



HAL
open science

Les facteurs de variations de la lipolyse spontanée du lait de vache et mécanismes biochimiques associés

Élise Vanbergue

► **To cite this version:**

Élise Vanbergue. Les facteurs de variations de la lipolyse spontanée du lait de vache et mécanismes biochimiques associés. Biologie animale. Agrocampus Ouest, 2017. Français. NNT : 2017NSARB291 . tel-01661523

HAL Id: tel-01661523

<https://theses.hal.science/tel-01661523v1>

Submitted on 12 Dec 2017

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.

AGRO CAMPUS

OUEST

Élise VANBERGUE • 20 janvier 2017

Thèse AGROCAMPUS OUEST
sous le label de l'Université européenne de Bretagne
pour obtenir le grade de
DOCTEUR D'AGROCAMPUS OUEST
Spécialité Biologie & Agronomie

ÉCOLE DOCTORALE • Vie - Agro - Santé (VAS)

LABORATOIRE D'ACCUEIL • UMR INRA / AGROCAMPUS OUEST
Physiologie, environnement et génétique pour l'animal et les
systèmes d'élevage (PEGASE)

Les facteurs de variations de la lipolyse spontanée du lait de vache et mécanismes biochimiques associés

Lucile MONTAGNE

Professeure, AGROCAMPUS OUEST, UMR INRA-AO PEGASE / *présidente*

Yvan CHOUINARD

Professeur, Université Laval / *rapporteur*

Francis ENJALBERT

Professeur, ENV Toulouse / *rapporteur*

Ernst JAKOB

PhD, Agroscope Bern / *examineur*

Thierry GESLAIN

Directeur des affaires scientifiques et techniques, CNIEL / *examineur*

Anne FERLAY

Directrice de recherche, INRA Auvergne Rhône Alpes, UMR H /
examinatrice

Jean-Louis PEYRAUD

Directeur de recherche, UMR INRA-AO PEGASE / *directeur de thèse*

Catherine HURTAUD

Ingénieure de recherche, UMR INRA-AO PEGASE / *co-directrice de thèse*

THESE / AGROCAMPUS OUEST

Sous le label de l'Université Européenne de Bretagne

pour obtenir le diplôme de :

**DOCTEUR DE L'INSTITUT SUPERIEUR DES SCIENCES AGRONOMIQUES,
AGRO-ALIMENTAIRES, HORTICOLES ET DU PAYSAGE**

Spécialité : « Biologie et Agronomie »

Ecole Doctorale : « Vie Agro Santé »

présentée par :

Elise Vanbergue

FACTEURS DE VARIATIONS DE LA LIPOLYSE SPONTANEE DU LAIT DE VACHE ET MECANISMES BIOCHIMIQUES ASSOCIES.

soutenue le 20 janvier 2017 devant la commission d'Examen

Composition du jury :

Pr. Lucile Montagne
Pr. Yvan Chouinard
Pr. Francis Enjalbert
Dr. Anne Ferlay
Dr. Jakob Ernst
M. Thierry Geslain
Dr. Jean-Louis Peyraud
Mme Catherine Hurtaud
Mme Marie-Pierre Jacqueroud

Présidente
Rapporteur
Rapporteur
Examinatrice
Examinateur
Examinateur
Directeur de thèse
Encadrante principale
Encadrante invitée

**I hear babies cry, I watch them grow
They'll learn much more, than I'll never know
And I think to myself
What a wonderful world***

Louis Amstrong

***J'entends des bébés pleurer, Je les vois grandir
Ils apprendront bien plus, Que je n'en saurai jamais
Et je pense en moi-même
Quel monde merveilleux**

REMERCIEMENTS

L'ensemble des travaux présentés dans ce mémoire ont eu lieu dans le cadre de ma thèse, qui a rassemblé l'UMR PEGASE et l'Institut de l'élevage. Je remercie **Jaap van Milgen** pour m'avoir accueillie au sein de l'UMR PEGASE et **André Le Gall** pour m'avoir accueillie dans le département des techniques d'élevage et environnement pendant toute la durée de ma thèse.

Cette thèse n'aurait pas pu être réalisée sans les contributions financières de l'équipe Alinut, du CNIEL, de l'ANR ALID et de l'association GALA.

Je remercie vivement les membres du jury : **Yvan Chouinard, Francis Enjalbert, Lucile Montagne, Anne Ferlay, Ernst Jakob et Thierry Gueslain** pour avoir accepté d'évaluer mon travail, pour les échanges qui ont eu lieu durant la soutenance et pour vos précieux conseils pour améliorer le manuscrit. Merci pour le temps que vous m'avez dédié, pour avoir fait le voyage jusque Rennes (parfois de très loin), pour m'avoir fait bénéficier de votre expérience.

Une thèse est le résultat du travail du doctorant, c'est une évidence, mais également de l'implication de plusieurs équipes et personnes qui rendent ce projet réalisable et concret. Je leur exprime ici ma plus profonde gratitude.

- L'équipe encadrante.

Catherine. *Encadrante du quotidien.* Merci pour la confiance et pour l'autonomie que tu m'as accordées tout au long de cette thèse. Tu m'as immédiatement considérée comme une collègue, quasiment indépendante, pour ma plus grande satisfaction. Même si cela impliquait quelques difficultés, j'ai pu ainsi me construire scientifiquement tout au long de ses trois ans ☺. Merci de m'avoir permis de m'exprimer en toute sincérité, de nombreuses fois, et d'avoir été disponible pour écouter mes déboires et réflexions tout au long de la thèse. Je sais comme les échanges honnêtes et sincères sont rares et précieux. A ce stade, ils étaient indispensables. Merci pour ta générosité. Merci pour tous tes conseils et pour ta grande patience (quasi maternelle) pour enrichir ma communication interpersonnelle dans le monde professionnel. Me concernant, c'est ta plus grande réussite ! J'ai beaucoup appris à tes côtés !! Merci Catherine !!

Jean Louis. *Directeur de thèse.* Merci pour votre implication aux moments clés de la thèse. Merci pour le temps très précieux accordé à échanger et à améliorer mes productions pendant ces trois ans.

Marie Pierre. *Encadrante Idele.* Merci pour m'avoir suivie pendant ces trois années. Merci pour ta volonté de m'intégrer au sein du service « Productions Laitières », veillant à ma participation aux réunions et à une collaboration étroite avec mes collègues. Cela m'a permis de découvrir le fonctionnement de la structure (il faut bien le dire, assez différent de celui de l'INRA, qui m'était plus familier) ainsi que de rencontrer et travailler en plus ou moins étroite collaboration avec des collègues de l'Idèle mais aussi de l'ensemble de la filière.

Benoit. *Co-encadrant officiel.* ;) Merci pour tous tes conseils et encouragements quand nous nous croisons lors des réunions de service, d'UMT, ou lors des congrès.

Anne. Merci d'avoir assuré parfois la suppléance de Catherine ;) Merci pour tes nombreux conseils en statistiques, rédaction de discussion ...et j'en passe ! Merci d'avoir accepté parfois de jouer le rôle périlleux de « départageuse » et d'avoir contribué au bon équilibre mental de notre couple

« encadrant-doctorant ». Merci pour ce travail dans l'ombre ;) Merci pour ton humour, pour tous nos échanges et toutes nos discussions.

Luc. Merci pour ton soutien scientifique et humain, et pour tes conseils en statistiques.

Anne Ferlay, Patrice Martin et Guy Miranda. Merci pour l'apport de votre expertise au sujet ; vous m'avez permis d'explorer les prémices des mécanismes de la lipolyse spontanée !

- Les équipes « laboratoire ». Elles ont participé à l'acquisition de nombreuses données pendant ces trois ans.

Cécile. Merci pour toute l'aide que tu m'as apportée sur la partie technique de la thèse, pour les acides gras ou les globules gras. Tu as été d'un grand support ! Merci pour nos nombreuses discussions autour d'un café ou d'un Mastersizer, pour ta générosité, pour ta sincérité.

Sandra. Merci pour ton aide dans la tâche fastidieuse de comptage des composants des globules gras. Merci aussi et surtout pour nos petites conversations, pour ta grande gentillesse, pour ta générosité, pour ta simplicité, pour ton sens du collectif.

Nicole, Thibaud, Yolande, Maryline, Sabrina, Stéphanie, Morgane. Merci pour les dosages d'azote, minéraux, pour les bilans sanguins, pour l'aide ponctuelle, mais aussi pour les petites discussions que nous pouvions avoir à la dérobée dans les couloirs, ou au labo, pour les sourires et pour les petites farces occasionnelles.

Jean-Noël. Belle tentative de travail sur les AGL et surtout belle performance sur les mots croisés. Merci pour ton humour et ta gentillesse.

Perrine. Merci pour ton aide dans les dosages de taille de globules gras.

Gwenola. Merci pour ton aide sur les dosages d'acides gras et pour ta gentillesse.

Un grand merci également à Alain Bernard, Nathalie Evenou et au personnel du LILANO ainsi qu'à Jean-Bernard Davière, Magali Foucher, Marie-Françoise Quesnel et au personnel d'ANALIS, pour l'intérêt porté à mon sujet de thèse et pour le sérieux dans le suivi des échantillons et dans le rendu des résultats de lipolyse.

- Les équipes des stations expérimentales du Pin-au-Haras et de Méjusseaume :

Merci pour la gestion quotidienne des deux exploitations. Vous avez rendu la thèse possible par la mise en place des essais dans les stations et par votre aide lors des nombreux prélèvements !

Pour Méjusseaume, merci à **Jacques Lassalas ; David Sidaner ; Gaël Boulet ; André Cozien ; Jean Baptiste Eon ; Antoine Eveno ; Michel Fargetton ; Mathieu Guilloux ; Arnaud Mottin ; Joseph Orinel ; Jean Parois ; Françoise Pichot ; Patrick Pichot ; Maryvonne Texier ; Ginette Théaud.** Pour le Pin-au-Haras, merci à **Yves Gallard ; Ségolène Colette ; Sarah Barbey ; Sébastien Blandamour ; Samuel Boulant ; Bernard Camp ; Yves Carbonnier ; Jean Luc Deust ; Julien Gentil ; Stéphane Gressin ; Loïc Leloup ; Denis Pichonat ; Cécile Toutain ; Laurent Vandenbroucke.**

- Les équipes « d'appui » de l'INRA et de l'Idele :

Jocelyne, merci pour ta patience sans faille dans la gestion de mon incompétence administrative ;) mais il faut dire qu'après quelques mois d'efforts, Axys et Navision n'avaient presque plus de secret pour moi.

Sarah, souvent la première personne que je croisais sur le site du Rheu, merci pour ton accueil souriant.

Laurence, Marie Claude, Myriam et Laëtitia merci pour votre gentillesse, votre patience et pour votre aide immédiate pour satisfaire mes petites requêtes.

Emilie merci pour ta gentillesse, pour nos petites discussions, et merci à toi et à **Alexiane** pour votre travail efficace dans la recherche des publications « introuvables ».

J'ai également une pensée particulière pour les stagiaires qui ont travaillé sur le sujet, notamment **Clément et Thibaud**. Merci pour votre travail, votre sérieux, votre gentillesse au quotidien. **Clément**, tu as été mon premier vrai stagiaire. J'ai été ravie de cette expérience et à titre plus personnel, ravie de te rencontrer et ravie que nous continuions à échanger même à 6400 km de distance !

Merci aussi à **Charlotte, Aubérie et Sébastien** que j'ai eu l'occasion de suivre en projet tutoré et qui ont contribué à mon travail de thèse. Merci à la promo ESA2012 qui m'a permis de m'essayer aux cours magistraux. Merci à Sébastien et Catherine de m'avoir fait confiance pour ce module.

Je remercie également l'ensemble des groupes et comités de réflexion qui ont gravité autour de la thèse :

- **Le comité de thèse – Laurence Bernard, Christelle Cébo, Olivier Cousin, Sébastien Couvreur, Catherine Hurtaud, Marie Pierre Jacqueroud, Jean-Louis Peyraud, Benoit Rouillé, Vincent Rioux, Philippe Roussel, Anne Thierry** – Merci pour le temps que vous avez dédié pour me faire bénéficier de votre expertise, de vos compétences et de votre recul à propos du projet de thèse. Votre engouement pour le sujet vous a même poussé à vouloir poursuivre les travaux de la thèse ! Merci pour ces élans de motivation et ces après-midi de réflexion autour du sujet pour monter les projets.

- **L'équipe Alinut – Catherine, Jaap, David, Etienne, Anne, Jacques, Alberto, Philippe, Jean-Noël, Cécile, Yolande, Gwenola, Maryline, Auriane, Hauteclaire, Pierre, Katia, Mathilde** - : merci pour vos réflexions et vos échanges lors des présentations scientifiques et pour votre aide dans la préparation de ma soutenance.

- **L'UMT RIEL – Nadine Ballot, Anne Boudon, Catherine Hurtaud, Marie-Pierre Jacqueroud, Marine Gelé, Marlène Guiadeur, Sophie Lemosquet, Stéphanie Minery, Jean-Louis Poulet** - : Merci pour les échanges que nous avons eu autour de mon sujet de thèse et merci pour l'ouverture scientifique autour de la qualité du lait.

- Le groupe «Agralid» - notamment **Elisabeth Baéza, Bernard Schmitt, Guillaume Chesneau, Jean-Yves Dourmad, Matthieu Guillevic, Nathalie Kerhoas, Jacques Mourot, Hayo Van Der Werf** - : Merci pour les échanges que nous avons eu et merci pour l'ouverture scientifique autour de l'alimentation lipidique.

- Les équipes de « l'Institut de l'élevage ».

Je remercie l'ensemble du service - **Marie Pierre, Jocelyne, Fabrice, Valérie, Dominique, Jérôme, Laurent, Amélie, Marine, Jérémie, Julien, Monique, Yves, Jean, Pauline, Jean-Louis, et Sarah** - ainsi que l'ensemble des membres du site du Rheu – **Marie Pierre, Jocelyne, Sarah, Clément, Josselin, Anne, Didier, Xavier, Valérie, Catherine, Laure, Baptiste, Jérémie, Jérôme, Magdé, Sylvain, Armelle, Hervé, Elise, Béatrice, Jean Louis, Benoit, Patrick** - pour les quelques moments que nous avons partagés, lors des réunions en Ecosse, à Clermont Ferrand ou au Rheu et encore aux pauses-café ! J'ai une pensée plus particulière pour certains d'entre vous, avec qui j'ai le plus interagi :

Jean Louis, merci pour l'ensemble des échanges que nous avons eu. Grâce à toi, j'ai pu étoffer mes connaissances sur la machine à traire (faisceaux trayeurs, faisceaux trayeurs, faisceaux trayeurs !! ;)) et la lipolyse induite ! Il me tarde de connaître la suite ! J'ai aimé travailler avec toi.

Marine, merci pour ton aide sur le programme PhenoFinLait et sur la prise en main des spectres MIR. Merci pour tes réponses toujours rapides à mes questions !

Laure, merci pour ta gentillesse et tes conseils en statistiques.

Sarah, merci pour avoir parfois accepté de partager ton bureau avec moi – et surtout pour ne pas avoir mangé les chocolats –

Valérie, merci notamment pour ta présentation sans faille de la ferme de Trévarez !

Je n'aurai jamais eu connaissance de cette thèse si je n'avais pas fait mes premiers pas à l'UMR PEGASE en temps qu'ingénieure d'études sur le projet Roquefort'in. Aussi, je souhaite remercier **Pierre Guy** qui m'a fait confiance, m'a permis de mettre un pied dans la recherche et, après deux années de nombreuses interrogations, de me lancer dans l'aventure. Merci de continuer à me suivre et à te soucier de mon avenir professionnel ! Merci également à **Frédéric** pour m'avoir suivie et pour ton aide dans mes interrogations professionnelles. Je peux écrire plus sereinement aujourd'hui « [qu'] il y a des questions à toutes nos réponses ».

J'en profite pour faire un clin d'œil aux membres de l'équipe « lactation » d'alors - **Hélène, Marion, Frédéric, Catherine, Sophie, Vanessa, Jocelyne, Jacques, Laurence, Colette, Nicole, Perrine, Thibaud, Sandra, Muriel – Michèle** et **Armelle**, avec qui j'ai eu la joie de partager mes deux premières années au sein de l'UMR.

Merci également à l'ensemble des 18 personnes avec qui j'ai partagé, plus ou moins longtemps, notre bureau – lieu privilégié de partage – pendant ces 5 années !! **Lucie, Alice, Rosa, Ana, Maeva, Geoffrey, Raquel, Raphaëlle, Clément, Clémence, Pierre, Xiao, Julien, Zac, Margaux, Adélaïde, Cléo et Luc**. Un "gracias" especial a **Rosa**, para ser quien eres, por tu amistad, por convertirme en un miembro de tu familia, la tita de Alvarito.

Merci à l'ensemble des « docs-prédocs-postdocs » **Alessandra, Alice (C), Alice (F), Auriane, Clément, Clémentine, David, Emmanuel, Hauteclair, Hugues, Jérémie, João, Katarzyna, Lucie, Lucile, Lucio, Magda, Marcolino, Mathilde, Matthieu, Elodie, Morgane (B), Morgane (R), Naveed, Paulo, Pierre, Sandy, Séverine, Raphaëlle, Rebecca, Rosa, Tiago, Tiphaine, Virginie** pour tous les bons moments passés ensemble tout au long de ces cinq années, pour les repas de midi, les restos, les pauses-café, les sushis, les petits-gouters-jeux, les sorties-plage, les escape game, le feu d'artifice (merci Jean Claude), les fêtes de la musique et autres soirées...

J'ai une pensée particulière pour **Sandy, Auriane, Séverine, Hauteclair** camarades de promotion ☺, pour « **petit-Pierre** », je te souhaite pour la fin de ta thèse « glhf » - témoin de l'impact qu'il a eu sur moi – pour **Alice**, nos petites discussions vont me manquer, et pour **Lucile**, :*:*:*:*:*:*:*:*:*:* .

Enfin, merci à tous, **Arnaud, Alexandra, Armelle, Michèle, Charlyne, Colomba, Chantal, Rémy, Christine, Catherine (H), Nadège, Amélie, Alberto, Philippe, Anne-Isabelle, Yannick, Ludovic, Jean-Yves, Florence (G-L), Marie-Christine, Luc (D), Cyrille, Perrine, Carole, Marion, Éric, Alessandra, Jean-Noël, Cécile, Jacques (L), Yolande, Gwenola, Katia, Alice (C), Alice (F), Auriane, Clément, Clémentine, David, Emmanuel, Hauteclair, Nicolas, Jean-Louis, Maryline, Hugues, Jérémie, João, Katarzyna, Lucile (H), Lucio, Magda, Marcolino, Mathilde, Matthieu, Catherine (D) Morgane (B),**

Morgane (R), Naveed, Paulo, Pierre, Sandy, Séverine, Raphaëlle, Rebecca, Sabrina, Rosa, Tiago, Tiphaine, Anne, Virginie, Jocelyne, Stéphanie, Colette, Sandra, Vanessa, Hélène, Pierre-Guy, Jacques (P), Morgane (K) Laurence, Nathalie, Élodie, Lucile (M), Armelle, Raphaël, Françoise, Frédéric (D), Florence (G), Lucie, Muriel, Nicole, Sandra, Thibaud, Ana, Maeva, Geoffrey, Raquel, Clémence, Xiao, Julien, Zac, Margaux, Adélaïde, Cléo, Luc (M), Jaap, Bénédicte, Isabelle (Lo), Isabelle (Lu), Sophie (B), Marie-Hélène, Nathalie, Sophie (L), Frédérique, Annie, Sandrine (L), Christine, Pascale, Christian, Marylène, Frédéric (H), Sandrine (T), Frédéric (L), Étienne, Sophie, David (R) pour les paroles et les sourires quasi-quotidiens que nous avons échangés pendant ces trois /cinq années.

Vous avez tous contribué à faire de cette expérience une expérience inoubliable ! Ces trois / cinq années resteront un très bon souvenir.

Et maintenant, quelques messages personnels ;) :

A **mes parents**, pour qui, « faire des études » était important. Vous m'avez éduquée dans cette voie et, indirectement, cet accomplissement est aussi le vôtre ! Merci de m'avoir donné ces clés qui m'ont permis de me construire. Merci de m'avoir transmis vos valeurs.

A ma petite sœur préférée, **Estelle**. Tu es mon premier souvenir d'enfant. Comparses de toutes les aventures d'enfants et pré-pubères, je suis heureuse de t'avoir retrouvée à Rennes après quelques années !

Rencontrés il y a déjà huit ans (ou un peu moins ;)) à Rennes ou ailleurs, restés Rennais ou éparpillés partout en France et à l'étranger, **Sarah, Flo, (et petite Agathe) Justine, Max, Julie, Marianne, Marie, Simon, Gwen, Kevin, Christophe, Christelle, Maïlys, Clémentine, Audrey, Tiphaine**. J'ai l'impression d'avoir toujours vécu et grandi à vos côtés ! Merci pour votre amitié ! On a presque tous partagé ces interrogations « thèse-ou-pas-thèse » ... finalement, pour moi, c'est fait !

A notre petit groupe de danseurs et notamment à **Agathe, Alex, Arnaud, Aurélien, Blandine, Edith, Hortense, Joséphine, Mathilde**. Merci pour les bons moments que nous avons passé à danser mais aussi autour d'un bon repas, à jouer ou à voyager ! Merci pour votre amitié !

Merci à tous d'être à mes côtés. Vous êtes une grande partie de ma vie.

SOMMAIRE

| | |
|---|----|
| Liste des tableaux et figures | 14 |
| Liste des publications et des communications | 19 |
| Liste des abréviations | 22 |
| Préambule | 23 |
| Introduction | 24 |
| Partie bibliographique | |
| I. La lipolyse influence les qualités organoleptiques des produits laitiers et l'aptitude des laits à la transformation | 29 |
| A. La lipolyse peut être responsable de défauts organoleptiques dans les produits laitiers | 29 |
| B. La lipolyse peut entraîner des inaptitudes à la transformation du lait | 31 |
| II. Présentation du système lipolytique du lait de vache | 32 |
| A. La lipoprotéine lipase, l'enzyme responsable de la lipolyse du lait | 32 |
| 1. Structure et fonction de la lipoprotéine lipase | 32 |
| 2. Sécrétion et localisation de la lipoprotéine lipase | 33 |
| 3. Caractérisation de l'activité de la LPL | 33 |
| 4. Comportement physico-chimique de la lipoprotéine lipase | 35 |
| B. Les globules gras du lait protègent les triglycérides de l'action de la lipoprotéine lipase | 37 |
| 1. Sécrétion des globules gras | 37 |
| 2. Caractéristiques structurelles des globules gras | 37 |
| a. <i>La taille des globules gras</i> | 37 |
| b. <i>Composition des globules gras</i> | 38 |
| C. Les cofacteurs de la lipoprotéine lipase | 39 |
| 1. La sérum albumine bovine | 39 |
| 2. Les fractions protéose peptone du lait | 40 |
| 3. Les apolipoprotéines | 42 |
| 4. Les glycoaminoglycanes du type héparine. | 42 |
| III. Fonctionnement du système lipolytique | 43 |
| A. Le refroidissement entraîne une réorganisation des composants du lait qui favorise la lipolyse spontanée | 43 |

| | | |
|-----|--|----|
| 1. | L'évolution de la structure des globules gras suite au refroidissement | 43 |
| 2. | La migration de la LPL à la surface des GG | 44 |
| 3. | Le rôle des activateurs et des inhibiteurs de LPL | 45 |
| B. | Mécanisme biochimique du système lipolytique | 45 |
| IV. | La variabilité du système lipolytique est modulée par les facteurs d'élevage | 46 |
| A. | Facteurs de variation du système lipolytique intrinsèques à l'animal | 47 |
| 1. | Individus et race | 47 |
| a. | <i>Lipoprotéine lipase</i> | 47 |
| b. | <i>Globule gras</i> | 47 |
| c. | <i>Cofacteurs de lipoprotéine lipase</i> | 47 |
| 2. | Génétique | 48 |
| a. | <i>Lipoprotéine lipase</i> | 48 |
| b. | <i>Globules gras</i> | 49 |
| c. | <i>Cofacteurs de la lipoprotéine lipase</i> | 49 |
| 3. | Stade physiologique | 49 |
| a. | <i>Lipoprotéine lipase</i> | 49 |
| b. | <i>Globules gras</i> | 49 |
| c. | <i>Cofacteurs de la lipoprotéine lipase</i> | 50 |
| 4. | Parité | 50 |
| B. | Facteurs de variations du système lipolytique extrinsèques à l'animal | 50 |
| 1. | Moment de la traite | 50 |
| a. | <i>Lipoprotéine lipase</i> | 50 |
| b. | <i>Globule gras</i> | 51 |
| 2. | Fréquence de traite | 51 |
| a. | <i>Lipoprotéine lipase</i> | 51 |
| b. | <i>Globule gras</i> | 51 |
| 3. | Alimentation | 51 |
| a. | <i>Lipoprotéine lipase</i> | 51 |
| b. | <i>Globule gras</i> | 52 |
| 4. | Saison | 53 |
| a. | <i>Lipoprotéine lipase</i> | 55 |
| b. | <i>Globule gras</i> | 55 |
| V. | La variabilité de la lipolyse est modulée par les facteurs d'élevage | 55 |
| A. | Facteurs de variation de la lipolyse spontanée intrinsèques à l'animal | 55 |
| 1. | Individus et race | 55 |
| 2. | Génétique | 55 |
| 3. | Stade physiologique | 56 |

| | |
|--|-----|
| 4. Parité | 57 |
| B. Facteurs de variations de la lipolyse spontanée extrinsèques à l'animal | 57 |
| 1. Moment de la traite | 57 |
| 2. Fréquence de traite | 57 |
| 3. Alimentation | 58 |
| 4. Saison | 58 |
| Résultats | |
| Chapitre 1 : Effets des facteurs d'élevage sur la lipolyse spontanée du lait de vache dans les troupeaux actuels : mise à jour des références | 64 |
| Chapitre 1, Partie 1 : Approche expérimentale : effets de la race, de la parité, du stade de lactation et de la stratégie alimentaire sur la lipolyse spontanée du lait de VL | 66 |
| Chapitre 1, Partie 2 : Approche « enquête en élevage » : effets des pratiques d'élevage sur la lipolyse du lait chez la VL | 89 |
| Chapitre 2 : Etude de différents facteurs zootechniques influençant les variations de la lipolyse spontanée chez la VL | 96 |
| Chapitre 2, Partie 1 : Effets du polymorphisme K232A du gène <i>DGAT-1</i> sur la lipolyse spontanée du lait de VL dans un contexte de variation de la fréquence de traite | 96 |
| Chapitre 2, Partie 2 : Effets de concentrés riches en oméga 3 (lin, microalgues) sur la lipolyse spontanée du lait | 114 |
| Chapitre 2, Partie 3 : Effet du stade de lactation/gestation sur les variations de la lipolyse spontanée du lait de vache | 141 |
| Chapitre 2, Partie 4 : Effet de la nature du fourrage et d'une restriction alimentaire sur la lipolyse spontanée du lait de vache | 151 |
| Chapitre 3 : Etude des mécanismes biochimiques de la lipolyse en fonction de la nature du fourrage distribué en association ou non avec une restriction alimentaire | 157 |
| Discussion | |
| I. Les facteurs d'élevage ont un effet sur la LS | 186 |
| A. La génétique intra race ou inter race semble définir le potentiel lipolytique des VL | 186 |
| 1. Il existe deux phénotypes de susceptibilité à la LS | 186 |
| 2. Le déterminisme génétique de la LS | 186 |
| B. Chez les VL susceptibles, nous avons confirmé l'existence de plusieurs facteurs de variations de la LS | 187 |
| 1. Importance du moment de la traite | 187 |
| 2. La parité et le stade physiologique : des facteurs intrinsèques à l'animal qui modulent les niveaux de LS. | 188 |

| | |
|--|-----|
| 3. La LS est modulée par des facteurs d'élevage (fréquence de traite, alimentation) et des facteurs environnementaux (saison) | 189 |
| II. Les mécanismes biochimiques de la LS | 191 |
| A. L'activité lipasique mesurée dans le lait total vs dans la fraction grasse : une importance variable dans l'explication de la LS selon les facteurs d'élevage ? | 191 |
| B. L'intégrité des globules gras, un indicateur difficile à évaluer. | 192 |
| C. Equilibre entre les cofacteurs de la lipoprotéine lipase | 192 |
| D. La membrane du globule gras, déterminante de l'intégrité des globules gras et de l'interaction avec la lipoprotéine lipase | 195 |
| III. Implications pratiques des résultats de la thèse pour maîtriser les taux de LS dans la filière laitière. | 196 |
| A. L'évaluation de la lipolyse individuelle en élevage demanderait des adaptations des acteurs de la filière | 197 |
| B. La LS en élevage, des solutions diverses selon les systèmes d'élevage | 197 |
| 1. Les points communs | 197 |
| 2. Les particularités | 197 |
| C. De meilleures connaissances sur les laits de mélange pour une meilleure compréhension des mécanismes à l'échelle du tank. | 199 |
| Conclusion générale | 201 |
| Références | 203 |
| Annexes | 231 |

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

FIGURES

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

- Figure 1** : Réaction de lipolyse. 25
- Figure 2** : Schéma des trois types de lipolyse. *D'après Heuchel et Chilliard (1988) TG : Triglycérides ; LPL : Lipoprotéine lipase* 25
- Figure 3** : Relation entre la capacité moussante du lait (CM) et la quantité d'acides gras libres (AGL). CM = volume de la mousse x 100 / volume de lait initial. *Adaptée de Deeth (2006)* 31
- Figure 4** : Modèle de la structure de la lipoprotéine lipase. Ce modèle a été établi à partir de la cristallographie aux rayons X de la lipase pancréatique, une lipase dont l'homologie de séquence avec la lipoprotéine lipase est très élevée. Le site catalytique est indiqué en magenta et en jaune. *D'après Bourne et al. (1994)* 32
- Figure 5** : Vitesse initiale d'apparition des acides gras libres selon la quantité de substrat (trioléine) dans le milieu pour la lipoprotéine lipase bovine. *D'après Hayashi (1986)*. 34
- Figure 6** : Schéma de la structure d'un globule gras (A) et mécanismes d'évolution intra cellulaire et excrétion des globules gras dans la lumière de l'épithélium (B). *D'après Lopez et al. (2008)* 36
- Figure 7** : Evolution de la lipolyse spontanée dans le lait en fonction de la quantité de protéose peptone ajoutée dans le milieu. *D'après Anderson (1981)* 41
- Figure 8** : Effet de l'addition d'héparine sur la lipolyse spontanée après 24h de stockage à 4°C. *D'après Sundheim et Bengtsson-Olivecrona (1987c)* 42
- Figure 9** : Quantité de lipoprotéine lipase présente au niveau de la fraction grasse du lait après 3h de stockage à différentes températures. *D'après Sundheim et al. (1987)* 44
- Figure 10** : Relation entre taille des globules gras et le rapport TB/TP. *D'après Couvreur et Hurtaud (2016)*. 48
- Figure 11** : Taille des globules gras en fonction de la part d'herbe dans la ration. *D'après Couvreur et al. (2006)* 53
- Figure 12** : Relation entre la taille des globules gras et le *trans 10 C18 :1*. *D'après Briard-Bion et al. (2008)* 53
- Figure 13** : Effet du stade de gestation et du stade de lactation sur les niveaux de lipolyse spontanée. ○ : 18 VL gestantes tarées entre août et septembre ; ● : 23 VL

gestantes tarées entre juin et juillet ; x : 12 VL non gestantes durant leur lactation.
D'après Chazal et al. (1986) 57

RÉSULTATS

Chapitre 1, partie 1

Figure 1: Diagram of the experimental design. 73

Figure 2: Effect of lactation period (LPeriod) on milk spontaneous lipolysis. A- In morning milks B- In evening milks. 82

Figure 3: Correlation between *cis* 9 C18:1 and SL during morning and evening milks in period 1. 83

Chapitre 1, partie 2

Figure 1 : Variations saisonnières de lipolyse 91

Chapitre 2, partie 2

Figure 1: Principal component analysis of the 44 volatile compounds significantly affected by animal diet (as determined by variance analysis) 133

Chapitre 2, partie 3

Figure 1 : Evolution de la production laitière au cours de la lactation pour les traites du matin et du soir. 145

Chapitre 3, partie 1

Figure 1: Experimental design 161

Figure 2: Correlation between spontaneous lipolysis and log (protease peptone 5) in milk whey in evening milks. 177

TABLEAUX

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

| | |
|--|----|
| Tableau 1 : Flaveurs associées aux acides gras libres à courte chaîne présents dans le lait des vaches laitières. <i>D'après Chouinard (2012), Bendall (2001) et Moio et al. (1993).</i> | 28 |
| Tableau 2 : Acides gras libres à courte chaîne participant à l'odeur des beurres. <i>D'après Mallia et al. (2008).</i> | 28 |
| Tableau 3 : Concentrations en acides gras libres totaux présents dans les fromages. <i>D'après Fox (1995), Woo et al. (1984) et Woo et Lindsey (1984).</i> | 28 |
| Tableau 4 : Inhibition de la lipolyse (mEq/L) par des protéines membranaires (PM) dans le lait et dans les suspensions de matière grasse laitière (MGL). <i>D'après Bengtsson et Olivecrona (1987).</i> | 40 |
| Tableau 5 : Effet des différentes protéoses peptones sur la lipolyse spontanée du lait. <i>D'après Anderson (1981).</i> | 41 |
| Tableau 6 : Taille des globules gras à différents stades de lactation. <i>D'après Altenhofer et al. (2015).</i> | 50 |
| Tableau 7 : Evolution du taux de transcrits de la lipoprotéine lipase dans la glande mammaire de vaches laitières nourries avec des suppléments lipidiques. | 52 |
| Tableau 8 : Niveaux de lipolyse spontanée du lait (meq/100 g de MG) en fonction de la race des vaches laitières. | 56 |
| Tableau 9 : Effet de la nature du fourrage sur les niveaux de lipolyse spontanée | 59 |
| Tableau 10 : Effect d'une restriction alimentaire sur les niveaux de lipolyse spontanée | 59 |
| Tableau 11 : Récapitulatif de l'effet des facteurs de variation de la composition de la membrane des globules gras | 60 |
| Tableau 12 : Récapitulatif des effets des facteurs de variation du système lipolytique et la lipolyse spontanée. | 61 |

