



**HAL**  
open science

## **Biomarq'Lait: Identification dans le lait de biomarqueurs pour le monitoring du statut nutritionnel de la vache laitière**

Marine Gele, Marion Boutinaud, Jocelyne Guinard-Flament, Fabienne Le Provost, Antoine Leduc, Christine Leroux, José Pires

### ► To cite this version:

Marine Gele, Marion Boutinaud, Jocelyne Guinard-Flament, Fabienne Le Provost, Antoine Leduc, et al.. Biomarq'Lait: Identification dans le lait de biomarqueurs pour le monitoring du statut nutritionnel de la vache laitière. *Innovations Agronomiques*, 2024, 94, pp.358-371. 10.17180/ciag-2024-vol94-art24 . hal-04622702

**HAL Id: hal-04622702**

**<https://hal.inrae.fr/hal-04622702>**

Submitted on 24 Jun 2024

**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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License



## BIOMARQ'LAIT –Identification dans le lait de biomarqueurs pour le *monitoring* du statut nutritionnel de la vache laitière

Marine GELE<sup>1</sup>, Marion BOUTINAUD<sup>2</sup>, Jocelyne GUINARD-FLAMENT<sup>2</sup>, Fabienne LE PROVOST<sup>3</sup>, Antoine LEDUC<sup>1,2,3</sup>, Christine LEROUX<sup>4</sup>, José PIRES<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Institut de l'Elevage, 75012, Paris, France

<sup>2</sup> INRAE, Institut Agro Rennes Angers, PEGASE – Physiologie, Environnement et Génétique pour l'Animal et les Systèmes d'Elevage, 35590, Saint-Gilles, France

<sup>3</sup> Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, GABI – Génétique Animale et Biologie Intégrative, 78350, Jouy-en-Josas, France

<sup>4</sup> INRAE, Université Clermont Auvergne, Vetagro Sup, UMRH - Unité Mixte de Recherche sur les Herbivores, 63122, Saint-Genès-Champanelle, France

Correspondance : [marine.gele@idele.fr](mailto:marine.gele@idele.fr)

### Résumé

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 entier, 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 projet a ensuite 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 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.

**Mots-clés** : bovin laitier, restriction alimentaire, micro-ARN, protéine, métabolite, spectrométrie moyen infrarouge

### Abstract: Biomark'Lait: identification of milk biomarkers for monitoring cow nutritional status

The aim of the BIOMARQ'LAIT project was to identify molecules that could be measured in milk, in order to use a non-invasive approach to determine the capacity of dairy cows to cope with an energy deficit. In this project, numerous milk components has been studied in whole milk, fat globules, extracellular vesicles and mammary epithelial cells. A panel of candidate biomarkers consisting of metabolites, proteins and microRNAs was built up. The project then led to the development of equations to predict the concentrations of three metabolites of interest based on the mid-infrared spectra of milk. The new references acquired during the project were then disseminated to stakeholders in the dairy sector through institutional, technical and scientific communications. An educational kit was also produced to provide farmers and students with a better understanding of the energy deficit in dairy cows.

**Keywords**: dairy cattle, food restriction, microRNA, protein, metabolite, mid-infrared spectrometry





## 1. Introduction

Dans le contexte socio-économique actuel, l'amélioration de l'efficacité alimentaire est un déterminant clé de la compétitivité des élevages laitiers. La gestion précise des courtes périodes où l'homéostasie est perturbée par des transitions physiologiques (démarrage de la lactation) ou des changements environnementaux (changement des apports à la suite d'un aléa climatique par exemple) pouvant provoquer un déficit énergétique chez la vache laitière, présente une réelle opportunité d'amélioration de l'efficacité alimentaire (Bradford *et al.*, 2016). Durant ces périodes, la capacité des animaux à endurer un changement de leur environnement sans pour autant dégrader leur potentiel de production (préservation d'un statut métabolique permettant de limiter l'apparition de maladies métaboliques, préservation d'une capacité de synthèse de lait et d'un nombre de cellules dans la mamelle pour conserver un bon potentiel de production) est différente d'un individu à un autre (Jorgensen *et al.*, 2016).

Le projet BIOMARQ'LAIT visait à exploiter cette variabilité individuelle en **identifiant 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** provoqué soit par le démarrage de la lactation (changement des besoins liés à l'apparition de besoin de production de lait), soit par un aléa (changement des apports suite à un aléa climatique par exemple). Le lait représente en effet une source d'information particulièrement riche puisqu'il contient une large gamme de biomolécules telles que des métabolites, des protéines (Miranda *et al.*, 2013), des ARNm (Boutinaud *et al.*, 2015), et des micro-ARN (Laubier *et al.*, 2015) qui sont présents dans les globules gras (Canovas *et al.*, 2014), les cellules somatiques comprenant des cellules épithéliales mammaires exfoliées (Hervé *et al.*, 2016) et les vésicules extracellulaires (Valadi *et al.*, 2007). Ces micro-ARN sont des petits ARN non codants (~ 22 nucléotides) qui contrôlent de nombreux processus biologiques tels que la prolifération, la croissance et la mort cellulaire, la réponse immunitaire et le *métabolisme*, sont impliqués dans la fonction mammaire (Le Guillou *et al.*, 2012) et sont affectés par les carences alimentaires (Mobuchon *et al.*, 2015).

