés d'interprétation des résultats. Le protocole de prélèvement a été revu en conséquence : lors de la seconde collecte, les échantillons ont été conservés et transportés au froid (4°C) pour être congelés dans les 24 heures suivant le prélèvement.

570 échantillons ont été prélevés (306 dans le Doubs, 203 dans le Jura et 61 en Haute-Saône) et analysés.

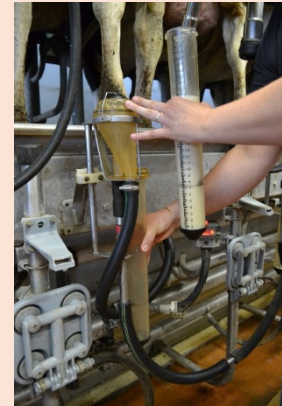


Figure 2. Le tru-test est l'outil utilisé pour collecter l'échantillon de lait du contrôle laitier. Il permet également de mesurer, pour chaque vache, le poids de lait collecté lors de la traite

Des variants rares et la mise en évidence d'un nouveau variant de la caséine ?

Les fréquences des variants génétiques des caséines κ , α_{s1} et β et de la β -lactoglobuline dans les laits prélevés sont représentées sur les graphiques de la Figure 3. La caséine α_{s2} ne présente que deux variants : A et D, le variant D étant en très faible proportion (0,1%).

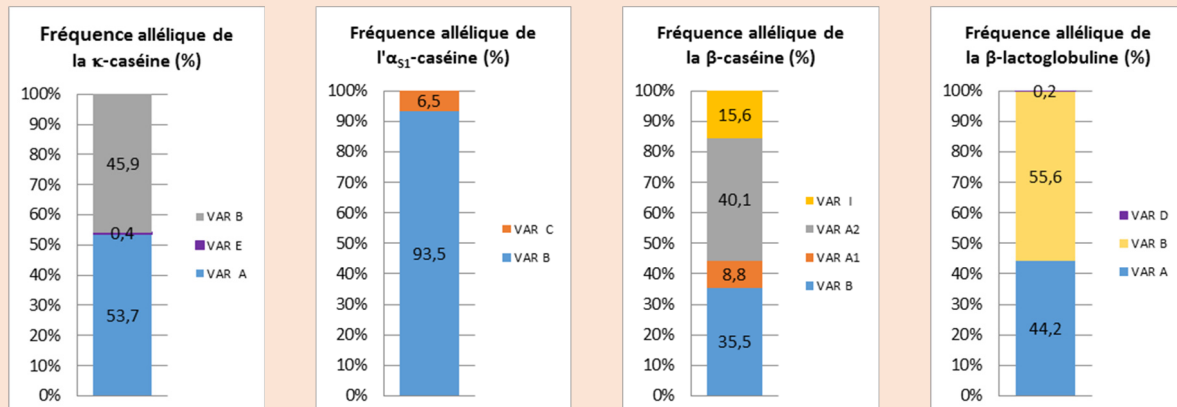


Figure 3. Fréquences alléliques des caséines κ , α_{s1} , et β et de la β -lactoglobuline dans les 570 laits prélevés de vaches de race Montbéliarde

On observe la présence en faibles proportions de variants rares de la caséine κ (κ -CN E), de la caséine α_{s2} (α_{s2} -CN D), de la β -lactoglobuline (β -LG D), de la caséine α_{s1} (α_{s1} -CN C). Un nouveau variant de la caséine β (β -CN I) a été détecté à une fréquence relativement élevée (environ 16%). Il n'y a pas de polymorphisme pour l' α -lactalbumine (α -LA).

Ces fréquences alléliques peuvent être comparées aux rares données disponibles en race Montbéliarde datant de 1965 et 1976 (Grosclaude, INRA Prod. Anim., 1988). Toutefois, cette comparaison doit être analysée avec précaution : notre échantillonnage ne visait pas une représentativité sur l'ensemble de la race, comme cela pouvait être le cas dans les études antérieures.

- Le variant E de la caséine κ n'était pas décrit à l'époque. Il est présent dans l'échantillonnage actuel mais en très faible proportion.
- Le variant D de la caséine α_{s2} semble disparaître progressivement (1% en 1976).
- Le variant D de la caséine α_{s1} qui était présent à 1% en 1976 n'a pas été retrouvé dans l'échantillonnage actuel. Il semble que le variant C tende également à disparaître.
- Le variant C de la caséine β n'a pas été retrouvé dans l'échantillon actuel (il n'était présent qu'en très faible proportion en 1965 et 1976). Par contre, le variant I n'était pas identifié dans les études de 1965 et 1976. Ce variant a été mis en évidence grâce à la puissance des nouvelles méthodes analytiques utilisées (LC-MS). Il devait être probablement confondu avec le variant A2 dans les études antérieures qui mettaient en œuvre des techniques analytiques basées à l'époque sur l'électrophorèse (focalisation isoélectrique).