RÉSULTATS

Chapitre 1, partie 1

| | |
|---|----|
| Table 1: Chemical composition and nutritional value of winter feeds | 70 |
| Table 2: Ingredients, chemical and nutritional composition of winter diets | 71 |
| Table 3: Effect of breed and feeding strategy on milk traits during each period of lactation | 75 |
| Table 4: Effect of breed and feeding strategy on animal characteristics | 76 |

| | |
|--|-----|
| Table 5: Effect of breed and feeding strategy on milk fat characteristics during period 1 | 77 |
| Table 6: Effect of breed and feeding strategy on milk fat characteristics during period 2 | 78 |
| Table 7: Effect of breed and feeding strategy on milk fat characteristics during period 3 | 79 |
| Table 8: Effect of breed and feeding strategy on milk fat characteristics during period 4 | 80 |
| Chapitre 2, partie 1 | |
| Table 1: Effect of <i>DGAT-1</i> K232A polymorphism on milk production and milk composition during TDM1 | 103 |
| Table 2: Effect of <i>DGAT-1</i> K232A polymorphism on plasma parameters during TDM1 | 103 |
| Table 3: Effect of <i>DGAT-1</i> K232A polymorphism on body condition during TDM1 | 104 |
| Table 4: Effect of <i>DGAT-1</i> K232A polymorphism on milk production and macronutrients upon milking frequency variations | 108 |
| Table 5: Effect of <i>DGAT-1</i> K232A polymorphism on milk composition upon upon milking frequency variations | 108 |
| Table 6: Effect of <i>DGAT-1</i> K232A polymorphism on milk spontaneous lipolysis upon milking frequency variations | 109 |
| Table 7: Effect of <i>DGAT-1</i> K232A polymorphism on plasma parameters upon upon milking frequency variations | 109 |
| Chapitre 2, partie 2 | |
| Table 1: Chemical composition and nutritional value of feeds | 117 |
| Table 2: Composition of experimental diets | 121 |
| Table 3: Effects of addition of extruded linseed, DHA Gold [®] and DHA Gold [®] /extruded linseed mixture on weight, DM, energy and protein intake and balance of dairy cows | 127 |
| Table 4: Effects of addition of extruded linseed, DHA Gold [®] and DHA Gold [®] /extruded linseed mixture on milk yield and milk composition | 128 |
| Table 5: Effects of addition of extruded linseed, DHA Gold [®] and DHA Gold [®] /extruded linseed mixture on milk protein and mineral composition | 128 |
| Table 6: Effects of addition of extruded linseed, DHA Gold [®] and DHA Gold [®] /extruded linseed mixture on milk fatty acids composition | 129 |
| Table 7: Effects of addition of extruded linseed, DHA Gold [®] and DHA Gold [®] /extruded linseed mixture on milk fat characteristics (milk fat globule size, milk spontaneous lipolysis) | 130 |
| Table 8: Effects of addition of extruded linseed, DHA Gold [®] and DHA Gold [®] /extruded linseed mixture on plasma composition | 130 |

| | |
|--|-----|
| Table 9: Effects of addition of extruded linseed, DHA Gold [®] and DHA Gold [®] /extruded linseed mixture on cheese making parameters | 131 |
| Table 10: Effects of addition of extruded linseed, DHA Gold [®] and DHA Gold [®] /extruded linseed mixture on cheese rheology | 131 |
| Table 11: Effects of addition of extruded linseed, on butter making parameters and rheology | 134 |
| Table 12: Effects of addition of extruded linseed, DHA Gold [®] and DHA Gold [®] /extruded linseed mixture on characteristics of cheeses determined by sensory analysis | 135 |
| Table 13: Effects of addition of extruded linseed on characteristics of butters determined by sensory analysis | 135 |
| Chapitre 2, partie 3 | |
| Tableau 1 : Valeur alimentaire de la ration. | 143 |
| Tableau 2 : Effet du moment de la traite | 145 |
| Tableau 3 : Evolution de la LS des laits au cours de la lactation | 147 |
| Tableau 4 : Evolution des caractéristiques de la matière grasse du lait de traite du matin au cours de la lactation | 148 |
| Tableau 5 : Evolution des caractéristiques de la matière grasse du lait de traite du soir au cours de la lactation | 149 |
| Chapitre 3, partie 1 | |
| Table 1: Chemical composition and nutritional value of feeds | 164 |
| Table 2: Composition of experimental diets | 165 |
| Table 3: Weight, DM, energy and protein intake of dairy cows according to feeding treatments | 166 |
| Table 4: Milk yield and milk composition according to feeding treatments | 167 |
| Table 5: Effect of time of milking (morning vs evening) on milk SL, lipase activity and fat globule size | 167 |
| Table 6: Milk fat characteristics (milk fat globule size, milk spontaneous lipolysis) and lipoprotein lipase activity according to feeding treatments | 169 |
| Table 7: Effect of time of milking (morning vs evening) on fatty acid profile | 171 |
| Table 8: Morning milk fatty acids composition according to feeding treatments | 172 |
| Table 9: Evening milk fatty acids composition according to feeding treatments | 173 |
| Table 10: Plasma composition according to feeding treatments | 175 |

Table 11: Protein composition in milk and whey, according to main distributed forage, in evening milks (N=12) 176

Table 12: Protein composition in milk and whey, according to restriction level, in evening milks (N=12). 178

LISTE DES PUBLICATIONS ET DES COMMUNICATIONS

Articles scientifiques de rang A

Vanbergue E., Peyraud J.L., Guinard-Flament J., Charton C., Barbey S., Lefebvre R., Gallard Y., Hurtaud C. 2016. Effects of DGAT-1 K232A polymorphism and milking frequency on milk composition and spontaneous lipolysis in dairy cows. *J Dairy Sci.* 99:5739-5749

Vanbergue E., Delaby L., Colette S., Gallard Y., Peyraud J.L, Hurtaud C. Effects of breed, feeding system and lactation stage on milk fat characteristics and spontaneous lipolysis in dairy cows. *J Dairy Sci.* *In press*

Vanbergue E., Peyraud J.L, Hurtaud C. Effects of n-3 fatty acid sources on milk fatty acid profile, milk fat properties, butter and hard cooked cheese technological properties and sensory quality. *Animal.* *Soumis le 3 mars 2017*

Vanbergue E., Hurtaud C., Peyraud J.L., Beuvier E., Duboz G., Buchin S. Effects of n-3 fatty acid sources on milk fatty acid profile, milk fat properties, butter and hard cooked cheese technological properties and sensory quality. *J Dairy Sci.* *A soumettre.*

Vanbergue E., Peyraud J.L., Miranda G., Martin P., Ferlay A., Hurtaud C. Effects of feeding restriction and nature of forage on milk lipolytic system. *J Dairy Sci.* *A soumettre.*

Vanbergue E., Peyraud J.L., Hurtaud C. Spontaneous lipolysis in dairy cows, a review. *En préparation.*

Communications orales en congrès internationaux

Vanbergue E., Delaby L., Colette S., Gallard Y., Hurtaud C. 2015. Effect of breed, energy level of diet, and lactation stage on the evolution of milk lipolysis in dairy cow. Annual Meeting of American Dairy Science Association, Orlando, 2015/07/13-16, Floride (USA) *J Dairy Sci.* 98, E-Suppl 1:552

Vanbergue E., Peyraud J.L., Miranda G., Martin P., Ferlay A., Hurtaud C. 2016. Impacts of energy level of the diet and nature of forage on milk spontaneous lipolysis in dairy cows. EAAP – 67th Annual Meeting, Belfast 2016, p289

Affiches en congrès internationaux

Vanbergue E., Mourot J., Debournoux P., Guillevic M., Huchet N., Perrier C., Hurtaud C. 2015. Effects of different sources of omega 3 fatty acids on cow milk spontaneous lipolysis. IDF World Dairy Summit, 2015/09/20-24, Vilnius, Lituanie.

Hurtaud C., **Vanbergue E.**, Cirot C., Hervé L., Boutinaud M. Evolution of milk composition in cow's milk during the time course of milking. EAAP – 67th Annual Meeting, Belfast 2016, p296

Communications orales en congrès nationaux

Vanbergue E., Guinard-Flament J., Barbey S., Charton C., Lefebvre R., Gallard Y., Hurtaud C. 2015. Effet du polymorphisme au locus diacylglycerol-O-transférase 1 sur la lipolyse spontanée, dans un contexte de variation de la fréquence de traite. *Rencontres Recherches Ruminants* 22 : 375-378

Vanbergue E., Mourot J., Debournoux P., Guillevic M., Huchet N., Perrier C., Hurtaud C. 2015. Effet de l'apport de concentrés riches en oméga 3 dans les rations des vaches laitières sur la lipolyse spontanée du lait. Journées Francophones de Nutrition, Marseille, 2015/12/9-11

Hurtaud C., **Vanbergue E.**, Buchin S., Duboz G., Beuvier E., Guillevic M., Mourot J. 2015. Effet de différentes formes d'apport d'oméga 3 sur le profil en acides gras des laits de vache et les propriétés sensorielles des fromages et des beurres. Journées Francophones de Nutrition, Marseille, 2015/12/9-11

Affiches en congrès nationaux

Vanbergue E., Cirot C., Fisher A., Faverdin P., Hurtaud C. 2016. Effet du stade de lactation/gestation sur les variations de la lipolyse spontanée du lait de vache. Rencontres Recherches Ruminants 23, 180

Paës C., Renouard A., Taussat S., Poulet J-L., Hurtaud C., **Vanbergue E.** 2016. Enquêtes sur les pratiques d'élevage en relation avec la lipolyse en bovins laitiers. Rencontres Recherches Ruminants 23, 282

Cirot C., **Vanbergue E.**, Hervé L., Boutinaud M., Hurtaud C. 2015. Evolution de la lipolyse spontanée du lait de vache au cours de la traite. Rencontres Recherches Ruminants 22, 392

LISTE DES ABREVIATIONS

AcL : Activité lipasique
AG : Acide gras
AGI : Acide gras insaturé
AGL : Acide gras libre
AGMI : Acide gras monoinsaturé
AGPI : Acide gras polyinsaturé
AGS : Acide gras saturé
BSA : Bovine Serum Albumin (Sérum Albumine Bovine)
CEM : Cellule épithéliale mammaire
DGAT-1 : Diglycérade acyltransférase 1
GLYCAM1 : Glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1
GG : Globule gras
GM : Glande mammaire
LPL : Lipoprotéine lipase
LS : Lipolyse spontanée
MG : Matière grasse
MFGM : Milk fat globule membrane (membrane des globules gras)
MSI : Matière sèche ingérée
PL : Production laitière
PP3 : Composant 3 de la fraction protéose peptone
PP5 : Composant 5 de la fraction protéose peptone
PP8 : Composant 8 de la fraction protéose peptone
PPT : Protéose peptone totale
PS : Phosphatidylsérine
RE : Réticulum endoplasmique
SLi : Système lipolytique
TB : Taux butyreux
TG : Triglycérides
TP : Taux protéique
VL : Vache laitière

Préambule

La lipolyse est une réaction enzymatique qui entraîne la formation d'acides gras libres (**AGL**) dans le lait. La lipoprotéine lipase (**LPL**) est responsable de cette réaction enzymatique. Dans le cadre d'accords interprofessionnels, les AGL issus de la lipolyse sont parfois dosés dans le lait de tank. L'échantillon est prélevé lors de la collecte qui a lieu tous les 4 à 6 traites. Le lait présent dans le tank a été stocké entre 2 h et 72 h. Les AGL ainsi dosés représentent la somme des AGL présents dans le lait à la sortie de la mamelle (entre 0,15 et 0,25 meq/100 g de MG) et les AGL produits par l'action de la LPL pendant la durée de stockage du lait. Ils sont à la fois issus de la composante « spontanée », de la composante « induite » et éventuellement de la composante « microbienne » de la lipolyse.

Dans la thèse, nous nous sommes intéressés uniquement à la lipolyse « spontanée » et nous avons appelé lipolyse l'action enzymatique qui se traduit par la formation d'AGL. Expérimentalement, nous avons choisi d'évaluer la lipolyse spontanée (**LS**) pendant les premières 24 h de stockage du lait. Nous l'avons quantifiée en soustrayant les AGL initialement présents dans le lait aux AGL présents après 24 h de stockage du lait. Cette mesure nous a permis de caractériser l'activité lipolytique (**AcL**) de chaque lait de l'ensemble des essais dans les mêmes conditions.

La lipolyse est la mise en œuvre du système lipolytique (**SLi**). Il est constitué principalement par la LPL, ses cofacteurs, et son substrat, les triglycérides. Dans la plupart de la littérature relative à la lipolyse, l'activité de la LPL est évaluée expérimentalement dans un milieu en excès de substrat et en présence d'activateurs de l'enzyme (apolipoprotéines du sérum, sérum albumine bovine), à pH neutre, à 37°C ou 39°C. L'activité de la LPL ainsi mesurée représente le potentiel d'activité de la LPL en conditions idéales. Elle dépend de la quantité de LPL présente et de l'efficacité de la LPL. Elle est donc différente de l'activité de la LPL dans le lait, qui elle dépend de l'équilibre du SLi.

Introduction

Le secteur laitier représente une activité économique prépondérante en France. En effet, la filière laitière emploie 250 000 personnes, dont 150 000 au sein des exploitations, et génère un chiffre d'affaires de 26,8 milliards d'euros. En 2012, la production de produits laitiers représentait 3 % de la production industrielle totale du pays en termes de valeur, se plaçant ainsi comme la 2^{ème} activité agroalimentaire, derrière la filière viande. En 2015, 63 600 exploitations ont produit 24,6 milliards de litres de lait ce qui représente un peu moins de 20 % de la production européenne de lait. Le Grand Ouest (Normandie, Bretagne, Pays de la Loire) concentre plus de 30 000 producteurs de lait soit près de la moitié des producteurs français.

En France, 98,2 % du lait produit est collecté par des coopératives ou des entreprises privées (Source Ministère de l'Agriculture). La loi Godefroy (1969) régit les modalités du paiement du lait aux éleveurs. Elle stipule que le lait doit être rémunéré en fonction de sa composition et de sa qualité hygiénique et sanitaire. Les grilles de classement du lait, définies par des accords interprofessionnels, intègrent les critères prévus par cette loi. Les critères obligatoires de paiement sont des critères de composition (protéines, lipides et point de congélation du lait) et des critères sanitaires (germes, cellules somatiques et présence éventuelle d'antibiotiques). Le taux protéique servant de référence est de 32 g/L, et le taux butyreux de 38 g/L. A cela s'ajoutent des critères facultatifs de paiement du lait tels que la présence de spores butyriques, le profil en acides gras (**AG**) ou la lipolyse depuis 1992. La lipolyse est un critère de paiement dans 5 régions interprofessionnelles laitières dont la Bretagne. Le lait de référence doit contenir moins de 0,89 meq d'AGL pour 100 g de matière grasse (**MG**). Au-dessus de cette valeur, le point de pénalité est de -3,049 € pour 1000 L de lait.

On appelle lipolyse, la mise en œuvre du SLI qui conduit à la formation d'AGL dans le lait (**Figure 1**). Le SLI est constitué par 1) une enzyme native du lait, la LPL, 2) son substrat, les triglycérides (**TG**) constituant les globules gras (**GG**) et 3) ses cofacteurs, activateurs et inhibiteurs. On distingue trois types de lipolyse : la LS, la lipolyse induite et la lipolyse microbienne (**Figure 2**). La LS se produit consécutivement au refroidissement du lait, en l'absence de chocs mécaniques. Elle dépend de l'animal et des facteurs d'élevage. La lipolyse induite se produit consécutivement aux chocs mécaniques et thermiques qui ont lieu pendant la traite et le stockage du lait. En pratique, dans les élevages, il n'est pas possible de dissocier la LS de la lipolyse induite dans les laits de tank. La lipolyse microbienne est le produit de l'action des enzymes microbiennes sur les GG du lait. La lipolyse microbienne devient significative après 3 à 4 jours de stockage du lait lorsqu'il est de qualité sanitaire satisfaisante.

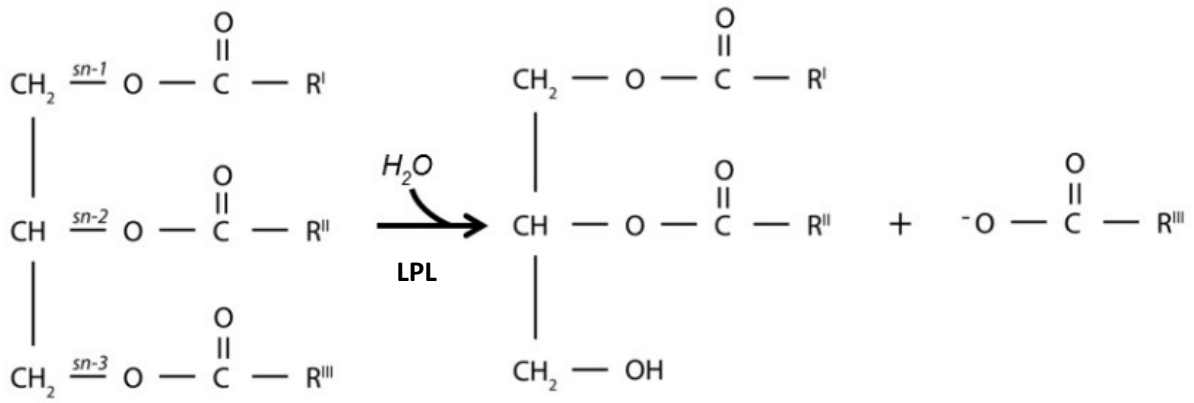


Figure 1 : Réaction de lipolyse.

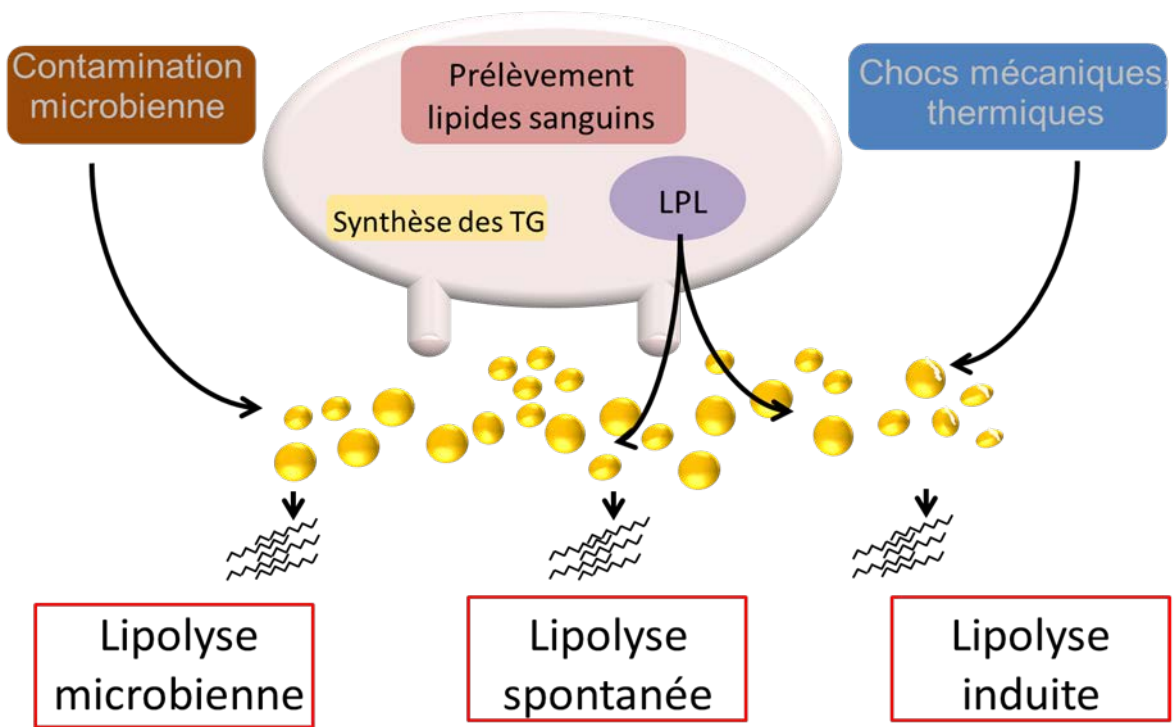


Figure 2 : Schéma des trois types de lipolyse. D'après Heuchel et Chilliard (1988)

TG : Triglycérides ; LPL : Lipoprotéine lipase

Dans les années 1960 à 1990, l'incidence de la lipolyse du lait s'est accrue du fait de l'intensification et la modernisation de la production laitière qui ont entraîné une augmentation de la taille et de la complexité des installations de traite, du stockage du lait au froid à la ferme puis à la réception à l'usine. A titre d'exemple, une enquête réalisée en 1981-1982 portant sur 135 usines françaises montrait que la lipolyse dépassait le seuil de 1,25 meq/100 g de MG dans 20 % des échantillons de beurres prélevés. A cette époque, ce problème a fait l'objet de nombreux travaux. La situation s'est nettement améliorée depuis, puisque la moyenne annuelle des résultats de lipolyse dans la zone URCIL (Union Régionale des Centres Interprofessionnels Laitiers) – Finistère, Côte d'Armor, Morbihan - est passée de 0,86 à 0,61 meq/100 g de MG entre 1986 et 1996. Cependant, depuis les années 2000, les industries laitières ont constaté de nouveau une augmentation des phénomènes de lipolyse dans les laits de collecte en France sans que cette augmentation ne soit pour autant objectivée ni expliquée par les techniciens d'élevage.

Dans cette thèse, l'attention a été exclusivement portée sur la LS avec un objectif de meilleure connaissance des animaux actuels et de leurs interactions avec l'environnement d'élevage. Les travaux ont été menés à deux échelles : zootechnique et biochimique.

Après un rappel des données bibliographiques essentielles sur le SLi et son fonctionnement ainsi que sa modulation par les systèmes d'élevage, nous présenterons les différents essais menés au cours de la thèse, qui nous conduiront à discuter et mettre en perspective les données nouvellement acquises.

Partie bibliographique

Tableau 1 : Flaveurs associées aux acides gras libres à courte chaîne présents dans le lait des vaches laitières ¹.

| Acide gras | Flaveur associée |
|--------------------------|---|
| Acide acétique | Vinaigre |
| Acide propionique | Vinaigre ; âcre |
| Acide butyrique | Vomi ; fromage féta |
| Acide valérique | Acide ; pain ; fromage ; chien |
| Acide caproïque | Graisseux ; fromageux ; cireux ; chèvre |
| Acide caprylique | Cire ; savon ; chèvre ; moisi ; rance ; fruité |
| Acide caprique | Rance |
| Acide déc-9-énoïque | Papier humide ; poussière brûlée |
| Acide 3-méthylbutanoïque | Herbeux léger ; légumes cuits |

¹ Adapté de Chouinard (2012), Bendall (2001) et Moio et al. (1993)

Tableau 2 : Acides gras libres à courte chaîne participant à l'odeur des beurres ¹

| Composant | Odeur associée | Seuil odeur nasale (mg/kg) |
|------------------|--|----------------------------|
| Acide butanoïque | Beurre, douce, fromagère, rance | 0,135 |
| Acide hexanoïque | Acres, moisie, fromagère, piquante | 5,4 |

¹ Adapté de Mallia et al. (2008)

Tableau 3 : Concentrations en acides gras libres totaux présents dans les fromages ¹

| Variété | AGL (mg/kg) | Variété | AGL (mg/kg) |
|---------------|-------------|-------------------|-------------|
| Sapsago | 211 | Gjetost | 1658 |
| Edam | 356 | Provolone | 2118 |
| Mozzarella | 363 | Brick | 2150 |
| Colby | 550 | Limburger | 4187 |
| Camembert | 681 | Fromage de chèvre | 4558 |
| Port Salut | 700 | Parmesan | 4993 |
| Monterey Jack | 736 | Romano | 6754 |
| Cheddar | 1028 | Blue mould (US) | 32230 |
| Gruyère | 1481 | Roquefort | 32453 |

¹ Adapté de Fox (1995), Woo et al. (1984) et Woo et Lindsey (1984)

I. La lipolyse influence les qualités organoleptiques des produits laitiers et l'aptitude des laits à la transformation

A. La lipolyse peut être responsable de défauts organoleptiques dans les produits laitiers.

L'hydrolyse des TG par la LPL peut être à l'origine d'une dégradation organoleptique des produits laitiers. Historiquement, le terme « rance » a été le plus utilisé pour décrire ce défaut de goût. Les termes de « savonneux », « chèvre », « butyrique » et « amer » ont également été utilisés. Or, les termes « amer » et « rance » ne sont pas spécifiques à la lipolyse et sont parfois utilisés pour décrire des saveurs liées à l'oxydation ou à la dégradation protéique. De ce fait, il est recommandé d'utiliser le terme de « lipolysé » pour faire référence à la saveur spécifique qui correspond à l'hydrolyse des TG (Shipe et al., 1978). Cependant cette nomenclature n'est pas toujours scrupuleusement respectée dans la littérature et le terme de « rance » est souvent rencontré (Scanlan et al., 1965 ; Duncan et al., 1991 ; Gonzalez-Cordova et Vallejo-Cordoba, 2003).

Pour mieux définir le défaut de flaveur associé à la lipolyse, des préparations de laboratoire (ajout dosé d'AGL dans la matrice lait) ont été réalisées pour préciser la contribution de chaque AGL à la flaveur du lait. Il a été montré que la flaveur « lipolysée » du lait provenait essentiellement des acides gras à courte chaîne (entre C4:0 et C12:0) et particulièrement de l'acide caprylique (C8:0) et de l'acide caprique (C10:0) (**Tableau 1** ; Scanlan et al., 1965 ; Bendall, 2001 ; Moio et al., 1993). Dans le beurre, la présence d'AGL perturbe l'équilibre entre composés volatiles et non-volatiles en apportant une saveur et une odeur « rance » aux beurres (**Tableau 2** ; Shipe et al., 1980 ; Gonzalez-Cordova et Vallejo-Cordoba, 2003 ; Mallia et al., 2008). L'acide butyrique (C4:0) et l'acide caproïque (C6:0) seraient les AGL les plus influents (Patton, 1964 ; Bills et al., 1969 ; McDaniel et al., 1969). Selon le type de fromages, la contribution des AGL à courtes chaînes, considérés les plus importants, peut être positive ou négative (**Tableau 3**). Dans les fromages dits à lipolyse élevée tels que les fromages à pâte molle, les fromages italiens à pâte pressée ou les fromages à pâte persillée, le C4:0 apporte une saveur « fromagère », le C6:0, une saveur de « bleu » ou « piquante » et le C8:0 une saveur « fruitée », « chèvre » ou encore « moisie » particulièrement recherchée dans le cas des bleus. Ces AGL sont également les précurseurs de composés volatiles essentiels dans le développement des flaveurs de ces fromages tels que les méthylcétones, les lactones, les esters et les alcools secondaires. A l'opposé, dans les fromages à lipolyse plus modérée tels que les fromages à pâte pressée non cuite du type cheddar, gouda, ou cuite du type gruyère ou emmental, les produits de la lipolyse et leurs dérivés participent à la flaveur générale du fromage mais doivent rester présents en quantité modérée. Dans le cas contraire, le C4:0 est associé à une flaveur « rance » et le C8:0 à une flaveur « savon », « rance » ou « cireuse ». Dans les fromages, les AGL peuvent provenir du lait initial, de l'action de la LPL (si lait cru), des préparations enzymatiques, des ferments et des

moisissures apportés au lait lors de la fabrication et l'affinage (Fox et al., 1995 ; Collins et al., 2003 ; Wilkinson et al., 2007). Concernant les yaourts, il y a peu d'information dans la littérature. Cependant, il a été montré une corrélation positive entre une saveur de type « savon » dans les yaourts et la concentration en AGL, et plus particulièrement le C8:0, le C10:0 et le C14:0 (Rychlik et al., 2006 ; Güler et al., 2007 ; Cheng, 2010).

Le seuil de perception de la flaveur « lipolysée » est variable selon les produits laitiers concernés (lait, beurre, crème, fromage) et selon les auteurs. En ce qui concerne le lait, dans le cas d'ajouts dosés d'AGL, il est souvent rapporté l'existence de corrélations entre la teneur en AGL et la perception de la flaveur « rance » ou « lipolysée » par les jurys (Duncan et al., 1991 ; Gonzalez-Cordova et Vallejo-Cordoba, 2003) alors que dans les laits issus de tank, aucune corrélation n'a été mise en évidence entre ces deux paramètres (Connolly et al., 1979 ; Earley et Hansen, 1982 ; Duncan et al., 1991). Le lait commence à être jugé négativement à partir d'un seuil d'AGL égal à 1,2 mEq/100 g de MG (MacLeod et al., 1957 ; Connolly et al., 1979 ; Santos et al., 2003). La variabilité des résultats est cependant à prendre en compte : selon Connolly et al. (1979), 23 % des jurys entraînés sont capables de reconnaître la saveur « lipolysée » à partir de 2,65 mEq / 100 g de MG, alors que Santos et al. (2003) rapportaient que 34 % des jurys détectaient cette flaveur au-delà de 1,25 mEq / 100 g de MG et 63 % au-delà de 1,75 mEq / 100 g de MG. La variabilité des résultats peut s'expliquer par le niveau d'entraînement des jurys mais également par l'abondance des saveurs retrouvées dans le lait. En effet, il n'y a pas moins de 207 composés volatiles (Maarse et Visscher, 1990) qui apportent leur flaveur au lait avec une synergie variable selon leur concentration. En ce qui concerne les beurres et les crèmes, beaucoup d'études n'ont pas montré de corrélation entre la teneur en AGL et la saveur « lipolysée » (Fouts, 1940 ; Bell et Parsons, 1977 ; Connolly et al., 1979). Cependant Woo et Lindsay (1983) ont fait le lien entre la teneur en AGL et la flaveur rance. Selon les publications, le seuil de perception de la flaveur « lipolysée » varie entre 0,78 et 2,80 mEq / 100 g de MG. Cependant, le seuil de 1,5 meq / 100 g de MG semble être le plus fréquemment utilisé (Stadhouders, 1972 ; Downey, 1980 ; Woo et Lindsay 1983 ; Fox et al., 1995). De plus, à ce seuil, les beurres sont susceptibles également d'être plus sensibles à d'autres phénomènes induisant des défauts de flaveur tels que l'oxydation des AG. Les AGL sont en effet plus disponibles pour réagir avec d'autres composés. (Fox et al., 1995). Selon Nursten (1997) et McNeill et al. (1986), la rancidité des beurres est ressentie à partir de 35 mg/kg de C4:0 et de 26 mg/kg de C6:0, le C4:0 et le C6:0 étant les AGL qui contribuent le plus à cette flaveur. Pour les fromages dits à lipolyse élevée, 5 à 10 % des triglycérides peuvent être transformés en AGL, dans le cas des pâtes molles et plus de 20 % dans le cas des pâtes persillées. Pour les fromages dits à lipolyse modérée, la lipolyse ne doit pas dépasser 2 % des triglycérides pour éviter le développement de saveur « rance » ou « lipolysée » (Gripon, 1993 ; Fox et al., 1993 ; Wilkinson et al., 2007).

B. La lipolyse peut entraîner des inaptitudes à la transformation du lait

Certains auteurs ont rapporté des défauts d'aptitude à la transformation des laits à partir d'un certain seuil de lipolyse. Lors de la fabrication du beurre, une lipolyse du lait élevée entraînerait des modifications au niveau du comportement lors de l'écémage et une augmentation du temps de barattage de la crème (Deeth et Fitzgerald, 1995 ; Deeth, 2006 ; Mallia et al., 2008). Ceci serait à mettre en lien avec des modifications des capacités moussantes rapportées par Deeth (2006) (Figure 3). En effet, les glycérides partiels présents dans le lait déplaceraient les protéines stabilisatrices de la mousse à l'interface eau/air des bulles formées par le moussage diminuant les capacités moussantes du lait (Deeth et Smith, 1983 ; Buchanan, 1965). Pour le fromage, il a été montré que certains AGL inhibaient la croissance des bactéries lactiques et des bactéries propioniques utilisées lors de la fabrication et de la maturation des fromages. A titre d'exemple, il a été montré que, même à faible dose (10 à 100 mg/L), le C12:0, le C14:0, le C18:0 et le C18:3 inhibaient la croissance du *Lactobacillus helveticus* et que le C12:0, C14:0, C18:0 et C18:2 inhibaient la croissance de *Freudenreichii shermani*, deux souches très employées en fromagerie (Fan et al., 1976 ; Boyaval et al., 1995).

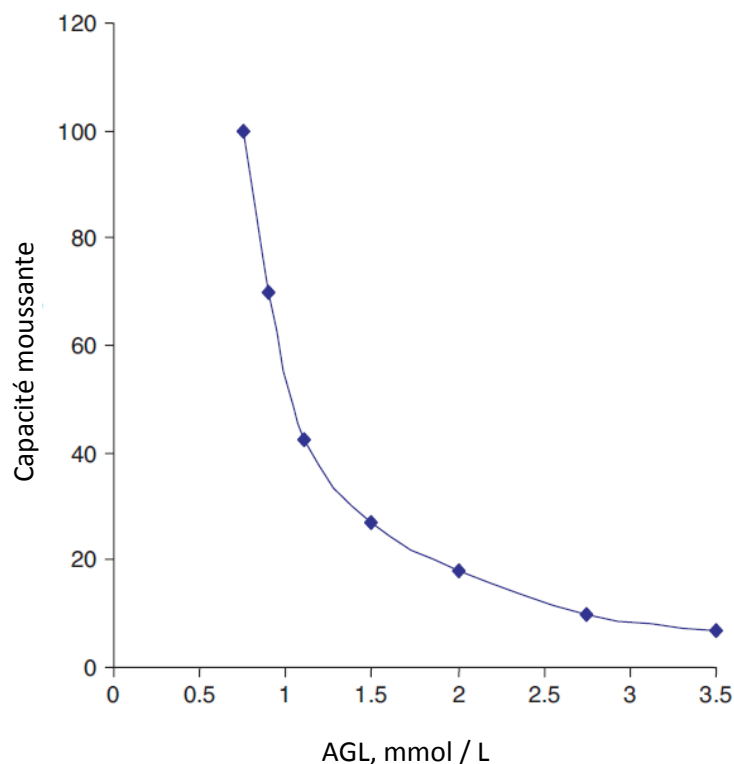


Figure 3 : Relation entre la capacité moussante du lait (CM) et la quantité d'acides gras libres (AGL).
CM = volume de la mousse x 100 / volume de lait initial. Adaptée de Deeth (2006)

Ces défauts de qualité organoleptique et technologique des laits ne peuvent être corrigés par l'aval de la filière. Ils justifient donc une étude approfondie de la lipolyse des laits et de ses facteurs de variation en amont de la filière, aux niveaux biochimique et zootechnique.