Ces molécules étant longues et coûteuses à doser, elles ne peuvent pas à l'heure actuelle être utilisées en routine. Or, la mesure à haut débit de ce type de caractère est un enjeu important. Elle permettrait d'une part aux éleveurs d'assurer un *monitoring* efficace de ses animaux dans les périodes à risque, et d'autre part de disposer d'une nouvelle mesure phénotypique pour enrichir la sélection génétique sur la robustesse des animaux. En conséquence, le second objectif du projet était de **développer une méthode permettant d'utiliser ces biomarqueurs sur le terrain**, la technologie retenue étant la spectrométrie dans le moyen infrarouge (MIR). 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. Cet objectif va dans le sens d'une réduction du gaspillage alimentaire ; en effet, nul besoin d'augmenter de manière préventive les apports énergétiques du lot ou du troupeau entier quand seulement quelques vaches ont besoin d'une complémentation supplémentaire à un instant donné.

Enfin, **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.

Ce projet a été réalisé en partenariat entre l'**Institut de l'Élevage, INRAE (UMR H, GABI et PEGASE)**, et l'**Institut Agro Rennes-Angers**.

## 2. Etat des lieux des pratiques de repérage du stress nutritionnel en élevage

Des enquêtes ont été réalisées en janvier 2019 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**. Ces enquêtes ont été réalisées par 20 élèves ingénieurs de la spécialisation « Sciences et Ingénierie en Productions Animales » (SIPA) de l'Institut Agro Rennes-



Angers par téléphone ou en présentiel. 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 éleveurs 14 professionnels de l'élevage (entreprises de conseil en élevage, chambres d'agriculture, cliniques vétérinaires, association d'éleveurs) ont répondu au questionnaire, 60 des 81 personnes enquêtées sont situées dans le Grand Ouest.

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 (Gelé et al., 2020). 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 a été mis en évidence. **Plus de la moitié des éleveurs répondants ont déjà constaté des situations de déficit énergétique dans leur troupeau.** La note d'état corporel 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.

### 3. Identification dans le lait de biomarqueurs de la réponse adaptative des vaches laitières à un déficit énergétique

Deux protocoles de restriction alimentaire ont permis de **caractériser la réponse adaptative des vaches laitières à une réduction des apports énergétiques au travers différents phénotypes** et d'évaluer l'impact de l'intensité et de la durée de ce challenge. Des molécules présentes dans lait ont été quantifiées afin d'évaluer leur potentiel comme biomarqueur de cette réponse.

#### 3.1 Les protocoles de restriction alimentaires

##### 3.1.1 *Le protocole de restriction court et intense (CI)*

Ce protocole a été mis en place en 2016 à la ferme expérimentale de Marcenat (INRAE, Herbipôle, <https://doi.org/10.15454/1.5572318050509348E12>) sur 20 vaches (10 Holstein et 10 Montbéliardes) en milieu de lactation. 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.

##### 3.1.2 *Le protocole de restriction long et modéré (LM)*

Réalisé en 2016 à la ferme expérimentale IE PL (Installation Expérimentale production laitière) (INRAE UMR PEGASE, <https://doi.org/10.15454/yk9q-pf68>), ce protocole portait 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.



## 3.2 Phénotypage dans le lait et le sang

### 3.2.1 *Phénotypage dans le sang*

Les concentrations en métabolites plasmatiques et le profil hormonal du sang ont été phénotypées dans les deux protocoles en période pré-expérimentale pour servir de témoin, en période expérimentale pour évaluer l'impact de la restriction, et en période post-expérimentale afin d'évaluer la dynamique de retour à l'état basal. Les **métabolites plasmatiques** ont été mesurés en cinétique complète pour l'essai CI et à 4 reprises pour l'essai LM. La quantification des acides gras non estérifiés (AGNE), du glucose, du  $\beta$ -hydroxybutyrate (BHB) et de l'urée a été réalisée par à l'aide d'automate de dosage (ARENA 20XT, Thermo Fisher Scientific, Kone Instrument Corp., Espoo, Finland) et de kits spécifiques tandis que les dosages de glutamine, de  $\text{NH}_2$  et de glutamate ont été réalisés par l'Université Aarhus au Danemark. Les **hormones du sang** (insuline et IGF-1) ont été dosées à 4 reprises pour l'essai LM par l'Université de Bern en Suisse mais n'ont pas été dosées pour le protocole CI car le kit n'était plus commercialisé.

### 3.2.2 *Phénotypage dans le lait*

En plus du volume de lait produit (PL) et des taux butyreux (TB) et protéique (TP), la composition fine du lait en acides gras (AG) et lactoprotéines a été phénotypées également dans les deux protocoles à plusieurs reprises avant, pendant et après restriction. Les **AG du lait** ont été quantifiés par chromatographie phase gazeuse (CPG) à l'UMRH sur le protocole CI en cinétique complète mais 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 sur les 19 vaches de l'essai LM à 5 reprises, et sur 8 vaches Holstein de l'essai CI à 4 reprises.