Sélection et collecte des laits de troupeaux et de cuves de fromagerie

200 laits de troupeaux et 110 laits de cuves ont été prélevés pour l'action 2 dont l'objectif est d'étudier la variabilité de la fromageabilité des laits et d'identifier les facteurs d'influence associés.

Parmi ces échantillons, 100 laits de troupeaux et 70 laits de cuve sont aussi utilisés pour les volets b) et c) de l'action 1, respectivement : validation des équations de composition fine sur des laits de mélange (troupeaux et cuves) et mise au point des équations de fromageabilité.

Des enquêtes et analyses associées à ces prélèvements ont également été réalisées en 2015 et seront détaillées dans une prochaine newsletter.

200 troupeaux sélectionnés sur une base de plus de 2 000 élevages

La base de données des 2106 élevages AOP/IGP de Franche-Comté a été utilisée.

La sélection des 200 troupeaux a été réalisée en cherchant à maximiser la variabilité des facteurs susceptibles d'impacter la fromageabilité des laits produits et/ou des indicateurs de la fromageabilité :

- la répartition géographique des troupeaux (approcher l'effet terroir) ;
- la répartition des vèlages (groupés vs étalés ; automne/printemps) ;
- le taux protéique (lié à la consommation de concentrés et à la production laitière).

55 fromageries sélectionnées parmi 160 recensées

La base de données initiale était constituée de 159 fromageries AOP franc-comtoises recensées au CTFC. L'objectif était de sélectionner 55 fromageries. A la différence des laits de troupeaux, chaque fromagerie sélectionnée a été suivie aux deux périodes (hiver et été).

La sélection des fromageries a été réalisée en tenant compte de plusieurs critères :

- zone géographique de collecte,
- taille des fromageries estimée par le nombre de producteurs collectés.

Les autres éléments pris en compte dans le choix des fromageries sont :

- la représentativité des 3 types de collecte de la zone d'étude : lait bi-traite rafraîchi à 12°C (94%), lait bi-traite refroidi à 4°C (3%), lait d'une seule traite à 18°C (coulée) (3%) ;
- l'historique des résultats d'analyses effectuées par le CTFC de 2008 à 2013 ;
- les laits produits sous label « Agriculture Biologique » ;

- la représentation de la diversité des affineurs, ces derniers pouvant influencer les pratiques des producteurs et des fromageries.

Une planification précise de la collecte

Un calendrier prévisionnel de collecte a été réalisé en tenant compte :

- de l'alimentation des animaux avec deux périodes de collecte définies : l'une correspondant à une alimentation en fourrage sec et l'autre à une alimentation au pâturage.
- des contraintes liées à la logistique de reconditionnement (« aliquotage ») et de la distribution des échantillons.
- des limites liées aux techniques et matériels utilisés pour les analyses dans les laboratoires impliqués. Pour procéder aux analyses simultanées de laits frais (moins de 24H), il n'était possible de programmer que deux jours d'analyse par semaine avec 7 laits analysés par jour.
- de contraintes pratiques : les déplacements des techniciens devaient être optimisés notamment pour raccourcir les délais de livraison au point de préparation, d'aliquotage et de distribution des échantillons prélevés (INRA de Poligny).

Ce calendrier a été partagé entre toutes les personnes en charge des prélèvements et des analyses.

Une logistique très lourde

Une forte exigence sur la qualité des échantillons



Figure 4. 3 % des fromageries suivies au CTFC sont en coulée : le lait de chaque traite est apporté par les producteurs à la fromagerie dans une "boule à lait" après chaque traite (Fromagerie de Chapelle des Bois, Doubs)