II. Présentation du système lipolytique du lait de vache

Le SLi est un système enzymatique réunissant trois composantes principales : l'enzyme, la LPL ; son substrat, les TG constituants des GG ; et ses activateurs et inhibiteurs. L'activation du SLi est à l'origine de la lipolyse qui se caractérise par la production d'AGL.

A. La lipoprotéine lipase, l'enzyme responsable de la lipolyse du lait

1. Structure et fonction de la lipoprotéine lipase

La LPL est une glycoprotéine présente sous deux formes : une forme active et une forme inactive. La forme inactive, une sous unité monomérique de 50 kDA s'associe en dimères avec une autre unité monomérique pour constituer la forme active de la LPL (Iverius et Ostlund-Lindqvist, 1976 ; Humbert et al., 1997 ; Osborne et al., 1985). La N-glycosylation et la dimérisation dans le réticulum endoplasmique sont des prérequis à l'activation de la LPL (Ben Zeev, 1992 ; Braun et Severson, 1992 ; Deeth, 2006). La structure de la LPL a été modélisée à partir de la structure de la lipase pancréatique, mieux connue (Figure 4).

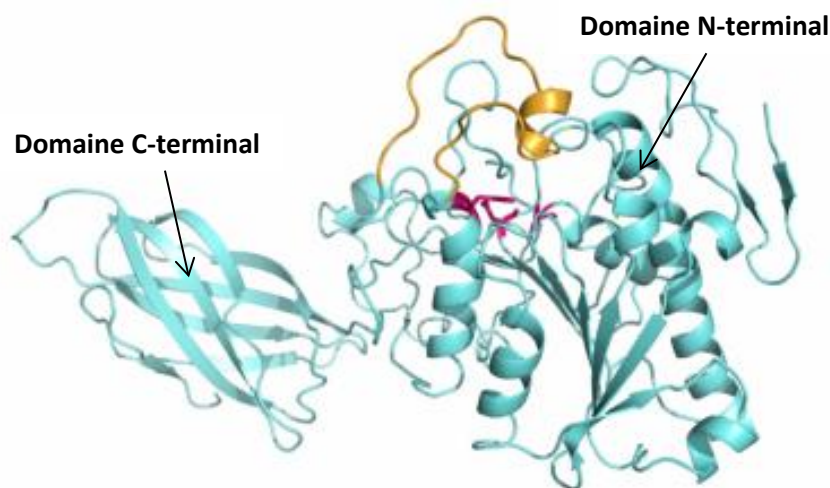


Figure 4 : Modèle de la structure de la lipoprotéine lipase. Ce modèle a été établi à partir de la cristallographie aux rayons X de la lipase pancréatique, une lipase dont l'homologie de séquence avec la lipoprotéine lipase est très élevée. Le site catalytique est indiqué en magenta et en jaune. *D'après Bourne et al. (1994)*

Dans la glande mammaire (**GM**), le rôle de la LPL est de catalyser l'hydrolyse des TG circulants. Les AGL, produits de la réaction enzymatique, sont alors prélevés pour être utilisés lors de la sécrétion de MG laitière (Chilliard et Ferlay, 2004). La LPL hydrolyse préférentiellement les AG positionnés en sn1 et sn3 des TG (positions externes du squelette de glycérol), libérant ainsi majoritairement des AG allant du C6:0 au C12:0 et du C16:0 au C24:0, présents en position externe sur le squelette du glycérol (Olivecrona et al., 2003 ; Collins et al., 2003).

Si la LPL joue un rôle important dans la GM pour la production de MG, (Barber et al., 1997 ; Olivecrona et al., 2003), sa présence dans le lait, n'a jusqu'à présent pas pu être reliée à un rôle biologique particulier (Olivecrona et al., 2003 ; Deeth, 2006), tant et si bien que certains auteurs relient la présence de LPL dans le lait à une « absence de barrière » de la GM (Deeth, 2006).

2. Sécrétion et localisation de la lipoprotéine lipase

La LPL est présente dans de nombreux tissus : les tissus adipeux, musculaires, cardiaques, hypothalamiques et mammaires, principalement. Dans le tissu mammaire, elle est sécrétée par les cellules adipeuses, les myocytes et majoritairement par les cellules épithéliales (Camps et al., 1990). Au sein des cellules épithéliales, la LPL est principalement localisée au niveau de la membrane basale pour capter les TG circulants. Cependant, une petite proportion de la LPL se retrouve intégrée aux membranes des vésicules de Golgi lors de la maturation des caséines. Cette portion de LPL est ainsi transférée en périphérie des micelles de caséines. Les micelles de caséines et les LPL associées sont ensuite excrétées dans la lumière des alvéoles (Olivecrona et al., 2003).

Dans le lait, 90 % des LPL sont associées aux micelles de caséines (Dorner et Widmer, 1932 ; Tarassuk et Frankel, 1957 ; Gaffney et al., 1962 ; Yaguchi et Tarassuk, 1963 ; McSweeney, 2004) et plus particulièrement aux caséines κ (Fox et al., 1966). L'association entre la LPL et les caséines est surtout due à des interactions électrostatiques entre les charges négatives des groupements phosphate des caséines et les charges positives des acides aminés de la LPL (Olivecrona et al., 2003) et à des interactions hydrophobes entre les acides aminés hydrophobes de la LPL et des caséines (Olivecrona et al., 2003 ; Deeth, 2006).

3. Caractérisation de l'activité de la LPL

La LPL suit le schéma réactionnel des réactions enzymatiques classiques :



avec [S], la concentration en substrat, soit ici les TG dans les GG, [E], la concentration en enzyme, soit ici la LPL et [P], le produit formé, soit ici les AGL. Cependant, à la différence des réactions enzymatiques classiques, l'accès au substrat est conditionné par la perte d'intégrité des GG

(dégradation des membranes des GG), qui contiennent les TG et la réaction a lieu à l'interface lipide-eau (Chilliard et Lamberet, 1984).

In vitro, lorsque les TG sont accessibles, il a été montré que la LPL était une enzyme michaélienne (Figure 5 ; Hayashi et al., 1986). Sa vitesse de réaction V est donc définie, dans le cas général, par l'équation de Briggs et Haldane (1925) :

$$V = V_{max} \cdot \frac{[S]_i}{[S]_i + K_m}$$

Avec : $V_{max} = K_{cat} \cdot [E]_{tot}$, la vitesse maximale de réaction en excès de substrat.

K_{cat} , la constante catalytique, qui définit la réactivité pour le substrat.

$[E]_{tot}$ la concentration totale en enzyme.

$[S]_i$ la concentration en substrat initial.

$K_m = \frac{K_{-1} + K_{cat}}{K_1}$, la constante de réaction, qui définit l'affinité de l'enzyme pour le substrat.

Dans le cas général (Briggs et Haldane, 1925), la vitesse de réaction dépend de la concentration initiale en substrat, de la concentration en enzyme et de ses cofacteurs qui définissent K_m et K_{cat} . Plus la concentration en enzyme est importante, plus la réaction sera rapide. Cependant, comme dans toute réaction enzymatique, la quantité d'enzymes fonctionnelles présentes dans le milieu n'influence pas la concentration en produits à l'équilibre. La concentration en produits à l'équilibre, c'est à dire en AGL, dépend donc uniquement de la concentration en substrat.

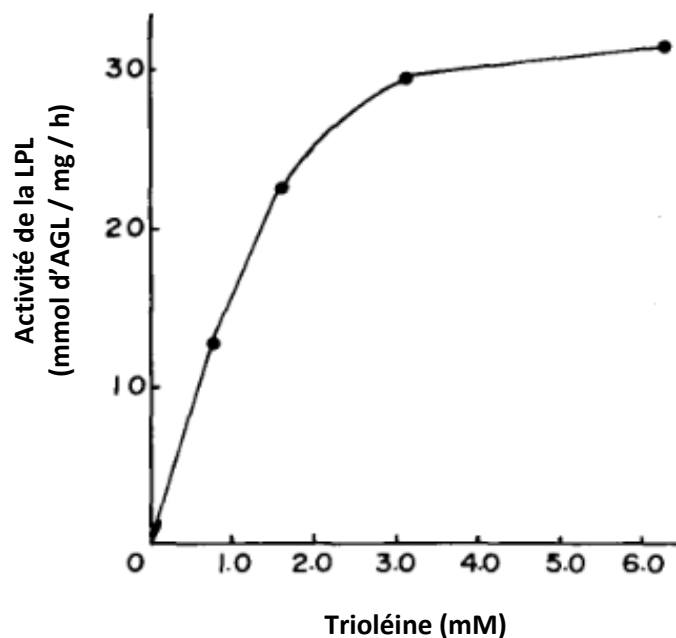


Figure 5 : Vitesse initiale d'apparition des acides gras libres selon la quantité de substrat (trioléine) dans le milieu pour la lipoprotéine lipase bovine. D'après Hayashi et al. (1986).

4. Comportement physico-chimique de la lipoprotéine lipase

La LPL native du lait est instable à la chaleur et peut-être inactivée par pasteurisation (Farkye et al., 1995), contrairement aux lipases microbiennes (Deeth, 2006). Elle est également instable en milieu acide d'où son inactivation dans l'estomac (Deeth, 2006). Le pH optimal de son fonctionnement se situe entre 8 et 9 (Driessen et al., 1989). Le pH du lait se situe en dessous de cet optimum et contribue donc à la préservation du lait (Walstra et Jenness, 1984). Expérimentalement, l'ajout de NaOH ou de HCl pour augmenter ou diminuer le pH des laits de 0,2 à 0,3 unités de pH modifie considérablement la teneur en AGL à l'équilibre. Une diminution du pH de 6,7 à 6,5 entraîne une diminution de moitié des produits de la lipolyse alors qu'une augmentation de 6,7 à 7,0 entraîne une multiplication par deux des produits de la lipolyse (Murphy et al., 1979). Cependant, il n'a pas été observé d'influence de la variabilité individuelle des pH du lait sur l'activité lipasique (**A_{CL}**) et la production d'AGL (Chilliard, 1986).

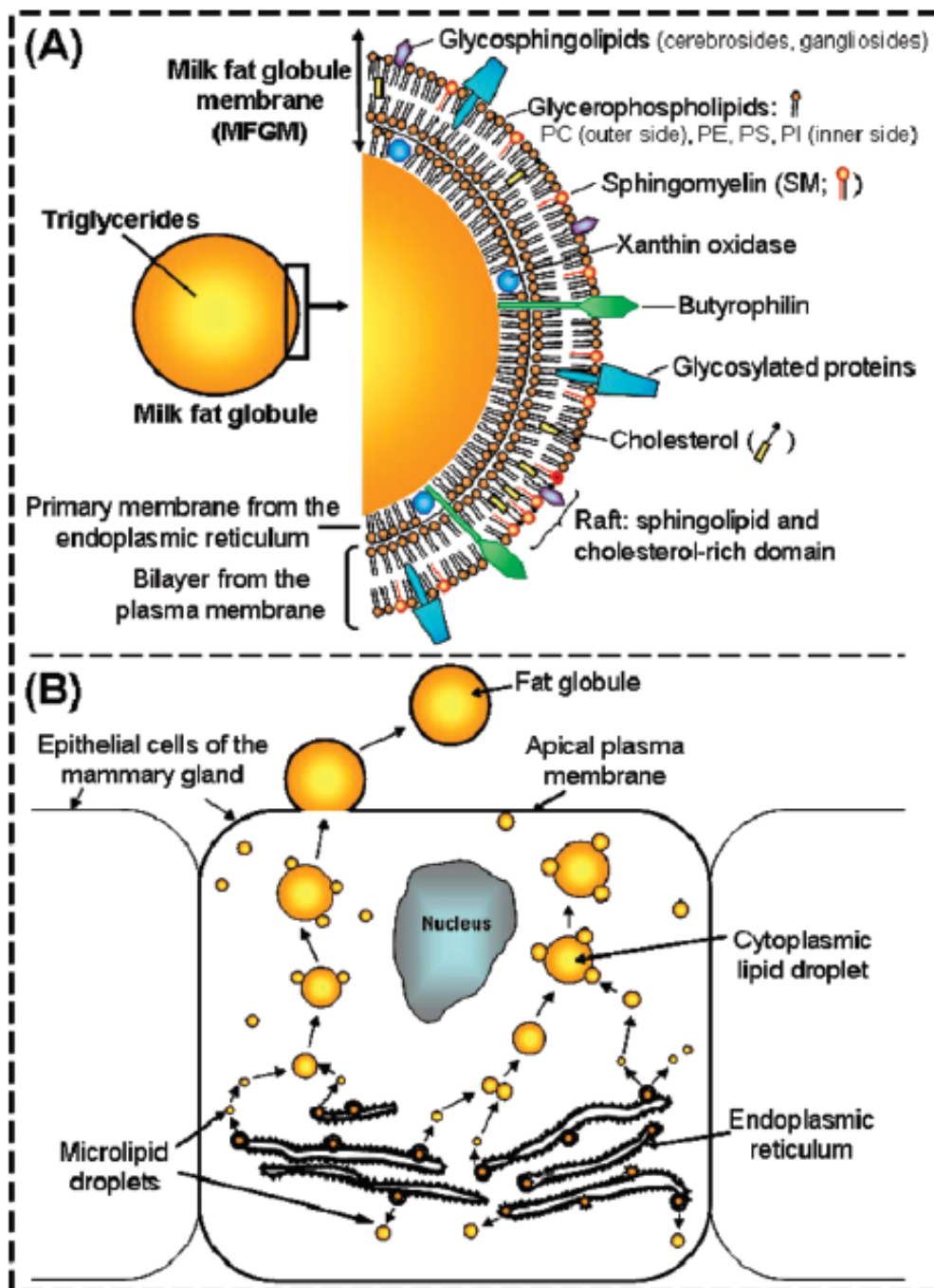


Figure 6 : Schéma de la structure d'un globule gras (A) et mécanismes d'évolution intra cellulaire et excrétion des globules gras dans la lumière de l'épithélium (B). D'après Lopez et al. (2008)

B. Les globules gras du lait protègent les triglycérides de l'action de la lipoprotéine lipase

1. Sécrétion des globules gras

Les TG sont synthétisés dans la membrane du réticulum endoplasmique (**RE**) des cellules épithéliales mammaires (**CEM**). Ils sont ensuite libérés dans le cytoplasme, sous forme de gouttelettes lipidiques, entourées d'une monocouche de phospholipides dérivée de la membrane du RE. La taille des gouttelettes s'agrandit au cours de leur migration vers le pôle apical de la cellule grâce à la synthèse continue de lipides (**Figure 6** ; Ollivier-Bousquet, 2002 ; Heid et Keenan, 2005 ; McManaman et al., 2007). L'excrétion des gouttelettes lipidiques se fait en association avec l'exocytose des vésicules de micelles de caséines. Cela permet l'enveloppement des gouttelettes lipidiques par la membrane des CEM pour former les GG. Les mécanismes impliqués dans la régulation de la sécrétion et l'excrétion de la MG du lait ne sont pas encore complètement élucidés (Couvreur et Hurtaud., 2016) et plusieurs hypothèses explicatives ont été proposées.

Ollivier-Bousquet (2002) et Thiam et al. (2013) ont envisagé une régulation de la taille des GG par la quantité de MG ou par les enzymes de synthèse de la MG, allant dans le sens d'une réduction de la perte membranaire par unité volumique : plus le TB est élevé, plus la taille des GG augmente. Cette hypothèse est cohérente avec la corrélation positive entre le taux butyreux (**TB**) et la taille des GG décrite par Wiking et al. (2006) et Couvreur et Hurtaud (2007) et avec la corrélation positive entre le rapport taux butyreux/taux protéique (**TB/TP**) décrite par Couvreur et Hurtaud (2016). Certaines protéines de la membrane des globules gras (**MFGM**) (butyrophiline, xanthine déshydrogénase, périlipine 2) seraient potentiellement impliquées dans la formation et la maturation des gouttelettes lipidiques (Heid et Keenan, 2005 ; Dewettinck et al., 2008 ; Lu et al., 2016). Une régulation via le turn over de la membrane plasmique ou via la cascade de migration des GG dans le RE, l'appareil de Golgi et la CEM a également été envisagée sans qu'aucune conclusion formelle ne soit possible (Couvreur et Hurtaud, 2016).

2. Caractéristiques structurelles des globules gras

a. La taille des globules gras

Dans le lait de vache laitière (**VL**), le nombre moyen de GG sécrétés est environ de $15 \cdot 10^9$ /mL et leur diamètre varie de 0,2 μm à 15 μm . La répartition de la population de GG en pourcentage du volume de MG est de type log-normale centrée sur 3 μm environ. Le diamètre moyen oscille entre 2 et 4 μm et le diamètre médian entre 3 et 6 μm . Quatre-vingts pour cent des GG ont un diamètre inférieur à 1 μm . Cependant, ces GG représentent moins de 10 % du volume total de la MG (Mulder et Walstra, 1974 ; Couvreur et Hurtaud, 2007).

La taille des GG peut être estimée par le diamètre moyen de la population ou par le mode de la répartition de la population en pourcentage du volume total. L'utilisation du diamètre moyen pondéré sur la surface, $d_{3,2} = \frac{\sum(Ni \times di^3)}{\sum(Ni \times di^2)}$ ou du diamètre pondéré en volume $d_{4,3} = \frac{\sum(Ni \times di^4)}{\sum(Ni \times di^3)}$ est courante dans la littérature (Wiking et al., 2006 ; Couvreur et Hurtaud., 2007 ; Logan et al., 2014). Le $d_{3,2}$ est plus sensible aux variations des GG de petits diamètres alors que le $d_{4,3}$ est plus sensible aux variations des GG de gros diamètres (Couvreur et Hurtaud, 2007).

b. *Composition des globules gras*

Le cœur des GG est constitué par les TG, qui constituent 95 à 97 % de la MG du lait. Ils sont entourés par une membrane tripartite dont la composition est plus hétérogène que son contenu. La MFGM est organisée telle que décrite par Singer et Nicholson (1972) et est composée d'eau (12 %) de phospholipides (28 %), de glycolipides (20 %) et de protéines (40 %) dont des enzymes (Keenan et al., 1970 ; Keenan et al., 1983 ; Keenan et Dylewski, 1995 ; Fong et al., 2007) distribuées de façon hétérogène (Evers et al., 2008 ; Lopez et al., 2010). Les protéines dominantes de la membrane sont l'adipophiline, la butyrophiline, le cluster de différenciation 36, la protéine de liaison des AG, la lactadhérine, les mucines 1 et 15 et la xanthine oxydase (Reinhardt et Lippolis, 2006 ; Fong et Norris, 2009 ; Dickow et al., 2011). Les phospholipides dominants de la membrane sont la phosphatidylcholine (35 % en moyenne), la phosphatidylétnolamine (30 % en moyenne), la sphingomyéline (25 % en moyenne), le phosphatidylinositol (5 % en moyenne) et la phosphatidylsérine (3 % en moyenne) (Figure 6 ; Deeth, 1997 ; Avalli et Contarini, 2005 ; Rombaut et Dewettinck, 2006 ; Lopez et al., 2008 ; Ménard et al., 2010). D'après Lopez et al. (2010 et 2011), les ségrégations latérales de la MFGM principalement composées de SM et de stomatine entourés d'une matrice fluide de glycérophospholipides correspondraient à une formation de domaines spécifiques appelés les rafts lipidiques dont le rôle biologique est encore hypothétique (Lopez et al., 2010 et 2011).

L'évolution de la composition des MFGM après son excrétion par les CEM a été étudiée dans la littérature sans qu'aucun consensus ne s'établisse dans la communauté scientifique. Des pertes de matériel membranaire ont été observées par Henson et al. (1971), Wooding (1971 a et b) et Bauer (1972), lors du séjour des GG dans les alvéoles et dans la citerne mammaire, puis lors de leur excrétion. Même si certains auteurs affirment qu'il s'agit d'artefacts provenant des marquages observés en microscopie électronique (Bauer, 1972 ; Keenan et al., 1983 ; Mather et Keenan, 1998), la membrane est une structure dynamique et ses éventuelles évolutions devraient pouvoir être décrites par les techniques de microscopie plus modernes telles que la microscopie confocale (Evers, 2004 ; Evers et al., 2008 ; Lopez et al., 2010). Il est important d'évaluer la variation de la composition

de la MFGM car elle induit des modifications au niveau de la stabilité et de la fluidité de cette dernière.

La composition de la MFGM serait liée, entre autre, à la taille des GG. Concernant la fraction lipidique de la membrane, les plus petits GG contiendraient plus de lipides polaires et une plus grande proportion de phosphatidylcholine, de sphingomyéline (Lopez et al., 2011 ; Logan et al., 2014) et de phosphatidyletanolamine (Lu et al., 2016) et une moindre proportion de phosphatidylinositol (Lu et al., 2016). Concernant la fraction protéique, Lu et al. (2016), par une approche protéomique, ont montré que 72 protéines avaient des concentrations différentes dans les petits et dans les gros GG. Notamment, les petits GG contenaient moins d'enzyme de synthèse de cholestérol, moins de composant 3 des protéoses peptones 3 (**PP3**) aussi connu sous le nom de glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1 (**GLYCAM1**), et moins de Périlipine 2, qui auraient un rôle dans l'inhibition de la lipolyse (Anderson, 1981 ; Russell et al., 2007).

C. Les cofacteurs de la lipoprotéine lipase

Plusieurs études se sont intéressées à la recherche des cofacteurs de la LPL dans le lait. Anderson (1979) et Sundheim (1988b) affirmaient, après avoir procédé à des mélanges de lait entiers et écrémés, que la plupart des cofacteurs de la LPL se trouvaient dans la partie non grasse du lait. Plusieurs composants pourraient être des activateurs et /ou inhibiteurs de la LPL, de façon directe ou indirecte. D'après Bengtsson et Olivecrona (1980), l'inhibition par excès de produit, par formation de complexe enzyme – AGL était importante, du moins *in vitro*. L'albumine sérique bovine (**BSA**) (Deeth et Fitzgerald, 1976 ; Murphy et al., 1979 ; Bengtsson et Olivecrona 1980), les glycosaminoglycanes du type héparine (Iverius et Ostlund-Linqvist, 1976) et les apolipoprotéines (Castberg et Solberg, 1974 ; Deeth, 2006) ont été identifiés comme de potentiels activateurs de la LPL. La PP3 et dans une moindre mesure le composant 8F des protéoses peptones (**PP8F**) (Anderson et al., 1981 ; Pâquet, 1989), la β -lactoglobuline et la lactoferrine (Bläckberg et al., 1979) ont été identifiés comme de potentiels inhibiteurs de la LPL. Le composant 5 des protéoses peptones (**PP5**) a été, quant à lui, identifié dans certaines études comme activateur de la LPL (Cartier et Chilliard, 1986) et dans d'autres études, comme inhibiteur de la LPL (Anderson et al., 1981). Finalement, il y a très peu de certitudes concernant les cofacteurs de la LPL. Les principaux cofacteurs décrits dans la littérature sont présentés ci-après.

1. L'albumine sérique bovine

La BSA est une protéine du lactosérum : elle représente environ 5 % des protéines du lait (Renner, 1983). La BSA n'est pas synthétisée par la GM et fait partie des protéines qui proviennent directement du système circulant (Wal, 1998). La BSA est un puissant ligand pour les AG : elle

possède au moins sept sites de liaison avec ces derniers. Les AG ont plus d'affinité pour ces sites que pour ceux de la LPL (Bengtsson et Olivecrona, 1980). Plusieurs auteurs ont envisagé une liaison entre la BSA et les AG issus de l'action de la LPL, levant de ce fait, l'inhibition par le produit, en éloignant les AGL de l'interface eau/gras (Bengtsson et Olivecrona 1980 ; Murphy et al., 1979). Si le phénomène se vérifie *in vitro* (Scow et Olivecrona, 1977 ; Bengtsson et Olivecrona, 1980 ; Posner et Desanctis, 1987), Murphy et al. (1979) n'ont montré aucun effet de l'ajout de BSA (4,5 %) dans le lait. Il est à noter cependant le faible nombre d'échantillons (deux) avec lequel ont travaillé ces auteurs.

2. Les fractions protéose peptone du lait

Les protéoses peptones (**PPT**) peuvent être séparées en deux groupes : les polypeptides issus de la protéolyse des caséines β , tels que la PP5, le composant 8S des protéoses peptone (**PP8S**), la PP8F et les glycoprotéines natives du lait comme PP3 encore appelé lactophorine ou Glycam1, issues de la MFGM. La concentration moyenne des PPT dans le lait frais est de 2,28 mg/mL soit un peu moins de 7 % des protéines totales du lait. La concentration de PP5 a été mesurée entre 0,84 mg/mL et 1,0 mg/mL de lait frais selon les auteurs, soit un peu plus de 36 % des PPT et 2,5 % des protéines totales du lait (Andrews, 1979 ; Pierre et Douin, 1984 ; Pâquet, 1989). La concentration de PP3 a été mesurée à 0,3 mg/mL soit 13 % des PPT et moins de 1 % des protéines totales du lait (Park, 2009).

La PP3, composante des MFGM, a été identifiée comme inhibitrice de la LPL. Alors que Shimizu et al. (1982), Bengtsson-Olivecrona et al. (1986), et Olivecrona et Bengtsson-Olivecrona (1987) constataient que des fractions de MFGM inhibaient l'action de la LPL (**Tableau 4 et 5**), Anderson (1981) et Cartier et Chilliard (1986) identifiaient PP3 comme inhibitrice de la LPL (**Figure 7**). Selon Pâquet (1989), la fraction inhibitrice présente sur les membranes serait en fait la PP3.

Le rôle de PP5 est controversé. Anderson (1981) reportait une action inhibitrice de PP5, alors que Chilliard (1986) reportait une action activatrice de PP5 dans des conditions *in vitro* similaires. Quant à PP8F, une seule étude a montré qu'elle exerçait un effet inhibiteur de la LPL (Anderson, 1981).

Tableau 4 : Effet des différentes protéoses peptones sur la lipolyse spontanée du lait ¹

| Traitement | Lipolyse du lait (mEq / L) |
|------------|----------------------------|
| Témoin | 0,192 |
| + PP3 | 0,072 |
| + PP5 | 0,126 |
| + PP8f | 0,171 |

¹ D'après Anderson (1981)

Tableau 5 : Inhibition de la lipolyse (mEq/L) par des protéines membranaires (PM) dans le lait et dans les suspensions de matière grasse laitière (MGL)¹

| N° Lait | Lait entier | Suspension de MGL | Suspension de MGL +PM |
|---------|-------------|-------------------|-----------------------|
| 1 | 0,88 | 0,40 | 0,11 |
| 2 | 1,39 | 1,45 | 1,17 |
| 3 | 0,81 | 1,04 | 0,65 |
| 4 | 1,36 | 0,82 | 0,14 |
| 5 | 1,87 | 1,25 | 1,30 |
| 6 | 1,82 | 1,21 | 1,12 |
| 7 | 0,99 | 1,19 | 1,04 |
| 8 | 1,52 | 1,01 | 0,42 |

¹ D'après Bengtsson et Olivecrona (1987)

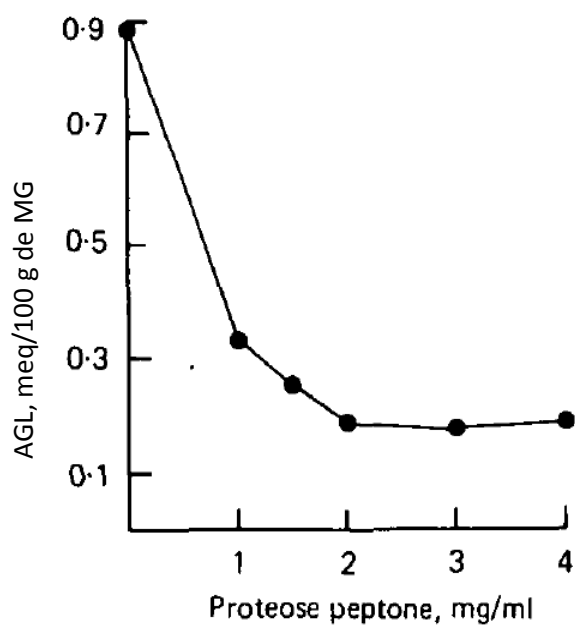


Figure 7 : Evolution de la lipolyse spontanée dans le lait en fonction de la quantité de protéoses peptones ajoutée dans le milieu. D'après Anderson (1981)

3. Les apolipoprotéines

Les apolipoprotéines sont les protéines constitutives des lipoprotéines. Elles se lient à des lipides pour former des complexes de protéines et de lipides qui véhiculent les lipides dans le système circulant. De façon artificielle, exploratoire et théorique, plusieurs groupes de chercheurs ont mis en contact la LPL du lait avec du sérum sanguin (Anderson 1982 ; Jellema et al., 1986 ; Needs et al., 1986 ; Cartier et Chilliard, 1990 ; Bachman et Wilcox, 1990) ou des extraits de plasma sanguin contenant des apolipoprotéines C2 ou d'autres lipoprotéines, connues pour activer la LPL du tissu adipeux ou du foie (Bachman et Wilcox, 1990 ; Anderson et Needs, 1983 ; Bengtsson et Olivecrona 1982 ; Sundheim et al., 1983). La LPL est activée par ces composants. A titre d'exemple, Bengtsson et Olivecrona (1980), ont montré que la quantité d'AGL produits était multipliée par cinq en présence de 5 µg/mL d'apolipoprotéines C2, T1 ou T2 et d'un ligand pour les AG. La présence de ces apolipoprotéines a été démontrée dans le lait (Castberg et Solberg, 1974 ; Anderson, 1979). Elles pourraient jouer le rôle d'activateur de LPL dans le lait, même si ce rôle n'est pas établi de façon indiscutable (Deeth, 2006).

4. Les glycoaminoglycane du type héparine.

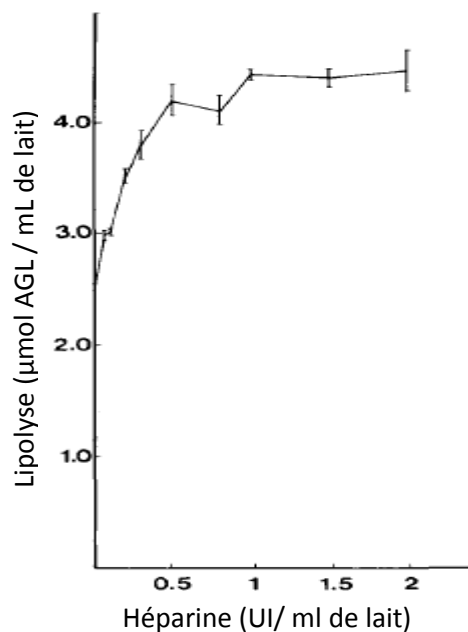


Figure 8 : Effet de l'addition d'héparine sur la lipolyse spontanée après 24 h de stockage à 4°C.
D'après Sundheim et Bengtsson-Olivecrona (1987)

Les glycoaminoglycanes sont des macromolécules glucidiques formant d'importants composants des matrices extracellulaires. Il s'agit en effet de chaînes de polymères non ramifiées, composées de la répétition d'un diholoside de base contenant toujours une hexosamine (glucosamine ou galactosamine) et un autre ose (acide glucuronique, acide iduronique, galactose).

Il a été montré que l'ajout d'héparine exogène augmentait la teneur en AGL et l'AcL *in vitro* (Figure 8 ; Iverius et Ostlund-Linqvist, 1976 ; Chilliard, 1982 ; Sundheim et Olivecrona, 1987c ; Heuchel et Chilliard, 1988 ; Olivecrona et al., 2003). Dans le lait, Ahrné et Björck (1985) ont montré que l'ajout d'héparine augmentait l'AcL au niveau de la fraction grasse du lait et les AGL produits. La présence de glycoaminoglycanes endogènes, notamment d'héparane sulfate, au niveau de la MFGM du lait a été mise en évidence par Olivecrona et Lindahl (1969) et Shimizu et al. (1981). Ces composants pourraient jouer le rôle d'activateur de LPL, mais d'autres études sont nécessaires pour préciser leur rôle au sein de la matrice lait.

III. Fonctionnement du système lipolytique

Le refroidissement du lait est un prérequis à l'activation du SLi. En effet, Bengtsson et Olivecrona (1982) ont montré qu'il n'y avait pas de LS dans un lait prélevé manuellement et maintenu à 37°C. La réfrigération permet une réorganisation des composants du lait, propice à la LS car elle permet de mettre en contact l'enzyme LPL et son substrat, les TG (Cartier et Chilliard, 1990).

A. Le refroidissement entraîne une réorganisation des composants du lait qui favorise la lipolyse spontanée

1. L'évolution de la structure des globules gras suite au refroidissement

Le refroidissement du lait entraîne une cristallisation fractionnée de la MG qui se manifeste par une rétractation des GG et une altération de leur membrane (Karray et al., 2006 ; Dickow et al., 2011). Il se produit une exsudation de TG hors du GG, accompagnée d'une agglomération et d'une perte d'intégrité des GG (Dickow et al., 2011) entraînant des modifications de la taille des GG par coalescence. L'évaluation de l'intégrité des GG peut donc se faire par des mesures de distribution de taille de GG (Evers, 2004). Le refroidissement du lait est également marqué par des phénomènes d'absorption / désorption des composants de la MFGM (Thompson et al., 1961 ; Payens et al., 1965 ; Anderson et al., 1972 ; Chen et Tobias, 1972 ; Badings et Van der Pol, 1973 ; Sundheim et Bengtsson-Olivecrona, 1987c). Plusieurs auteurs ont rapporté un changement de morphologie et d'organisation des domaines lipidiques (Nguyen et al., 2016) accompagné d'une perte des phospholipides de la MFGM. Cette perte est évaluée entre 10 et 18 % selon les auteurs (Wasltra et Jenness, 1984 ; Baumrucker et Keenan, 1973 ; Patton et al., 1980 ; Evers, 2004), mais reste néanmoins très variable

selon les individus (Patton et al., 1980). Dickow et al. (2011), par une approche de protéomique, ont montré que 29 protéines avaient changé leur association à la MFGM suite au refroidissement. Ils ont ainsi pu montrer une augmentation de l'association de la lactoferrine, de l'adipophiline et de la lactadhérine et une diminution de l'association de la caséine β , de la fatty acid binding protein et de la protéine de choc thermique 71 avec la MFGM. Bhavadasan et Ganculi (1980) ont montré une désorption de la xanthine oxydase sous l'effet du refroidissement. Le réarrangement des composants de la MFGM permet à la LPL d'avoir accès aux TG (Sundheim et Bengtsson-Olivecrona, 1987c). L'évolution de la structure des GG suite à un refroidissement est variable selon la race de VL (Dickow et al., 2011). En effet, il n'a pas été mis en évidence de changement de répartition de l'ADPH et de la lactadhérine chez la Jersiaise alors que ce changement existe chez la Holstein. De même, l'augmentation de l'association de la lactoferrine avec la MFGM est plus importante chez la Jersiaise que chez la Holstein (+285 % vs +50 à 100 %).