Le phénotypage des molécules cibles a été réalisé dans le lait entier. Les constituants potentiellement biomarqueurs potentiels pressentis étaient les métabolites, les micro-ARN et les protéines, ainsi que le taux d'exfoliation des cellules épithéliales mammaires (CEM). Les micro-ARN ont également été dosés dans différents compartiments du lait : globule gras (GG), vésicules extracellulaires (VE) et CEM.

**L'analyse des teneurs en métabolites du lait** (BHB, acide urique, isocitrate, glucose, glucose-6-phosphate, glutamate et  $\text{NH}_2$ ) a été réalisée par des méthodes fluorométriques par l'Université Aarhus au Danemark en cinétique complète pour l'essai CI, et à 4 reprises pour les vaches de l'essai LM.

**Le comptage des CEM** du lait a été réalisé à 4 reprises pour le protocole LM. Les CEM ont été tout d'abord purifiées par une méthode de séparation immuno-magnétique (Boutinaud *et al.*, 2008) puis leur concentration a été mesurée à l'UMR PEGASE. 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.

**L'extraction des miRNomes** a été réalisée sur un sous-groupe de 8 individus pour chaque protocole expérimental à raison d'un échantillon avant restriction et un après restriction pour chaque compartiment (lait entier avec le kit RNA Now par l'UMR GABI, GG avec le kit Trizol LS par l'UMR H, CEM avec le kit RNA Now par l'UMR PEGASE, et VE avec le kit miRVana par le laboratoire Excilone). Les séquençages ont été réalisés par la plateforme GenomEast de l'IGBMC. Une grande variabilité de concentrations selon le compartiment a été observée et l'insuffisance de matériel biologique n'a finalement pas permis l'analyse des séquences à partir des VE pour le protocole LM.

**L'analyse des protéomes** a été réalisée par la plateforme PAPPISO 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.

## 3.3 Caractérisation de la réponse adaptative des vaches à la restriction alimentaire

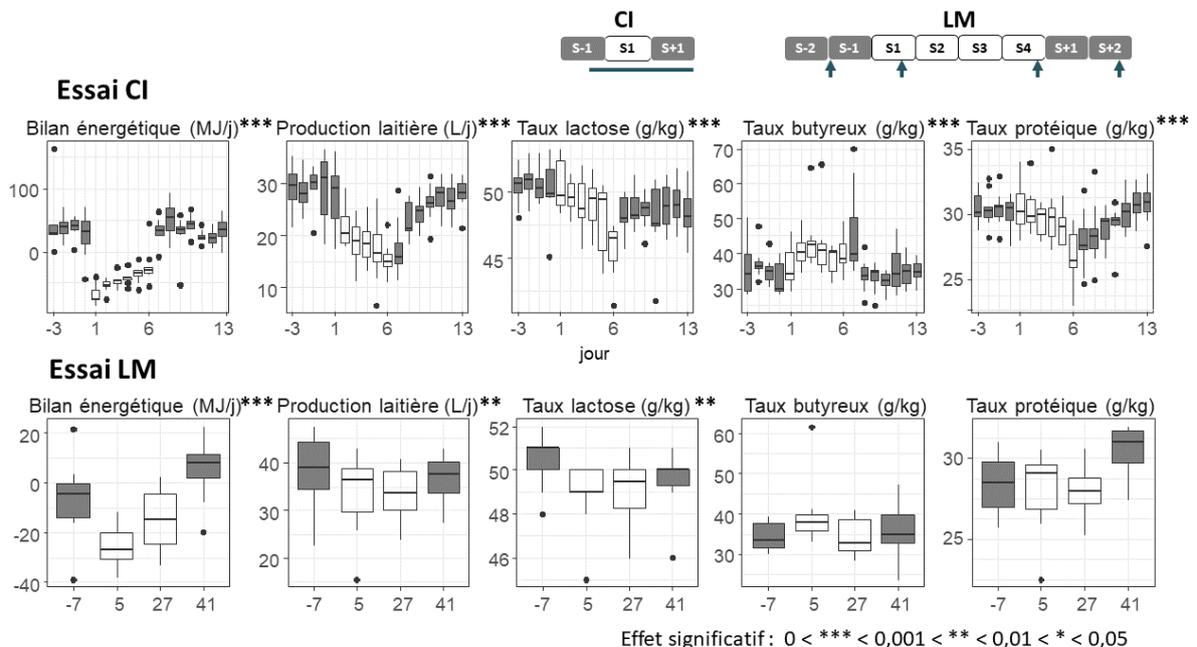
La réponse adaptative des animaux a été évaluée de manière indépendante sur chacun des protocoles, par l'analyse des phénotypes (niveau basal avant restriction, déviation pendant la restriction, capacité à

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. **Ces analyses ont permis de mettre en évidence une cinétique de mise en place de la réponse sur la durée de la restriction, ainsi qu'un retour à l'état basal lors de la réalimentation *ad libitum*, puis de caractériser ces réponses en fonction de la durée et de l'intensité de la restriction subie** (Billa et al., 2020 ; Leduc et al., 2021a).