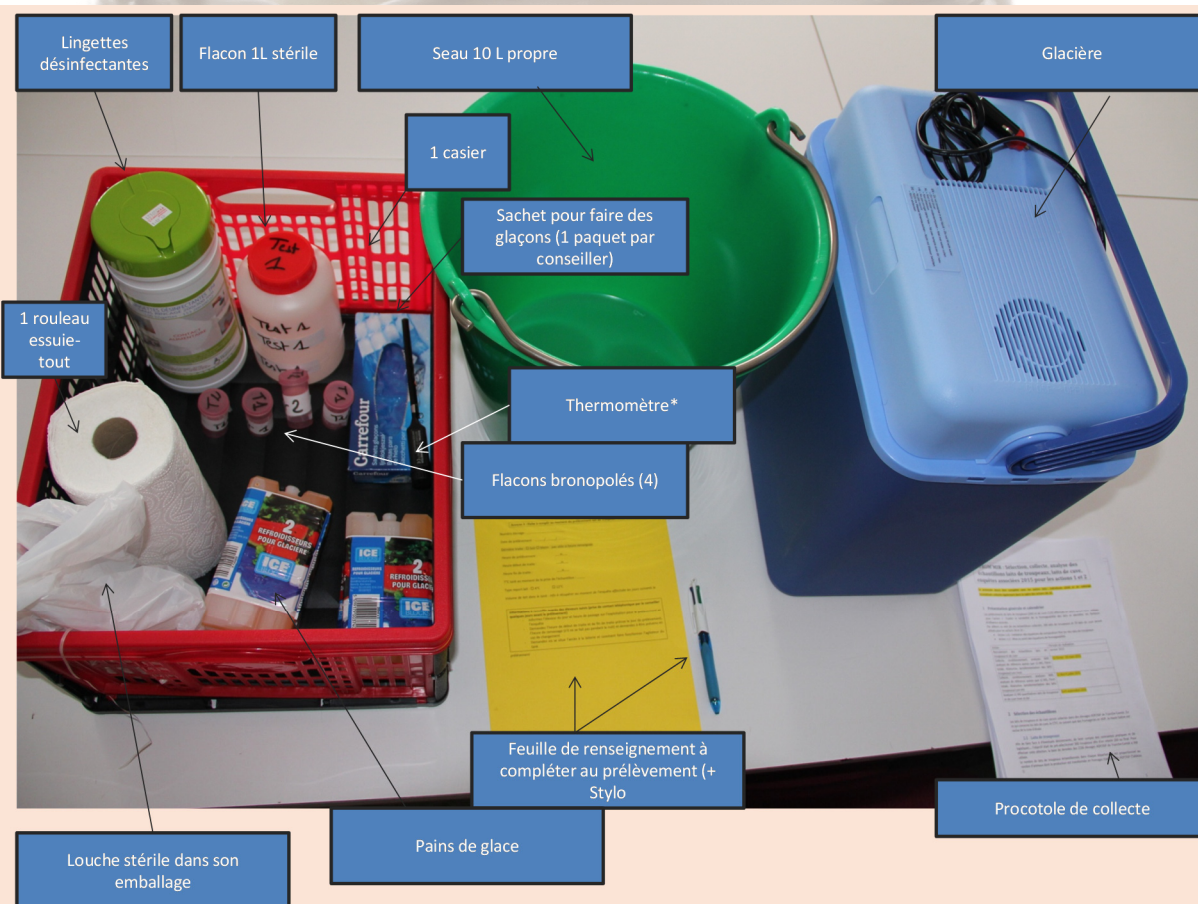


Figure 5. Des précautions pour les prélèvements ont été prises : utilisation de flacons et de matériel de prélèvements (louches, louchettes) stériles, utilisation de lingettes désinfectantes

Les analyses réalisées imposaient de travailler sur des laits crus, frais et de bonne qualité. Les analyses étaient réalisées maximum 24H après la collecte, excepté pour les analyses LC-MS pour lesquelles l'échantillon utilisé était congelé. La congélation était effectuée au moment de la réalisation des autres analyses pour avoir des caractéristiques d'échantillon identiques.

Pour être de bonne qualité, les échantillons ne devaient pas être dégradés (maîtrise de la protéolyse) et il fallait éviter les contaminations et/ou les développements bactériens. Les échantillons devaient donc être collectés très proprement de la manière la plus aseptique possible, refroidis immédiatement et maintenus à 4°C.

Un protocole précis de prélèvement des laits de troupeaux

Une trentaine de techniciens des contrôles laitiers ont été mobilisés pour la réalisation des prélèvements. Les éleveurs étaient avertis par courrier puis contactés de manière individuelle par le conseiller afin d'obtenir les informations nécessaires à la bonne conduite des échantillonnages.

Un protocole détaillé de prélèvement a été fourni à chacun des conseillers réalisant un prélèvement.