2. La migration de la LPL à la surface des GG

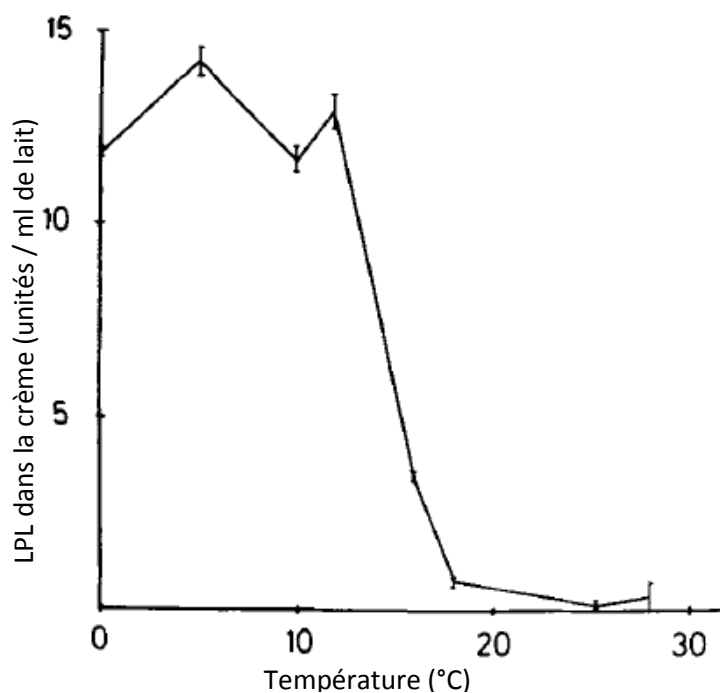


Figure 9 : Concentration de lipoprotéine lipase présente au niveau de la fraction grasse du lait après 3 h de stockage à différentes températures. D'après Sundheim et Bengtsson et Olivecrona (1987c)

Le refroidissement entraîne également une migration de la LPL des micelles de caséines vers la surface des GG (Figure 9 ; Anderson et al., 1972 ; Hohe et al., 1985 ; Sundheim et Bengtsson-

Olivecrona, 1987c ; Wang et Randolph, 1978 ; Dickow et al., 2011). Les déterminants de cette migration sont toutefois peu connus. La réduction de la taille des micelles de caséines et leur plus grande dispersion dans le lait ainsi que leur solubilisation (essentiellement la caséine β) dans la partie non grasse du lait pourraient, en partie, expliquer ces changements d'interaction entre composants du lait (Davies et Law, 1983 ; Dickow et al., 2011). La réorganisation de la membrane des GG précédemment décrite pourrait modifier la liaison entre LPL et GG lors de la migration en surface (Dickow et al., 2011).

3. Le rôle des activateurs et des inhibiteurs de LPL

Le comportement des activateurs et inhibiteurs de la LPL, connus ou suspectés (BSA, fraction protéose peptone, apolipoprotéines, glycosaminoglycanes) après refroidissement du lait ne sont pas connus.

B. Mécanisme biochimique du système lipolytique

Chez la VL, il n'y aurait pas de relation entre l'AcL dans le lait total et la quantité d'AGL produits ($R^2 < 0,15$) (Bachman et Wilcox, 1990 ; Cartier, 1987 ; Olivecrona, 1980 ; Deeth et Fitzgerald, 1976). La production d'AGL dépend de l'AcL liée aux GG (Fleming, 1980 ; Sundheim, 1988a ; Arhné et Björck, 1985 ; Cartier et Chilliard, 1990). Ces auteurs ont rapporté un coefficient de corrélation de $R^2=0,65$ entre la quantité d'AGL produits et l'AcL liée à la MG. Néanmoins, d'après Arhné et Björck (1985), l'AcL serait corrélée aux AGL produits dans les laits du matin, voire même dans le lait total ($R^2 = 0,4$; Ferlay et al., 2006). La corrélation entre la quantité d'AGL et l'AcL peut également dépendre du moment de la mesure ; une mesure au niveau du plateau enzymatique, lorsque l'enzyme est « saturée » par le substrat, sera indépendante de la quantité et de l'efficacité des enzymes présentes dans le milieu (Cartier et Chilliard, 1990). La faible corrélation ($R^2=0,24$) entre l'AcL dans le lait total et l'AcL liée aux GG suggère que l'AcL n'est pas limitante et que le lien avec la MG dépend des caractéristiques et de l'intégrité des GG (Cartier et Chilliard, 1990). Cependant peu de recherches ont porté sur les interactions entre la LPL et le GG (Dickow et al., 2011). Il est néanmoins connu que la LPL se lie aux glycosaminoglycanes du type héparane sulfate présents à la surface des GG (Shimizu et al., 1981 ; Sehayek et al., 1995 ; Dickow et al., 2011). La quantité de ligands (not. Glycosaminoglycanes) présents à la surface des MFGM pourrait expliquer la proportion de LPL présente en surface des GG et finalement la susceptibilité à la lipolyse. Le mode d'action des autres activateurs et inhibiteurs est peu connu. Cependant, il a été observé, lors d'essais *in vitro*, que la PP3 n'avait pas d'interaction avec la LPL, ni avec les activateurs de la LPL. PP3 aurait donc une action

inhibitrice via la protection du substrat grâce à ses propriétés hydrophobes très marquées (Wagh et Olivecrona, 1978 ; Anderson, 1981 ; Cartier et Chilliard, 1986 ; Pâquet, 1989 ; Girardet et al., 1993).

Finalement, d'après Cartier et Chilliard (1990) et Sundheim et Olivecrona (1987b), les trois facteurs biochimiques déterminants de la susceptibilité d'un lait à la LS seraient :

- L'AcL à la surface des GG
- L'intégrité et les caractéristiques de la MFGM
- L'équilibre entre facteurs activateurs et facteurs inhibiteurs.

Chacun de ces déterminants peut être modulé par des facteurs intrinsèques à l'animal ou par des facteurs environnementaux (facteurs d'élevage).

IV. La variabilité du système lipolytique est modulée par les facteurs d'élevage

Dans cette partie, nous allons envisager successivement les facteurs de variations intrinsèques et extrinsèques à l'animal qui modulent les variations de chaque composant du SLi : la LPL, les GG, les cofacteurs de la LPL.

LPL. La régulation de l'AcL peut avoir lieu à plusieurs niveaux : transcriptionnel, post transcriptionnel, traductionnel et post traductionnel. Chez la VL, deux transcrits de la LPL ont été mis en évidence dans la GM (Beswick et Kennelly, 2000) : le transcrit 3.4 kb et le transcrit 3.6 kb. Contrairement à la chèvre et à la souris (Jensen et al., 1994 ; Bernard et al., 2009 a et b), il existe une régulation transcriptionnelle de la LPL dans le tissu mammaire chez la VL. Dans les tissus musculaires et adipeux, Hocquette et al. (1998) ont mis en évidence l'existence d'une corrélation positive entre l'AcL et la quantité d'ARN messagers. Cependant, à notre connaissance, il n'existe pas d'étude reliant l'AcL et la quantité de transcrits dans la GM. Chez la VL, les régulations traductionnelles et post traductionnelles de la LPL n'ont pas été étudiées.

GG. La régulation de la taille et de la composition des GG a fait l'objet de plusieurs revues et même si beaucoup de mécanismes ne sont toujours pas compris, c'est le composant du SLi le plus étudié dans la littérature (McPherson et Kitchen, 1983 ; Couvreur et Hurtaud, 2007 ; Couvreur et Hurtaud, 2016 ; Martini et al., 2016).

Cofacteurs. La régulation des cofacteurs de la LPL a été jusqu'alors peu étudiée. Dans la littérature nous n'avons trouvé qu'une seule étude sur une longue période avec un nombre important d'animaux, s'intéressant aux variations des PPT dans le lait (Schaar, 1985). Les variations des autres activateurs et inhibiteurs potentiels de la LPL selon les facteurs d'élevage n'ont pas été envisagées.

A. Facteurs de variation du système lipolytique intrinsèques à l'animal

1. Individus et race

a. *Lipoprotéine lipase*

Chez la VL, peu d'études se sont intéressées aux variations de l'AcL dans le lait. Cependant ces études montrent une forte variabilité individuelle. (Pomiès et al., 2007 ; Ferlay et al., 2006).

L'étude de Ferlay et al. (2006) met également en évidence un effet race, en interaction avec un effet du régime, sur l'AcL présente du lait de vache. Dans cette étude, les vaches Tarentaise présentaient une plus faible AcL que les vaches Montbéliarde et les régimes à base de fourrages conservés favorisaient l'expression des différences entre les races.

b. *Globule gras*

La taille des GG et leur composition varient significativement d'un individu à l'autre (Walstra et Jenness, 1984 ; Evers, 2004 ; Couvreur et al., 2007 ; Logan et al., 2014). Au sein d'un même troupeau, Couvreur et al. (2007) et Logan et al. (2014) ont constaté des variations de taille moyenne de GG entre 2,5 et 5,7 μm , même si la plupart des VL ont des tailles moyennes de GG comprises entre 3 et 4 μm .

Un effet de la race sur la taille et la composition des GG a également pu être mis en évidence. Les races de VL dont le TB est élevé, telles que la Normande ou la Jersiaise, ont de plus gros GG comparées à des vaches de race productive telles que la Holstein, même si les différences restent relativement faibles ($<1 \mu\text{m}$) (Mulder et Walstra, 1974 ; Martini et al., 2006b ; Couvreur et Hurtaud, 2007 ; Graves et al., 2007 ; Logan et al., 2014). Cela est en accord avec Carroll et al. (2006) et Couvreur et Hurtaud (2016) qui identifient une relation positive entre le TB du lait, le rapport TB/TP et la taille des GG (**Figure 10**).

Une proportion de SM plus importante a été mise en évidence dans la MFGM chez les VL Holstein (Graves et al., 2007). La proportion de SM est supérieure dans les plus petits GG (Lopez et al., 2011). L'effet de la race sur les autres phospholipides et protéines membranaires n'a pas encore été étudié.

c. Cofacteurs de lipoprotéine lipase

Sur 20 individus d'une même race (Frisonne), à même stade de lactation, les PPT représentent entre 2,8 et 4,2% de la fraction protéique totale (Pâquet, 1989). La race Jersiaise a un taux plus important de PPT que la race Frisonne. Ce taux est corrélé à la teneur en caséines totales des laits, plus élevée chez la race Jersiaise (Schaar, 1985).

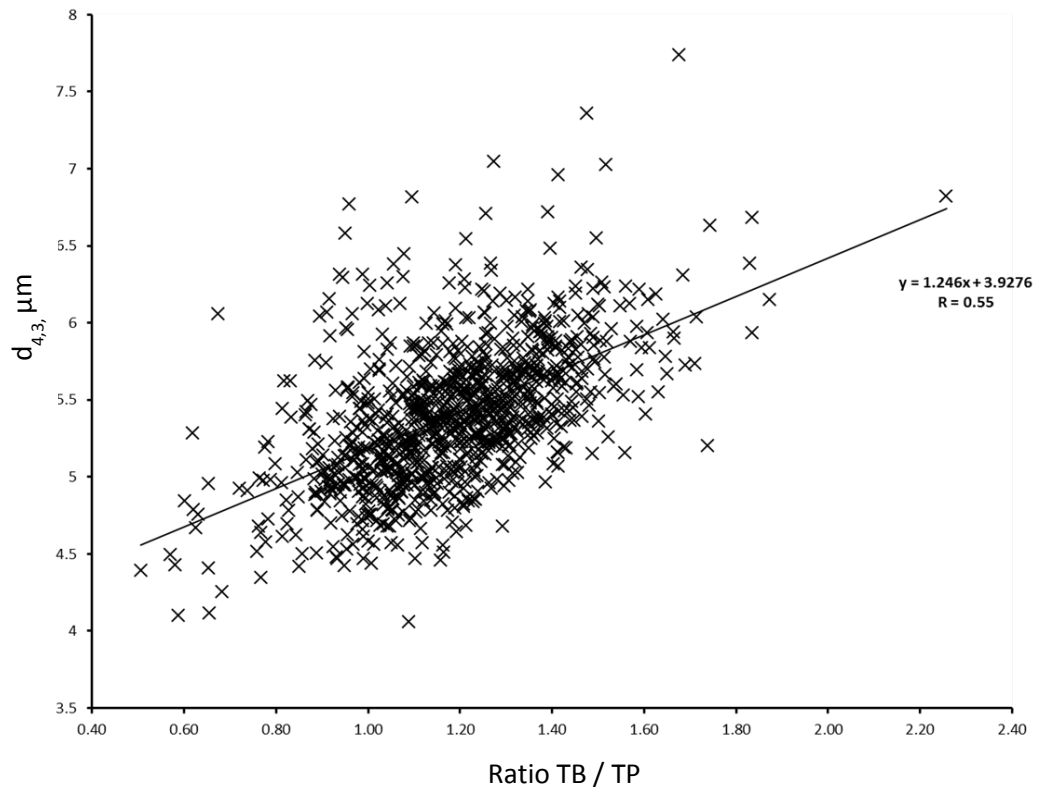


Figure 10 : Relation entre la taille des globules gras et le rapport TB/TP. D'après Couvreur et Hurtaud (2016).

2. Génétique

a. Lipoprotéine lipase

Chez la VL, le polymorphisme du gène *DGAT-1* au locus K232A serait un déterminant de la régulation transcriptionnelle de la LPL. En effet, Faucon (2009) a montré que le génotype AA de *DGAT-1* était associé à des taux de transcrits du gène *LPL* supérieurs aux autres génotypes. Il n'y a pas eu de mesures de l'ACL dans cet essai. La répercussion de la régulation transcriptomique sur l'ACL n'est donc pas connue. L'impact d'autres gènes polymorphiques sur la régulation de la LPL du tissu mammaire n'est pas connu chez la VL. L'existence d'un polymorphisme du gène *LPL* a été démontré

chez la chèvre laitière (Badaoui et al., 2007) et chez les bovins allaitants Quinchuan et Xiangxi (Wang et al., 2012 ; Gui et al., 2016) mais n'a pas été étudié chez les VL.

b. Globules gras

Le génotype KK du gène *DGAT-1* est associé à des GG plus gros comparé au génotype AA, en cohérence avec un TB plus élevé pour le génotype KK (Faucon, 2009 ; Argov-Argaman et al., 2013 ; Couvreur et Hurtaud., 2016). Le génotype KA n'a pas été considéré dans cette étude. La MFGM associée au génotype KK contiendrait plus de sphingomyéline et moins de PI et de PS (Argov-argaman et al., 2013).

Le génotype BB du gène *CSN3* a également été associé à de plus gros GG comparé au génotype AB dans une étude de Martini et al. (2006a) sur des vaches Holstein Italiennes.

c. Cofacteurs de la lipoprotéine lipase

Schaar (1985) a mis en évidence un effet du polymorphisme du gène *BLG* codant pour la β Lactoglobuline sur la quantité de PPT dans le lait. Le génotype BB est associé à un niveau de PPT plus important. Le gène *BLG* est impliqué dans la synthèse de β Lactoglobuline mais également dans la synthèse des caséines (McLean et al., 1984). La quantité de PPT dans le lait initial étant expliquée à 38 % par l'activité de la plasmine, via l'hydrolyse des β caséines, il est possible que l'influence du génotype BB de *BLG* sur le taux de PPT se fasse via la régulation positive de la teneur en caséines (Schaar, 1985). Aucun effet des génotypes des κ caséines, β caséines et α 1 caséines sur la quantité de PPT n'a été mis en évidence dans cette même étude.

3. Stade physiologique

a. Lipoprotéine lipase

Les effets du stade physiologique sur la LPL sont contradictoires dans la littérature. En effet, Maass (1909), Palmer (1920), Leitch (1932), Bailey (1933) et Hileman et Courtney (1935) contrairement à Wüthrich et al. (1963) et Murphy et al. (1979), relevaient des AcL plus importantes en début de lactation comparativement au milieu et à la fin de lactation.

b. Globules gras

La plupart des études montrent une diminution de la taille des GG au cours de la lactation. La taille des GG atteindrait son minimum en milieu de lactation (25 / 30 semaines) selon Mulder et Walstra (1974), Ye et al. (2002) et Altenhofer et al. (2015) (**Tableau 6**). Selon Ingr et al. (1972), la taille des GG continuerait à diminuer jusqu'au tarissement. La composition de la MFGM évolue également au cours de la lactation. Bitman et Wood (1990) et Mesilaty-Stahy et Argov-Argaman

(2014) ont observé une réduction de la proportion en lipides polaires et du cholestérol. Kinsella et Houghton (1975) ont montré une augmentation de PI. Kinsella et al. (1970) ont montré une diminution de la quantité de phosphatidylcholine et de sphingomyéline en fin de lactation alors que Graves et al. (2007) ont observé une augmentation de la SM à cette même période. Des modifications au niveau des protéines ont également été relevées par plusieurs auteurs. Selon Mondy et Keenan (1993), Ye et al. (2002) et Evers (2004) les concentrations en butyrophiline et xanthine-oxydase étaient plus élevées en début de lactation et en fin de lactation.

Tableau 6 : Taille des globules gras à différents stades de lactation ¹

| | Début Lactation ² | Milieu Lactation ² | Fin Lactation ² |
|----------------------------|------------------------------|-------------------------------|----------------------------|
| D₅₀, μm | 4,80 ^a | 3,78 ^b | 3,83 ^b |
| D_{3,2}, μm | 5,67 ^a | 4,49 ^b | 4,40 ^b |
| D_{4,3}, μm | 6,60 ^a | 5,21 ^b | 5,09 ^b |

¹ D'après Altenhofer et al. (2015)

² Début de lactation = 0 à 100 jours ; Milieu de lactation = 101 à 200 jours ; Fin de lactation = 201 à 300 jours.

c. Cofacteurs de la lipoprotéine lipase

La fraction PPT du lait augmente à partir du milieu de lactation (Barry et Donnelly, 1981 ; Hagrass et al., 1983 ; Andrews, 1983 ; Schaar, 1985). Cette évolution serait due à l'augmentation de l'activité plasminique au cours de la lactation (Schaar, 1985).

4. Parité

D'après Couvreur et Hurtaud (2007), il n'y a pas d'effet de la parité sur la taille des GG. Nous n'avons pas trouvé d'étude reliant la composition de MFGM avec la parité.

B. Facteurs de variations du système lipolytique extrinsèques à l'animal

1. Moment de la traite

a. Lipoprotéine lipase

Murphy et al. (1979) et Sundheim (1988a) ont montré que l'AcL dans le lait total était plus importante le soir alors que Arhne et Björck (1985) n'avaient pas observé de différence selon le moment de la traite. Ils avaient cependant observé que la fraction de LPL liée aux GG était plus importante dans les laits du soir que dans les laits du matin. L'AcL est plus importante la nuit dans la GM chez le rat et chez l'humain et dans le tissu adipeux (Shand, 1989 ; Bergö et al., 1996 ; Arasaradnam et al., 2002)

b. Globules gras

Murphy et al. (1979) avaient évalué la taille des GG dans les laits du matin et du soir et n'avaient pas trouvé de différence significative même si les GG présents dans les laits du matin étaient numériquement plus petits (-0.26 μm).

Chez l'humain, des variations circadiennes de composition des phospholipides membranaires ont été observées par Ryf et Arnold (2015). Ces variations pourraient entraîner des modifications de comportement membranaire.

2. Fréquence de traite

a. Lipoprotéine lipase

Pomiès et al. (2007) et Rémond et Pomiès (2005) ont décrit une diminution de l'AcL de 27 % consécutivement à la réduction de la fréquence de traite (monotraite vs bitraite). Boutinaud et al. (2013) et Littlejohn et al. (2010) ont montré une diminution du nombre de transcrits pour le gène codant pour la LPL également lors de la réduction de la fréquence de traite. L'AcL pourrait donc être régulée négativement par la diminution du nombre de transcrits lors de la réduction de la fréquence de traite. Ceci n'excluant pas la possibilité de régulations post transcriptionnelles de la LPL. Contrairement à ce qui est observé dans le cadre d'une réduction de la fréquence de traite, aucune modification du taux de transcrits du gène *LPL* n'a été observée consécutivement à l'augmentation de la fréquence de traite (Shields et al., 2011). Cependant, cette absence de variation du taux de transcrits pourrait être due à la méthode de quantification des ARNm utilisée par Shields et al. (2011) (utilisation des CEM purifiées). En effet, Boutinaud et al. (2013) ont montré que des variations des taux de transcrits LPL identifiées par biopsies mammaires n'étaient pas mises en évidence dans le cas de mesure du taux de transcrits dans les CEM purifiées.

b. Globules gras

Dutreuil et al. (2016) n'ont pas montré de variations de la taille des GG consécutivement au passage à la monotraite. Wiking et al. (2006) ont observé une augmentation de la taille des GG en augmentant la fréquence de traite (4 traites par jour).

Il n'y a pas d'information disponible dans la littérature concernant l'évolution de la composition de la MFGM en relation avec la variation de fréquence de traite.

3. Alimentation

a. *Lipoprotéine lipase*

A notre connaissance, une seule étude a porté sur l'impact des fourrages et du rapport fourrage/concentrés sur les variations d'AcL dans le lait (Ferlay et al., 2006). Plusieurs régimes à base de foin (foin de montagne, raygrass et dactyle), d'ensilage de maïs et de foin de dactyle avec un pourcentage élevé de concentré (65 % MSI) ont été comparés. Aucune différence d'AcL n'a été observée entre ces régimes.

Beaucoup d'études reliant l'alimentation et le nombre de transcrits LPL ont été menées dans le cadre de la compréhension des mécanismes de la « milk fat depression » consécutive à l'introduction de suppléments lipidiques dans l'alimentation. Dans ces études, les VL ont reçu de l'huile de poisson (Ahnadi et al., 2002 ; Harvatine et Bauman, 2006), de l'huile de tournesol associée à un régime riche en concentré (Peterson et al., 2003) et de l'huile de soja (Harvatine et Bauman, 2006). La supplémentation lipidique a induit une diminution du taux de transcrits de la LPL (**Tableau 7**). De la même façon, une supplémentation en lipides protégés a provoqué une diminution de l'AcL (Chilliard et al., 2003). Des résultats semblables ont été retrouvés chez la brebis (Hussein et al., 2013). Chez la chèvre, la supplémentation lipidique n'a entraîné aucune modification du nombre de transcrits LPL, alors que l'AcL a diminué significativement (Bernard et al., 2005 a et b ; Bernard et al., 2009 a et b).

Tableau 7 : Evolution du taux de transcrits de la lipoprotéine lipase dans la glande mammaire de vaches nourries avec des suppléments lipidiques

| | Traitement | Δ ARNm LPL |
|----------------------------------|--|------------|
| Ahnadi et al., 2002 | Huile de poisson non protégée (3,7 % MSI) | - 60 % |
| Peterson et al., 2003 | Régime pauvre en fibres, riche en concentrés, huile de tournesol (1% MSI) | - 25 % |
| Harvatine et Bauman, 2006 | Perfusion de CLA | - 20 % |
| Harvatine et Bauman, 2006 | Régime pauvre en fibres, huile de poisson (1,5 % MSI), huile de soja(3% MSI) | - 60 % |

MSI = Matière sèche ingérée ; CLA = Acide linoléique conjugué ;

b. *Globules gras*

L'herbe, quelle que soit sa forme (pâturage, herbe conservée) semble induire une diminution de la taille des GG (-0.5 µm) (Couvreur et Hurtaud, 2007 ; Hurtaud et al., 2010 ; Lopez et al., 2014). D'après Couvreur et al. (2006), 30 % d'herbe dans la ration suffiraient pour que la diminution de la taille des GG soit maximale (**Figure 11**). En ce qui concerne la composition de la MFGM, Lopez et al.

(2014) ont montré une plus grande proportion de lipides polaires et de SM lorsque les VL sont nourries à l'herbe.

L'impact de la supplémentation lipidique dans la ration sur la taille des GG semble dépendre de la nature du supplément lipidique, de la dose utilisée et son impact sur la digestion ruminale. En effet, Lopez et al. (2008) ont montré une diminution de la taille des GG lors d'une incorporation de 3,4 kg de lin extrudé dans la ration, alors que Hurtaud et al. (2010), n'ont observé aucune évolution de la taille des GG après une incorporation de 600 g de lin extrudé dans la ration.

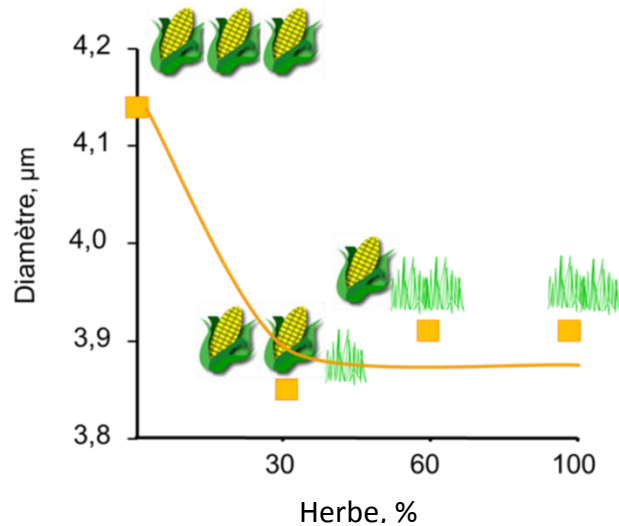


Figure 11 : Taille des globules gras en fonction de la part d'herbe dans la ration. D'après Couvreur et al. (2006)

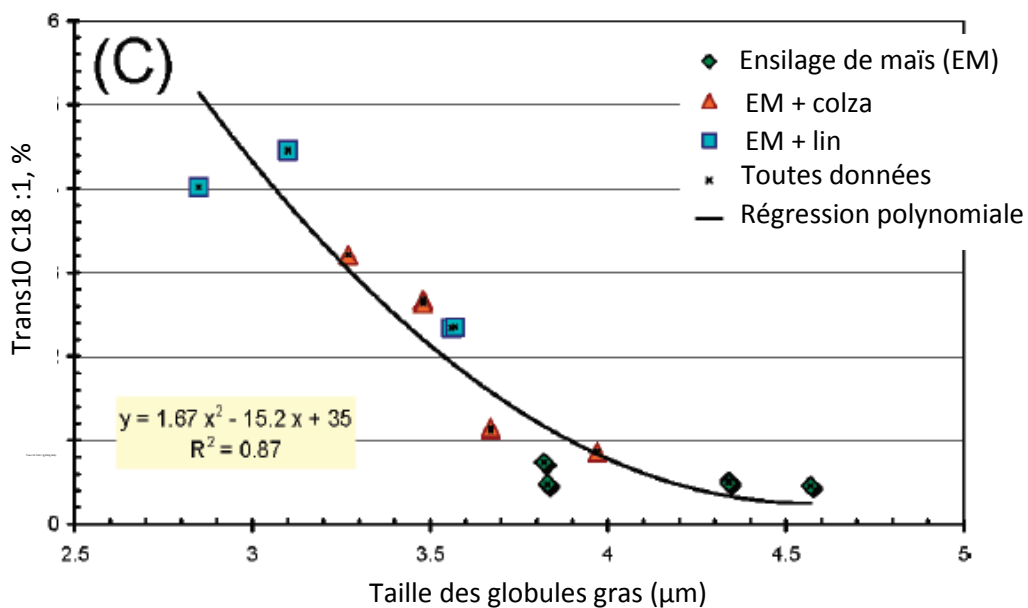


Figure 12 : Relation entre la taille des GG et le *trans 10 C18 :1*. D'après Briard et al. (2003)

D'après Avramis et al. (2003), une supplémentation en algues marines induirait une diminution de la taille des GG. Une quantité importante de lipides dans la ration des VL peut entraîner des perturbations ruminales et des déviations fermentaires conduisant à une modification du profil en AG des laits avec la formation d'AG intermédiaires de biohydrogénation tels que le *trans*10 C18:1, le *trans*11 C18 :1 et le *cis9trans*11 C18 :2. Briard-Bion et al. (2008) ont montré que la taille des GG était corrélée négativement au *trans*10 C18:1 dans le cadre d'une « milk fat depression » (Figure 12). En ce qui concerne la composition de la MFGM, Lopez et al. (2008) ont montré une augmentation de la teneur en phospholipides (+18 %) et en SM (+30 %) dans le cadre d'une supplémentation en lin extrudé. Ceci serait en lien avec la présence de plus petits GG (Lopez et al., 2011 ; Logan et al., 2014 ; Lu et al., 2016).

Dans le cas d'un régime riche en concentré (65 % MSI) avec une ration à base de foin de trèfle et d'avoine et d'ensilage de maïs, Argov-Argaman et al. (2014) ont montré une tendance à la diminution de la taille des GG (- 0.2 µm). Cette réduction de la taille des GG était associée à un changement de composition de la MFGM avec plus de lipides polaires (+ 34 %) et plus de cholestérol (+ 200 %).

Kinsella et Houghton (1975) ont montré que des régimes pauvres en fibres étaient associés à une augmentation de phosphatidyletanolamine et une diminution de phosphatidylcholine et de sphingomyéline dans la MFGM.

Aucun changement au niveau de la taille des GG n'a été mis en évidence lors d'une restriction alimentaire que ce soit dans le cadre de rations à base d'ensilage de maïs ou d'herbe conservée (Couvreur et al., 2004 ; Graves et al., 2007). Graves et al. (2007) n'ont pas montré de variation de la quantité de sphingomyéline dans le cas de restriction alimentaire. Récemment, Lu et al. (2013) ont mis en évidence des variations de la composition membranaire en fonction du bilan énergétique des VL : les bilans énergétiques positifs étaient associés à des niveaux de stomatine, de cholestérol et de glycoprotéines plus élevés. Ces composants font partie des rafts lipidiques identifiés par Lopez et al. (2010) et seraient associés, selon ces auteurs à une meilleure intégrité membranaire.

4. Saison

a. *Lipoprotéine lipase*

D'après Csiszar (1934), l'AcL du lait serait plus importante en hiver qu'en été. Des variations semblables ont été observées chez l'humain avec une AcL plus importante l'hiver que l'été dans le tissu adipeux et dans le tissu musculaire (Donahoo et al., 2000).

b. Globules gras

Briard et al. (2003) ont observé des GG plus petits au printemps comparé à l'hiver. Cependant, il n'y a pas d'information sur l'alimentation des VL et la diminution des GG observée à cette saison peut être due, dans nos régions, à la mise à l'herbe des VL (Hurtaud et al., 2002). Concernant la composition de la MFGM, Graves et al. (2007) ont constaté des teneurs plus élevées de sphingomyéline durant l'été. L'effet de la saison sur la taille des GG et la composition de la MFGM a été peu étudié et, dans les études précitées, il n'est pas possible de dissocier l'effet de la saison (variation de température, de photopériode) de l'effet de l'alimentation ou du stade de lactation.

V. La variabilité de la lipolyse est modulée par les facteurs d'élevage

A. Facteurs de variation de la lipolyse spontanée intrinsèques à l'animal

1. Individus et race

Heuchel et Chilliard (1988) ont identifié un effet individu important : dans leur essai, 30 à 40 % de la LS étaient expliqués par l'individu et ce résultat était répétable d'une lactation à l'autre.

Plusieurs études se sont intéressées à l'impact de la race sur le niveau de LS (**Tableau 8**). Chilliard (1982) et Chazal et al. (1987) n'ont pas observé de différences entre les races Holstein et Montbéliarde. Bachman et al. (1988) ont montré que les vaches Jersiaise étaient moins susceptibles à la LS que les vaches Holstein. Plus récemment, Ferlay et al. (2006) ont montré que les VL Tarentaise étaient moins susceptibles à la LS que les VL Montbéliarde. Cependant, les mécanismes explicatifs de l'effet de la race sont peu décrits et contradictoires dans la littérature. Pour Ferlay et al. (2006), la plus faible susceptibilité de la race Tarentaise à la LS serait liée à la plus grande richesse de son lait en AGPI. A l'opposé, Hurtaud et al. (2010) ont observé une corrélation positive entre LS et teneur en AGPI lors d'une supplémentation en lin extrudé. Enfin, des variations de susceptibilité à la LS semblent perceptibles entre différentes populations d'une même race. Jurczak (1995) a constaté une hiérarchisation de la susceptibilité à la LS au sein de la race Holstein avec une plus forte susceptibilité des Holstein Canadienne et Polonaise comparées aux Holstein Hollandaise, les Holstein Américaines et Néozélandaises ayant des résultats intermédiaires.

2. Génétique

Chez la VL, la relation entre les variants génétiques et la LS n'a pas encore été étudiée. Cependant, des effets individuels forts et répétables sur plusieurs lactations, ont été mis en évidence (Heuchel et Chilliard, 1988). Chez la chèvre, des effets génétiques ont été mis en évidence. En effet, le polymorphisme du gène *CSN1S1* codant pour la caséine α S1 influence les niveaux de LS : des

niveaux de LS plus élevés sont observés avec le génotype FF comparé au génotype AA (Chilliard et al., 2014).