### 3.3.1 Une réponse plasmatique proportionnelle à l'intensité de la restriction

Dans le protocole CI, la restriction engendre une 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 NH<sub>2</sub> et de l'insuline ont diminué. Dans le protocole LM, 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, sans effet sur la glycémie. Dans les deux protocoles, les valeurs reviennent à leur niveau basal en période post expérimentale.

### 3.3.2 Une réponse en lait en lien avec le niveau d'ingestion et la lipomobilisation



**Figure 1 :** Réponse des vaches à la restriction dans les protocoles de restriction court et intense (CI) et long et modéré (LM)

Dans l'essai CI, la restriction a conduit à une chute de l'ingestion de 64 % et de la PL de 34 %. Les taux ont chuté de manière importante : -25 % pour le TB, -36 % pour le TP et -34 % pour le taux de lactose (Figure 1). Les effets observés sont plus marqués en race Montbéliarde qu'en race Holstein. Une baisse de la synthèse des AG *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 restriction a également affecté le profil en lactoprotéines : les concentrations en caséines  $\alpha_{S1}$ ,  $\alpha_{S2}$  et  $\beta$  ont diminué de façon significative lors de la restriction alimentaire.

**La restriction mise en place dans l'essai LM a conduit à des tendances similaires au protocole CI dans une moindre mesure :** baisse de 20 % de l'ingestion et de 7,6 % de la PL chez les vaches du lot Restreint par rapport au lot Témoin pendant la phase expérimentale (Figure 1). 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. Au cours de cet essai, seule la concentration en caséine  $\alpha_{S2}$  a diminué.

### 3.4 Identification d'un panel de biomarqueurs de la réponse à la restriction alimentaire

#### 3.4.1 Effet de la restriction alimentaire sur les molécules cibles

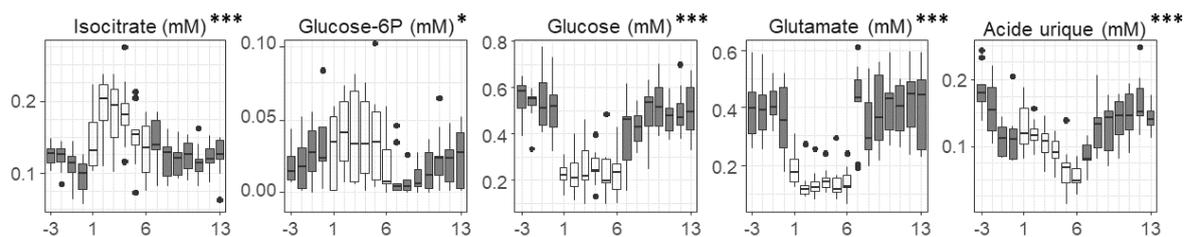
L'analyse comparative des concentrations de ces molécules avant et pendant la phase de restriction alimentaire a permis de confirmer leur intérêt en tant que biomarqueur. Cette analyse a été réalisée de manière indépendante sur chaque protocole, afin d'évaluer l'impact de la sévérité de la restriction.

#### Davantage de CEM exfoliées chez les vaches restreintes

Une augmentation significative de l'exfoliation des CEM dans le lait et une hausse de la viabilité des CEM exfoliées ont été observés pendant la phase de restriction du protocole LM (Hervé *et al.*, 2019). L'effet de la restriction alimentaire ne semble pas rémanent sur l'exfoliation des CEM. La teneur en  $\text{Na}^+$  est plus élevée chez les animaux témoins, ce qui suggère une rupture des jonctions serrées pendant la restriction. Cette observation ne suffit cependant pas à valider l'hypothèse que la hausse du taux d'exfoliation des CEM serait liée à une perte d'intégrité de l'épithélium mammaire.

#### Essai CI

S-1 S1 S+1



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

**Figure 2** : Evolution des teneurs en métabolites du lait en réponse à la restriction (essai de restriction court et intense CI)

#### Des variations de concentrations en métabolites dépendantes de l'intensité de la restriction

Les métabolites sanguins sont déjà utilisés comme marqueurs du déficit énergétique, mais les métabolites du lait, plus faciles 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.

Sur le **protocole CI**, on observe une forte baisse des concentrations en glucose et glutamate, et plus faible pour le BHB, l'acide urique, et le  $\text{NH}_2$ , ainsi qu'une hausse de l'isocitrate et du glucose-6-phosphate pendant la restriction alimentaire (Figure 2). La cinétique est plus ou moins rapide selon les métabolites. Les concentrations en glutamate, isocitrate et  $\text{NH}_2$  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 (Billa *et al.*, 2020). 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).

Sur le **protocole LM**, 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, glutamate et NAGase ne sont pas significatives. 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. En revanche, les résultats contradictoires observés sur le glutamate suggèrent 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 (Leduc et al., 2021b).

