



**HAL**  
open science

## Composition fine du lait: Vers une meilleure compréhension de la biologie de la lactation

Christelle Cebo

► **To cite this version:**

Christelle Cebo. Composition fine du lait: Vers une meilleure compréhension de la biologie de la lactation. Journées conjointes INRA-consortium Op+Lait, Nov 2019, Saint-Hyacinthe, Canada. hal-02954925

**HAL Id: hal-02954925**

**<https://hal.inrae.fr/hal-02954925>**

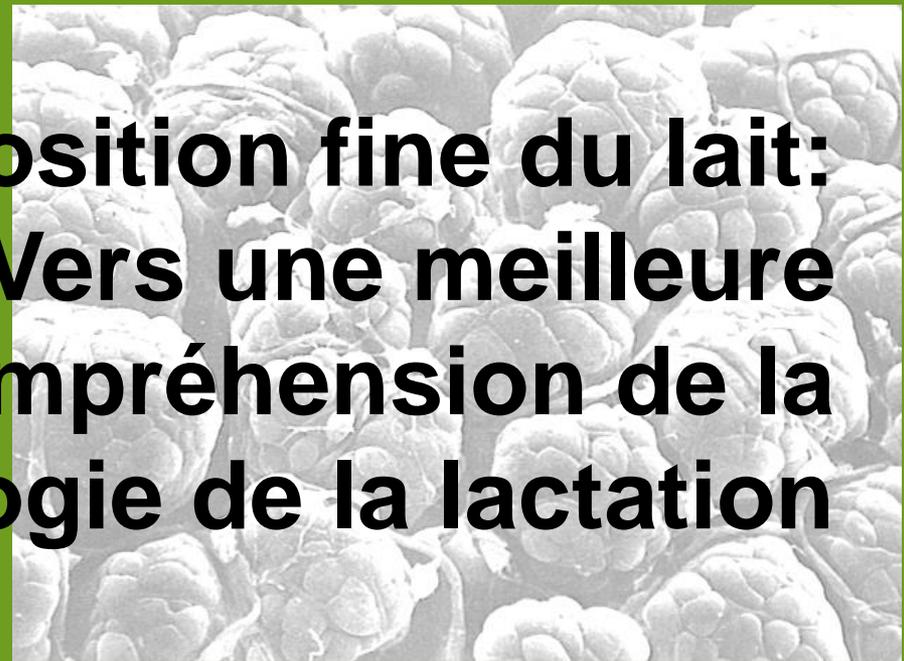
Submitted on 1 Oct 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



# Composition fine du lait: Vers une meilleure compréhension de la biologie de la lactation



Institut National de la Recherche  
Agronomique (INRA)  
Unité Génétique Animale et Biologie  
Intégrative (GABI)  
INRA Jouy-en-Josas-FRANCE



<https://www6.jouy.inra.fr/gabi>

Christelle CEBO

christelle.cebo@inra.fr

# Unité GABI: Génétique Animale et Biologie Intégrative

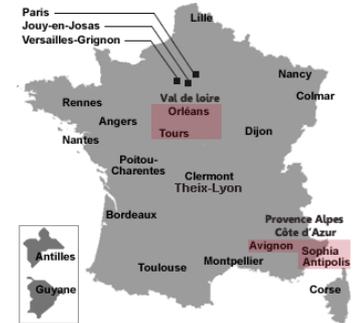
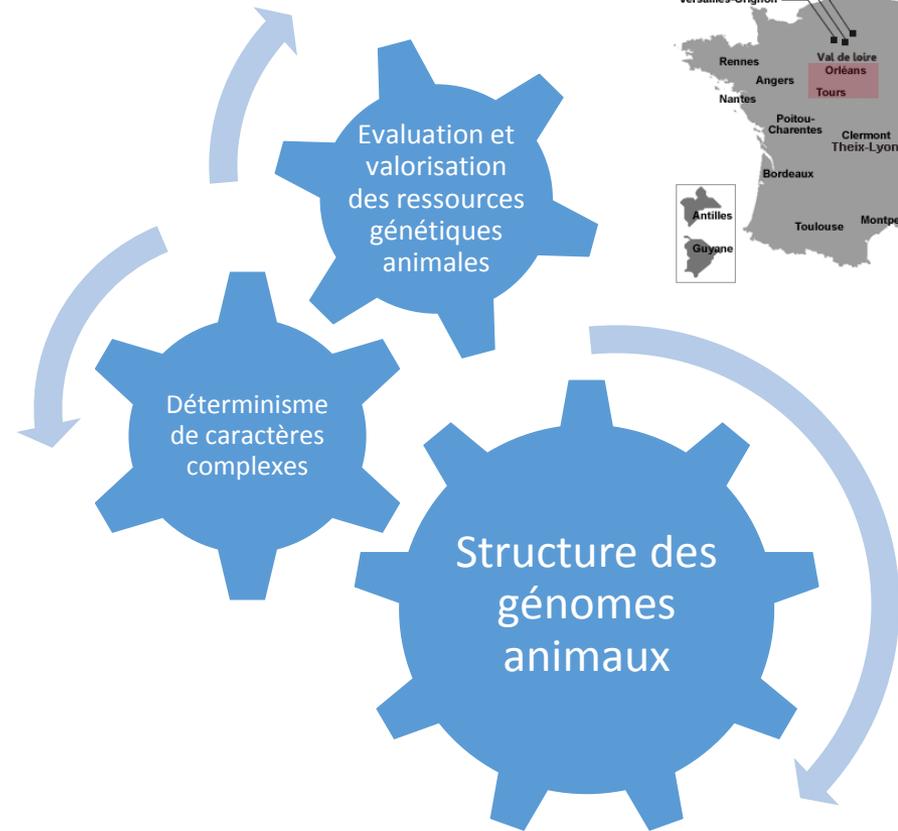
## Département de Génétique Animale (GA) (+ PHASE)

Dir: Claire Rogel-Gaillard



200 chercheurs, enseignants-chercheurs, ingénieurs, techniciens et étudiants:

- INRA
- AgroParisTech
- ENVA (Ecole Nationale Vétérinaire de Maisons Alfort)
- Organismes techniques ou professionnels