Les flacons d'échantillons de lait étaient immédiatement refroidis après le prélèvement en les plongeant dans un seau d'eau glacée. Les flacons refroidis à 4°C étaient ensuite maintenus à cette température lors du transport dans une glacière ou un véhicule réfrigéré.

Un protocole précis de prélèvement des laits de cuves

Le prélèvement était réalisé par le fromager ou le technicien du CTFC. Les fromagers étaient avertis de façon générale par courrier puis contactés de manière individuelle par le technicien pour être informés des modalités de prélèvement.

Le lait prélevé était représentatif de toute la cuve et devait être prélevé avant tout ensemencement.

Centralisation des prélèvements, « aliquotage » et acheminement vers les laboratoires

L'INRA de Poligny était chargé de répartir le lait de l'échantillon prélevé (flacon d'un litre) dans des nouveaux flacons destinés aux différents laboratoires réalisant les analyses (« aliquotage»). La température du lait, le pH et l'aspect visuel des laits étaient contrôlés afin de détecter tout échantillon anormal.

Les aliquotes étaient réalisées en conditions aseptiques. Les flacons étaient ensuite transportés au froid vers les autres laboratoires réalisant les analyses (l'ENILBiO à Poligny, Actalia à Mamirolle et LACOLAIT à Roulans) pour être analysés dans la journée. Un échantillon était également congelé directement après les aliquotages pour les analyses LC-MS. Ces échantillons étaient ensuite transportés congelés jusqu'à l'INRA de Jouy (carboglâce) en fin de période de prélèvement.

Les premiers résultats seront présentés dans la prochaine newsletter.



Figure 6. Les prélèvements étaient réalisés dans le tank à lait de l'élevage sur des laits de deux traites, avant la collecte effectuée par la laiterie



Figure 7. Les modalités de prélèvement et de transport étaient comparables à celles des laits de troupeaux (matériel et flacons stériles, refroidissement rapide et transport en glacières et/ou véhicule réfrigéré)

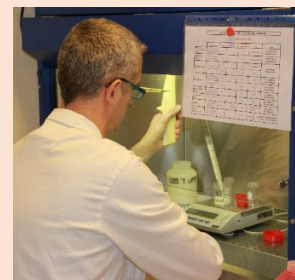


Figure 8. La réalisation des aliquotages par l'INRA de Poligny

Zoom sur les activités d'un partenaire de FROM'MIR : l'équipe LGS de l'INRA de Jouy-en-Josas

Présentation de l'équipe

Les travaux de l'équipe LGS de l'INRA de Jouy-en-Josas, comprenez « Lait-Génome-Santé », visent à étudier les liens entre le génome, la composition du lait et leur impact sur des aspects liés à la santé de la mamelle, au développement du système immunitaire des jeunes mais aussi aux propriétés technologiques du lait.

Les principales activités de l'équipe sont centrées sur 3 grands champs thématiques :

1. Le développement de nouveaux outils et méthodes d'analyses dont la mise au point de la méthode LC-MS pour l'identification et la quantification des protéines du lait.
2. La production de connaissances autour de deux grandes thématiques : l'épithélium mammaire en tant que première ligne de défense de la mamelle et l'impact de la variabilité du génome (polymorphisme génétique) et de son expression sur la composition du lait.
3. La mise à disposition de la communauté scientifique de technologies d'analyse du génome et de son expression à l'échelle de la cellule grâce au développement d'une méthode permettant d'isoler et d'extraire des cellules de leur environnement tissulaire par microdissection laser (microgénomique). Cette activité s'exerce dans le cadre d'une structure de type plateforme, ouverte à des partenaires publics ou privés.

L'équipe, animée par P. Martin, est composée d'une dizaine de personnes dont trois consacrent une part de leur temps aux activités du pôle microgénomique (ICE) de la plateforme @BRIDGE. Trois personnes sont impliquées dans FROM'MIR : A. Delacroix-Buchet, P. Martin et G. Miranda.

La méthode LC-MS et son utilisation dans FROM'MIR

En quoi consiste la méthode LC-MS ?

L'équipe LGS de l'INRA de Jouy a mis au point une méthode originale pour l'identification et la quantification des 6 protéines majeures du lait sous leurs différentes formes (variants génétiques, variants d'épissage, isoformes de glycosylation et de phosphorylation) ainsi que les principaux produits de leur dégradation tels que les caséines gamma et les protéoses peptones.