### Six protéines affectées par la restriction quelle que soit son intensité

L'étude de l'impact d'une restriction sur les protéomes du lait est la première du genre (Leduc et al., 2022). Parmi les 232 protéines trouvées dans le protéome du lait de l'**essai CI**, l'abondance de 160 protéines 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. 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'une a diminué pendant la restriction alimentaire. Six protéines ont été affectées de façon similaire par les restrictions LM et CI, dont cinq sont normalement présentes dans le plasma. 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 différenciellement abondantes lors de la restriction sont impliquées. Soixante-six 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.

### Cinq micro-ARN identifiés dans le lait entier comme biomarqueurs potentiels

Cette étude est la première à caractériser l'impact de la restriction alimentaire sur les micro-ARN du lait. 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. 2 896 micro-ARN ont été détectés dont 1 493 déjà connus dans l'espèce bovine. Parmi les 1 096 micro-ARN assez abondants pour être informatifs, 10 % étaient exclusifs à un compartiment du lait et l'abondance de 1027 d'entre eux a varié entre les compartiments, révélant un miRNome spécifique pour chaque fraction du lait. La restriction alimentaire a affecté l'abondance de 159 micro-ARN, les compartiments des VE et du lait entier étant les plus touchés, tandis que les GG et les CEM exfoliées ont été peu ou pas affectés. Aucun micro-ARN différenciellement 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 micro-ARN 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 micro-ARN 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. **Cinq micro-ARN ont finalement été identifiés comme biomarqueurs potentiels, essentiellement dans le lait total car l'utilisation potentielle est plus aisée** (Leduc et al., 2023).

#### 3.4.2 Identification des biomarqueurs de la réponse adaptative par analyse intégrative

Dans un second temps, l'ensemble des données communes aux essais LM et CI a été analysé de manière intégrative afin d'identifier les biomarqueurs de la réponse adaptative des vaches laitières à un



déficit énergétique. Deux approches consécutives ont été utilisées et ont permis de constituer un **panel de biomarqueurs** du déficit énergétique de la vache laitière.

### **Passage d'un état ad libitum à un état restreint suivi d'un retour à l'état initial.**

Un **test en cinétique** par analyse de redondance de l'effet jour a permis de marquer les modifications cinétiques lors du passage d'un état *ad libitum* à un état restreint suivi d'un retour à l'état initial. Cette analyse a permis 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. On note ainsi l'importance des variations d'isocitrate dans le passage à l'état restreint dans les deux protocoles, et des variations de glucose et glutamate dans le retour à un état *ad libitum* dans le protocole CI. Cette approche n'a cependant pas permis de prendre en compte l'ensemble des biomarqueurs potentiels, en particulier les protéomes et miRNomes.

### **Identification d'un panel de biomarqueurs du déficit énergétique**

La seconde approche, par **analyse multi-omique** (méthode DIABLO), 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 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, parmi lesquels 13 micro-ARN, le taux de lactose, la sérotransferrine déjà identifiée dans l'analyse des protéomes et 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 ».

Après intégration de l'ensemble des résultats, 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 **micro-ARN** 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  $\alpha_{s2}$** , 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.**

## **4. Validation des biomarqueurs identifiés sur des animaux en déficit énergétique de différentes origines**

Un troisième protocole expérimental a été mis en place dans le but de 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.

### **4.1 Le protocole DEFFILAIT**

Les mesures ont été réalisées dans le cadre d'un essai mis en place dans le programme ANR DEFFILAIT à la ferme expérimentale INRAE de l'UMR PEGASE (IEPL), sur une trentaine de vaches Holstein choisies pour être représentatives de la variabilité du troupeau. Ces vaches ont vêlé à l'automne 2017 ont été

alimentées *ad libitum* avec un régime constant (ration complète à base d'ensilage de maïs, luzerne déshydratée, tourteau de soja et concentré de production) durant les premiers mois de lactation. **En milieu de lactation, l'ensemble des vaches a subi un changement de régime en mars 2018 en passant d'une alimentation témoin (2 semaines) à une alimentation restreinte (5 semaines) après une 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.