# Le lait: un aliment complexe

Macro  
éléments

Oligo  
saccharides

LAIT

Vitamines

Acides  
nucléiques

Protéines

caséines

protéines mineures

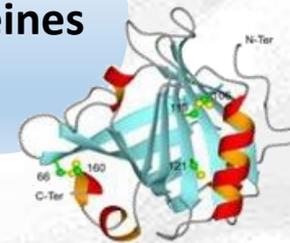
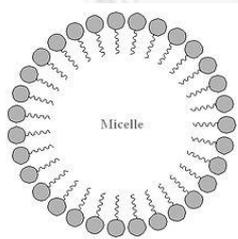
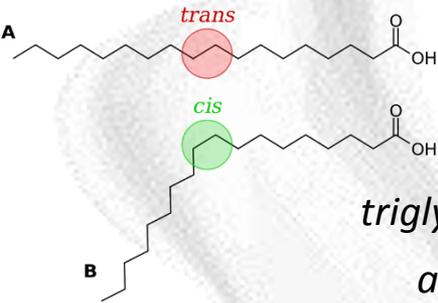
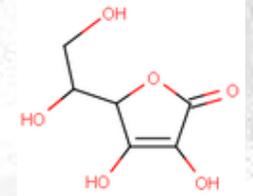
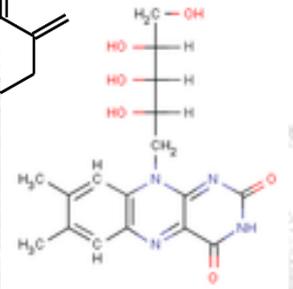
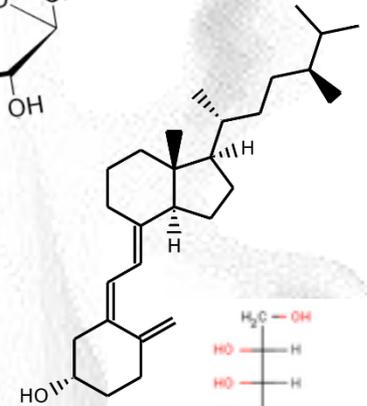
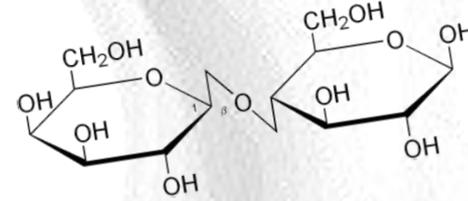
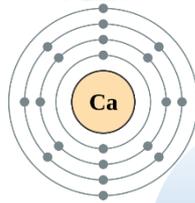
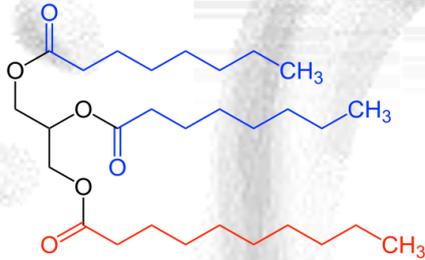
triglycérides **Lipides**

acides gras

phospholipides

ARNm

microARNs



# Le lait: un aliment complexe

Macro  
éléments

Oligo  
saccharides

# LAIT

Vitamines

Lipides

Acides  
nucléiques

Protéines

triglycérides

acides gras

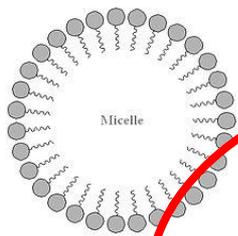
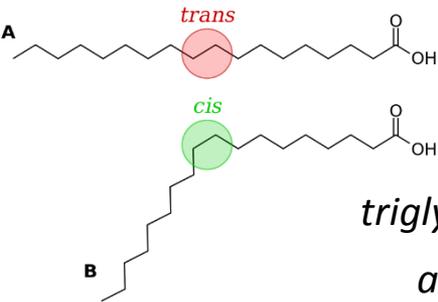
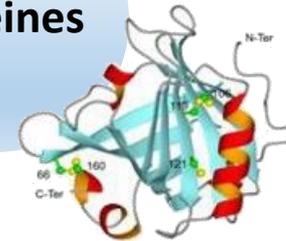
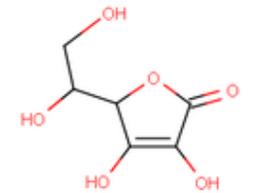
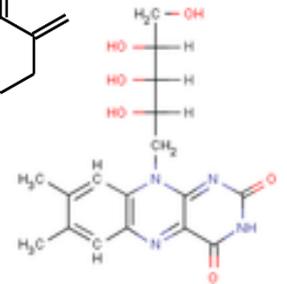
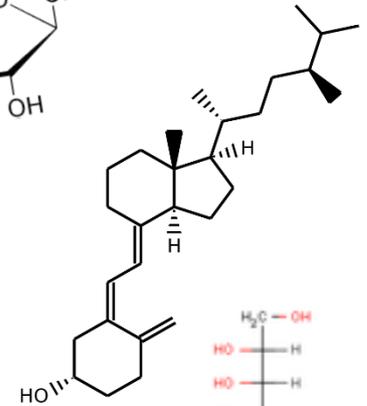
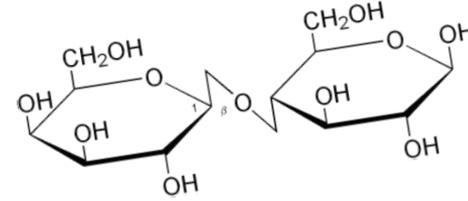
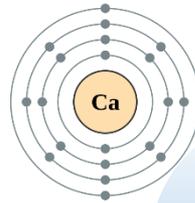
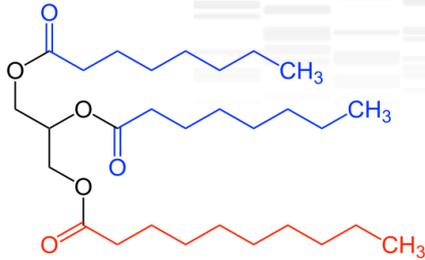
phospholipides

ARNm

microARNs

caséines

protéines mineures



# Le lait: un aliment complexe

Macro  
éléments

Oligo  
saccharides

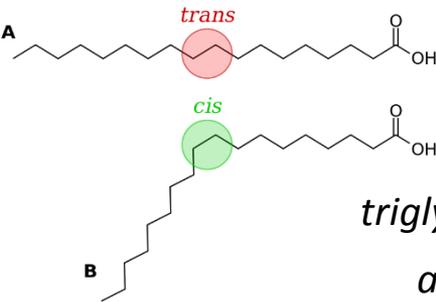
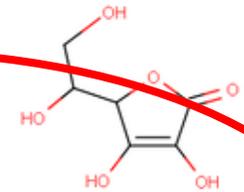
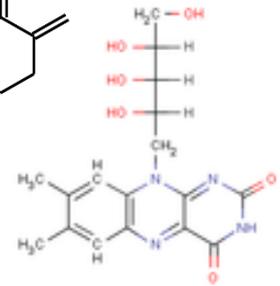
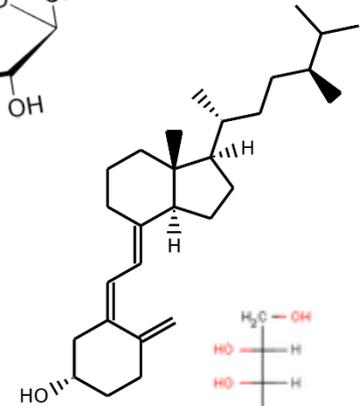
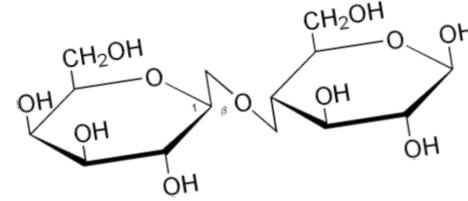
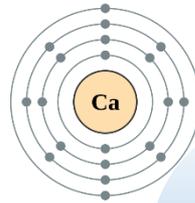
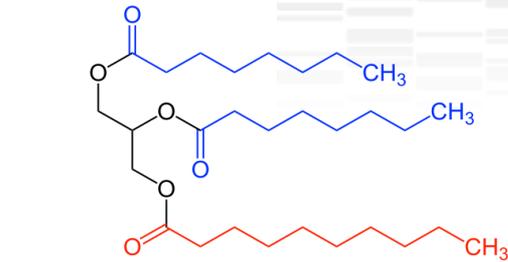
LAIT