Tableau 8 : Niveaux de lipolyse spontanée (mEq/100 g de MG) en fonction de la race de vache laitière.

| | Traitements | HO | MO | J | T |
|-------------------------------|---|------|------|------|------|
| Chazal et al., 1987 | 1 lactation complète Herbe fraîche, Herbe Conservée, | 1,20 | 1,20 | | |
| Bachman et al., 1988 | 1 lactation complète Ø alim. | 0,88 | | 0,67 | |
| Ferlay et al. 2006 (1) | 2 prélèvements Milieu lactation E.Maïs, E. Raygrass, foin | | 0,58 | | 0,14 |
| Ferlay et al. 2006 (2) | 2 prélèvements Milieu de lactation Pâturage, foin | | 0,13 | | 0,07 |

HO : Holstein ; MO : Montbéliarde ; J : Jersiaise ; T : Tarentaise

3. Stade physiologique

La LS seraient plus importante en fin de lactation/gestation (Arhné et Björck, 1985 ; Chazal et Chilliard, 1986 ; Bachman et al., 1988 ; Jurczak, 1995). Chazal et Chilliard (1986) ont notamment observé une augmentation notable de la LS après 32 semaines de lactation, quand le stade de gestation est supérieur à 24 semaines et que la PL est faible. L'importance relative de ces trois paramètres est difficile à déterminer car ils sont souvent en interaction. D'après Chazal et Chilliard (1986), le stade de gestation est le principal responsable de l'augmentation de la LS en fin de lactation (**Figure 13**). L'augmentation de la libération d'hormones (œstrogènes, progestérone) après le 4^{ème} mois et après le 6^{ème} mois de gestation pourrait être responsable de cette variation de la LS (Jurczak, 1995). Cela a été observé lors d'injection d'œstrogènes aux VL (Kästli, 1973 ; Bachman, 1982 ; Chilliard et al., 1997). Le niveau de PL semble également influencer le niveau de LS au-delà de l'effet du stade physiologique car avant même la 24^{ème} semaine de gestation, Chazal et Chilliard (1987), ont constaté une forte augmentation de la LS en lien avec la diminution de PL.

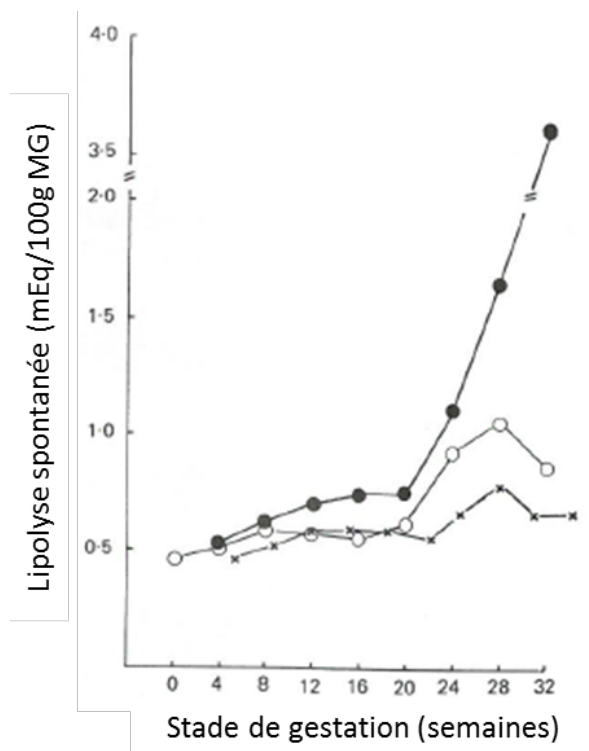


Figure 13 : Effet du stade de gestation et du stade de lactation sur les niveaux de lipolyse spontanée. ○ : 18 VL gestantes tarées entre août et septembre ; ● : 23 VL gestantes tarées entre juin et juillet ; x : 12 VL non gestantes durant leur lactation. *D'après Chazal et Chilliard, 1986*

4. Parité

Selon Connolly (1978) et Chilliard et Lamberet (1984), les multipares présentaient des niveaux de LS inférieurs aux primipares.

C. Facteurs de variations de la lipolyse spontanée extrinsèques à l'animal

1. Moment de la traite

Jensen (1959), Murphy et al. (1979), Jellema (1975) et Arhné et Björck (1985) ont montré que la LS était plus importante dans le lait de la traite du soir que dans celui de la traite du matin. La différence observée entre le matin et le soir pourrait être due aux durées d'intervalles de traite. En effet, avec des intervalles égaux entre les deux traites, Bachman et al. (1988) n'ont pas observé de différence de niveaux de LS entre le lait des traites du matin et celui des traites du soir.

2. Fréquence de traite

L'augmentation de la fréquence de traite est accompagnée d'une augmentation de la LS du lait. Comparé à un système de traite biquotidienne, classiquement rencontré en élevage bovin français, la monotraite entraîne une diminution drastique de la LS (-268 %) (Pomiès et al., 2007 ; Dutreuil et al., 2016) alors que la traite trois à quatre fois par jour entraîne une augmentation de la LS

quel que soit le stade de lactation (+20 à +23,5 % ; Klei et al., 1997 ; Wiking et al., 2006). Les mécanismes responsables de ces variations seraient plutôt des mécanismes locaux, impliquant la GM, que des mécanismes systémiques puisque ces variations sont observables sur demi-mamelle avec des fréquences de traite différentes entre les mamelles (Wiking et al., 2006).

3. Alimentation

La nature du fourrage influence les variations de LS. En effet, lorsque les VL sont au pâturage, des niveaux de LS bas ont été observés (Kuzdzal-Savoie et al., 1975 ; Deeth et Fitzgerald, 1976 ; Chazal et al., 1987). Un foin de bonne qualité, utilisé comme fourrage principal est également généralement associé à des niveaux de LS bas (Deeth et Fitzgerald, 1976 ; Chazal et al., 1987). L'utilisation d'ensilage d'herbe comme fourrage principal augmenterait les niveaux de LS comparé à la l'herbe fraîche (+130 %) et au foin (+93 %) (Chazal et al., 1987 ; Ferlay et al., 2006). L'ensilage de maïs semble être associé à des niveaux de LS plus faibles que l'herbe conservée. (Ferlay et al., 2006) **(Tableau 9)**.

L'effet d'une restriction alimentaire (-10 à -20 % des apports) sur les niveaux de LS a également été étudié dans la littérature **(Tableau 10)**. La réponse des VL est variable selon le fourrage principal de la ration et selon le stade physiologique de l'animal. Une réduction de 38 % de l'accessibilité à la pâture n'a pas d'incidence sur la LS (Thomson et al., 2005) alors qu'une restriction alimentaire (-10 à -20 % des apports) dans le cadre d'une alimentation à base de fourrage conservé entraîne une dégradation de la LS des VL (Jellema, 1975 ; Chilliard, 1986) particulièrement en fin de lactation (Stobbs et al., 1973 ; Deeth et Fitzgerald, 1976 ; Connolly, 1978 ; O'Brien et al., 1996).

Selon Salih et Anderson (1979), des rations avec des niveaux bas de matières azotées totales (9 % vs 18 %) entraîneraient une augmentation de la LS.

Le rapport foin/concentré (75 : 25 vs 60 : 40) ne semble pas modifier la LS quand les besoins nutritionnels sont couverts (Salih et Anderson, 1979).

La supplémentation lipidique (lin extrudé, huile de colza) des rations semble entraîner une augmentation de la LS (Chazal et Chilliard, 1985 ; Hurtaud et al., 2010).

4. Saison

Même si des variations saisonnières sont observées dans les élevages Français, avec un pic de LS observé l'été (Le Guénic et al., 2008), aucune étude n'a porté sur l'évaluation de l'effet de la saison (température, photopériode).

Tableau 9 : Effet de la nature du fourrage sur les niveaux de lipolyse spontanée

| Autres facteurs | | Fourrage | Lipolyse |
|------------------------------------|-----------------|------------------------------|-------------------|
| Chazal et Chilliard, 1986 | | Foin | 0,63 ^b |
| | | Ens. Herbe | 1,49 ^a |
| Chazal et al., 1987 | Holstein et | Herbe | 0,63 ^b |
| | Montbéliarde | Foin | 0,60 ^b |
| | | Ens. Herbe | 1,52 ^a |
| Chilliard et Lamberet, 1984 | Revue | Herbe vs autres fourrages | ↘ |
| Ferlay et al., 2006 | Montbéliarde et | Foin | 0,20 ^b |
| | Tarentaise | Ens. Herbe | 0,29 ^a |
| | | Ens. Maïs | 0,06 ^c |

Tableau 10 : Effect d'une restriction alimentaire sur les niveaux de lipolyse spontanée

| Autres facteurs | Fourrage | Restriction | Δ Lipolyse | |
|--|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------|------------------------|
| Stobbs et al., 1973 | Jersiaise, milieu et fin de lact. | Herbe | +6 kg conc Vs ∅ | ↗ |
| Kuzdal-Savoie et al. 1975 (revue) | – | – | – | ↗ |
| Deeth et Fitzgerald, 1976 (revue) | – | – | – | ↗ |
| Chilliard et Lamberet, 1984 | – | – | – | ↗ |
| O'Brien et al., 1996 | Holstein, Début et milieu lact. | Herbe | - 16 % MSI - 33 % MSI | - 0,02 ns + 0,08 ns |
| | Thomson et al., 2005 | Jersiaise, Milieu et fin de lact. | Herbe | -28 % MSI -63 % MSI |

Les effets des facteurs intrinsèques à l'animal (race, génétique, parité, stade physiologique) et extrinsèques (moment de la traite, fréquence de traite, alimentation, saison) sur les composants du SLi (taille des GG, composition de la membrane des GG, LPL, fraction PPT) et la LS sont résumés dans les [tableaux 11 et 12](#).

Tableau 11 : Récapitulatif de l'effet des facteurs intrinsèques et extrinsèques sur la composition de la membrane des globules gras





| Facteurs | Modalités | Composition de la MFGM |
|----------------------------|------------------------------------|---|
| Race | Holstein/Jersiaise | + SM |
| Génétique (DGAT-1) | KK/KA et AA | +SM ; -PI ; -PS |
| Parité | Multipares/ Primipares | ? (<i>pas d'infos</i>) |
| Stade physiologique | Début et fin / milieu de lactation | Lipides : (<i>contradictions</i>) Protéines : +BTN +XO |
| Moment de la traite | Matin/Soir | ? (<i>pas d'infos chez la VL</i>) |
| Fréquence de traite | 4x/j / 2x/j /1x/j | ? (<i>pas d'infos</i>) |
| Alimentation | | |
| Fourrage | Ens. Maïs / Herbe | + SM |
| Restriction | Restreint / Non restreint | - Stomatine ; - Glycoprotéine ; - Cholestérol |
| Suppl. lipides | Suppl. /Non suppl. | + PI ; + PE ; +PS ; +PC |
| Saison | Été/printemps/Automne/Hiver | ? (<i>pas d'infos</i>) |

SM : sphingomyéline ; PC : Phosphatidylcholine ; PE : Phosphatidylétanolamine ; PI :

Phosphatidylinositol ; PS : Phosphatidylsérine

Graves et al., 2007 ; Argov-Argaman et al., 2013 ; Mondy et Keenan, 1993 ; Ye et al., 2002 ; Evers, 2004 ; Lopez et al., 2008 ; Lu et al., 2013.

Tableau 12 : Récapitulatif des effets des facteurs de variation du système lipolytique et de la lipolyse spontanée chez la vache laitière

| Facteurs | Taille des GG | LPL | Fraction protéose peptone | Lipolyse spontanée |
|----------------------------|---|--|---|---|
| |  |  |  |  |
| Race | Jersiaise Normande Holstein | Montbéliarde Tarentaise (activité LPL) | Jersiaise Frisonne | Holstein Jersiaise Montbéliarde Tarentaise |
| Génétique | | | | |
| DGAT-1 | KK AA | AA KA et AA (transcrits LPL) | - | ? |
| CNS3 | BB AB | - | - | |
| β-LG | - | - | BB AB et AA | |
| Parité | ∅ | ? (pas d'infos) | ? (pas d'infos) | Primipares Multipares |
| Stade physiologique | Début lact. Milieu/Fin lact. | ? (contradictions) | Début lact. Milieu lact. Fin lact. | Fin lact. Début/milieu lact. |
| Moment de la traite | Soir Matin (ns) | ? (contradictions) | ? (pas d'infos) | Soir Matin |
| Fréquence de traite | 4x/j 1 à 2 x/j | 2 x/j 1x/j (activité LPL et transcrits) | ? (pas d'infos) | 4x/j 2x/j 1x/j |
| Alimentation | | | | |
| Fourrage | Ens. Maïs Herbe | ∅ | | Herbe cons. Ens. Maïs Herbe |
| Restriction | ∅ | ∅ | ? (pas d'infos) | Restreint Non-restreint |
| Suppl. lipides | ? (contradiction) | Suppl Non-suppl (activité LPL) Non-suppl Suppl (transcrits LPL) | | Suppl. Non-suppl |
| Saison | ? (pas d'infos) | Hiver Eté | ? (pas d'infos) | ? (pas d'infos) |

Mulder et Walstra, 1974 ; Kuzdzal- Savoie et al., 1975 ; Deeth et Fitzgerald, 1976 ; Connolly, 1978 ; Murphy et al., 1979 ; Barry et Donnelly, 1981 ; Andrews, 1983 ; Hagrass et al., 1983 ; Schaar, 1985 ; Chazal et Chilliard, 1986 et Chazal et al., 1987 ; Bachman et al., 1988 ; Chilliard et Lamberet, 1988 ; Arhne et Björck, 1985 ; Rémond et Pomiès, 2005 ; Ferlay et al., 2006 ; Wiking et al., 2006 ; Couvreur et Hurtaud, 2007 et 2016 ; Pomiès et al., 2007 ; Faucon, 2009 ; Littlejohn et al., 2010 ; Hurtaud et al., 2010 ; Argov-Argaman, 2013 ; Boutinaud et al., 2013 ; Logan et al., 2014 ; Altenhofer et al., 2015

Dans cette revue bibliographique, la plupart des études concernant l'impact des facteurs d'élevage sur la LS a été menée dans les années 80. Or la génétique et l'alimentation des animaux ont évolué conjointement depuis 30 ans, modifiant potentiellement la réponse des animaux aux facteurs d'élevage. **Une première partie de la thèse a donc consisté à valider les résultats obtenus dans les années 80 avec des vaches actuelles.** Pour cela, dans une première partie de la thèse, nous avons combiné une approche expérimentale avec une approche « terrain » pour actualiser notre connaissance de l'effet de facteurs identifiés comme modulateurs de la LS dans les troupeaux. Expérimentalement, nous avons effectué un suivi de la LS pendant une lactation complète sur des vaches Holstein et Normande associées à 2 stratégies alimentaires différentes. Cet essai nous a permis d'étudier les effets de la race, de la parité, du stade physiologique et de la stratégie alimentaire (niveau d'apport et nature du fourrage) sur la LS. L'approche terrain a été faite sous forme d'enquête auprès d'éleveurs qui étaient interrogés sur leurs pratiques d'élevage en lien avec la LS.

Dans le passé, l'impact de beaucoup de facteurs a été étudié sur la LS cependant, d'autres n'ont pas été abordé alors qu'ils ont susceptibles de moduler la LS. **Une seconde partie de la thèse a donc consisté à travailler sur des facteurs dont l'étude est restée incomplète et dont on suspecte un effet sur la variabilité de la LS :**

- nature du fourrage et restriction alimentaire abordés de manière dissociée
- nouvelles sources lipidiques riches en acides gras insaturés
- variants génétiques associés à la synthèse de la MG en interaction avec des facteurs d'élevage (ex monotraite)
- stade physiologique indépendamment du niveau de PL.

Enfin, les publications recensées sont divisées entre deux approches explicatives de la LS selon l'échelle de travail :

- l'échelle zootechnique, qui étudie et explique les variations de la LS en fonction des facteurs d'élevage et des caractéristiques des VL
- l'échelle biochimique, qui étudie l'équilibre entre les différents composants du SLI. Ces études étaient surtout centrées sur la LPL ainsi que sur ses éventuels activateurs et inhibiteurs et ce sur très peu d'échantillons.

Pas ou peu d'études ont fait le lien entre les approches zootechniques et les mécanismes mis en œuvre dans le lait pour moduler la LS. **Une troisième partie de la thèse a donc porté sur l'étude simultanée de facteurs d'élevage (nature du fourrage et restriction alimentaire) et des mécanismes biochimiques impliqués.** Cette approche multi-échelles (de l'animal à la biochimie de la LPL) a permis d'avoir un grand nombre d'échantillons et d'étudier l'équilibre entre les composants au sein même du lait, grâce à la variabilité individuelle.

Résultats

Chapitre 1

Effets des facteurs d'élevage sur la lipolyse spontanée du lait de vaches dans les troupeaux actuels : mise à jour des références

Plusieurs facteurs d'élevage modulant la LS ont été identifiés dans les années 1970 à 1990. Les causes des variations de la LS dans les élevages étaient multiples : effet de la génétique des VL, de la race, du stade physiologique en lien avec le niveau de PL, de la parité, de la fréquence de traite et de l'alimentation, sans que ces facteurs ne soient hiérarchisés. Cependant, les connaissances acquises avaient permis la réduction des niveaux de LS.

Aujourd'hui, ces références ne semblent pas suffisantes pour comprendre les fluctuations de lipolyse liées au troupeau et à sa conduite et relevées par la filière laitière depuis les années 2000.

L'objectif du chapitre 1 de la thèse a donc été de réévaluer, dans les troupeaux actuels, l'impact des facteurs d'élevage identifiés dans les années 1970 à 1990 comme modulant la LS.

Les VL ont beaucoup évolué depuis ces dernières études suite à la sélection génétique. A titre d'exemple, les vaches Normande produisent aujourd'hui 750 kg de plus de lait / an et les vaches Holstein 950 kg de plus de lait / an qu'il y a dix ans. Le paysage laitier français a lui aussi beaucoup évolué avec une Holsteinisation des exploitations laitières en zone de plaine. L'évolution des races et de leur représentativité sur le territoire remet donc en question les différents facteurs expliquant la variabilité de la LS. De plus, les systèmes d'alimentation ont également évolué pour permettre l'expression du potentiel de production de ces VL. L'interaction entre la VL et son alimentation a donc également évolué, pouvant également modifier les variations de LS.

Une actualisation des données sur l'impact des facteurs liés à l'animal et aux facteurs d'élevage a donc été nécessaire pour mieux appréhender les fluctuations de la LS dans les exploitations laitières. Deux approches complémentaires ont donc été mises en place : une approche expérimentale et une approche via des enquêtes en élevage.

Chapitre 1 - Partie 1

Approche expérimentale : effets de la race, de la parité, du stade de lactation et de la stratégie alimentaire sur la lipolyse spontanée du lait de VL

Le suivi d'un essai mis en place sur le domaine du Pin-au-Haras, a été effectué de manière à observer les variations de la LS au cours d'une lactation complète d'une soixantaine de vaches, primipares et multipares, de races Holstein et Normande, alimentées via deux systèmes d'alimentation correspondant à deux stratégies d'exploitation différentes : la maximisation du potentiel de production des animaux (système intensif) et l'utilisation des ressources locales (système extensif). Le système intensif consistait en un régime à base d'ensilage de maïs et de 30 % de concentrés l'hiver et en un régime pâturant avec 4 kg/j de concentrés. Le système extensif consistait en un régime à base d'herbe conservée l'hiver et en un régime strictement pâturant sans apport de concentrés. Les vêlages étaient groupés entre janvier et mars. La variabilité individuelle importante de cet essai a permis d'étudier les effets liés à l'individu, à la parité, à la race, au stade physiologique et à l'alimentation même si plusieurs facteurs étaient confondus par le schéma expérimental (stade de lactation, alimentation, saison d'une part et nature du fourrage et restriction alimentaire d'autre part).

Ces travaux ont fait l'objet d'une soumission dans le Journal of Dairy Science ainsi que d'une communication orale à l'Annual Meeting of American Dairy Science Association (2015/07/13-16 ; Orlando, Floride, USA – [annexe 1](#))

Dans la suite du manuscrit, on se réfèrera à cet essai comme à l'essai **Système**

Effects of breed, feeding system and lactation stage on milk fat characteristics and spontaneous lipolysis in dairy cows.

E. Vanbergue^{*†}, L. Delaby^{*}, J.L. Peyraud^{*}, S. Colette[‡], Y. Gallard[‡] and C. Hurtaud^{*1}

^{*}PEGASE, INRA, Agrocampus Ouest, 35590, Saint-Gilles, France.

[†]Institut de l'élevage, Monvoisin, 35910 Le Rheu, France.

[‡]DEP, INRA, 61310, EXMES, France.

1Corresponding author: Catherine Hurtaud, PEGASE, INRA, Agrocampus Ouest, 35590, Saint-Gilles, France.

Phone: +33 (0)2 23 48 51 02; Fax: +33 2 23 48 50 80

Email: Catherine.Hurtaud@inra.fr

ABSTRACT

Spontaneous lipolysis (SL) is an enzymatic reaction which leads to a release of free fatty acids that can modify technological and sensory properties of milk and milk products. However, few studies have been done to assess the impact of feeding systems (FS) and breed on SL. Most of them were led in the eighties and may no longer be representative of actual cattle. None of them investigated the effect of cow breed at the whole lactation scale. A trial was carried out to study the effects of 2 FS (high and low inputs FS) with 2 breeds (Holstein – **HO** and Normande - **NO**) during an entire lactation. Sixty-three cows were followed throughout one lactation. Cows were divided into 4 groups according to their breed and their FS. The high FS (**HFS**) consisted in a high energy diet (in winter, corn silage with 30% concentrate; otherwise, pasture with 4 kg/d of concentrate) and the low FS (**LFS**) consisted in a low energy diet (in winter, conserved grass with no concentrate; otherwise, pasture with no concentrate). The cows calved between January and March. Individual milk samples were collected every month from both morning and evening milkings for fat, protein, milk fat globule size, major fatty acids and proteins profiles, and SL determinations. Data were analyzed using SAS mixed procedure. Spontaneous lipolysis was higher in evening milks compared to morning milks. Spontaneous lipolysis was slightly impacted by the FS thorough lactation. However, in early lactation, SL was higher in LFS in evening milks. Pasture was associated with low SL rate in mid lactation. Normande cows were less susceptible to SL during the entire lactation than HO cows. Finally, early and late lactation periods were identified as being more susceptible to SL, but this depended on breed and FS: during early lactation, HO cows and LFS were associated with higher levels of SL, particularly in evening milks, and, during late lactation, HO cows were associated with higher levels of SL. No inter-treatment or inter-cow correlations ($R^2 < 0.16$) were found between SL, milk fat and protein contents, milk production, milk fat globule size, and proportion of fatty acids and proteins, and body condition and weight during the entire lactation. Effects of breed, FS, and lactation stage had been identified and quantified. Causal mechanisms might involve energy balance and circadian secretion of milk fat globule components.

Keywords: free fatty acids, herd management, milk quality

INTRODUCTION

Nutritional factors and breed affect spontaneous lipolysis (**SL**) and thus modify technological and sensory properties of milk and dairy products (Cartier and Chilliard, 1990; Ferlay et al., 2006; Deeth, 2006). Indeed, short chain fatty acids released by the lipoprotein lipase (**LPL**) cause development of rancid flavors, undesirable for consumers (Scanlan et al., 1965; Chilliard et al., 2003), and partial glycerides impair foaming and creaming abilities (Deeth, 2006). Several studies pointed out that SL depends on lactation stage, breed and feeding systems (**FS**), among other factors (Cartier and Chilliard, 1990). Conserved and fresh grass was found to induce less SL than corn silage based diet when energy and protein needs were covered (Ferlay et al., 2006). On the contrary, low energy diets were found to be associated with higher levels of SL, particularly in late lactation (Chazal et al., 1987; Cartier and Chilliard, 1990; Thomson et al., 2005). Several studies have shown a link between breed and SL (Chilliard, 1982; Chazal et Chilliard, 1987a; Bachman et al., 1988; Ferlay et al., 2006) and although Normande (**NO**) is the third dairy cow breed present in France and is present all over the world, no study has been done to quantify SL of NO cows' milk throughout lactation. Few studies have been done to assess the impact of the interactions between FS and breed on SL although interactions between breed (HO and NO) and diet on milk traits have been shown in various previous trials (Kolver et al., 2002; Delaby et al., 2009; Chilliard et al., 2014). None of the studies investigated the entire lactation.

Most of the studies dealing with SL in relation to dairy farming systems were led in the eighties with cows having a low potential for milk production. But genetic selection and feeding strategies had co-evolved for several decades: genetic performances of dairy herds increased and feeding systems (**FS**) changed to satisfy energy requirements of high genetic merit cows. Proportion of corn silage and energy concentrate increased in dairy cows' diets (Pflimlin et al., 2009). However, there is a wide range of farm practices between intensive systems maximizing HO cows' performances and more extensive systems prioritizing local resources and other breeds (Dillon et al., 2005; Raison et al., 2008; Le Gall et al., 2009; Peyraud and Delagarde, 2013) and the effects of these systems on SL remain unknown.

The aim of our trial was to assess the impact of 2 breeds, NO and HO and of 2 feeding systems, a high FS (corn silage in winter and grazing plus concentrate in spring and summer) and a low FS (conserved grass in winter and grazing with no concentrate in spring and summer) on milk SL, during the entire lactation and to evaluate correlations between SL, milk composition, and milk fat characteristics inter-treatment, inter-cow, during the entire lactation and among lactation periods (early, mid and late lactation).

MATERIAL AND METHODS

Experimental design

Two breeds, HO and NO and 2 FS, a High FS (**HFS**) with high energy diets and a Low FS (**LFS**) with low energy diets were used in this trial. These 2 systems corresponded to 2 different winter diets and 2 different pasture managements. Sixty three cows were divided into 4 groups according to their FS and their breed: the HFS was composed of 15 HO cows (8 multiparous and 7 primiparous) and 17 NO cows (11 multiparous and 6 primiparous) and the LFS was composed by 14 HO cows (8 multiparous and 6 primiparous) and 17 NO cows (14 multiparous and 4 primiparous). The other criteria for batching multiparous cows were, in that order: parity, milk production, fat content, protein content, weight, body condition score (**BCS**) and somatic cells score (**SCS**). Primiparous cows were introduced in each group with the same criteria, except for the rank of lactation and milk fat, protein contents, SCC, and the number of animals in each group, in order to keep the same number of cows in each group. Calving was compacted from January to March 2014 and cows were monitored thorough their lactation until January 2015. Cows were milked every day at 0730 h and 1730 h. When kept indoors, cows had an average area of 10 m².

Description of feeding systems and diets

High feeding system (HFS). From January to April 3rd, cows received a high digestible diet *ad libitum* composed of corn silage (55% of dry matter (**DM**) of the diet), dried alfalfa (16% of DM of the diet), rapeseed meal (4% of DM of the diet) and energy concentrate (25% of DM of the diet). Concentrate was composed, on a DM basis, of 45% soybean meal, 12% wheat, 12% corn, 12% barley, 11% beets pulp, 4% molasses and 4% minerals and vitamins. From April 3rd to April 15th, cows were in dietary transition to turn out to pasture. From April 15th to November 17th, cows were grazing white clover (15-20%) - perennial ryegrass (80 - 85%) pastures and received 4 kg/d of concentrates and between 3 and 8 kg/DM/d of corn silage when grass growth was not sufficient to cover the cows' needs. The mean surface allocated per cow was 0.22 ha of pasture from April 15th to July 10th and 0.33 ha of pasture from July 10th to November 17th. Cows were managed on a simplified rotational grazing system (Hoden et al., 1991; Delaby and Peyraud, 2003) based on 3 to 4 plots in spring and extended to 5 plots in autumn. From November 17th to January 2015, cows received 5 kg DM/d of corn silage, 4 kg/d of concentrate, and grass silage *ad libitum*. Diets were formulated to meet cows' requirements (Institut National de la Recherche Agronomique, 2007). Nutritive values of forages, concentrates and winter diets are presented in [tables 1 and 2](#).

Table 1. Chemical composition and nutritional value of winter feeds

| | Corn silage | Grass silage | Haylage | Concentrate ⁽¹⁾ | Rapeseed meal | Dried alfalfa |
|--|-------------|--------------|---------|----------------------------|---------------|---------------|
| DM ⁽²⁾ , % | 31.4 | 37.2 | 79.2 | 87.2 | 88.7 | 91.8 |
| OM ⁽³⁾ , g/kg MS | 965 | 922 | 910 | 896 | 922 | 884 |
| CP ⁽⁴⁾ , g/kg MS | 61 | 90 | 120 | 278 | 378 | 164 |
| CF ⁽⁵⁾ , g/kg MS | 210 | 266 | 284 | 60 | 148 | 148 |
| NDF ⁽⁶⁾ , g/kg MS | 445 | 519 | 541 | 140 | 368 | 368 |
| ADF ⁽⁷⁾ , g/kg MS | 249 | 313 | 303 | 73 | 232 | 232 |
| Fat, g/kg MS | 33 | 23 | 21 | 23 | 20 | 20 |
| NE _L ⁽⁸⁾ , MJ/kg of DM | 6.65 | 6.85 | 6.94 | 8.28 | 7.32 | 5.10 |
| PDIE ⁽⁹⁾ | 61 | 69 | 93 | 149 | 156 | 81 |
| PDIN ⁽¹⁰⁾ | 38 | 54 | 78 | 190 | 246 | 99 |

⁽¹⁾ Concentrate: 45% soya meal, 12% wheat, 12% corn, 12% barley, 11% beets pulp, 4% minerals and vitamins, 4% molasses

⁽²⁾ DM: Dry Matter

⁽³⁾ OM: Organic Matter

⁽⁴⁾ CP: Crude Protein

⁽⁵⁾ CF: Crude Fiber

⁽⁶⁾ NDF: Neutral Detergent Fiber

⁽⁷⁾ ADF: Acid Detergent Fiber

⁽⁸⁾ NEL: Net Energy for Lactation

⁽⁹⁾ PDIE: protein digested in the small intestine supplied by rumen-undegraded dietary protein and by microbial protein from rumen fermented OM (Institut National de la Recherche Agronomique, 2007)

⁽¹⁰⁾ PDIN: protein digested in the small intestine supplied by rumen-undegraded dietary protein and by microbial protein from rumen degraded N (Institut National de la Recherche Agronomique, 2007)

Low feeding system (LFS). From January to April 3rd, cows received grass silage (50% of DM of the diet), haylage (48% of DM of the diet) and minerals and vitamins (2% of DM of the diet) *ad libitum*. From April 3rd to April 15th, cows were in dietary transition to turn out to pasture. From April 15th to November 17th, cows were grazing white clover (15-20%) - perennial raygrass (80-85%) pastures. The total area allocated per cow was 0.22 ha of pasture from April 15th to July 10th and 0.55 ha of pasture from July 10th to November 17th. Cows received grass silage when grass growth was not sufficient. Grazing management was the same as in the HFS treatment. From November 17th to January 2015, cows received grass silage *ad libitum*. Cows did not receive any concentrate during their entire lactation. Diets were formulated to meet 80% of the energy of cows' diet in HFS (Institut National de la Recherche Agronomique, 2007). Nutritive values of forages, concentrates and winter diets are presented in [tables 1 and 2](#).

Table 2. Ingredients, chemical and nutritional composition of winter diets

| | HFS ⁽¹⁾ | LFS ⁽²⁾ |
|--|--------------------|--------------------|
| Ingredients, % DM | | |
| Corn silage | 55 | / |
| Grass silage | / | 50 |
| Haylage | / | 48 |
| Concentrate ⁽³⁾ | 25 | / |
| Rapeseed meal | 4 | / |
| Dried alfalfa | 16 | / |
| Minerals | / | 2 |
| Chemical composition, g/kg of DM unless noted | | |
| DM ⁽⁴⁾ , % | 57.3 | 56.6 |
| OM ⁽⁵⁾ | 933 | 898 |
| CP ⁽⁶⁾ | 144 | 103 |
| CF ⁽⁷⁾ | 160 | 269 |
| NDF ⁽⁸⁾ | 353 | 519 |
| ADF ⁽⁹⁾ | 202 | 302 |
| Fat | 27.9 | 21.6 |
| Nutritional value, g/kg of DM unless noted | | |
| NEL ⁽¹⁰⁾ , kJ/kg of DM | 6.84 | 6.75 |
| PDIE ⁽¹¹⁾ | 90 | 79 |
| PDIN ⁽¹²⁾ | 94 | 64 |
| DMI ⁽¹³⁾ | 18.5 | 15.1 |

⁽¹⁾ HFS: High feeding system; ⁽²⁾ LFS: Low feeding system

⁽³⁾ Concentrate: 45% soya meal, 12% wheat, 12% corn, 12% barley, 11% beets pulp, 4% minerals and vitamins, 4% molasses

⁽⁴⁾ DM: Dry Matter ; ⁽⁵⁾ OM: Organic Matter ; ⁽⁶⁾ CP: Crude Protein ; ⁽⁷⁾ CF: Crude Fiber

⁽⁸⁾ NDF: Neutral Detergent Fiber; ⁽⁹⁾ ADF: Acid Detergent Fiber; ⁽¹⁰⁾ NEL: Net Energy for Lactation

⁽¹¹⁾ PDIE: protein digested in the small intestine supplied by rumen-undegraded dietary protein and by microbial protein from rumen fermented OM (INRA, 1989)

⁽¹²⁾ PDIN: protein digested in the small intestine supplied by rumen-undegraded dietary protein and by microbial protein from rumen degraded OM (INRA, 1989)

⁽¹³⁾ DMI: Dry Matter Intake

Measures, sample collection and laboratory analysis

Measures. Milk yield was recorded at every milking. Animals were weighed every wk during the entire lactation. We only showed data corresponding to milk sampling. Body condition score was recorded every month using the French notation scale of 0–5 (Bazin et al., 1984).

Sample collection. During the entire lactation, animals were milked at a milking parlor twice a day at 0730 h and 1730 h. Milking protocol was adapted to collect milk samples. Milk samples were obtained by milking the cows on milk cans at morning and evening milkings, once or twice a month during the entire lactation. We collected 4 vials of 70 mL for the analyses described below. Milk samples were obtained on January 28th, February 25th, March 25th, April 15th, May 13th, June 3rd, July 8th, July 22th, August 19th, September 16th, October 21st, November 18th and December 16th.

Laboratory analyses. Milk was kept at 4°C after sampling. Analyses were performed at the Normandy Interprofessional Milk Analysis Laboratory (LILANO, Saint-Lô, France). Milk fat, protein and lactose contents, saturated fatty acids (**SFA**), C16:0, C18:0, unsaturated fatty acids (**UFA**), *cis*9 C18:1, polyunsaturated fatty acids (**PUFA**), β -CN, α s1-CN, α s2-CN, κ -CN, β -LG and α -LA were determined by mid-infrared spectrometry (MilkoScan FT6000, Foss, Hillerød, Denmark) (Ferrand-Calmels et al., 2014; Gelé et al., 2014) and SCC by flow cytometry. Two samples were collected per cow to calculate SL by the difference between free fatty acid content after 24 h of storage at 4°C and initial free fatty acid content. Immediately after milking, a 50 mL sample was heated in a water bath at 100°C during 2.5 min to stop lipase activity, and then kept at 4°C. A second sample was stored at 4°C for 24 h, then heated and kept at 4°C in the same way. Free fatty acid analyses were performed on both samples by the copper soap method (Vanbergue et al., 2016; Shipe et al., 1980). A sample was collected and kept at room temperature with potassium dichromate (Merck, Darmstadt, Germany) to evaluate milk fat globule (**MFG**) size distribution by laser light scattering (Mastersizer 3000, Malvern, UK). Samples were measured by diluting 1:6 vol with EDTA/NaOH buffer (0.5 M, pH=8) to dissociate casein micelles. The average diameters $d_{4,3} = \frac{\sum(N_i \times d_i^4)}{\sum(N_i \times d_i^3)}$ was calculated by the Malvern software (Malvern, Les Ulis, France).