## 4.2 Phénotypage dans le lait et le sang

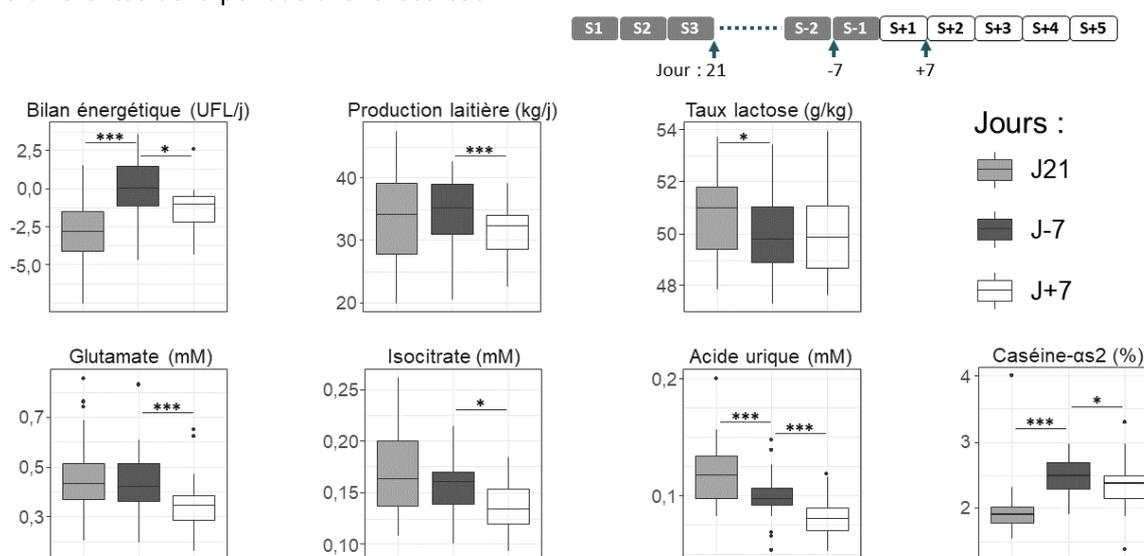
Parmi les vaches de l'essai DEFFILAIT, **des prélèvements de lait et de sang ont été réalisés à 22 ± 1 jours de lactation (J21) sur 34 vaches ayant vêlé à l'automne 2017, puis à J-7 et J+7 par rapport à la transition alimentaire.** Les phénotypes permettant d'évaluer la réponse adaptative des vaches ont été mesurés : production laitière, TB, TP, taux de lactose, métabolites et minéraux du lait et du sang, hormones plasmatiques, lactoprotéines majeures, et CEM. Les analyses ont été réalisées de manière conjointe et par les mêmes laboratoires que pour les protocoles CI et LM.

## 4.3 Effets du déficit énergétique de début de lactation et de la restriction alimentaire

Les effets du déficit énergétique de début de lactation et de la restriction alimentaire ont été évalués par comparaison aux valeurs mesurées avant la restriction afin 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 et de valider les biomarqueurs identifiés sur un nouvel essai de restriction alimentaire. 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 qui comprenait le jour d'échantillonnage comme effet fixe et la vache comme effet aléatoire.

### 4.3.1 Une réponse au déficit énergétique différente en début de lactation

En début de lactation, les vaches présentaient un bilan énergétique négatif comme attendu (Figure 3). **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 et la PL n'étaient pas différentes de la période avant restriction.



Effet significatif : 0 < \*\*\* < 0,001 < \*\* < 0,01 < \* < 0,05 < t < 0,1

**Figure 3 :** Variations de bilan énergétique, de production laitière et des composants du lait dans l'essai DEFFILAIT.



Parmi les métabolites biomarqueurs candidats, la teneur en glucose-6-phosphate, en acide urique et en lactose était supérieure à J21 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. Les concentrations du lait en caséine  $\alpha_{S2}$ ,  $\alpha$ -LA et  $\beta$ -LG étaient inférieures à celles mesurées en milieu de lactation, à J-7. **Ces résultats suggèrent une réponse différente selon que le déficit énergétique est d'origine physiologique (début de lactation) ou alimentaire.** En effet, seule la concentration en glucose-6P a augmenté que ce soit en cas de déficit énergétique en début de 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.

#### 4.3.2 Une adaptation des vaches laitières en réponse à la restriction alimentaire

La restriction alimentaire découlant du changement de régime a été de faible intensité. La Production laitière a diminué de 9 % (contre une baisse de 20 % des apports) 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 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 AGNE 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 du 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  $\alpha_{S2}$  et  $\alpha$ -LA ont diminué alors que celle en caséine  $\kappa$  a augmenté. Ces résultats suggèrent une réponse différente selon l'intensité de la restriction subie (mobilisation des réserves ou non).

## 5. Monitoring du déficit énergétique à partir des spectres moyen infrarouges du lait

Afin que les résultats obtenus permettent aux éleveurs d'adapter l'alimentation des vaches le nécessitant, un outil de monitoring du statut nutritionnel par spectrométrie moyen infrarouge a été développé. Parmi les biomarqueurs du panel identifié, des équations ont été développées pour estimer les concentrations en glutamate, acide urique et isocitrate, pour lesquels aucune équation n'existait par ailleurs.

### 5.1 728 couples de données spectres MIR – concentration en métabolites utilisés

Pour réaliser ce travail, les données des protocoles CI et DEFFILAIT ont été utilisées, ce qui 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.