Vitamines

Lipides

Acides  
nucléiques

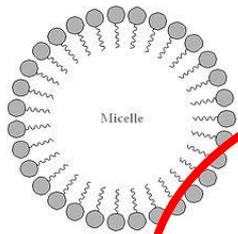
Protéines



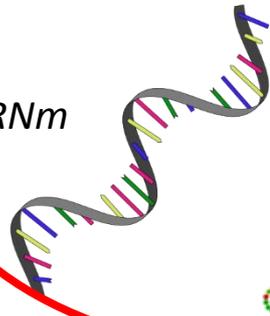
triglycérides

acides gras

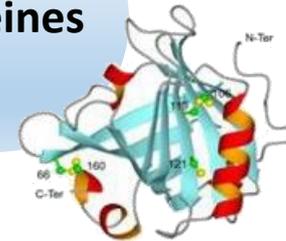
phospholipides



ARNm



microARNs



caséines

protéines mineures

# Collaborations GABI/Galactinnov, axe 3: « Un lait et des produits transformés de qualité »

- *Une méthode de phénotypage fin des protéines laitières développée dans l'unité GABI: principes & applications*
- *Les microARN comme biomarqueurs de qualité du lait: principes & applications (Programme BioMarq'lait)*
- *Lipolyse et qualité du lait : vers une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires contrôlant la dégradation de la matière grasse laitière (Programme LIPOMECE)*



# Collaborations GABI/Galactinnov, axe 3: « Un lait et des produits transformés de qualité »

- *Une méthode de phénotypage fin des protéines laitières développée dans l'unité GABI: principes & applications*
- *Les microARN comme biomarqueurs de qualité du lait: principes & applications (Programme BioMarq'lait)*
- *Lipolyse et qualité du lait : vers une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires contrôlant la dégradation de la matière grasse laitière (Programme LIPOMECE)*



# Pas UN lait mais DES laits !

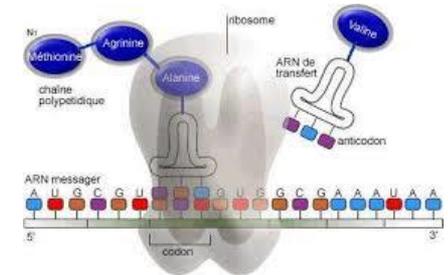
## 6 lactoprotéines majeures....

- Caséine  $\alpha$ 1
- Caséine  $\alpha$ 2
- Caséine  $\beta$
- Caséine  $\kappa$
- $\beta$ -lactoglobuline
- $\alpha$ -lactalbumine



## ...mais de nombreuses isoformes !

- Variants génétiques
- Variants d'épissage
- Modifications post-traductionnelles (glycosylation-phosphorylation)



- Produits de protéolyse (essentiellement caséines  $\gamma$  issues de l'hydrolyse de la caséine  $\beta$  par la plasmine)



Dans le cas simple d'un lait individuel homozygote pour les 6 lactoprotéines majeures, la composition en protéines contiendra à minima **21** molécules différentes!

# Mise au point d'une méthode d'identification « en ligne » des lactoprotéines (et de leurs dérivés naturels)



## Un équipement performant

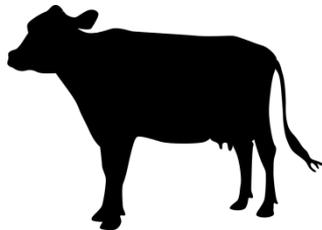
- Séparation: chromatographie liquide (LC) (RP-HPLC Dionex LC System Ultimate 3000)
- Identification +quantification (MS) Spectrométrie de masse: ESI -TOF



+

## Une base de données *in-house*

Méthode LC-MS: Identification des protéines du lait sur la base de leur masse moléculaire (confrontation masses observées / masses théoriques)



Base de données bovine: (3000 masses)

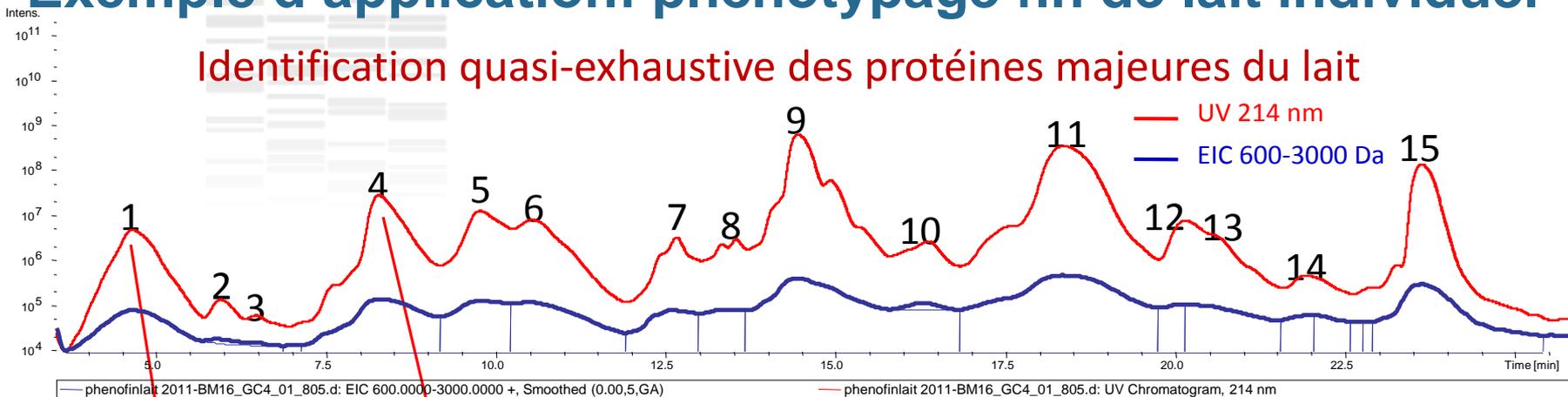
Dépôt auprès de l'Agence de Protection des Programmes 17 novembre 2011.  
(IDDN.FR.001.460019.000.R.C.2011.000.10300)