Calculation and statistical analyses. To facilitate further interpretations, the lactation period of the trial was divided into 4 periods (LPeriod) according to the main variation factors which are mixed in the trial: nature of forage, lactation stage and season (**Figure 1**). The first period went from January to March, where cows were in early lactation (average lactation stage: 43 ± 21 d), and fed with the winter diet (corn silage vs conserved grass). The second period went from April to June, the spring period, where cows were in early/mid-lactation (average lactation stage: 99 ± 34 d) and grazing. The third period went from July to September, the summer period, where cows were in mid lactation (average lactation stage: 189 ± 39 d) and grazing. The fourth period went from October to December,

the autumn period, where cows were in late lactation (average lactation stage: 304 ± 42 d) and receiving pasture, conserved grass and corn silage according to forage supplies.

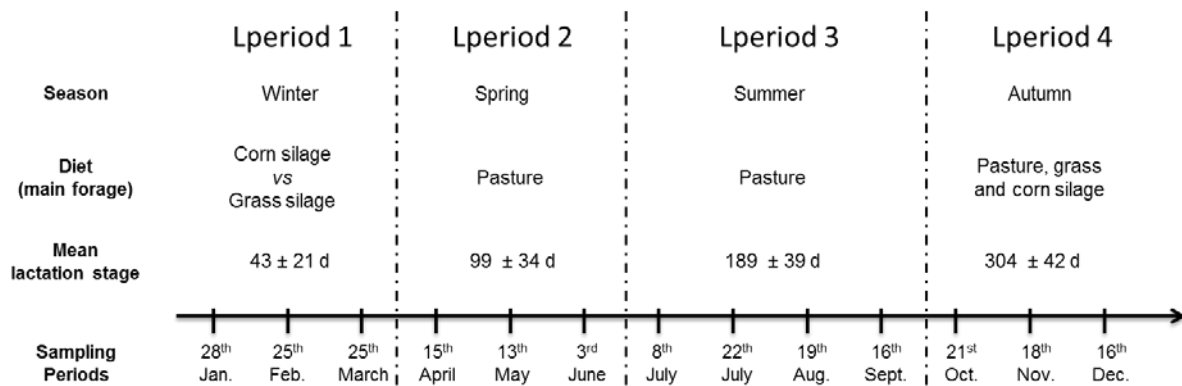


Figure 1. Diagram of the experimental design.

All statistical analyses on the data set were performed using SAS software (SAS 9.2 Institute Inc., Cary, NC). The statistical significance threshold was set to $P < 0.05$. Trend was set to $P < 0.10$. Normality of data was checked using the Shapiro-Wilk test of the SAS-package univariate procedure. The effects of breed, FS, parity, and their interactions on milk traits and zootechnical parameters were assessed by period using the mixed procedure of SAS for repeated measures on every sampling period (SPeriod in the model) according to the statistical model:

$Y_{ijkl} = \mu + \text{parity}_i + \text{breed}_j + \text{FS}_k + \text{SPeriod}_l + \text{parity}_i \times \text{breed}_j + \text{parity}_i \times \text{FS}_k + \text{parity}_i \times \text{SPeriod}_l + \text{breed}_j \times \text{FS}_k + \text{breed}_j \times \text{SPeriod}_l + \text{FS}_k \times \text{SPeriod}_l + \epsilon_{ijkl}$; where μ is the mean and Y_{ijkl} is the variable dependent on the fixed effects of parity_i (primiparous, multiparous), breed_j (HO, NO), FS_k (HFS, LFS) during Speriod_l (15 periods of sampling during the entire lactation) and their interactions, and ϵ_{ijkl} is the residual error associated with each *ijkl* observation. Individual effects were treated as random effects.

The effects of breed, FS, parity, and their interactions on milk fat characteristics (SL, MFG size, fatty acid profile) were assessed by period using the mixed procedure of SAS for repeated measures on every sampling period (SPeriod in the model) according to the statistical model:

$Y_{hijkl} = \mu + \text{milking}_h + \text{parity}_i + \text{breed}_j + \text{FS}_k + \text{SPeriod}_l + \text{parity}_i \times \text{breed}_j + \text{parity}_i \times \text{FS}_k + \text{parity}_i \times \text{SPeriod}_l + \text{breed}_j \times \text{FS}_k + \text{breed}_j \times \text{SPeriod}_l + \text{FS}_k \times \text{SPeriod}_l + \epsilon_{hijkl}$; where μ is the mean and Y_{hijkl} is the variable dependent on the fixed effects of milking_h (morning milks, evening milks) parity_i (primiparous, multiparous), breed_j (HO, NO), FS_k (HFS, LFS) during Speriod_l (15 periods of sampling during the entire lactation) and their interactions, and ϵ_{hijkl} is the residual error associated with each *hijkl* observation. Individual effects were treated as random effects.

The effect of the lactation period (Lperiod) on milk traits and milk fat characteristics was assessed by using the mixed procedure of SAS for repeated measures on every SPeriod within LPeriod according to the statistical model:

$Y_{ijklm} = \mu + \text{parity}_i + \text{breed}_j + \text{FS}_k + \text{LPeriod}_l + \text{parity}_i \times \text{breed}_j + \text{parity}_i \times \text{FS}_k + \text{parity}_i \times \text{LPeriod}_l + \text{breed}_j \times \text{FS}_k + \text{breed}_j \times \text{LPeriod}_l + \text{FS}_k \times \text{LPeriod}_l + \varepsilon_{ijklm}$ where μ is the mean and Y_{ijklm} is the variable dependent on the fixed effects of parity_i (primiparous, multiparous), breed_j (HO, NO), FS_k (HFS, LFS), LPeriod_l (4 periods as explained below) during SPeriod_i (15 periods of sampling during the entire lactation) and their interactions, and ε_{ijklm} is the residual error associated with each $ijklm$ observation. Individual effects were treated as random effects.

Correlations between SL and milk yield, fat content, fat yield, protein content, protein yield, SCC, lactose content, MFG size, SFA, C16:0, C18:0, UFA, *cis9* C18:1, PUFA, β -CN, α 1-CN, α 2-CN, κ -CN, β -LG, α -LA, weight and BCS inter-treatments, inter-cows, during lactation and within Lperiods, were assessed by using the CORR procedure of SAS.

RESULTS

Effect of breed and feeding strategies on zootechnical parameters and milk fat characteristics

No significant interaction between breed and FS effects has been identified on milk traits.

Milk yield was significantly higher for HO cows compared to NO cows during the entire lactation (+ 9.6; + 6.7; + 4.5 and + 2.8 kg/d respectively for the 4 periods) and was significantly higher in HFS during periods 1, 2 and 3 (+ 9.9; + 5.4; + 6.9 kg/d respectively) (Table 3).

Milk composition. Fat content was lower for HO cows compared to NO cows during periods 2, 3 and 4 (- 0.46, - 0.70 and - 0.86 % respectively). Fat yield was higher for HO cows compared to NO cows during periods 1, 2 and 3 (+ 522, + 152, + 65 g/d respectively) and lower during period 4 (- 196 g/d). Fat content was lower in HFS compared to LFS during period 1, (- 0.45%) and tended to be higher during period 4 (+ 0.34%). Fat yield was higher in HFS during periods 1, 2, 3 (respectively + 480; + 152, + 124 g/d) (Table 3).

Milk protein content was lower and protein yield was higher for HO cows compared to NO during the entire lactation, (for protein content: - 0.36, - 0.48, - 0.39 and - 0.39%; for protein yield: + 193, + 97, + 80 and + 64 g/d respectively for the 4 periods). Protein content tended to be higher in HFS than in LFS during period 2 and was higher during period 4 (+ 0.13, P=0.057 and + 0.28% respectively). Protein yield was higher in HFS than in LFS during periods 1, 2 and, 3 (+ 341, + 189, + 129 g/d respectively) and tended to be higher during period 4 (+ 60 g/d). No significant effect of breed and FS was detected on lactose content. No significant effect of breed and FS was revealed on SCS except a higher SCS in HFS during period 3 (Table 3).

Table 3. Effect of breed and feeding strategy on milk traits during each period of lactation

| | HO ⁽¹⁾ | | NO ⁽²⁾ | | RMSE ⁽⁵⁾ | Breed | p-value | |
|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|--------|---------|----------|
| | HFS ⁽³⁾ | LFS ⁽⁴⁾ | HFS ⁽³⁾ | LFS ⁽⁴⁾ | | | FS | Breed×FS |
| Period 1 | | | | | | | | |
| Milk yield, kg/d | 37.4 | 25.1 | 25.4 | 18.0 | 5.70 | <0.001 | <0.001 | 0.093 |
| Fat content, % | 3.22 | 3.86 | 3.58 | 3.85 | 0.681 | 0.243 | 0.004 | 0.185 |
| Protein content,% | 2.91 | 2.75 | 3.28 | 3.10 | 0.519 | 0.003 | 0.156 | 0.922 |
| Fat yield, g/d | 1202 | 953 | 912 | 681 | 281.9 | <0.001 | 0.001 | 0.892 |
| Protein yield, g/d | 1084 | 678 | 827 | 550 | 202.7 | <0.001 | <0.001 | 0.165 |
| SCS | 4.60 | 4.70 | 4.82 | 4.90 | 0.784 | 0.211 | 0.618 | 0.857 |
| Lactose, % | 4.83 | 4.99 | 4.52 | 4.88 | 0.646 | 0.122 | 0.059 | 0.411 |
| Period 2 | | | | | | | | |
| Milk yield, kg/d | 29.6 | 23.6 | 22.3 | 17.5 | 4.80 | <0.001 | <0.001 | 0.331 |
| Fat content, % | 3.50 | 3.75 | 4.00 | 4.22 | 0.628 | <0.001 | 0.114 | 0.963 |
| Protein content,% | 2.90 | 2.79 | 3.40 | 3.25 | 0.321 | <0.001 | 0.057 | 0.749 |
| Fat yield, g/d | 1041 | 877 | 877 | 737 | 217.1 | 0.004 | 0.004 | 0.805 |
| Protein yield, g/d | 858 | 656 | 748 | 572 | 149.0 | 0.005 | <0.001 | 0.686 |
| SCS | 4.90 | 4.83 | 5.20 | 4.89 | 0.524 | 0.144 | 0.121 | 0.280 |
| Lactose, % | 4.79 | 4.79 | 4.79 | 4.86 | 0.540 | 0.711 | 0.705 | 0.689 |
| Period 3 | | | | | | | | |
| Milk yield, kg/d | 21.1 | 17.7 | 16.7 | 13.2 | 4.15 | <0.001 | 0.002 | 0.954 |
| Fat content, % | 3.61 | 3.69 | 4.20 | 4.50 | 0.607 | <0.001 | 0.135 | 0.357 |
| Protein content,% | 3.22 | 3.22 | 3.67 | 3.55 | 0.291 | <0.001 | 0.380 | 0.322 |
| Fat yield, g/d | 766 | 646 | 705 | 577 | 161.0 | 0.098 | 0.002 | 0.904 |
| Protein yield, g/d | 673 | 565 | 614 | 464 | 121.0 | 0.008 | <0.001 | 0.449 |
| SCS | 5.06 | 4.92 | 5.36 | 4.98 | 0.447 | 0.102 | 0.018 | 0.226 |
| Lactose, % | 4.74 | 4.72 | 4.70 | 4.66 | 0.294 | 0.406 | 0.604 | 0.887 |
| Period 4 | | | | | | | | |
| Milk yield, kg/d | 10.4 | 10.4 | 8.8 | 6.5 | 3.50 | 0.005 | 0.218 | 0.176 |
| Fat content, % | 4.63 | 4.19 | 5.39 | 5.14 | 0.774 | <0.001 | 0.097 | 0.585 |
| Protein content,% | 3.87 | 3.57 | 4.24 | 3.99 | 0.477 | 0.004 | 0.039 | 0.854 |
| Fat yield, g/d | 537 | 500 | 372 | 276 | 158.9 | <0.001 | 0.146 | 0.425 |
| Protein yield, g/d | 389 | 369 | 365 | 265 | 114.8 | 0.040 | 0.055 | 0.140 |
| SCS | 5.24 | 5.13 | 5.30 | 5.31 | 0.364 | 0.194 | 0.650 | 0.519 |
| Lactose, % | 4.49 ^b | 4.75 ^a | 4.66 ^{ab} | 4.54 ^{ab} | 3.476 | 0.863 | 0.457 | 0.014 |

⁽¹⁾ HF: Holstein Cows ; ⁽²⁾ NO: Normande Cows ; ⁽³⁾ HFS: High Feeding System ; ⁽⁴⁾ LFS: Low Feeding System ; ⁽⁵⁾ RMSE: Root mean square error

^{a-c} Means in the same row with no common superscript differ (P<0.05)

Weight and BCS. Weight of animals did not differ between breeds and was higher in HFS compared to LFS (+ 71 kg) during the entire lactation (Table 4). Body condition score was lower for HO cows compared to NO cows (- 0.70 points) and was higher in HFS than in LFS (+ 0.4 points) during the entire lactation (Table 4).

Table 4. Effect of breed and feeding strategy on animal characteristics

| | HO ⁽¹⁾ | | NO ⁽²⁾ | | RMSE ⁽³⁾ | p-value | | |
|------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|---------|---------|----------|
| | HFS ⁽⁴⁾ | LFS ⁽⁵⁾ | HFS ⁽⁴⁾ | LFS ⁽⁵⁾ | | Breed | FS | Breed×FS |
| Whole lactation | | | | | | | | |
| BCS | 2.19 ^c | 2.03 ^c | 3.10 ^a | 2.52 ^b | 0.493 | < 0.001 | < 0.001 | 0.013 |
| Weight, kg | 634 | 588 | 688 | 593 | 90.4 | 0.120 | < 0.001 | 0.102 |
| Period 1 | | | | | | | | |
| BCS | 2.27 | 2.14 | 3.14 | 2.58 | 0.495 | < 0.001 | 0.007 | 0.064 |
| Weight, kg | 638 | 594 | 676 | 595 | 80.9 | 0.395 | 0.009 | 0.383 |
| Period 2 | | | | | | | | |
| BCS | 2.18 | 1.94 | 2.88 | 2.47 | 0.500 | < 0.001 | 0.002 | 0.401 |
| Weight, kg | 605 | 559 | 642 | 571 | 72.9 | 0.208 | 0.004 | 0.501 |
| Period 3 | | | | | | | | |
| BCS | 2.08 | 1.93 | 2.98 | 2.54 | 0.443 | < 0.001 | 0.003 | 0.070 |
| Weight, kg | 616 | 579 | 660 | 574 | 67.8 | 0.287 | 0.001 | 0.151 |
| Period 4 | | | | | | | | |
| BCS | 2.14 ^{bc} | 2.00 ^c | 3.28 ^a | 2.37 ^b | 0.419 | < 0.001 | < 0.001 | < 0.001 |
| Weight, kg | 651 ^b | 612 ^{bc} | 738 ^a | 599 ^c | 59.4 | 0.030 | < 0.001 | 0.002 |

⁽¹⁾ HO: Holstein Cows ; ⁽²⁾ NO: Normande Cows ; ⁽³⁾ RMSE: Root mean square error

⁽⁴⁾ HFS: High Feeding System ; ⁽⁵⁾ LFS: Low Feeding System

^{a-c} Means in the same row with no common superscript differ (P<0.05)

Milk fat globule size. Effects of breed and FS on MFG size were different according to periods and milking times throughout lactation. MFG were significantly larger for NO cows than for HO cows in evening milks during period 1 ($d_{4,3}$: + 0.27 μm) (Table 6), in morning milks during period 2 ($d_{4,3}$: + 0.31 μm) and in morning and evening milks during periods 3 and 4 (for period 3, $d_{4,3}$: + 0.41 and + 0.39 μm , for period 4, $d_{4,3}$: + 0.40 and + 0.27 μm respectively for morning and evening milks) (Tables 5, 6, and 7). MFG was smaller for HFS compared to LFS in morning milks during periods 1 and 3 (- 0.30 and - 0.24 μm respectively) (Tables 6 and 8). No significant effect of FS was detected during period 2 (Table 7). During period 4, MFG was larger for HFS in morning and evening milkings (+ 0.23 and + 0.33 μm respectively) (Table 8).

Table 5. Effect of breed and feeding strategy on milk fat characteristics during period 1

| | | HO ⁽¹⁾ | | NO ⁽²⁾ | | RMSE ⁽⁵⁾ | p-value | | |
|---------------------------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|---------|--------|----------|
| | | HFS ⁽³⁾ | LFS ⁽⁴⁾ | HFS ⁽³⁾ | LFS ⁽⁴⁾ | | Breed | FS | Breed×FS |
| <i>Milk fat characteristics</i> | | | | | | | | | |
| SL ⁽⁸⁾ | | | | | | | | | |
| | MM ⁽⁶⁾ | 0.31 | 0.48 | 0.24 | 0.28 | 0.112 | 0.034 | 0.122 | 0.109 |
| | EM ⁽⁷⁾ | 0.36 | 0.82 | 0.22 | 0.40 | 0.154 | 0.004 | 0.001 | 0.555 |
| iFFA ⁽⁹⁾ | | | | | | | | | |
| | MM ⁽⁶⁾ | 0.14 | 0.13 | 0.13 | 0.11 | 0.027 | 0.051 | 0.101 | 0.580 |
| | EM ⁽⁷⁾ | 0.12 | 0.15 | 0.12 | 0.11 | 0.036 | 0.072 | 0.579 | 0.071 |
| d _{4,3} ⁽¹⁰⁾ , μm | | | | | | | | | |
| | MM ⁽⁶⁾ | 3.80 | 4.28 | 4.20 | 4.32 | 0.557 | 0.112 | 0.028 | 0.152 |
| | EM ⁽⁷⁾ | 3.87 | 4.28 | 4.29 | 4.40 | 0.681 | 0.094 | 0.113 | 0.356 |
| <i>Milk fatty acid proportion, %</i> | | | | | | | | | |
| SFA ⁽¹¹⁾ , % | | | | | | | | | |
| | MM ⁽⁶⁾ | 69.2 | 66.0 | 73.7 | 73.5 | 0.42 | <0.001 | 0.099 | 0.115 |
| | EM ⁽⁷⁾ | 66.6 | 61.8 | 72.7 | 70.3 | 0.42 | <0.001 | 0.011 | 0.218 |
| MUFA ⁽¹²⁾ , % | | | | | | | | | |
| | MM ⁽⁶⁾ | 27.1 | 31.2 | 23.0 | 23.8 | 0.42 | <0.001 | 0.017 | 0.076 |
| | EM ⁽⁷⁾ | 29.8 | 34.7 | 23.9 | 26.5 | 0.40 | <0.001 | 0.004 | 0.197 |
| cis9 C18:1, % | | | | | | | | | |
| | MM ⁽⁶⁾ | 17.3 ^b | 22.5 ^a | 14.8 ^c | 15.9 ^c | 0.41 | <0.001 | 0.002 | 0.022 |
| | EM ⁽⁷⁾ | 20.5 | 26.1 | 15.7 | 18.6 | 0.39 | <0.001 | <0.001 | 0.138 |

⁽¹⁾ HO: Holstein Cows ; ⁽²⁾ NO: Normande Cows

⁽³⁾ HFS: High Feeding System ; ⁽⁴⁾ LFS: Low Feeding System

⁽⁵⁾ RMSE: Root mean square error

⁽⁶⁾ MM: Morning milkings ; ⁽⁷⁾ EM: Evening milkings

⁽⁸⁾ SL: Spontaneous lipolysis, mEq/ 100 g of fat

⁽⁹⁾ iFFA: initial free fatty acids, mEq/100 g of fat

⁽¹⁰⁾ d_{4,3}: $\sum(N_i \times d_i^4) / \sum(N_i \times d_i^3)$, volume weighted diameter, where Ni is the number of fat globules in a size class of diameter di

⁽¹¹⁾ SFA: Saturated Fatty Acid

⁽¹²⁾ MUFA: Monounsaturated Fatty Acid

^{a-c} Means in the same row with no common superscript differ (P<0.05)

Table 6. Effect of breed and feeding strategy on milk fat characteristics during period 2

| | | HO ⁽¹⁾ | | NO ⁽²⁾ | | RMSE ⁽⁵⁾ | p-value | | |
|---------------------------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|---------|-------|----------|
| | | HFS ⁽³⁾ | LFS ⁽⁴⁾ | HFS ⁽³⁾ | LFS ⁽⁴⁾ | | Breed | FS | Breed×FS |
| <i>Milk fat characteristics</i> | | | | | | | | | |
| SL ⁽⁸⁾ | | | | | | | | | |
| | MM ⁽⁶⁾ | 0.19 | 0.13 | 0.16 | 0.12 | 0.129 | 0.525 | 0.066 | 0.785 |
| | EM ⁽⁷⁾ | 0.26 | 0.27 | 0.21 | 0.18 | 0.178 | 0.170 | 0.808 | 0.644 |
| iFFA ⁽⁹⁾ | | | | | | | | | |
| | MM ⁽⁶⁾ | 0.15 | 0.13 | 0.16 | 0.12 | 0.035 | 0.502 | 0.012 | 0.241 |
| | EM ⁽⁷⁾ | 0.20 | 0.17 | 0.18 | 0.14 | 0.032 | 0.034 | 0.005 | 0.232 |
| d _{4,3} ⁽¹⁰⁾ , μm | | | | | | | | | |
| | MM ⁽⁶⁾ | 3.62 | 3.79 | 4.13 | 3.89 | 0.535 | 0.012 | 0.115 | 0.752 |
| | EM ⁽⁷⁾ | 3.90 | 4.08 | 4.12 | 4.27 | 0.647 | 0.103 | 0.196 | 0.868 |
| <i>Milk fatty acid proportion, %</i> | | | | | | | | | |
| SFA ⁽¹¹⁾ , % | | | | | | | | | |
| | MM ⁽⁶⁾ | 64.5 | 64.9 | 67.5 | 67.0 | 0.32 | <0.001 | 0.954 | 0.498 |
| | EM ⁽⁷⁾ | 62.2 | 62.2 | 64.5 | 64.0 | 0.32 | 0.009 | 0.750 | 0.708 |
| MUFA ⁽¹²⁾ , % | | | | | | | | | |
| | MM ⁽⁶⁾ | 31.3 | 31.1 | 28.6 | 29.2 | 0.29 | <0.001 | 0.854 | 0.520 |
| | EM ⁽⁷⁾ | 34.0 | 34.0 | 31.8 | 32.2 | 0.30 | 0.006 | 0.794 | 0.746 |
| cis9 C18:1, % | | | | | | | | | |
| | MM ⁽⁶⁾ | 21.3 | 21.4 | 19.3 | 20.3 | 0.24 | 0.006 | 0.329 | 0.388 |
| | EM ⁽⁷⁾ | 24.2 | 24.5 | 22.5 | 23.0 | 0.26 | 0.010 | 0.502 | 0.859 |

⁽¹⁾ HF: Holstein Cows ; ⁽²⁾ NO: Normande Cows

⁽³⁾ HFS: High Feeding System ; ⁽⁴⁾ LFS: Low Feeding System

⁽⁵⁾ RMSE: Root mean square error

⁽⁶⁾ MM: Morning milkings ; ⁽⁷⁾ EM: Evening milkings

⁽⁸⁾ SL: Spontaneous lipolysis, mEq/ 100 g of fat

⁽⁹⁾ iFFA: initial free fatty acids, mEq/100 g of fat

⁽¹⁰⁾ d_{4,3}: $\sum(N_i \times d_i^4) / \sum(N_i \times d_i^3)$, volume weighted diameter, where N_i is the number of fat globules in a size class of diameter d_i

⁽¹¹⁾ SFA: Saturated Fatty Acid

⁽¹²⁾ MUFA: Monounsaturated Fatty Acid

Table 7. Effect of breed and feeding strategy on milk fat characteristics during period 3

| | | HO ⁽¹⁾ | | NO ⁽²⁾ | | RMSE ⁽⁵⁾ | p-value | | |
|---------------------------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|---------|-------|----------|
| | | HFS ⁽³⁾ | LFS ⁽⁴⁾ | HFS ⁽³⁾ | LFS ⁽⁴⁾ | | Breed | FS | Breed×FS |
| <i>Milk fat characteristics</i> | | | | | | | | | |
| SL ⁽⁸⁾ | | | | | | | | | |
| | MM ⁽⁶⁾ | 0.24 | 0.22 | 0.11 | 0.13 | 0.106 | <0.001 | 0.789 | 0.408 |
| | EM ⁽⁷⁾ | 0.57 | 0.54 | 0.23 | 0.31 | 0.121 | <0.001 | 0.498 | 0.296 |
| iFFA ⁽⁹⁾ | | | | | | | | | |
| | MM ⁽⁶⁾ | 0.16 | 0.19 | 0.12 | 0.13 | 0.036 | <0.001 | 0.063 | 0.474 |
| | EM ⁽⁷⁾ | 0.19 | 0.16 | 0.15 | 0.12 | 0.030 | <0.001 | 0.008 | 0.804 |
| d _{4,3} ⁽¹⁰⁾ , μm | | | | | | | | | |
| | MM ⁽⁶⁾ | 3.22 | 3.50 | 3.67 | 3.86 | 0.655 | 0.001 | 0.050 | 0.673 |
| | EM ⁽⁷⁾ | 3.33 | 3.38 | 3.66 | 3.83 | 0.375 | <0.001 | 0.222 | 0.500 |
| <i>Milk fatty acid proportion, %</i> | | | | | | | | | |
| SFA ⁽¹¹⁾ , % | | | | | | | | | |
| | MM ⁽⁶⁾ | 66.0 | 66.5 | 68.3 | 67.6 | 0.39 | 0.068 | 0.545 | 0.943 |
| | EM ⁽⁷⁾ | 65.6 | 65.9 | 67.3 | 67.9 | 0.38 | 0.040 | 0.601 | 0.887 |
| MUFA ⁽¹²⁾ , % | | | | | | | | | |
| | MM ⁽⁶⁾ | 30.2 | 29.6 | 28.9 | 28.0 | 0.12 | 0.100 | 0.359 | 0.857 |
| | EM ⁽⁷⁾ | 30.7 | 30.1 | 29.4 | 28.6 | 0.11 | 0.076 | 0.402 | 0.883 |
| cis9 C18:1, % | | | | | | | | | |
| | MM ⁽⁶⁾ | 20.6 | 19.3 | 19.5 | 18.7 | 0.29 | 0.229 | 0.130 | 0.737 |
| | EM ⁽⁷⁾ | 20.8 | 19.6 | 19.9 | 19.5 | 0.29 | 0.462 | 0.222 | 0.549 |

⁽¹⁾ HF: Holstein Cows ; ⁽²⁾ NO: Normande Cows

⁽³⁾ HFS: High Energy Diet ; ⁽⁴⁾ LFS: Low Energy Diet

⁽⁵⁾ RMSE: Root mean square error

⁽⁶⁾ MM: Morning milkings ; ⁽⁷⁾ EM: Evening milkings

⁽⁸⁾ SL: Spontaneous lipolysis, mEq/ 100 g of fat

⁽⁹⁾ iFFA: initial free fatty acids, mEq/100 g of fat

⁽¹⁰⁾ d_{4,3}: $\sum(N_i \times d_i^4) / \sum(N_i \times d_i^3)$, volume weighted diameter, where N_i is the number of fat globules in a size class of diameter d_i

⁽¹¹⁾ SFA: Saturated Fatty Acid

⁽¹²⁾ MUFA: Monounsaturated Fatty Acid

Table 8. Effect of breed and feeding strategy on milk fat characteristics during period 4

| | | HO ⁽¹⁾ | | NO ⁽²⁾ | | RMSE ⁽⁵⁾ | p-value | | |
|--------------------------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|---------|-------|----------|
| | | HFS ⁽³⁾ | LFS ⁽⁴⁾ | HFS ⁽³⁾ | LFS ⁽⁴⁾ | | Breed | FS | Breed×FS |
| <i>Milk fat characteristics</i> | | | | | | | | | |
| SL ⁽⁸⁾ | | | | | | | | | |
| | MM ⁽⁶⁾ | 0.85 | 0.84 | 0.18 | 0.39 | 0.196 | <0.001 | 0.168 | 0.112 |
| | EM ⁽⁷⁾ | 1.60 | 1.71 | 0.47 | 0.78 | 0.148 | <0.001 | 0.214 | 0.267 |
| iFFA ⁽⁹⁾ | | | | | | | | | |
| | MM ⁽⁶⁾ | 0.21 | 0.22 | 0.16 | 0.18 | 0.019 | 0.002 | 0.229 | 0.710 |
| | EM ⁽⁷⁾ | 0.19 ^A | 0.22 ^A | 0.15 ^B | 0.17 ^B | 0.035 | 0.018 | 0.095 | 0.803 |
| d _{4,3} , μm | | | | | | | | | |
| | MM ⁽⁶⁾ | 3.43 | 3.08 | 3.71 | 3.60 | 0.389 | <0.001 | 0.051 | 0.254 |
| | EM ⁽⁷⁾ | 3.61 | 3.26 | 3.86 | 3.55 | 0.499 | 0.046 | 0.030 | 0.881 |
| <i>Milk fatty acid proportion, %</i> | | | | | | | | | |
| SFA ⁽¹¹⁾ , % | | | | | | | | | |
| | MM ⁽⁶⁾ | 69.5 | 69.7 | 68.3 | 70.9 | 0.31 | 0.999 | 0.109 | 0.134 |
| | EM ⁽⁷⁾ | 69.4 | 69.6 | 69.0 | 70.8 | 0.28 | 0.601 | 0.200 | 0.252 |
| MUFA ⁽¹²⁾ , % | | | | | | | | | |
| | MM ⁽⁶⁾ | 27.4 | 27.0 | 28.4 | 25.8 | 0.27 | 0.848 | 0.058 | 0.102 |
| | EM ⁽⁷⁾ | 27.4 | 27.3 | 27.9 | 26.1 | 0.25 | 0.625 | 0.154 | 0.217 |
| cis9 C18:1, % | | | | | | | | | |
| | MM ⁽⁶⁾ | 19.7 ^a | 18.4 ^b | 19.8 ^a | 17.4 ^b | 0.26 | 0.515 | 0.031 | 0.357 |
| | EM ⁽⁷⁾ | 20.2 ^a | 19.0 ^b | 19.8 ^a | 17.4 ^b | 0.25 | 0.148 | 0.017 | 0.264 |

⁽¹⁾ HF: Holstein Friesian ; ⁽²⁾ NO: Normande Cows

⁽³⁾ HFS: High Energy Diet ; ⁽⁴⁾ LFS: Low Energy Diet

⁽⁵⁾ RMSE: Root mean square error

⁽⁶⁾ MM: Morning milkings ; ⁽⁷⁾ EM: Evening milkings

⁽⁸⁾ SL: Spontaneous lipolysis, mEq/ 100 g of fat

⁽⁹⁾ iFFA: initial free fatty acids, mEq/100 g of fat

⁽¹⁰⁾ d_{4,3}: $\sum(N_i \times d_i^4) / \sum(N_i \times d_i^3)$, volume weighted diameter, where N_i is the number of fat globules in a size class of diameter d_i

⁽¹¹⁾ SFA: Saturated Fatty Acid

⁽¹²⁾ MUFA: Monounsaturated Fatty Acid

Fatty acid proportions. SFA percentage was higher for NO cows compared to HO cows in morning and evening milks during periods 1, 2 and 3 (Period 1: + 6.0 and + 7.3%; period 2: + 2.6 and + 2.1%; period 3: +1.7 and 1.9% respectively in morning and evening milks) (Tables 6, 7 and 8). MUFA percentage was lower for NO cows compared to HO cows during periods 1 and 2 and tended to be lower during period 3 in morning and evening milks (Period 1: + 5.8 and + 7.1%; period 2: + 2.3 and + 2.0% and period 3: - 1.5 and -1.4% respectively for morning and evening milks) (Tables 5 and 6). *Cis9* C18:1 percentage was lower for NO cows in morning and evening milkings during periods 1 and 2 (Period 1: - 6.2 and - 4.6% and period 2: - 1.6 and - 1.6% respectively for morning and evening milks) (Tables 5 and 6).

FS had no significant effect on SFA content except during period 1: SFA percentage tended to be higher in HFS compared to LFS in morning milks and was higher in evening milks (+ 1.7 P=0.099 and + 3.6% respectively for morning and evening milks). MUFA percentage was lower in HFS in morning and evening milks (- 2.5 and - 3.8% respectively) during period 1 and tended to be higher for HFS in morning milks in period 4 (+ 1.5%, P=0.058). During period 1, *cis9* C18:1 percentage was lower for HFS in morning and evening milks (- 1.8 and - 1.8% respectively) (Table 5). During period 4, *cis9* C18:1 percentage was higher in HFS in morning and evening milks (+ 1.9 and + 1.8% respectively) (Table 9).

Factors affecting milk spontaneous lipolysis

Milking time. SL was significantly higher in evening milkings compared to morning milkings during the whole experimentation period (0.81 vs 0.57 mEq/100 g fat, P < 0.001).

Parity. During the entire lactation, no effect of parity was detected on SL in morning milks (P=0.180) but, in evening milks, SL was higher in multiparous cows during period 1 (+ 0.18 mEq/100 g of fat; P=0.038) and lower during periods 3 and 4 (- 0.17 mEq/100 g of fat; P=0.024 and - 0.66 mEq/100 g of fat; P=0.018 respectively).

No significant interaction between breed and FS effects had been identified on SL.

Breed. SL was higher for HO cows compared to NO cows in periods 1, 3 and 4 (+ 0.13, + 0.11, + 0.57 mEq/100 g of fat in morning milks and + 0.28, + 0.28, + 0.40 mEq/100 g of fat in evening milks, respectively for periods 1, 3 and 4) (Tables 6, 8, and 9).