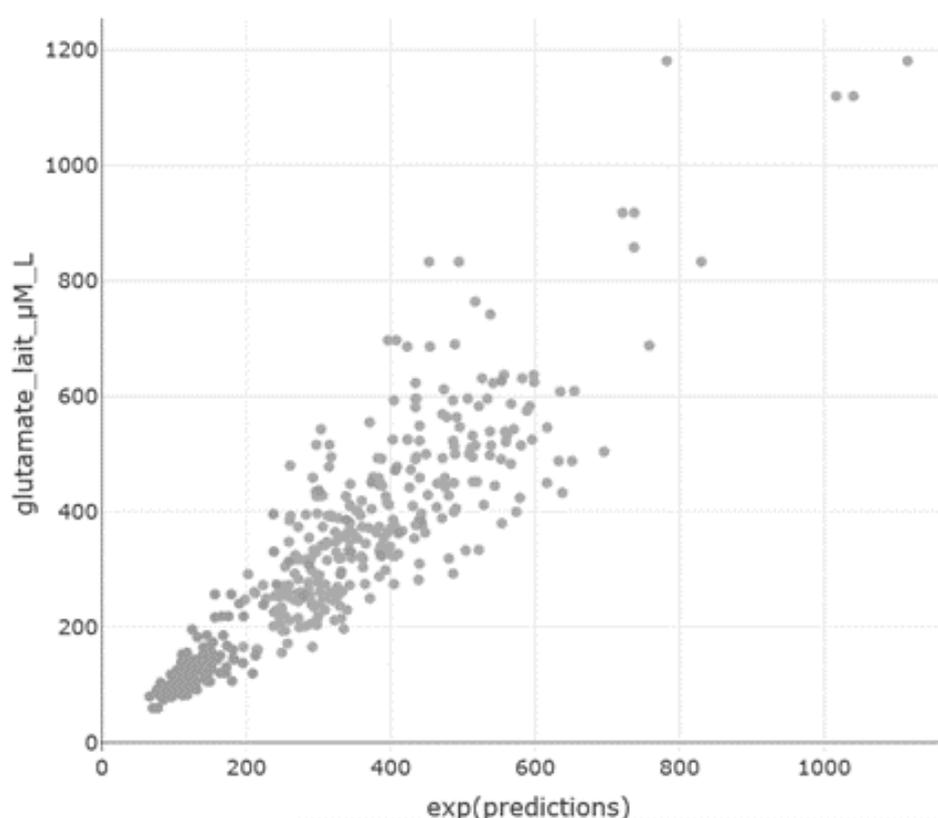
Une Analyse en Composantes Principales (ACP) réalisée sur les 728 spectres MIR a permis de confirmer qu'il semblait possible de discriminer les vaches selon leur alimentation à l'aide des spectres MIR. Deux jeux de données ont alors été constitués :



- 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.

## 5.2 Une prédiction prometteuse des concentrations en glutamate

Les premiers résultats montrent que les concentrations en glutamate du lait sont assez bien prédites par le spectre MIR, que ce soit avec ou sans transformation logarithmique avec un  $R^2$  de calibration autour de 0,80 (Figure 4). L'isocitrate est un peu moins bien estimé, avec un  $R^2$  de calibration supérieur à 0,60, tandis que la prédiction de l'acide urique n'est pas satisfaisante ( $R^2 < 0,50$ ). Les équations développées pourront être utilisées conjointement aux équations déjà existantes (lactose, C18:1c9, BHB, citrate...) afin de constituer un panel de biomarqueurs de manière simple et peu coûteuse pour une utilisation en routine.



**Figure 4 :** Valeurs prédites du glutamate (en abscisses) par rapport aux valeurs mesurées (en ordonnées). Résultats sur jeu de calibration après transformation log.

## 6. Réalisation de supports pédagogiques à destination des éleveurs, encadrants techniques, et enseignement agricole et agronome

**Des supports pédagogiques** à destination des éleveurs et encadrants techniques et de l'enseignement agricole et agronome ont été réalisés afin de transférer aux éleveurs et conseillers actuels et futurs les connaissances nécessaires pour prévenir, identifier et corriger le déficit énergétique dans les exploitations laitières. Des enquêtes réalisées auprès de 21 enseignants en zootechnie dans les formations Bac Technologique STAV, BP REA et BTS PA, 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 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). Ces trois supports peuvent être utilisés de manière indépendante et dans l'ordre souhaité.

Les éléments qui composent le kit sont :

- 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** ludique réalisé sous l'application Plickers, 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 est disponible gratuitement sur [www.idele.fr](http://www.idele.fr) et pourra être relayé aux techniciens conseil par le réseau FCEL, aux lycées agricoles par la DGER et aux écoles d'ingénieurs par IDELE.

## 7. 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- $\alpha_{S2}$ , apolipoprotéine A-IV,  $\alpha$ -1B-glycoprotéine, angiotensinogène, et serotransferrine), et 5 micro-ARN du lait entier et 8 micro-ARN des globules gras.

Les résultats ont été 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. Pour les protéines et en particulier la serotransferrine, le développement de dosages immunochimiques de type ELISA spécifiques est en réflexion. Enfin, une puce de type microfluidique permettant la détection directe des micro-ARN 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.

### Ethique

Les auteurs déclarent que les expérimentations ont été réalisées en conformité avec les réglementations nationales applicables.



### **Déclaration sur la disponibilité des données et des modèles**

Les données qui étayent les résultats évoqués dans cet article sont accessibles sur demande auprès de l'auteur de correspondance de l'article.

### **Déclaration relative à l'Intelligence artificielle générative et aux technologies assistées par l'Intelligence artificielle dans le processus de rédaction.**

Les auteurs n'ont pas utilisé de technologies assistées par intelligence artificielle dans le processus de rédaction.