Miranda, *et al*, 2019

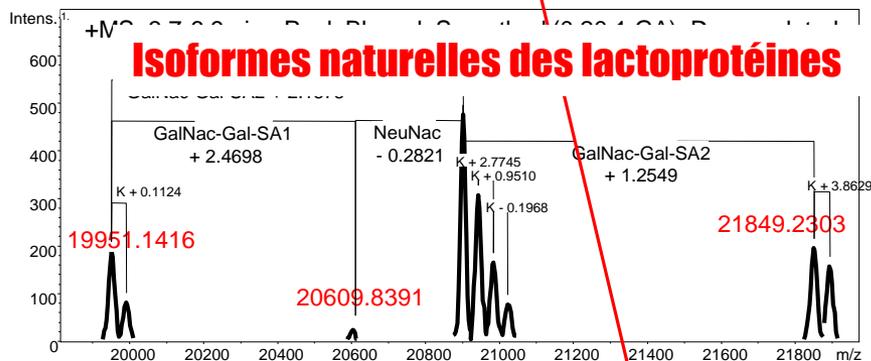


# Exemple d'application: phénotypage fin de lait individuel

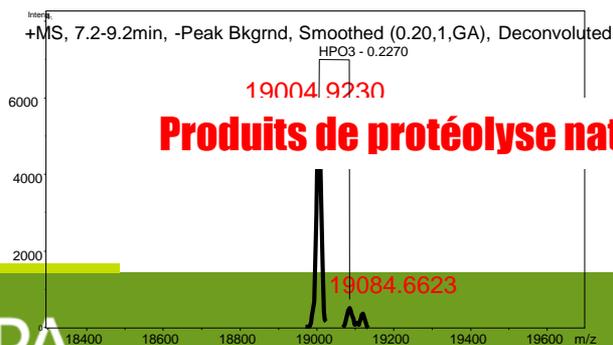
## Identification quasi-exhaustive des protéines majeures du lait



Pic 1



Pic 4



- κ Glyco**
  - (2) 19952.719 = κ\_VarB\_1P\_10G (GalNac-Gal-SA2)
  - (1) 20608.699 = κ\_VarB\_1P\_20G (GalNac-Gal-SA2 + Gal-Nac-SA)
  - (1) 20900.684 = κ\_VarB\_1P\_20G (GalNac-Gal-SA2 + Gal-Nac-SA2)
  - (1) 21557.122 = κ\_VarB\_1P\_30G (GalNac-Gal-SA2 + Gal-Nac-SA + GalNac-Gal-SA2)
  - (1) 21849.04 = κ\_VarB\_1P\_30G (GalNac-Gal-SA2 + Gal-Nac-SA2 + GalNac-Gal-SA2)
- κ**
  - (4) 19004.923 = κ\_VarB\_1P
  - (3) 19084.758 = κ\_VarB\_2P
- α<sub>s2</sub>**
  - (5) 25147.886 = α<sub>s2</sub>\_VarA\_10P
  - (5) 25228.066 = α<sub>s2</sub>\_VarA\_11P
  - (6) 25307.903 = α<sub>s2</sub>\_VarA\_12P
  - (6) 25387.548 = α<sub>s2</sub>\_VarA\_13P
  - (6) 25467.380 = α<sub>s2</sub>\_VarA\_14P
- α<sub>s1</sub>**
  - (9) 23486.5813 = α<sub>s1</sub>\_VarB(-Q78)\_8P
  - (9) 23614.712 = α<sub>s1</sub>\_VarB\_8P
  - (9) 23694.692 = α<sub>s1</sub>\_VarB\_9P
- β**
  - (11) 23903.2053 = β\_varA2\_4P
  - (11) 23983.1853 = β\_varA2\_5P
  - (7) 12176.879 = PP5\_complement γ2 (pep 1-105\_Beta\_VarA2\_5P)
  - (6) 12442.17 = complément γ3 (pep 1-170\_Beta\_VarA2\_5P)
  - (11) 20522.479 = γ1 (pep 29-209\_Beta\_VarA2\_1P)
  - (11) 11823.627 = γ2 (pep 106-209\_Beta\_VarA2\_0P)
  - (13) 11558.047 = γ3 (pep 108\_209\_Beta\_VarA2\_0P)
- α Lac**
  - (12) 14186.446 = α-Lac\_VarB
- β Lg**
  - (13) 14265.839 = α-Lac\_VarB\_1P
  - (15) 18366.796 = β-Lg\_VarA



# Exemple d'application: phénotypage fin de lait individuel: cas du lait A1/A2 (1)

Caséine « A2 »= variant (dérivé) de la caséine  $\beta$  = 30 % des caséines totales

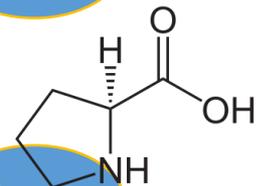
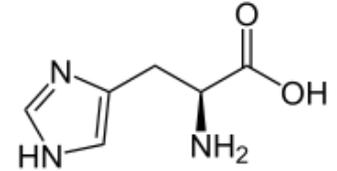
A2 beta-caséine (vache)

protéine  
« ancestrale »

Pro Phe Pro Gly Pro Ile Pro Asn Ser

A1 beta-caséine (vache)

Pro Phe Pro Gly Pro Ile His Asn Ser



La caséine beta est une des protéines majeures du lait.  
La caséine beta donne naissance à de nombreux peptides à activité biologique.