L'originalité de la méthode consiste à coupler la chromatographie liquide (LC, méthode classique de fractionnement des protéines permettant leur quantification) à la spectrométrie de masse (MS).

Le spectromètre de masse permet de déterminer de manière précise la masse moléculaire des protéines présentes dans l'échantillon de lait (figure 10). Les masses ainsi déterminées (masses observées) sont ensuite comparées aux masses théoriques des constituants protéiques majeurs du lait de l'espèce analysée, consignées dans une base de données, ce qui permet leur identification. La constitution de cette base de données (qui a fait l'objet d'une protection intellectuelle) est issue d'un travail de l'équipe qui repose sur une expertise de plusieurs années de recherche.

L'ensemble des masses théoriques des lactoprotéines connues (publiées) y sont répertoriées. La base de données de l'espèce bovine comporte plus de 3 000 masses.

L'analyse d'un échantillon en LC-MS prend environ 1 heure. Le traitement du chromatogramme (UV) et du signal de masse correspondant nécessite de l'expertise et son interprétation un temps parfois plus conséquent.



Agnès
DELACROIX-BUCHET



Patrice
MARTIN



Guy
MIRANDA



Figure 9. Guy Miranda devant les deux machines réalisant la LC-MS

Quels sont les intérêts de la méthode ?

- Méthode hautement résolutive, fiable et robuste qui se base sur l'analyse des protéines entières et non sur des peptides comme beaucoup de méthodes de protéomique faisant appel à la spectrométrie de masse.
- Identification et quantification des isoformes protéiques non accessibles par l'approche classique (RP-HPLC) ainsi que détection de nouveaux variants génétiques (variant I de la caséine β).
- Transposable à l'analyse des laits d'autres espèces : petits ruminants (ovins, caprins), homme, souris. Des travaux sont actuellement en cours sur les laits de lapins et de camélidés (lama, chameau, dromadaire).

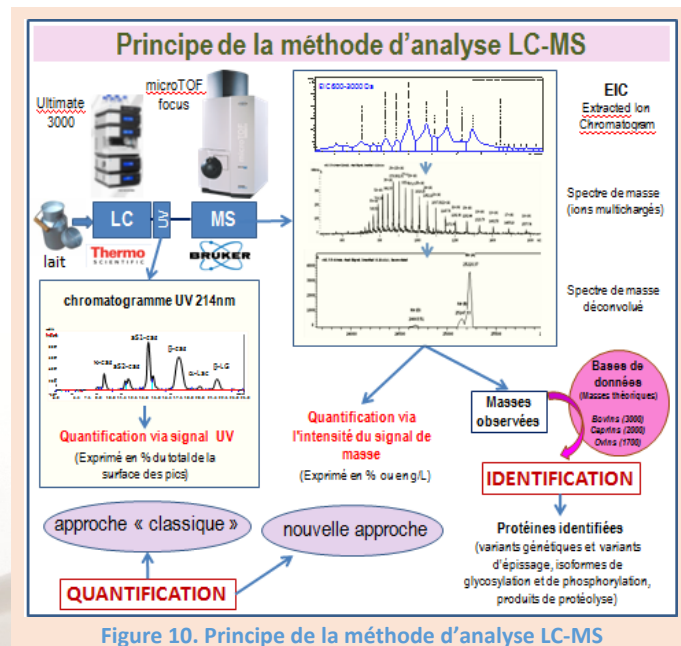


Figure 10. Principe de la méthode d'analyse LC-MS

La méthode LC-MS a été proposée comme méthode de référence internationale au niveau de la FIL (Technical Specification ISO-IDF/FIL) pour la caractérisation fine et la quantification de la fraction protéique des laits.

Comment est utilisée la méthode LC-MS dans FROM'MIR ?

- Identification des variants génétiques de la race Montbéliarde.
- Etude des liens entre la composition protéique des laits et leurs aptitudes fromagères.
- Validation, sur les laits de troupeaux et de cuve, des équations d'estimations des protéines du lait par la spectrométrie MIR, développées sur laits individuels, dans le cadre du programme Phénofinlait.



Figure 11. Interprétation des spectres de masse obtenus

Contacts : Cécile LAITHIER Institut de l'Elevage cecile.laithier@idele.fr
Valérie WOLF CEL 25-90 valerie.wolf@cel2590.fr

Crédit photos : A. LECERF (CNIEL), V. WOLF (CEL 25-90), CTFC

Mise en page : Isabelle GUIGUE, Institut de l'Elevage

PARTENAIRES TECHNIQUES ET FINANCIERS :