### **ORCID des auteurs**

GELE Marine - ORCID: 0000 -0002 -8186 -1851

BOUTINAUD Marion – ORCID : 0000 -0003 -0820 -0966

GUINARD-FLAMENT Jocelyne - ORCID: 0000 -0001 -5646 -3774

LE PROVOST Fabienne – ORCID : 0000-0002-0588-5333

LEDUC Antoine – ORCID : 0000-0003-1509-2959

LEROUX Christine – ORCID : 0000-0001-6835-3978

PIRES José – ORCID : 0000-0002-3773-9293

### **Contributions des auteurs**

Marine Gelé a rédigé l'article, et tous les co-auteurs l'ont lu et approuvé.

### **Déclaration d'intérêt**

Les auteurs déclarent ne pas travailler, ne conseiller, ne pas posséder de parts, ne pas recevoir pas de fonds d'une organisation qui pourrait tirer profit de cet article, et ne déclarent aucune autre affiliation que celles citées en début d'article.

### **Remerciements**

Les auteurs remercient le personnel des fermes expérimentales de l'Herbipôle (INRAE, UE1414, Marcenat, France) et de l'IEPL (INRAE, UMR PEGASE, Le Rheu, France) ainsi que les laboratoires ayant contribué aux analyses, et toutes les personnes ayant participé au projet.

### **Déclaration de soutien financier**

Le projet BIOMARQ'LAIT a reçu le soutien financier du Ministère de l'Agriculture et de la Souveraineté alimentaire au moyen des fonds CASDAR.

### **Références bibliographiques :**

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.

Boutinaud M., Ben Chedly M.H., Delamaire E., Guinard-Flament J., 2008. Milking and feed restriction regulate transcripts of mammary epithelial cells purified from milk. *J Dairy Sci.*, 91, 988-998.

Boutinaud M., Hervé L., Lollivier V., 2015. Mammary epithelial cells isolated from milk are a valuable, non-invasive source of mammary transcripts. *Front Genet*, 6, 323.

Bradford B.J., Yuan K., Ylloja C., 2016. Managing complexity: Dealing with systemic crosstalk in bovine physiology. *J Dairy Sci*, 99, 4983-4996.

Canovas A., Rincon G., Bevilacqua C., Islas-Trejo A., Brenaut P., Hovey R.C., Boutinaud M., Morgenthaler C., VanKlompberg M.K., Martin P., Medrano J.F., 2014. Comparison of five different RNA sources to examine the lactating bovine mammary gland transcriptome using RNA-Sequencing. *Scientific Reports*, 4, 5297.

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*, Paris, France.



Hervé L., Quesnel H., Lollivier V., Boutinaud M., 2016. Regulation of cell number in the mammary gland by controlling the exfoliation process in milk in ruminants. *J Dairy Sci*, 99, 854-863.

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.

Horny M.-C., Dupuis V., Siaugue J.-M., Gamby J., 2021. Release and detection of microRNA by combining magnetic hyperthermia and electrochemistry modules on a microfluidic. *Sensor*, 21(1), 185, 1-18.

Jorgensen C.H., Spornly R., Bertilsson J., Ostergaard S., 2016. Invited review: Carryover effects of early lactation feeding on total lactation performance in dairy cows. *J Dairy Sci*, 99, 3241-3249.

Laubier J., Castille J., Le Guillou S., Le Provost F., 2015. No effect of an elevated miR-30b level in mouse milk on its level in pup tissues. *RNA Biol*, 12, 26-29.

Le Guillou S., Sdassi N., Laubier J., Passet B., Vilotte M., Castille J., Laloe D., Polyte J., Bouet S., Jaffrezic F., Crihiu E.P., Vilotte J.L., Le Provost F., 2012. Overexpression of miR-30b in the developing mouse mammary gland causes a lactation defect and delays involution. *PLoS One*, 7 (9), e45727.

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.

Leduc A., Souchet S., Gelé M., Le Provost F., Boutinaud M., 2021a. Effect of feed restriction on dairy cow milk production: a review. *Journal of Animal Science*, 99 (7), 1–12.

Leduc A., Souchet S., Le Provost F., Fischer A., Faverdin P., Pires J. A. A., Gele M., Boutinaud M., 2021b. Milk metabolites, a novel noninvasive approach to assess energy balance in dairy cattle. 2021 American Dairy Science Association Annual Meeting, visioconférence.

Miranda G., Krupova Z., Bianchi L., Martin P., 2013. A novel LC-MS protein profiling method to characterize and quantify individual milk proteins and multiple isoforms. 10th Milk Genomics and Human Health Symposium, Davis, USA.

Mobuchon L., Marthey S., Le Guillou S., Laloe D., Le Provost F., Leroux C., 2015. Food Deprivation Affects the miRNome in the Lactating Goat Mammary Gland. *PLoS One*, 10, e0140111.

Valadi H., Ekstrom K., Bossios A., Sjostrand M., Lee J.J., Lotvall J.O., 2007. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*, 9, 654-659.



Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-NC-ND 4.0)

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue *Innovations Agronomiques* et son DOI, la date de publication.