**Différence entre lait « A1 » et lait « A2 »= un seul acide aminé !!!**



Lait « A2 »= argument commercial dans certains pays

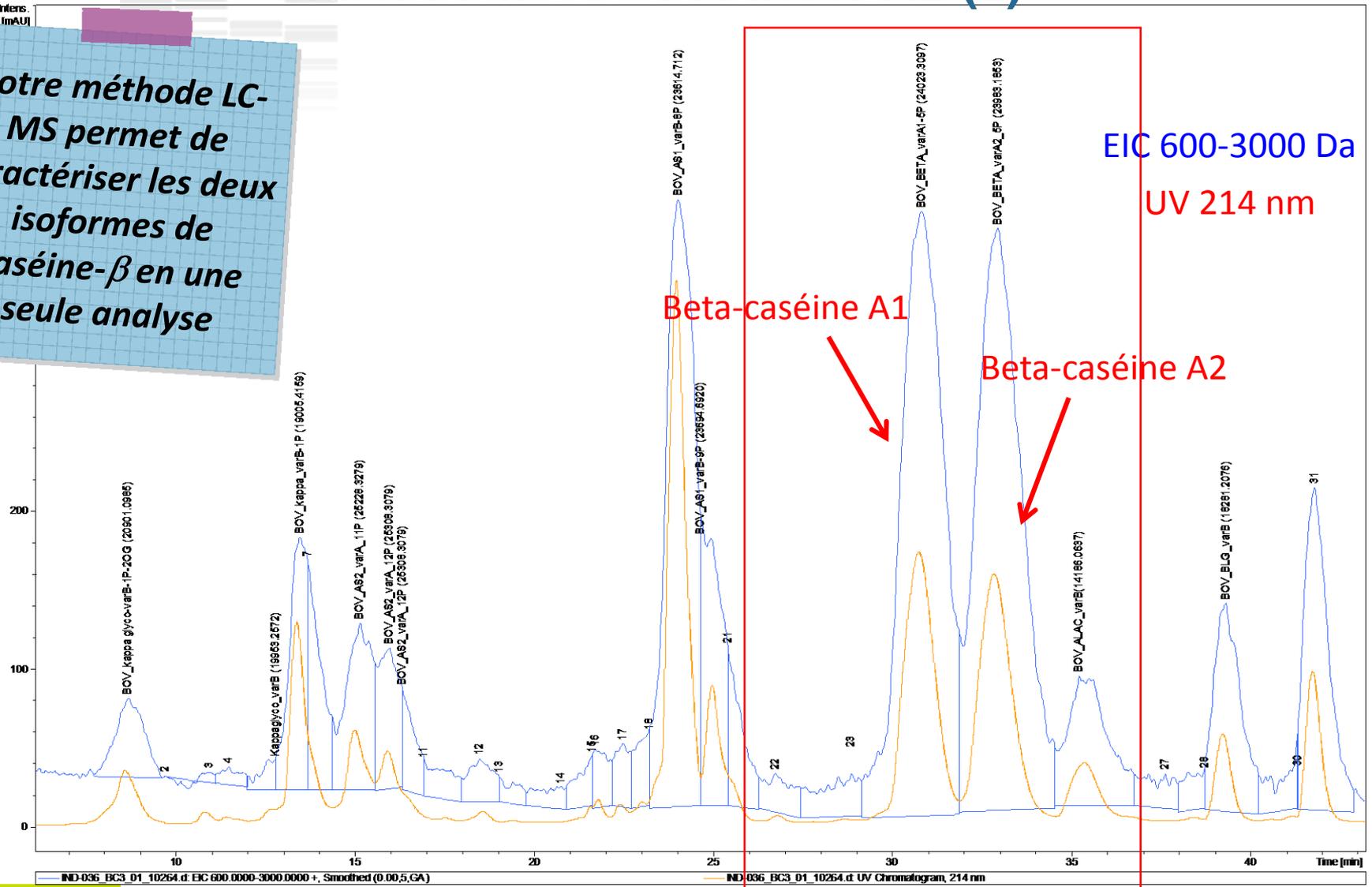


# Exemple d'application: phénotypage fin de lait individuel: cas du lait A1/A2 (2)

Notre méthode LC-MS permet de caractériser les deux isoformes de caséine- $\beta$  en une seule analyse

EIC 600-3000 Da

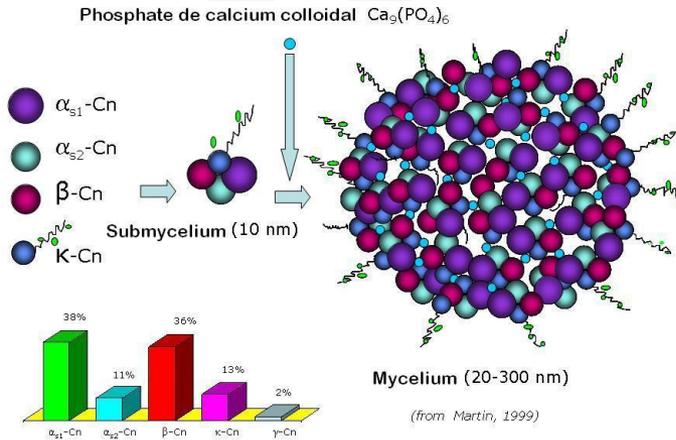
UV 214 nm



Beta-caséine A1

Beta-caséine A2

# Exemple d'application: phénotypage fin de lait individuel: cas des isoformes de phosphorylation (1)



Rendement fromager

## Phosphorylation des caséines

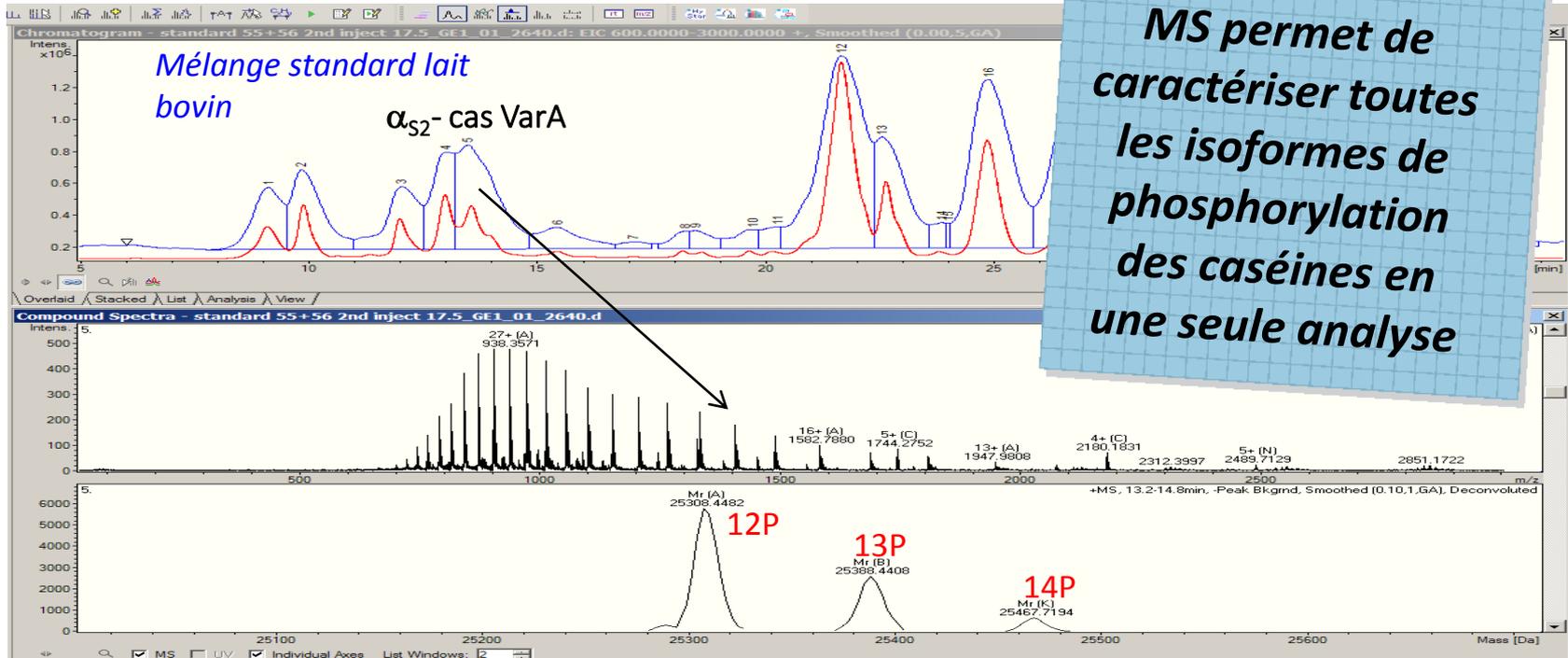
Structure du caillé

Dans le lait, les caséines sont organisées en structures supra-moléculaires, les micelles de caséines. Cette organisation est dépendante des modifications post-traductionnelles des caséines.