Feeding systems. FS did not affect SL throughout lactation for morning or evening milks except for a lower value in HFS (- 0.32 mEq/100 g of fat) in evening milking during period 1.

Period. To facilitate further interpretation, we recall that the four periods in our trial are defined as follows: period 1 corresponds to winter, early lactation, winter diets; period 2 correspond to spring, mid lactation, pasture; period 3 correspond to summer, mid lactation, pasture and period 4 correspond to autumn, late lactation. In morning milks, there was a period × breed interaction and no period × FS interaction (Figure 2). For HO cows, SL decreased from period 1 to period 2 (-

0.24 mEq/100g of fat), was low and stable during periods 2 and 3 and increased from period 3 to period 4 (+0.40 mEq/100g of fat). For NO cows, SL decreased from period 1 to period 2 (-0.19 mEq/100g of fat) and was low and stable during periods 2, 3 and 4 (Figure 2). In evening milks, there were a period × breed and a period × FS interaction. In HO-HFS, SL increased during periods 3 and 4 (+0.25 and +1.11 mEq/100 g of fat compared to period 1). In HO-LFS, SL decreased from period 1 to period 2 (-0.55 mEq/100 g fat) and increased during periods 3 and 4 (+0.35 and +1.00 mEq/100 g of fat compared to period 2). In NO-HFS, SL was low and stable during periods 1, 2 and 3 and slightly increased during period 4 (+0.12 mEq/100g of fat compared to period 3). In NO-LFS, SL decreased from period 1 to period 2 (-0.24 mEq/100g of fat) and increased during periods 3 and 4 (respectively +0.16 mEq/100 g of fat and +0.30 mEq/100 g of fat compared to period 2).

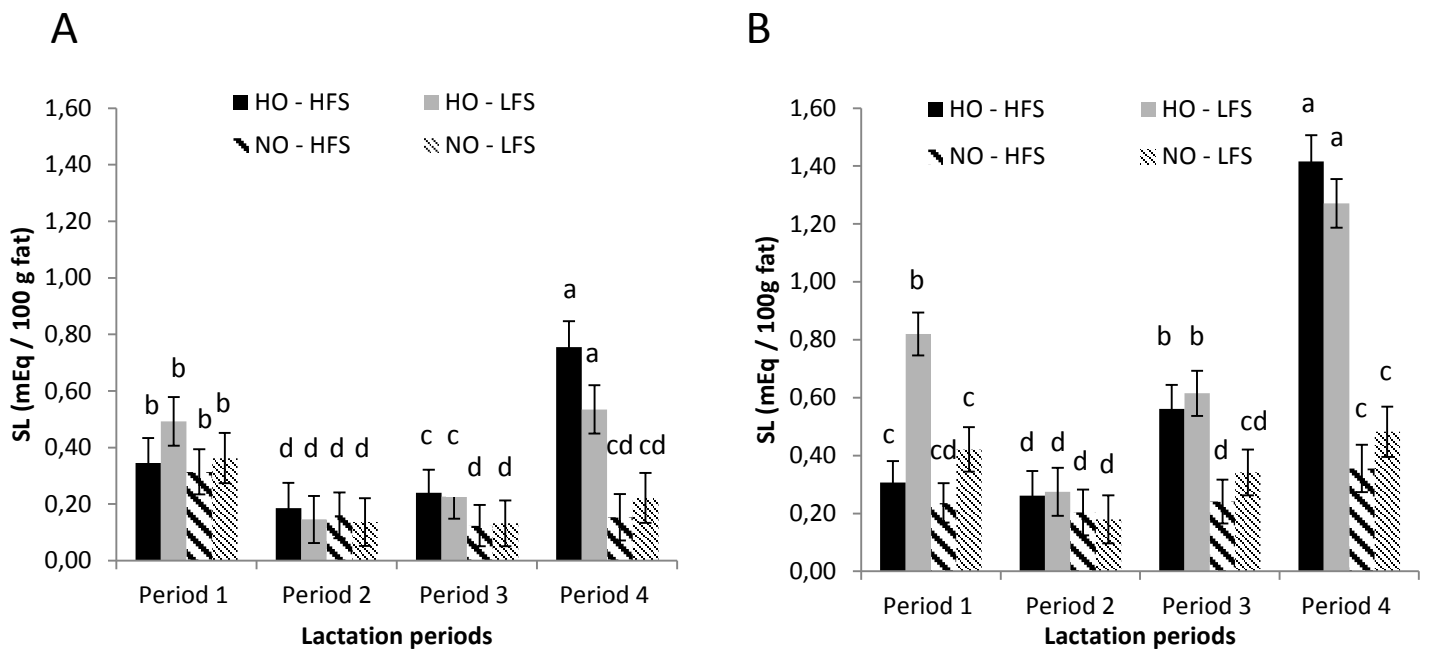


Figure 2. Effect of lactation period (LPeriod) on milk spontaneous lipolysis. A- In morning milks B- In evening milks. The effects of breed, feeding systems and period are noticed by a-e: means in the same row with no common superscript differ ($P < 0.05$).

Correlations between spontaneous lipolysis, milk composition and animal characteristics.

During period 1, a high correlation between estimated means by groups (NO-HFS, NO-LFS, HO-HFS, HO-LFS) of SL and *cis9* C18:1 was found in morning and evening milks ($R^2 = 0.89$; $P < 0.001$) (Figure 3). Poor correlations inter-treatments, inter-cows among lactation and among periods ($R^2 < 0.16$) were found between SL and milk yield and milk composition (i.e., fat content, protein content, SCS, lactose content, MFG size, SFA, C16:0, C18:0, MUFA, *cis* 9 C18:1, PUFA, β -CN, α 1-CN, α 2-CN, κ -CN, β -LG, α -LA) and animal characteristics (weight, BCS).

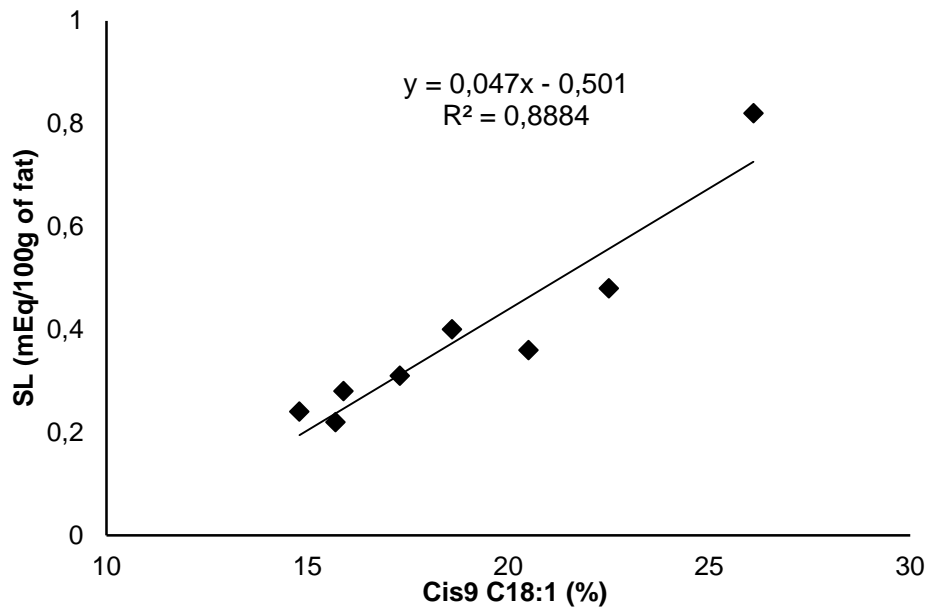


Figure 3. Correlation between *cis9* C18:1 and SL during morning and evening milks in period 1. Mean values of *cis9* C18:1 and SL were estimated by groups (NO-HFS, NO-LFS, HO-HFS, HO-LFS) by SAS mixed procedure.

DISCUSSION

Effect of breed, feeding system and lactation stage on milk traits and animal characteristics.

Comparison of NO and HO in terms of milk yield, milk solid content, BCS and weight were consistent with the literature. As expected, under the same FS, NO cows, compared to HO cows, had lower milk yield, but the milk was richer in protein and fat contents (Dillon et al., 2003; Delaby et al., 2009; Hurtaud et al., 2009), except in early lactation in period 1. BCS was superior in NO cows compared to HO cows (Dillon et al., 2003; Walsh et al., 2008).

Feeding treatments had a strong effect on milk yield, milk fat and milk protein yields although partially offset in period 4, at the end of lactation. Strong effect of feeding treatments has also been shown on BCS and weight. LFS reduced milk yield, due to feeding restriction as previously shown in literature, whatever the forage based diet (Delaby et al., 2009; Hurtaud et al., 2009; Burke et al., 2010). LFS reduced protein yield and the difference in protein yields between both FS was higher than in literature (during period 1: - 341 g/d in our trial compared to - 213 g/d and -204 g/d in Hurtaud et al. (2009) and Delaby et al. (2009), respectively). These differences could be explained by the highest differences in milk yields. Fat content was higher in LFS during period 1 and remain unchanged otherwise. However fat yield was lower in LFS during the entire lactation. These results are consistent with Gross et al. (2011) for mid lactation but differ from Hurtaud et al. (2009), Delaby

et al. (2009) and Burke et al. (2010) who found a decrease in fat content and fat yield in similar feeding conditions. In our trial, the higher fat content in LFS in early lactation could be explained by the difference in milk yields as already mentioned in the explanation about the protein contents. As expected, BCS and weight were higher in HFS compared LFS during the entire lactation (Delaby et al., 2009; Hurtaud et al. 2009).

Effect of breed, feeding system and lactation stage on milk fat characteristics

Breed. NO cows secreted larger MFG. These results are consistent with the literature (Couvreur et al., 2006; Hurtaud et al., 2009; Logan et al., 2014) and the differences between breeds were more significant in late lactation.

NO cows produced milk with higher SFA content and lower MUFA content. Particularly during periods 1 and 2, NO milks contained less *cis*9 C18:1 than HO milks. Although Hurtaud et al. (2009) and Couvreur et al. (2006b) showed that milk FA profiles differed in both breeds, they did not find any difference in SFA, MUFA or *cis* 9 C18:1 contents. In our trial, lower *cis*9 C18:1 and MUFA contents can be explained by lower body fat mobilization rate in NO cows, in accordance with Dillon et al. (2003), Van Kneysel et al. (2005) and Delaby et al. (2009).

Feeding system. Milk fat globules were larger in LFS during periods 1 and 3. Contrary to Couvreur et al. (2004), we observed an increase in MFG size in case of feeding restriction. Actually, as secretion of caseins and lipids involved joined mechanism pathways, lower protein secretion in LFS could lead to lower plasmic membrane availability that lead to larger MFG secretion (Couvreur and Hurtaud, 2016). MFG size is also known to be modulated by nature of forage: conserved and fresh grass based diets are known to lead to MFG size reduction, compared to corn silage based diets (Couvreur et al., 2007; Lopez et al., 2010). During period 1, cows from LFS, based on conserved grass, presented larger MFG, suggesting a more important impact of feed restriction compared to nature of forage on MFG secretion mechanisms. These results are not consistent with Hurtaud et al. (2009) in the same conditions. During period 2, both LFS and HFS were fed with high quality pasture and cows in LFS may have eaten more, compensating for the difference in the diets' energy levels, and reducing its impact on MFG size. During period 4, MFG were smaller in LFS due to nature of forage and we found lower differences in diets' energy levels.

LFS was associated with higher MUFA and *cis*9 C18:1 contents and lower SFA contents during period 1. This can be due to a higher body fat mobilization linked with reduced nutrient inputs in early lactation (Chilliard et al., 2001; Delaby et al., 2009; Gross et al., 2011). Nature of provided forage can also explain the difference in FA profiles between HFS and LFS during period 1 (more MUFA and PUFA contents in milk with grass silage vs corn silage) (Hurtaud et al., 2002; Couvreur et al., 2006).

Effect of milking time, feeding system, breed and parity on milk spontaneous lipolysis

Milking time. SL was higher and more fluctuant in evening milks. Very few studies evaluated the impact of milking time on SL. Ahrné and Bjork (1985) found higher levels of SL in evening milks although Bachman et al. (1988) found no difference between morning and evening milks. The difference might be due to the decreased interval (9 vs. 15 h instead of 12 vs. 12 h) between morning and evening milkings (Ahrné and Bjork, 1985; Bachman et al., 1988), or could be explained by circadian rhythms observed in mammals leading to different milk compositions in morning and evening milkings (Giannetto and Picciano, 2009; Plaut and Casey, 2012). Indeed, daily cycle variation in phospholipid composition of human cell membranes had been described by Ruf and Arnold (2015). The determinants of this daily remodeling are not fully understood but as said by these authors, several membrane functions could be affected by changes in membranes phospholipids composition and interaction between milk fat globule membrane (**MFGM**) and LPL could be one of them.

Feeding Systems. SL was slightly impacted by the FS. It was higher in LFS only during period 1, when cows were fed with conserved grass feeding, in evening milks. In the literature, conserved grass is mainly associated with lower LS rate than corn silage (Chilliard, 1982; Ferlay et al., 2006) so we assumed that the difference in SL during period 1 would be explained by the energy level of the diet, as also supported by the positive correlation observed between C18:1, indicator of lipid mobilization, and SL. Period 1 corresponded to early lactation, when cows might have negative energy balance and be more sensitive to feed restriction (de Vries and Veerkamp, 2000; Friggens et al., 2007) as also suggested below by fatty acid profile analysis and BCS and weight evaluation. Feeding restriction (-10 to -20 % of ingested food) increased SL especially in late lactation (Stobbs et al, 1973; Chilliard, 1986; Connolly, 1978; Jellema et al., 1986; O'Brien et al., 1996) and sometimes in early and mid-lactation (Chilliard, 1986). The absence of a significant effect of FS on SL during late lactation in our trial might be due to reduction of the number of dairy cows due to progressive dry off.

Lowest SL levels were observed during pasture periods when cows were in mid-lactation (periods 2 and 3) in agreement with previous studies (Kuzdzal-Savoie et al., 1975; Chazal et al., 1987) and there was no effect of energy supply as previously reported by Thomson et al. (2005). Energy balance and nature of forage had been shown to be responsible for changes in MFGM composition, which could explain SL variations. As described by Lopez et al. (2008), diets richer in PUFA, such as pasture-based diets or linseed-supplemented diets, are associated with higher levels of phospholipids, particularly sphingomyeline and higher levels of PUFA in MFGM. Recently, Lu et al. (2013), using metabolomics approach, found that improved energy balance in cows was associated with higher levels of stomatin, cholesterol and N-acetylated sugar which are major components of lipid rafts in MFGM (Lopez et al., 2010). Improved energy balance was thus associated with a better membrane integrity,

according to these authors. We can assume that changes in membrane composition of MFG could modulate MFG integrity or proportion of LPL linked to the MFGM, modulating SL levels in milk.

Breed. Milk SL was higher for HO cows compared to NO during the entire lactation (except period 2). An effect of cow breed has already been reported in various experiments comparing HO and Montbéliarde (Chilliard, 1982; Chazal et al., 1987), HO and Jersiaise (Bachman et al., 1988), Montbéliarde and Tarentaise (Ferlay et al., 2006). In these trials, HO and Montbéliarde cows had the same level of SL, Jersiaise cows presented lower levels of SL than HO and Tarentaise cows presented lower levels of SL than Montbéliarde. In our case, the lower SL levels in NO cows could be attributed to genetics (Vanbergue et al., 2016) and/or to the difference of lipid metabolism between both breeds, illustrated by different energy partitions, with higher susceptibility to negative energy balance and adipose tissue mobilization for HO cows, as also suggested by fatty acid profile, with higher levels of *cis9* C18:1 for HO cows (Delaby et al., 2009; Hurtaud et al., 2009). As previously discussed, the positive correlation between *cis9* C18:1 and SL would support this argument.

Parity. Multiparous cows were more sensitive to SL in early lactation and less sensitive in mid and late lactation. This is consistent with Connolly (1978) and Chilliard and Lamberet (1984) who found lower SL in multiparous cows' milks. The higher sensitivity of multiparous cows in early lactation could be explained by higher milk production leading to more negative energy balances and higher adipose tissue mobilization (McNamara et al., 1987; Berry et al., 2008; Delaby et al., 2009) as also supported by *cis9* C18:1 variations according to parity in our trial (data not shown).

Period effects. The period effect partly reflects the effect of the stage of lactation in this study. The increase in SL in period 4 when cows are in late lactation is consistent with literature (Chazal and Chilliard, 1986; Arhné and Bjorck, 1985). The higher levels of SL in period 1 when cows were in early lactation compared to period 2 could be explained by the negative energy balance around lactation peak, in agreement with Kuzdzal-Savoie et al. (1975) and Chazal et al. (1987), as previously discussed in the manuscript. The higher sensitivity to lactation stage of evening milks compared to morning milks have already been described by Arhné and Bjorck (1985).

Correlation between milk spontaneous lipolysis, milk composition and animal characteristics.

High correlation between SL and *cis9* C18:1 was found in period 1 and supported the assumed link between energy balance/tissue mobilization and SL when cows had negative energy balance. No global correlation and no inter-treatments and inter-cows correlations among lactation and among period were found between fat content, protein content and SL. This result is consistent with literature (Chilliard and Cartier, 1990; Stadnik et al., 2015). Concerning MFG size, it happened to move in the same direction as SL in some trials (Murphy et al., 1979; Wiking et al., 2006) but we

found no direct correlation between MFG size and SL. No correlations were found between SL and milk major fatty acids and major proteins. To our knowledge, it is the first time that such correlations have been tested.

CONCLUSION

Effects of feeding systems, breed, parity and lactation stage and the interaction between these factors were identified, thus giving a more comprehensive view of the factors affecting SL at farm scale. These results will help advise the actors of the milk chain. SL is low at pasture, increases in case of energy deficit, which is often the case in early lactation, but also increases at the end of lactation. NO cows are less susceptible to SL than HO cows. SL was systematically higher in evening milks compared to morning milks, which could reflect the existence of a circadian clock in mammary gland. The mechanisms controlling these effects were not clarified but apart from the circadian effect, the role of MFGM may be central. Metabolomics approaches would enable to precise the role of minor milk metabolites and the milk fat globule membrane in the milk lipolytic system.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the all staff of the experimental farm at le Pin-au-Haras (DEP, INRA, 61310, EXMES, France): S. Blandamour, S. Boulan, B. Camps, Y. Carbonnier, J-L. Deust, J. Gentil, S. Gressin, L. Leloup, D. Pichonat, L. Vandenbroucke, for the herd management and for their assistance with milk sampling. We are also grateful to P. Debournoux, N. Huchet, C.Perrier, and LILANO (Laboratoire Interprofessionnel Laitier de Normandie, Saint Lô, France) for technical assistance. Thanks are also due to the Join Technical Unit of Research and Ingeneering on dairy farming (UMT RIEL, Rennes, France) for the constructive exchanges and to Marine Gelé (Institut de l’Elevage, Monvoisin, 35910, Le Rheu) for fatty acid and protein profiles determination. The authors also thank Gwen Christiansen (INRA-UMR Agroécologie innovation et territoire (AGIR), Castanet Tolosan, France) for her fine work correcting the English in the manuscript. This research received financial support from the CNIEL (Centre National Interprofessionnel de l’Economie Laitière, Paris, France).

REFERENCES

Les références sont fournies pour l’ensemble du manuscrit dans la partie « références bibliographiques »

Chapitre 1 - Partie 2

Approche « enquête en élevage » : effets des pratiques d'élevage sur la lipolyse du lait chez la vache laitière

Dans le cadre d'un projet d'étudiants en partenariat avec Agrocampus Ouest, une enquête a été réalisée auprès d'éleveurs adhérant à un organisme de contrôle de performances, appartenant à trois régions dans lesquelles la lipolyse est un critère de paiement du lait : la Bretagne, le Poitou-Charentes et l'Auvergne-Limousin. Un questionnaire a été mis en place pour répondre à deux objectifs : 1) permettre une mise en relation des valeurs de lipolyse mesurées dans le cadre du paiement du lait et les facteurs de variations de la LS et de la lipolyse induite, qui sont indissociables dans le tank et 2) étudier les éventuelles corrélations entre la lipolyse et les paramètres laitiers (TB, TP, CCS). Concernant les facteurs en lien avec la LS, des questions sur la race, la parité, le stade moyen de lactation, les horaires de traite et les rations ont été posées aux éleveurs. Les résultats concernent la campagne 2014-2015. - Voir questionnaire en [annexe 2](#)- Soixante-sept éleveurs ont répondu au questionnaire permettant de dégager des évolutions de la valeur de lipolyse sur une lactation et de mettre en avant des facteurs de variation.

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication sous forme d'affiche au congrès des Rencontres Recherches Ruminants (8-9/12/2016 ; Paris, France – [annexe 3](#))

Enquêtes sur les pratiques d'élevage en relation avec la lipolyse du lait de vache

Investigation of husbandry practices related to milk lipolysis in dairy cattle

PAËS C. (1)*, RENOUARD A. (1)*, TAUSSAT S. (1)*, POULET J-L. (2), HURTAUD C. (1), VANBERGUE E. (1) (2)

**Ces auteurs ont contribué de façon équivalente au projet*

(1) : PEGASE, INRA, Agrocampus Ouest, 35590 Saint Gilles

(2) : Institut de l'Élevage, Monvoisin - BP 85225, 35652 Le Rheu

INTRODUCTION

La lipolyse correspond à la dégradation des triglycérides du lait via l'action de la lipoprotéine lipase. Lorsque la lipolyse est trop importante, la qualité organoleptique des produits laitiers peut être détériorée. En France, cinq Centres Régionaux Interprofessionnels de l'Economie Laitière ont intégré le taux de lipolyse dans les critères de paiement du lait. Dans les 3 jours qui suivent la traite, 2 types de lipolyse coexistent : 1) la lipolyse spontanée, qui correspond à la lipolyse « naturelle » du lait, liée à l'animal et aux systèmes d'élevage, et 2) la lipolyse induite, qui est consécutive aux chocs mécaniques et/ou thermiques subis lors de la traite et du stockage du lait. Cette enquête a eu pour objectif de mieux identifier les différents facteurs associés aux lipolyses spontanée et induite dans 3 régions françaises.

MATERIEL ET METHODES

L'étude s'est déroulée sous forme d'enquêtes téléphoniques auprès d'éleveurs. Seuls les adhérents à un organisme de contrôle de performance officiel, choisis aléatoirement par tirage au sort dans une liste des contrôles Opti'Traite® (**OT**) effectués en 2014 (OT : contrôle technique régulier des machines à traire organisé dans le cadre du COFIT – Comité français interprofessionnel pour les techniques de production du lait) ont été interrogés. L'entretien était divisé en 4 parties : 1) descriptif de l'exploitation et du troupeau (races, proportion de primipares), 2) relevé des données mensuelles de lipolyse, TP, TB et cellules, d'octobre 2014 à septembre 2015, 3) conduite mensuelle du troupeau (alimentation, stades moyens de lactation, productions laitières, horaires de traite) 4) descriptif de l'installation de traite (caractéristiques des manchons trayeurs, lactoduc et pré-refroidisseur). Les données des OT correspondants (mesures de fonctionnement et jugements de satisfaction effectués par un agent qualifié OT : vide de traite, débits, capacité du lactoduc, faisceaux trayeurs, pulsation) ont également été utilisées. Trois régions ont été enquêtées : la Bretagne (**B**), le Poitou-Charentes (**P-C**) et l'Auvergne-Limousin (**A-L**). Les résultats ont été analysés via le logiciel R_{3.2.3} par des modèles linéaires (ANOVA).

RESULTATS ET DISCUSSION

Soixante-sept éleveurs ont répondu à l'enquête. Les valeurs de lipolyse obtenues étaient comprises entre 0,27 et 1,20 mEq/100g de MG, avec une moyenne de 0,61 mEq/100 g de MG. Les principaux facteurs explicatifs de la variabilité du taux de lipolyse mensuel mis en évidence ont été la saison et

l'alimentation, en lien avec la lipolyse spontanée, ainsi que les caractéristiques du lactoduc et l'utilisation d'un pré-refroidisseur, en lien avec la lipolyse induite.

Les taux de lipolyse ont présenté des variations saisonnières, avec des pics estivaux (Figure 1), observés également dans d'autres élevages français (Le Guénic, 2008). Si la chaleur ou la photopériode peuvent expliquer ces pics saisonniers, l'évolution des rations en été est une autre cause possible.

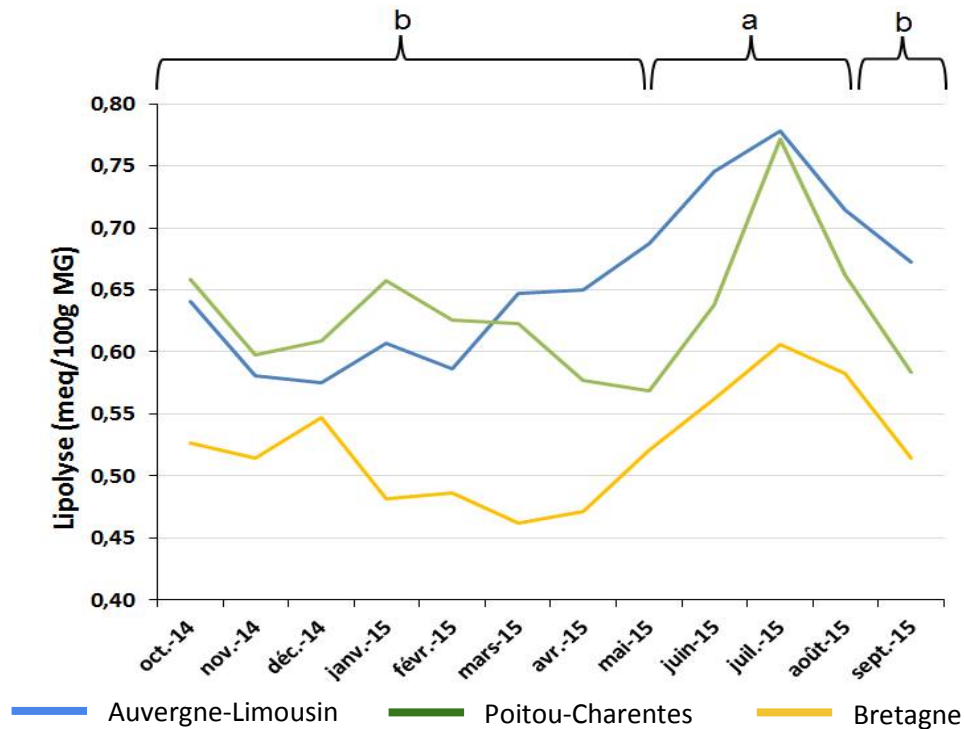


Figure 1 : Variations saisonnières de lipolyse (n=770). Les lettres a et b représentent des différences significatives au seuil de $p < 0,05$.

L'alimentation des vaches laitières affecte en effet la lipolyse des élevages enquêtés ($p < 0,001$). Les rations ayant comme fourrage principal l'herbe fraîche ou l'ensilage de maïs ont été associées à des taux de lipolyse plus élevés que des rations à base d'herbe conservée ou des rations complexes à base d'herbe, d'herbe conservée et d'ensilage de maïs. Dans la littérature, dans le cas de rations équilibrées, l'herbe est associée à de plus faibles taux de lipolyse que l'ensilage de maïs. Le niveau énergétique plus faible des rations à base d'herbe pourrait expliquer une lipolyse élevée (Deeth et Fitzgerald, 2002). Cette hypothèse est corroborée par le fait que les taux de lipolyse soient faibles ($p < 0,05$) lorsque que la ration comporte des concentrés protéiques et énergétiques (tourteau de soja). De même, il a été mis en évidence une corrélation négative entre lipolyse et TP. Même si cette corrélation est faible ($R^2 = 0,13$; $p < 0,001$), elle indique que des taux de lipolyse élevés sont associés à des TP faibles, qui peuvent être dus à un déséquilibre énergétique ou protéique de la ration.

Le fait que le lactoduc de traite soit estimé "satisfaisant" (combinaison pente, diamètre intérieur et état correct) par les techniciens OT a été associé à des taux de lipolyse plus faibles ($p=0,001$). D'autres études ont montré un effet du lactoduc sur la lipolyse : la présence de coudes par exemple augmenterait les niveaux de lipolyse (Park et Haenlein, 2009). Enfin, l'utilisation d'un pré-refroidisseur a été associée à des taux de lipolyse plus faibles ($p=0,036$). Ce résultat est en accord avec d'autres études ayant montré que la température du lait à son arrivée dans le tank (lait chaud sur lait froid) augmente les taux de lipolyse (Deeth et Fitzgerald, 1976).

CONCLUSION

Cette enquête auprès de 67 élevages a permis de recueillir 770 valeurs mensuelles de lipolyse et de les analyser en relation avec différentes pratiques d'élevage. La saison, l'alimentation (nature du fourrage, équilibre de la ration), la conformité du lactoduc de traite et l'utilisation d'un pré-refroidisseur ont été identifiés comme des facteurs de variation de lipolyse.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier chaleureusement les éleveurs enquêtés pour leur patience et disponibilité.

REFERENCES

Les références sont fournies pour l'ensemble du manuscrit dans la partie « références bibliographiques »

Ces deux approches ont permis de réévaluer, dans les troupeaux actuels, l'effet de plusieurs facteurs en lien avec la LS :

- la race : les vaches Normande ont été moins susceptibles à la LS que les vaches Holstein. La race Normande n'avait jamais été étudiée auparavant.

- le stade de lactation : la LS augmente en fin de lactation/gestation, surtout chez les VL Holstein, comme déjà souligné dans les années 80. L'augmentation de la LS en fin de lactation/gestation pourrait être due aux modifications hormonales et physiologiques de la GM. La LS a également été plus élevée en début de lactation. Cette période n'avait pas été détectée comme sensible à la LS dans les années 1970-1980. Cela peut s'expliquer par l'élévation des niveaux de PL qui induirait un déficit énergétique plus important chez VL pendant cette période, potentiellement lié à une augmentation de la LS.

- la parité : les multipares ont été plus susceptibles que les primipares en début de lactation et moins susceptibles en milieu et fin de lactation. La plus grande sensibilité des multipares en début de lactation n'avait pas encore été mise en évidence. Les multipares seraient plus susceptibles en début de lactation car plus fortes productrices que les primipares. Le déficit énergétique associé à cette plus forte PL serait la cause de l'augmentation de la LS.

- le moment de la traite : la LS est plus importante dans les laits issus de la traite du soir que dans les laits issus de la traite du matin.

- l'alimentation : une restriction alimentaire et/ou un déficit énergétique et/ou protéique semblent accentuer la sensibilité à la LS. Cette observation a été faite lors des enquêtes en élevage et par l'approche expérimentale. Pour l'approche expérimentale, cet effet de l'alimentation a surtout été démontré en début de lactation, et n'a pas été retrouvé en milieu de lactation, lorsque les vaches étaient au pâturage. Cela peut s'expliquer par les écarts plus faibles des bilans énergétiques entre les deux lots au pâturage et/ou par une moindre sensibilité à la restriction alimentaire lorsque les VL sont nourries à l'herbe fraîche (déjà observé par Thomson et al., 2005) et en milieu de lactation. Dans cet essai, il est difficile de dissocier les effets de la restriction alimentaire des effets de la nature du fourrage et du stade de lactation. Le pâturage est classiquement associé à des niveaux de LS bas, sauf en cas de restriction drastique des quantités d'herbe offertes, comme cela paraît pouvoir avoir été le cas l'été dans les élevages enquêtés. L'impact de l'ensilage de maïs vs ensilage d'herbe n'a pas pu être clairement identifié. Un schéma expérimental permettant de différencier les effets de la nature du fourrage de la restriction alimentaire a été mis en place et commenté dans le chapitre 3.

- la saison : Comme indiqué par l'interprofession, un pic estival de lipolyse a été mis en évidence dans les enquêtes. Il peut être expliqué à la fois par la saison en elle-même, notamment la chaleur (et/ou

la photopériode) mais également par les variations alimentaires qui ont lieu pendant cette saison. Cet effet n'a pas été observé lors de l'approche expérimentale, peut-être à cause de la confusion d'effets déjà importante.

L'approche expérimentale et l'approche « terrain » nous a également permis de conclure qu'il n'y avait a priori pas de liens forts (corrélations) entre la LS et le TB, TP et la taille des GG ($R^2 < 0.16$).

Chapitre 2

Etude de différents facteurs zootechniques influençant les variations de la lipolyse spontanée chez la VL.

L'objectif du deuxième chapitre de la thèse a été de s'intéresser à des paramètres précis, qui pourraient avoir un effet sur la LS. Cette partie juxtapose des essais parfois assez éloignés en termes de facteurs étudiés. Cependant la démarche et l'approche utilisées les rassemblent. Ces études concerneront : l'interaction entre des effets « génétiques » et « environnementaux » (DGAT-1 x fréquence de traite), l'utilisation de concentrés lipidiques (lin, microalgues) dans la ration, le stade physiologique et le niveau de PL et l'association nature du fourrage - restriction alimentaire.

Chapitre 2 - Partie 1

Effets du polymorphisme K232A du gène *DGAT-1* sur la lipolyse spontanée du lait de vache laitière dans un contexte de variation de la fréquence de traite

Des effets de la génétique de l'animal sur les niveaux de LS ont été suspectés dans plusieurs études sans qu'ils ne soient confirmés. Dans l'essai précédemment mené (chapitre 1, partie 1), les premiers mois de suivis de la lactation avaient permis d'identifier des animaux plus ou moins susceptibles à la LS, renforçant l'intérêt d'un travail sur la génétique.

De par son rôle dans la synthèse et la composition du lait, *DGAT-1* est un gène d'intérêt pour l'étude de la LS. Il code pour l'enzyme diglycérade acyltransférase (**DGAT-1**) qui intervient dans la synthèse des TG du lait. Une substitution de 2 nucléotides successifs GC (Guanine, Cytosine) par AA (Adénine) a induit une substitution de la Lysine (K) par l'Alanine (A) à la position 232 (K232A) de l'enzyme DGAT-1, modifiant ses propriétés fonctionnelles et influençant la composition du lait. L'allèle K est associé à un TB et un TP plus élevés, une PL plus faible, ainsi qu'à des variations de la composition des AG et des protéines du lait.