# Exemple d'application: phénotypage fin de lait individuel: cas des isoformes de phosphorylation (2)

- Mise en évidence d'une grande variabilité individuelle dans la proportion relative des isoformes de phosphorylation notamment au niveau la caséine  $\alpha_{S2}$  bovine (Fang et al., 2016)

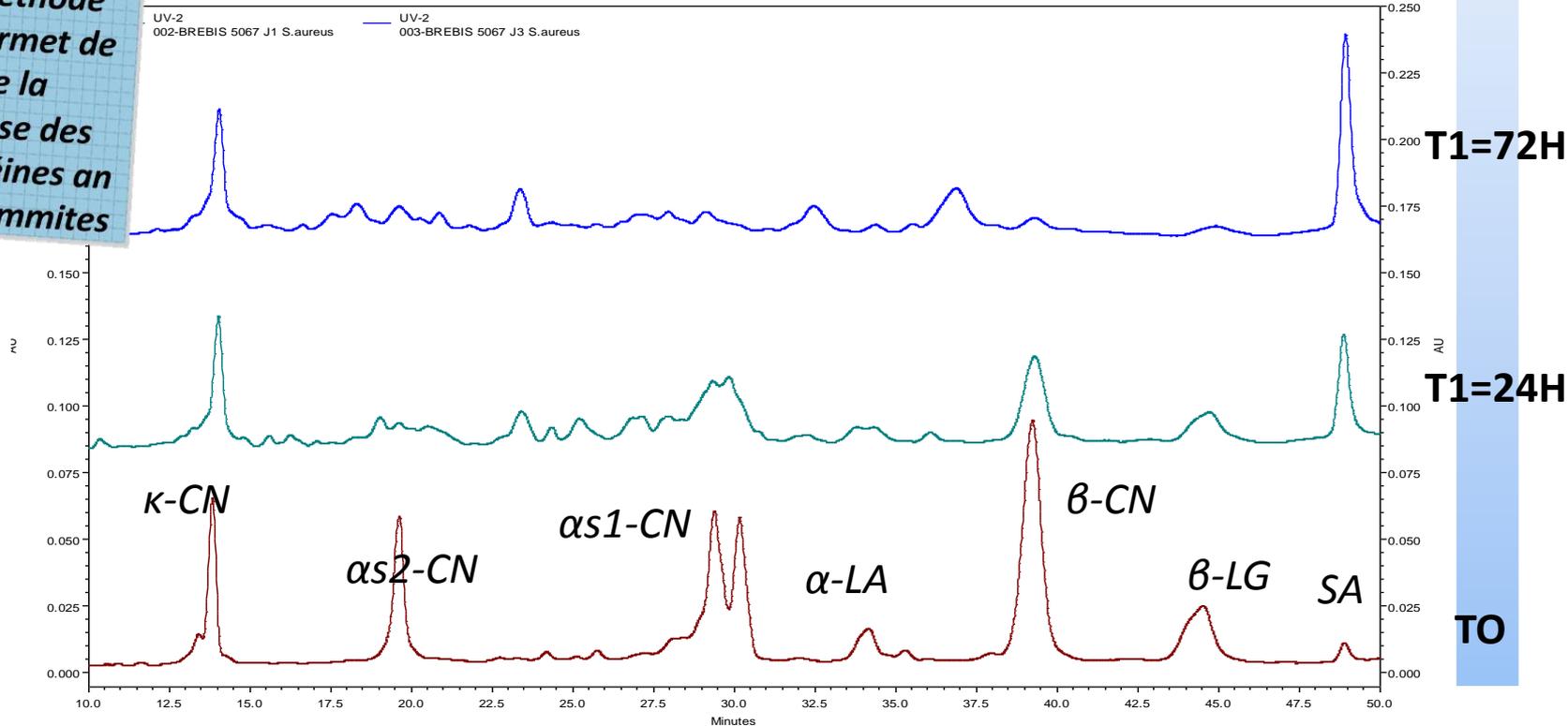


Notre méthode LC-MS permet de caractériser toutes les isoformes de phosphorylation des caséines en une seule analyse

# Exemple d'application: phénotypage fin de lait individuel: cas d'un lait mammiteux

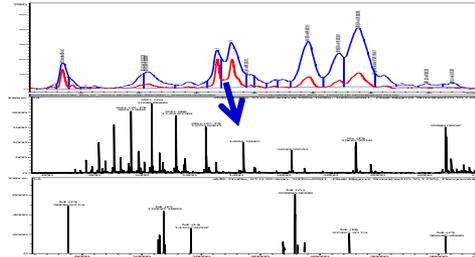
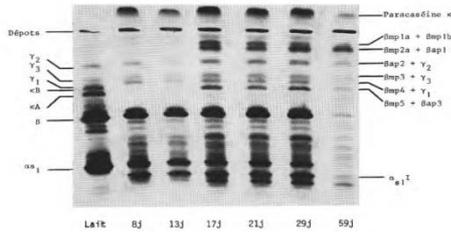


Notre méthode LC-MS permet de suivre la protéolyse des lactoprotéines au cas de mammite



**Mammite=protéolyse rapide des lactoprotéines majeures+ augmentation du pic de sérualbumine (SA)-Programmes GENOMA**

# Exemple d'application: suivi de la protéolyse primaire des lactoprotéines au cours de l'affinage de fromages



Méthode classique:  
~~SDS-PAGE~~

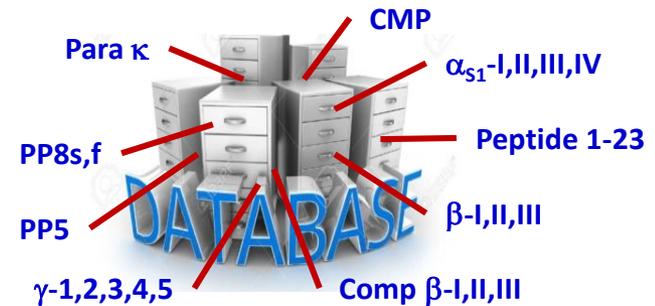
Méthode LC-MS



Miranda, G *et al*, 2019

Notre méthode LC-MS permet de suivre la composition protéique et peptidique des fromages au cours de l'affinage

Construction d'une base de données de masses théoriques des peptides d'affinages issues des lactoprotéines bovines (Plus de **1000** masses théoriques)



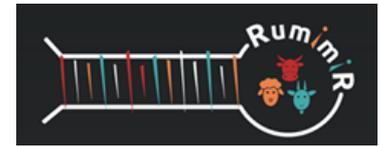
# Collaborations GABI/Galactinnov, axe 3: « Un lait et des produits transformés de qualité »

- *Une méthode de phénotypage fin des protéines laitières développée dans l'unité GABI: principes & applications*
- *Les microARN comme biomarqueurs de qualité du lait: principes & applications (Programme BioMarq'lait)*
- *Lipolyse et qualité du lait : vers une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires contrôlant la dégradation de la matière grasse laitière (Programme LIPOMECE)*

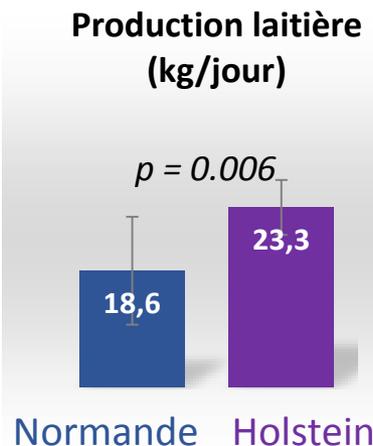


# Les microARN comme biomarqueurs de qualité du lait: principes & applications (1)

- microARNs= petits ARN non codants (~22 nucléotides)
- Impliqués dans la régulation post-transcriptionnelle des gènes
- Développement d'une base de données de microARNs chez les ruminants (Bourdon, C., *et al* 2019)
- 4533 microARNs matures recensés chez le bovin, tous tissus confondus et toutes bases confondues (miRBase + RumimiR)

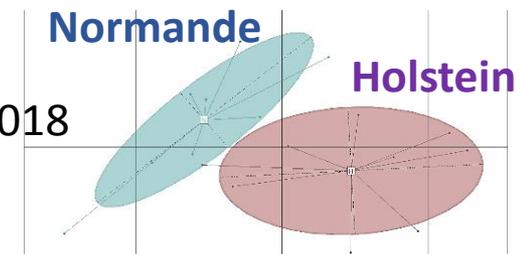


<http://rumimir.sigena.org/>



- Le niveau d'expression de certains microARNs dépendent de la race

Le Guillou, *et al*, 2018



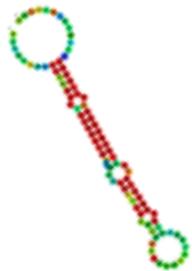
Principal component analysis

# Les microARN comme biomarqueurs de qualité du lait: principes & applications (2)

Programme BioMarq'Lait (Porteur: Marion Boutinaud, INRA)  
Effet d'un **stress métabolique (restriction alimentaire)** sur la production laitière



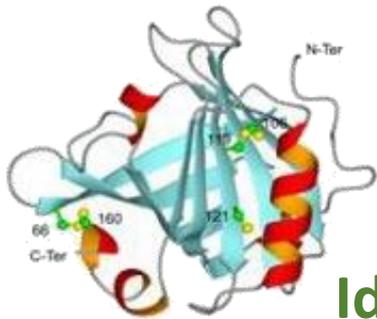
Avec la contribution financière  
du compte d'affectation spéciale  
«développement agricole et rural»



**miRNomes, protéomes**



Source: Freepik



Identification de biomarqueurs non invasifs de stress alimentaire dans différents compartiments (lait écrémé, globules gras, vésicules extra-cellulaires)

Burtey, A, *et al.*

# Collaborations GABI/Galactinnov, axe 3: « Un lait et des produits transformés de qualité »

- *Une méthode de phénotypage fin des protéines laitières développée dans l'unité GABI: principes & applications*
- *Les microARN comme biomarqueurs de qualité du lait: principes & applications (Programme BioMarq'lait)*
- *Lipolyse et qualité du lait : vers une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires contrôlant la dégradation de la matière grasse laitière (Programme LIPOMECC)*



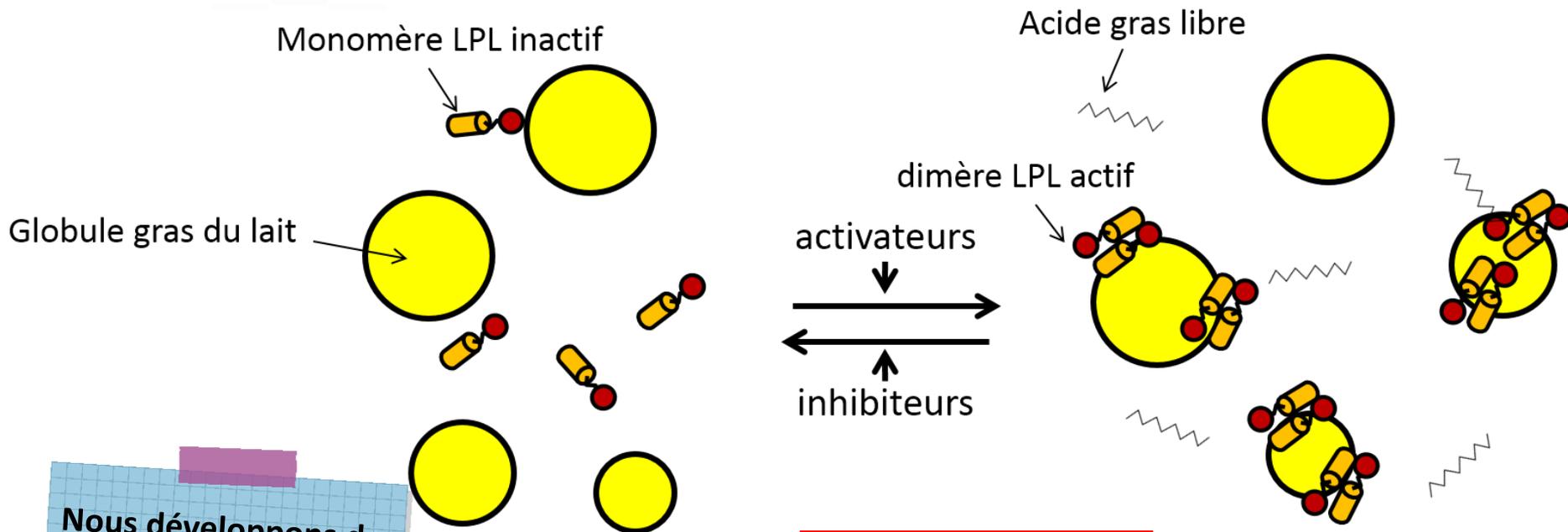


# Lipolyse et qualité du lait: le programme ANR LIPOMECA (2020-2022) (1)



**APIS-GENE**  
Investir Innover Valoriser

**Lipolyse = dégradation des lipides des laits**



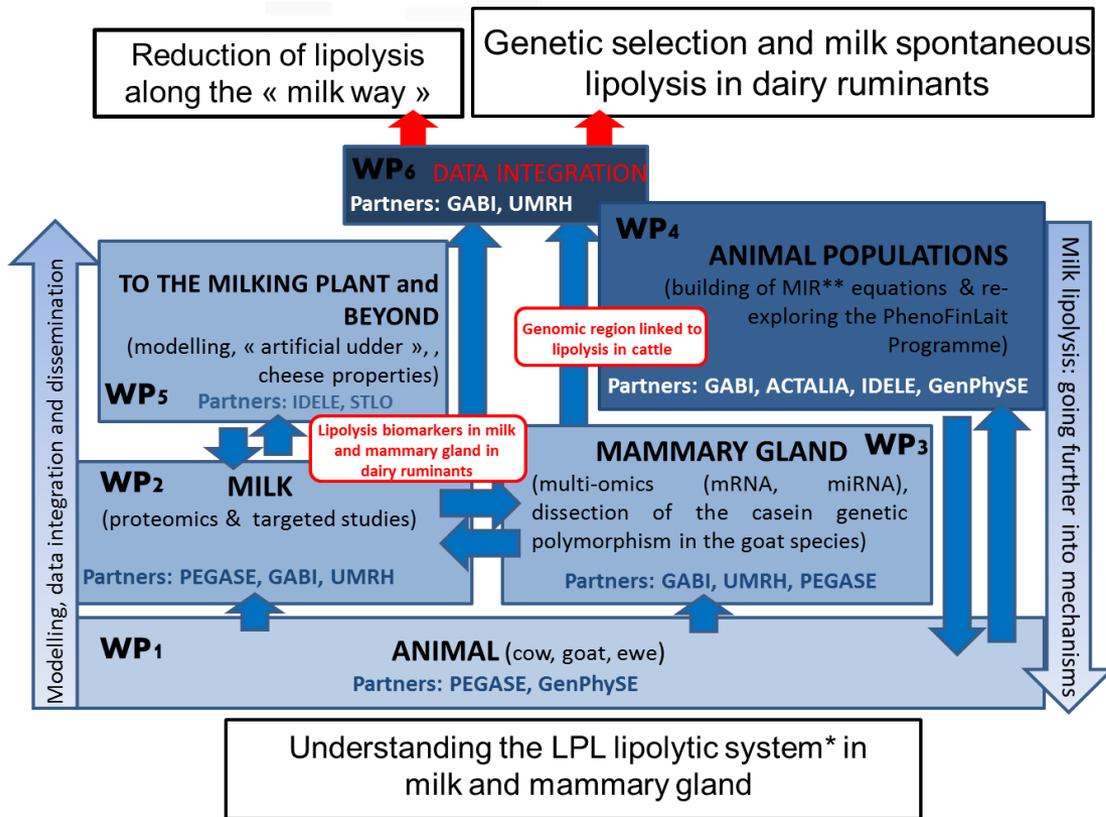
Nous développons des programmes pour mieux comprendre les mécanismes et les facteurs génétiques et environnementaux qui activent la lipolyse

**LPL= lipoprotéine lipase**

*Lipolyse du lait ⇒ acides gras libres dans le lait ⇒ diminue les qualités technologiques et organoleptiques du produit « LAIT »*

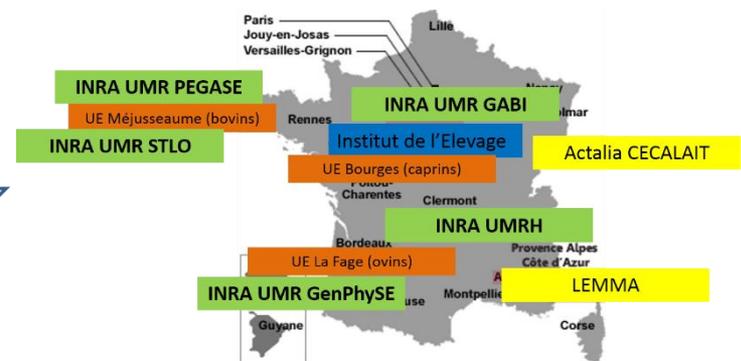
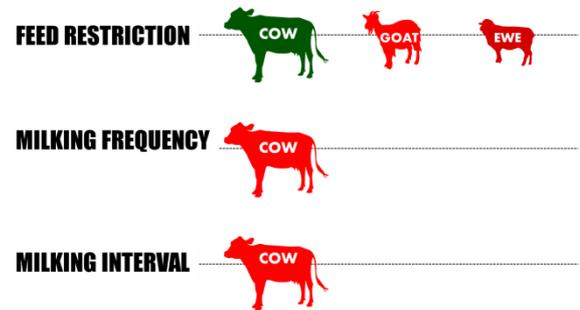


# Lipolyse et qualité du lait: le programme ANR LIPOMECH (2020-2022) (2)



\*LPL enzyme, milk fat globule, regulators \*\*Mid Infra Red

## 3 LEVERS FOR ACTION TO REDUCE LIPOLYSIS IN RUMINANT MILK



Coordination: C. Cebo (INRA)

# Collaborations GABI/Galactinnov, axe 2: « Vers une gestion plus durable de la santé animale et du bien-être des animaux »

- Métaprogramme INRA **LongHealth** (2018-2020): Effet à long terme des mammites sur la production laitière bovine (Coordination: Pierre Germon, INRA)



(Hue-Beauvais,C, *et al.*)

(Charlier,M,  
Petridou,B, *et al.*)

- ANR **REIDSOCS**: Effet du variant R96C SOCS-2 sur la lactation et la sensibilité aux mammites chez les ovins (WP2: Cellular and molecular mechanisms related to the SOCS-2 variant in a new mouse model) (Coordination: Gilles Foucras (2016-2020))



# Conclusions

- Nos objectifs de recherche: la qualité du lait, la durabilité de la production laitière, la transmission de marques épigénétiques
- Nos sujets d'étude: la glande mammaire, le lait, et le continuum mère-petit
- Nos compétences: génétique, génomique fonctionnelle, physiologie, protéomique, immuno-histochimie, biostatistiques
- Principaux axes de collaboration GABI/Galactinnov:



**AXE 2: modèles animaux (souris, lapin), mécanismes moléculaires et cellulaires associés à la physiopathologie de la glande mammaire (mammites)**

**AXE 3: phénotypage fin des lactoprotéines dans différentes matrices laitières, identificateurs de biomarqueurs de stress de type protéique ou épigénétique (microARNs)**



# Merci !



*« Il n'y a pas d'échecs, il n'y a que des abandons (Albert Einstein) »*