Les facteurs d'élevage et l'environnement peuvent moduler l'expression génétique. L'alimentation et la fréquence de traite sont connues pour moduler la LS. Si les effets de l'alimentation sur la LS sont complexes à définir et à interpréter, les effets de la fréquence de traite

sont plutôt bien décrits dans la littérature. La réduction de la fréquence de traite entraîne une réduction de la LS et vice versa. La variation de la fréquence de traite a donc été utilisée comme variable de forçage pour évaluer l'interaction entre le polymorphisme du gène *DGAT-1* et les facteurs d'élevage.

Nous avons suivi un essai mis en place dans le cadre du projet RUMINFLAME sur le troupeau du Pin-au-Haras. Vingt et une VL multipares Holstein croisées Normande, en milieu de lactation, ont été réparties en 3 groupes selon leur génotype au locus K232A de *DGAT-1* : KK, KA et AA. L'essai s'est déroulé en 3 périodes successives : une semaine de référence où les vaches étaient conduites en bitraite, suivie de 3 semaines où les vaches étaient conduites en monotraite, et deux semaines où les vaches étaient conduites en bitraite pour pouvoir examiner les éventuels effets résiduels.

Compte tenu du faible nombre d'individus impliqués dans cet essai, nous ne pouvons que supposer l'existence d'interactions entre la génétique des VL et leur environnement d'élevage en relation avec la LS. Cette hypothèse mériterait d'être validée sur un très grand nombre d'animaux.

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans le Journal of Dairy Science (DOI: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-10731>) ainsi que d'une communication orale aux Rencontres Recherches Ruminants (3-4/12/2015, Paris, France – [annexe 4](#))

Effects of *DGAT-1* K232A polymorphism and milking frequency on milk composition and spontaneous lipolysis in dairy cows.

E. Vanbergue^{*†‡}, J.L. Peyraud^{*†}, J. Guinard-Flament^{*†}, C. Charton^{*†#}, S. Barbey[§], R. Lefebvre^{||}, Y. Gallard[§] and C. Hurtaud^{*†1}

*INRA UMR1348 Physiologie, Environnement, Génétique pour l'Animal et les Systèmes d'Élevage (PEGASE), F-35590 Saint-Gilles, France.

†Agrocampus Ouest UMR1348 Physiologie, Environnement, Génétique pour l'Animal et les Systèmes d'Élevage (PEGASE), F-35000 Rennes, France.

‡Institut de l'élevage, Monvoisin, F-35910 Le Rheu, France.

§INRA, Domaine du Pin-au-Haras, F-61310 Exmes, France.

#INRA / INPT ENSAT / INPT ENVY, UMR 1388 Génétique Physiologie Systèmes d'Élevage (GenPhySE), F-31326 Castanet-Tolosan cedex, France.

|| INRA, UMR1313 Génétique Animale et Biologie Intégrative, F- 78352 Jouy en Josas, France.

¹Corresponding author: Catherine Hurtaud, INRA-Agrocampus Ouest UMR1348 Physiologie, Environnement et Génétique pour l'Animal et les Systèmes d'Élevage (PEGASE), F-35590 Saint-Gilles, France

Phone: +33 (0)2 23 48 51 02; Fax: +33 2 23 48 50 80

Email: Catherine.Hurtaud@rennes.inra.fr

ABSTRACT

Milk spontaneous lipolysis (SL) of milk triglycerides is induced by the lipoprotein lipase, a milk native enzyme, and leads to an accumulation of partial glycerides and free fatty acids that are responsible for the deterioration of the taste of milk products. The gene coding for diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1), an enzyme implicated in triglycerides synthesis, has an important polymorphic site at the K232A locus. This gene is well known to modulate milk composition. No data are available on the effects of DGAT1 on SL. Thus, a trial was carried out to evaluate the effects of DGAT1 K232A polymorphism on milk SL upon milking frequency variations [once- (ODM) and twice-daily milking (TDM)]. Twenty-one cows were divided into 3 groups according their DGAT1 K232A genotype: 8 cows had the KK genotype of DGAT1 (KK cows), 8 had the KA genotype (KA cows), and 5 had the AA genotype (AA cows). The trial consisted in 3 successive periods: 3 wk of TDM, 3 of ODM, and 4 of TDM. Samples were collected for fat and protein contents, SL, fatty acid, and protein profiles determinations. The KK cows presented higher fat and protein contents, lower milk production, and higher κ -casein percentage. No significant difference in fatty acid composition was noted between groups. The SL was twice as high for KK cows in TDM situations (1.13 vs. 0.59 and 0.63 mEq/100 g of fat, respectively, for KK, KA, and AA cows during the first period of TDM, and 0.46 vs. 0.25 and 0.21 mEq/100 g of fat, respectively, for KK, KA, and AA during the second period of TDM). The SL remained lower in TDM2 than in TDM1. During ODM, no difference in SL was found between groups and SL remained below 0.2 mEq/100 g of fat. These results demonstrate the existence of a correlation between DGAT1 genotypes and spontaneous lipolysis, in interaction with an environmental factor, milking frequency, although it has not been possible to clarify the causal mechanism at this stage.

Keywords: spontaneous lipolysis, once daily milking, *DGAT-1*, dairy cow, milk composition

Dans la suite du manuscrit, on se réfèrera à cet essai comme à **l'essai *DGAT-1* x monotraite**

INTRODUCTION

Milk lipolysis is the hydrolysis of triglycerides, the major lipid components of milk, by lipoprotein lipase (**LPL**), a milk native enzyme. This leads to an accumulation of partial glycerides and free fatty acids in milk. Short free fatty acids (Scanlan et al., 1965; Moio et al., 1993; Bendall, 2001) are responsible for rancid flavor, unacceptable for consumers, in milk and dairy products such as butter or fresh cream. Free fatty acids are also more susceptible to oxidation, responsible for deterioration of the taste of milk products. Besides, partial glycerides impair milk functionality such as foaming and creaming abilities (Deeth, 2006). As a consequence, lipolysis is an important issue for dairy farms and dairy industries.

Three types of lipolysis are defined: spontaneous, induced, and microbial lipolysis. Spontaneous lipolysis (**SL**) is inherent to the cow and to the husbandry management. Induced lipolysis is a consequence of mechanical and thermal shocks during milking and storage. Microbial lipolysis is due to microorganism contaminations such as *Pseudomonas* (Toušová et al., 2013). Spontaneous lipolysis was widely studied in the 1980s, and it was pointed out that SL depended mainly on feeding system, lactation or gestation stage, breed, and milking frequency (Cartier and Chilliard, 1990). A strong individual effect was also detected by Heuchel and Chilliard (1988): 30 to 40% of the variability of SL was explained by the individuals and this effect was repeatable from lactation to lactation. This suggested a potential genetic determinism of SL.

A gene, *DGAT1*, coding for the enzyme diglycérine acyltransferase 1 (**DGAT1**), catalyzes the last step of triglycerides synthesis in the mammary gland. Cases et al. (1998) identified the *DGAT1* K232A polymorphism in bovine species. A dinucleotide substitution of adenine and adenine (A-A) by guanine and cytosine (G-C) led to a replacement of Lys by Ala in the amino acid chain of the enzyme, changing its functional properties. Besides, milk composition has been shown to be modulated by *DGAT1* genotypes. The *DGAT1* K232 allele is associated with higher fat yield, higher fat content, lower protein yield, higher protein content, and lower milk yield (Grisart et al., 2002; Spelman et al., 2002). The *DGAT1* K232A is also known to modulate milk fatty acid composition: *DGAT1* K232 allele is associated with a larger fraction of SFA and C16:0 and smaller fractions of C14:0, unsaturated C18, and CLA (Schennink et al., 2007). It also modulates protein composition: *DGAT1* K232 allele is associated with lower α S1-CN with 9 phosphorylated serine residues (Bijl et al., 2014; Boichard et al., 2014). The *DGAT1* gene has a strong effect on milk fat content and composition and, therefore, could also modulate SL.

It is also well known that environmental factors and husbandry management, such as milking frequency, can modulate gene expression. In the mammary gland tissue, once-daily milking (ODM) modulates gene expression, leading to a downregulation of secretory activity (Littlejohn et al., 2010;

Boutinaud et al., 2013). Lipoprotein lipase gene is downregulated upon ODM (Littlejohn et al., 2010; Boutinaud et al., 2013) and ODM is associated with lower SL (Rémond and Pomiès, 2005; Pomiès et al., 2007). Environmental and husbandry management could modulate gene expression differently according to gene genotypes. Hence, by changing milking frequency, gene expression could be modulated differently according to DGAT1 genotypes, leading to different component contents and different levels of SL. The objective of the current study was to evaluate the effect of DGAT1 K232A polymorphism on milk production traits and particularly on milk SL in a context of milking frequency variations.

MATERIAL AND METHODS

Protocol was approved by ethics committee under number 01810.02.

Animals, experimental design and diets

Twenty-one multiparous Holstein × Normande crossbred dairy cows in mid lactation were used. Lactation stage at the beginning of the trial was 81 ± 9 d. Cows were divided into 3 groups according to their DGAT1 K232A genotypes. The DGAT1 K232A genotypes were designated as follows: homozygous KK, heterozygous KA, or homozygous AA. Eight cows had the KK genotype (KK cows), 8 cows had the KA genotype (KA cows), and 5 cows had the AA genotype (AA cows). All cows were kept indoors with an average area of 10 m² per cow. The experiment consisted of 3 successive periods: (1) 3 control weeks of twice-daily milking (**TDM1**), (2) 3 wk of ODM, and (3) 4 wk of twice-daily milking (**TDM2**) to examine residual effects. Cows were milked at 0645 and 1630 h in TDM situations and at 0745 h in ODM situations. Cows were fed in groups, and the diet was formulated to meet the requirements of TDM cows (Institut National de la Recherche Agronomique, 1989). Cows were given a complete diet composed of corn silage fed ad libitum, grass silage (4 kg of DM/d), dehydrated beet pulp (2 kg of DM/d), and soybean meal (2 kg of DM/d). In addition, cows received 1 kg of concentrate (30% corn, 29% barley, 13% soybean meal, 10% wheat, 10% wheat bran, 4% molasses, and 4% of minerals) for each 2.5 kg of milk produced daily above 22 kg of milk yield. Animals were weighted and BCS was recorded using the French notation scale of 0 to 5 (Bazin, 1984) at the end of every period (TDM1, ODM, TDM2).

Genotyping

Genotyping was performed on blood samples for all animals of the trial. The DGAT1 K232A polymorphism was genotyped with the Illumina Infinium BovineLD BeadChip (Illumina, San Diego, CA; Boichard et al., 2012).

Milk yield

Milk yield was recorded every day at each milking. For TDM1, the average daily milk production was calculated on the basis of 3 wk for each cow. For ODM, we show data at d 1, 2, 7, and 15 of the experiment, with d 0 corresponding to the first day of ODM. During TDM2, we show data at d 36 and 49.

Sampling

Milk samples. Milk samples were obtained by milking the cows on milk cans at d -20, -18, -13, -11, -6, -4 (TDM1 period), 1, 2, 7, 15, 36, and 49 of the experiment, where d 0 was the first day of ODM. In TDM situations, milk collected at morning and evening milkings was pooled in 60:40 proportions. At each milking, we collected 3 vials of 50 mL of milk for laboratory analyses. Samples for milk composition analyses were kept at 4°C immediately after milking until analyzed. In ODM situation, we collected 3 vials of 50 mL of milk during the morning milking.

Blood samples. Tail blood samples were collected using 5-mL heparinized tubes (VT-050SHL, Venoject, Terumo Europe, Leuven, Belgium) after morning milking on d -4 (TDM1), 1, 2, and 15 of the experiment. Blood was centrifuged at $2,264 \times g$ for 15 min at 4°C, and plasma was removed and stored at -20°C until analysis.

Laboratory analyses

Milk composition analyses were performed from the first vial of 50 mL at the Normandy Interprofessional Milk Analysis Laboratory (LILANO, Saint-Lô, France). Milk fat and protein contents were determined for each day of sampling. For TDM1, the average protein and fat contents were calculated on the basis of the 6 samplings during the 3 wk of TDM1. Milk lactose content, SCC, SFA, C16:0, C18:0, UFA, C18:1, PUFA, total casein, β -CN, α S1-CN, α S2-CN, and κ -CN contents were determined for d -4, 1, 2, 7, 15, 36, and 49. These analyses were performed by mid-infrared spectrometry (MilkoScan FT6000, Foss, Hillerød, Denmark; Ferrand-Calmels et al., 2014; Gelé et al., 2014) and SCC by flow cytometry. The 2 others vials per cow were collected to calculate SL by the difference between free fatty acid contents after 24 h of storage at 4°C and initial free fatty acid contents. Immediately after milking, a 50-mL sample was heated in a water bath at 100°C for 2.5 min to stop lipase activity and then kept at 4°C. A second sample was stored at 4°C for 24 h, then heated and kept at 4°C in the same way. Free fatty acid analyses were performed on both samples by copper soap method (Shipe et al., 1980). Spontaneous lipolysis was determined at d -4, 1, 2, 7, 15, and 36. Plasma lactose, glucose, urea, acetate, nonesterified fatty acids, and BHB contents were assayed using colorimetric enzymatic reaction on 2 replicates as reported in Delamaire and Guinard-Flament (2006).

Calculation and statistical analyses

All statistical analyses on the data set for the 21 cows were performed using SAS software (SAS 9.2 Institute Inc., Cary, NC). The statistical significance threshold was set to $P < 0.05$. Trend was set to $P < 0.10$. Normality of data was checked using the Shapiro-Wilk test of the SAS-package univariate procedure.

The effects of the DGAT-1 genotypes during TDM1, on milk yield and milk composition were analyzed using the SAS GLM procedure, according to the statistical model: $Y_{ij} = \mu + \text{group}_i + \varepsilon_{ij}$ where μ is the mean and Y_{ij} is the dependent variable on the fixed effects of group i (KK, KA, AA) and ε_{ij} is the residual error associated with each ij observation. The effects on the DGAT-1 genotyped cows of TDM/ODM/TDM switches on milk yield, milk composition and blood composition were analyzed using the SAS MIXED procedure for repeated measures, according to the statistical model: $Y_{ijk} = \mu + \text{group}_i + \text{period}_j + \text{group}_i \times \text{period}_j + \varepsilon_{ijk}$, where μ is the mean and Y_{ijk} is the dependent variable on the fixed effects of group i (KK, KA, AA) during period j (TDM1, d1, d2, d7, d15, d36, d49) and their interactions, and ε_{ijk} is the residual error associated with each ijk observation.

RESULTS

Effect of DGAT-1 K232A polymorphism during TDM1

Milk yield and composition. Milk yield was significantly lower for KK and KA cows compared with AA cows (-5.3 and -5.0 kg, respectively; [Table 1](#)). Milk protein content and milk fat content tended to be higher for KK and KA cows compared with AA cows [0.24 and 0.18% for protein content ($P = 0.074$) and 0.63 and 0.49% ($P = 0.082$) for fat content, respectively]. No difference in milk lactose content and SCC was noted between groups. Percentages of SFA, MUFA, PUFA, and C16:0 and C18:0 were not significantly different between groups. Percentage of C18:1 tended to be higher for KA cows (2.2 and 1.7% compared with KK and AA cows, respectively; $P = 0.097$). κ -Casein percentage was higher for KK and KA cows compared with AA cows (0.8 and 0.5%, respectively). We observed no difference in total casein, β -CN, α S1-CN, and α S2-CN percentage. α S1-Casein and κ -CN contents were also higher for KK and KA cows compared with AA cows (0.9 and 0.5 g/L vs. 0.7 and 0.4 g/L, respectively). **Spontaneous lipolysis.** Spontaneous lipolysis was twice higher for KK cows (1.13 vs. 0.59 and 0.63 mEq/100 g of fat, respectively, for KK, KA, and AA cows), although we noted no difference in initial free fatty acids ([Table 1](#)).

Plasma parameters. Plasma nonesterified fatty acids, glucose, urea, and acetate contents were not significantly different. β -Hydroxybutyrate content was higher for KA cows (206.9 and 296.8 $\mu\text{mol/L}$, respectively, compared with KK cows and AA cows; $P = 0.031$) ([Table 2](#))

Body conditions. Weight and BCS were not significantly different ([Table 3](#)).

Table 1. Effect of *DGAT-1* K232A polymorphism on milk production and milk composition during TDM1

| | KK | KA | AA | RMSE ⁽¹⁾ | Effect |
|---------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|---------------------|--------|
| Milk yield (kg) | 26.2 ^a | 26.5 ^a | 31.5 ^b | 3.71 | 0.046 |
| SCC (x10 ³ /ml) | 59 | 44 | 107 | 3.5 | 0.341 |
| Initial FFA ⁽²⁾ | 0.22 | 0.23 | 0.24 | 0.104 | 0.924 |
| LS ⁽²⁾ | 1.13 ^a | 0.59 ^b | 0.63 ^b | 0.550 | 0.035 |
| Milk macronutrients | | | | | |
| Fat content (%) | 4.05 ^a | 3.91 ^a | 3.42 ^b | 0.454 | 0.074 |
| Protein content (%) | 3.09 ^a | 3.03 ^a | 2.85 ^b | 0.173 | 0.082 |
| Fat yield (g/d) | 1057 | 1027 | 1069 | 153.3 | 0.876 |
| Protein yield (g/d) | 810 | 801 | 899 | 162.8 | 0.364 |
| Lactose (%) | 5.04 | 5.03 | 5.24 | 0.106 | 0.367 |
| Milk fatty acids proportion (%) | | | | | |
| SFA | 74.6 | 72.0 | 75.6 | 2.97 | 0.181 |
| MUFA | 23.8 | 26.3 | 23.8 | 2.51 | 0.214 |
| PUFA | 4.4 | 4.5 | 4.7 | 1.25 | 0.950 |
| C16:0 | 35.9 | 32.9 | 35.9 | 2.54 | 0.105 |
| C18:0 | 9.8 | 10.0 | 9.4 | 1.13 | 0.723 |
| C18:1 | 17.1 | 19.3 | 17.6 | 1.68 | 0.097 |
| Milk protein content (g/L) | | | | | |
| Total CN | 26.3 ^a | 25.8 ^a | 23.8 ^b | 1.66 | 0.048 |
| β-CN | 10.6 | 10.6 | 9.8 | 0.73 | 0.169 |
| αs1-CN | 8.4 ^a | 8.2 ^a | 7.5 ^b | 0.51 | 0.017 |
| αs2-CN | 3.5 | 3.4 | 3.2 | 0.28 | 0.301 |
| κ-CN | 3.4 ^a | 3.3 ^a | 2.9 ^b | 0.28 | 0.009 |
| Milk protein proportion (%) | | | | | |
| Total CN | 83.0 | 83.1 | 82.7 | 1.45 | 0.875 |
| β-CN | 33.5 | 33.9 | 34.1 | 1.31 | 0.397 |
| αs1-CN | 26.5 | 26.4 | 26.0 | 0.65 | 0.833 |
| αs2-CN | 11.0 | 11.0 | 11.2 | 0.67 | 0.680 |
| κ-CN | 10.8 ^a | 10.5 ^a | 10.0 ^b | 0.50 | 0.029 |

⁽¹⁾ RMSE: root mean square error; ⁽²⁾ mEq/100g of fat^{a,b} Means in the same row with no common superscript differ (P<0.05)**Table 2.** Effect of *DGAT-1* K232A polymorphism on plasma parameters during TDM1

| | KK | KA | AA | RMSE ⁽¹⁾ | Effect |
|------------------|------------------|------------------|------------------|---------------------|--------|
| NEFA (μmol/L) | 85 | 112 | 92 | 39.5 | 0.380 |
| BHBA (μmol/L) | 625 ^b | 832 ^a | 535 ^b | 19.6 | 0.031 |
| Glucose (mg/dL) | 67.2 | 62.2 | 65.1 | 6.77 | 0.362 |
| Acetate (mmol/L) | 1.04 | 1.30 | 1.23 | 0.305 | 0.257 |
| Urea (mg/dL) | 18.5 | 16.3 | 17.2 | 6.02 | 0.771 |

⁽¹⁾ RMSE: root mean square error^{a,b} Means in the same row with no common superscript differ (P<0.05)

Table 3. Effect of *DGAT-1* K232A polymorphism on body condition during TDM1

| | KK | KA | AA | RMSE ⁽¹⁾ | Effect |
|-------------|-----|-----|-----|---------------------|--------|
| Weight (kg) | 649 | 665 | 607 | 49.0 | 0.142 |
| BCS | 2.5 | 2.8 | 2.3 | 0.50 | 0.203 |

⁽¹⁾ RMSE: root mean square error

Effect of DGAT-1 K232A polymorphism upon milking frequency variations

Milk production and composition. Milk production decreased during the period of ODM. At d 7, compared with TDM1, the differences reached -7.3, -4.5, and -9.0 kg/d for KK, KA, and AA cows, respectively (Table 4). Cow milk production remained lower during TDM2 compared with TDM1 regardless of the *DGAT1* K232A polymorphism (-3.0, -2.6, and -3.6 kg for KK, KA, and AA cows, respectively). Milk fat content increased in the 3 groups upon ODM (1.12, 0.85, and 1.02%, respectively, for KK, KA, and AA cows at d 7) and remained higher at d 36 than in TDM1. At d 15, no significant difference was found between KK, KA, and AA. No significant differences were found between d 49 and TDM1. During the whole experimental period fat content was higher in KK cows (0.61 and 0.62% compared with KA and AA, respectively). In all groups, milk protein content slightly decreased at d 2, increased from d 7 (0.12, 0.11, and 0.21% for KK, KA, and AA cows, respectively, at d 7) and remained higher at d 36 than in TDM1. Fat and protein contents followed the same trend in ODM: they had a transitory period at d 1 and 2 and reached equilibrium at d 7 and 15. Milk lactose content decreased upon ODM in the 3 groups (-0.34, -0.38, and -0.33% for KK, KA, and AA cows, respectively) and was higher for AA cows (0.25 and 0.23%, respectively, for KK and KA cows). Somatic cell count increased upon ODM regardless of the *DGAT1* K232A polymorphism. Monounsaturated fatty acids, C18:1, and PUFA decreased regardless of the *DGAT1* K232A polymorphism during ODM period (-1.6% for MUFA, -1.46% for C18:1, and -1.04 for PUFA) compared with TDM1. At d 36, compared with ODM and TDM1, SFA (particularly C16:0) increased (0.9, 2.1, and 1.2 for C16:0 for KK, KA, and AA cows, respectively), MUFA, C18:1, and PUFA decreased (-2, -3.3, and -2.7% for C18:1 for KK, KA, AA cows, respectively) and C18:0 also decreased (Table 5). We observed an interaction between milking frequency and *DGAT1* K232A polymorphism for total casein percentage. At d 1, total casein percentage increased less for KK and KA cows than for AA cows (respectively, 1.1, 1.9, and 2.9%) and was lower for KK and KA cows in ODM. At d 36, we found no difference in total casein percentage according to *DGAT1* K232A polymorphism. However, no interaction was noted between *DGAT1* K232A polymorphism and milking frequency for total casein content. Regardless of *DGAT1* K232A polymorphism, κ - and α S2-CN percentages were lower and β - and α S1-CN percentages were higher during ODM than TDM1 (respectively, -0.34 and -1.16, and 0.50 and 1.50% at d 7 compared with TDM1) and remained higher at d 36. β -Casein percentage increased at d 1 (1.5%), and decreased at d 2 and 7 (-1.2% compared with d 1), but remained higher than in TDM1 and increased at d 36. κ -

Casein percentage decreased at d 1 (-0.8%) and increased at d 2 and 7 (1% compared with d 1), but remained lower than in TDM1 and decreased at d 36. α S2-Casein percentage decreased at d 1 and remained lower at d 2, 7, and 36 than in TDM1 (-1.2% at d 7 and 36 compared with TDM1). α S1-Casein percentage increased during ODM (1.6% at d 7), and decreased at d 36 (-1% compared with d 7) but remained higher than TDM1. For KK and KA cows, κ -CN percentage was higher and β -CN lower than for AA cows during the whole experimental period (-0.5 and -0.4% for κ -CN and 1 and 1% for KK and KA cows for β -CN, respectively). Variations in β -, κ -, α S2-, and α S1-CN contents were parallel to the variations of protein contents (Table 5).

Milk spontaneous lipolysis. Milk SL sharply decreased during ODM and did not significantly differ among the 3 groups of cows during the ODM period (below 0.2 mEq/100 g of fat after d 7), although SL was higher for KK cows during TDM1. At d 36, SL was increased compared with ODM and was higher for KK cows (0.41 vs. 0.21 and 0.27 mEq/100 g of fat, respectively, for KK, KA, and AA cows). However, SL remained sharply lower than in TDM1 (-0.67, -0.34, and -0.42 mEq/100 g of fat, respectively, for KK, KA, and AA cows) (Table 6).

Plasma parameters. Evolution of nonesterified fatty acids, urea, acetate, and glucose was not significantly different according to DGAT1 K232A polymorphism. Nonesterified fatty acid content tended to decrease at d 2 (-22.3 μ mol/L) and increased at d 15. At d 15, nonesterified fatty acid content was not significantly different from nonesterified fatty acid content in TDM1 (96.3 and 95.3 μ mol/L for TDM1 and d 15, respectively). Uremia decreased at d 1 and 2 (-9.1 mg/dL for d 2 compared with TDM1) and increased at d15. At d 15, uremia was not significantly different from uremia in TDM1 (17.3 and 19.2 mg/dL for TDM1 and d 15, respectively). Acetate content decreased at d 1 (-0.27 mmol/L) and was not significantly different at TDM1, d 2, and d 15 (respectively, 1.19, 1.27, and 1.16 mmol/L). Plasma glucose increased at d 1 (8.5 mg/dL) and was not significantly different at TDM1, d 2, and d 15 (respectively, 64.5, 63.9, and 67.6 mg/dL). β -Hydroxybutyrate content did not change upon ODM for AA and KK cows but decreased for KA cows at d 1 (-228 μ mol/L compared with TDM1), increased at d2 (200 μ mol/L compared with d 1), and decreased at d15 (-191 μ mol/L compared with d 2). (Table 7).

DISCUSSION

Effect of DGAT-1 K232A polymorphism during TDM1

Milk yield and composition. Effects of DGAT1 K232A polymorphism on milk yield, fat, and protein contents are consistent with the previous studies (Grisart et al., 2002; Spelman et al., 2002; Thaller et al., 2003; Schennink et al., 2007). It should be noted that mean lactation stage of our cows was 81 ± 9 d and that DGAT1 K232A polymorphism effects on milk traits are the strongest in that period of

lactation (Bovenhuis et al., 2015). Compared with KA and AA genotypes, the KK genotype was associated with a lower milk production, higher protein content, and higher fat content, although these results were only trends in our experiment given the relatively low number of cows and the constraints of the experimental design. Contrary to Bovenhuis et al. (2015), we did not find a significant effect on lactose content in TDM situations although lactose content was numerically higher when associated with the AA genotype. Contrary to Schennink et al. (2007), we showed few differences in fatty acid composition; this could be explained by the low number of animals combined with the use of the mid-infrared spectrometry equation method (Ferrand-Calmels et al., 2014) for fatty acid determination. κ -Casein and α S1-CN contents were higher for KK and KA cows. Those results are not consistent with Schopen et al. (2011), who found that the DGAT1 232A allele was associated with a higher content of α S1-CN and a lower content of α S2-CN. However, Bijl et al. (2014) found that the DGAT1 232A allele was only associated with a higher level of α S1-CN with 9 phosphorylated serine residues (**α S1-CN-9P**), although α S1-CN with 8 phosphorylated serine residues (**α S1-CN-8P**) was regulated by other gene genotypes, such as β -LG. This can explain the differences in α S1-CN content in both trials. According to Boichard et al. (2014), DGAT1 would regulate the expression of all milk caseins, but would only explain 3 to 11% of the genetic variance depending on type of casein and cow breed. Thus, an association between DGAT1 and protein composition exists, but it is small and variable depending on the regulation of other genes. The existence of gene polymorphism at the LPL locus (Badaoui et al., 2007), in linkage disequilibrium with DGAT1, would be interesting to investigate.

Milk spontaneous lipolysis. The KK genotype was associated with a milk SL twice as high as the KA and AA genotypes. The current study is, to our knowledge, the first to describe an association between milk SL and DGAT1 genotypes, but the results did not allow us to describe the mechanism, although we can put forward several assumptions. According to Cartier and Chilliard, (1990), biochemical factors better correlated with SL are (1) proportion of LPL linked to the milk fat globule membrane (**MFGM**), (2) MFGM integrity, and (3) balance between LPL activators and inhibitors. The DGAT1 K232A polymorphism might act through these 3 ways. (1) In our trial, DGAT1 232A allele was associated with lower casein content and lower SL rate. Casein micelles and LPL are normally linked by electrostatic interactions in the skimmed fraction of milk (Deeth, 2006). Thus, variations in casein or LPL contents could modify the equilibrium between those components and, as a consequence, could modify the proportion of LPL linked to the MFGM upon cooling. Investigation of casein content in relation to SL enabled us to conclude that lower casein content would not enhance milk SL as expected. (2) The MFGM integrity could be linked either to milk fat globule (**MFG**) size or MFGM composition (Evers, 2004; Wiking et al., 2006; Dickow et al., 2011). Concerning MFG size, Wiking et al. (2006) showed that MFG size and SL happened to move in the same direction, although direct

correlation was not established, and Argov Argaman et al. (2013) showed that DGAT1 KK genotype was associated with larger MFG. However, in previous trials, we found no correlation between MFG size and SL ($n = 600$, $R^2 = 0.14$; data not shown); thus, MFG size might not be considered as an explicative variable. The DGAT1 K232 allele would be associated with higher stamatin and sphingomyelin contents in MFGM (Argov-Argaman et al., 2013; Lu et al., 2015), which are components of lipid rafts on the MFGM (Lopez et al., 2010). These rafts could facilitate the interactions between LPL and MFGM. The differences in MFGM composition would be the most susceptible way to explain variations in milk SL rates. (3) Lu et al. (2015) analyzed the variation of proteome and did not mention any variation of protease peptone 3, an inhibitor of LPL activity, or protease peptone 5, an activator of LPL activity (Chilliard et al., 1986). Activators and inhibitors of LPL did not seem to vary according to DGAT1 K232A polymorphism.

Plasma Parameters. The KA genotype was associated with higher level of BHB, which could be an indicator of higher lipid mobilization for those cows. This is consistent with the higher level of milk C18:1 detected for the KA genotype. The KA genotype would be associated with a different energy metabolism from KK and AA genotypes, with a higher negative energy balance. In the literature, plasma metabolic traits in relation to DGAT1 K232A polymorphism have been poorly studied and results are contradictory. Oikonomou et al. (2009) found that the DGAT1 232A allele had a favorable effect on energy balance during the entire lactation. On the contrary, Banos et al. (2008) found a marginal positive effect of K232 allele on energy balance. Bovenhuis et al. (2015) found no difference according to DGAT1 K232A polymorphism in energy outputs for multiparous cows during the whole lactation, although the KA genotype was shown to increase energy outputs in primiparous cows. Finally, no direct link appeared between SL and lipid mobilization in the body.

Table 4. Effect of *DGAT-1* K232A polymorphism on milk production and macronutrients upon milking frequency variations

| | TDM1 | d1 | d2 | d7 | d15 | d36 | d49 | RMSE ⁽¹⁾ | | Effects | |
|---------------------|------|------|------|------|------|------|------|---------------------|--------|----------|-------|
| | | | | | | | | d | DGAT-1 | d×DGAT-1 | |
| Milk yield (kg) | | | | | | | | 2.09 | <0.001 | 0.137 | 0.280 |
| KK | 26.2 | 19.4 | 17.7 | 18.9 | 21.7 | 24.0 | 23.2 | | | | |
| KA | 26.5 | 19.9 | 18.4 | 22.0 | 22.6 | 25.3 | 23.9 | | | | |
| AA | 31.5 | 22.1 | 20.3 | 22.5 | 23.8 | 28.8 | 27.9 | | | | |
| Fat (%) | | | | | | | | 0.844 | <0.001 | 0.003 | 0.487 |
| KK | 4.04 | 5.10 | 6.53 | 5.16 | 4.96 | 5.40 | 3.96 | | | | |
| KA | 3.91 | 4.62 | 5.13 | 4.76 | 4.48 | 4.58 | 3.41 | | | | |
| AA | 3.42 | 4.41 | 6.52 | 4.44 | 4.50 | 4.37 | 3.14 | | | | |
| Fat yield (g/d) | | | | | | | | 260.9 | <0.001 | 0.234 | 0.823 |
| KK | 1057 | 964 | 1127 | 972 | 1196 | 1291 | 914 | | | | |
| KA | 1027 | 928 | 948 | 1056 | 951 | 1175 | 818 | | | | |
| AA | 1068 | 964 | 1335 | 995 | 1304 | 1280 | 874 | | | | |
| Protein (%) | | | | | | | | 0.217 | <0.001 | 0.132 | 0.513 |
| KK | 3.09 | 3.04 | 3.09 | 3.21 | 3.16 | 3.35 | 3.40 | | | | |
| KA | 3.03 | 2.92 | 2.96 | 3.14 | 3.08 | 3.35 | 3.36 | | | | |
| AA | 2.85 | 2.72 | 2.84 | 3.06 | 2.98 | 3.09 | 3.13 | | | | |
| Protein yield (g/d) | | | | | | | | 125.6 | <0.001 | 0.651 | 0.373 |
| KK | 810 | 593 | 534 | 610 | 690 | 804 | 788 | | | | |
| KA | 800 | 578 | 543 | 689 | 695 | 847 | 799 | | | | |
| AA | 898 | 603 | 577 | 681 | 710 | 889 | 874 | | | | |

⁽¹⁾ RMSE: root mean square error**Table 6.** Effect of *DGAT-1* K232A polymorphism on milk spontaneous lipolysis upon milking frequency variations

| | TDM1 | d1 | d2 | d7 | d15 | d36 | RMSE ⁽¹⁾ | | Effects | |
|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|--------|----------|-------|
| | | | | | | | d | DGAT-1 | d×DGAT-1 | |
| SL ⁽²⁾ | | | | | | | 0.357 | <0.001 | 0.013 | 0.388 |
| KK | 1.13 ^{aA} | 1.15 ^{aA} | 0.64 ^{bB} | 0.09 ^{aC} | 0.08 ^{aC} | 0.46 ^{bB} | | | | |
| KA | 0.59 ^{bA} | 0.66 ^{bA} | 0.54 ^{bA} | 0.06 ^{aC} | 0.07 ^{aC} | 0.25 ^{cB} | | | | |
| AA | 0.63 ^{bA} | 0.72 ^{bA} | 0.57 ^{bA} | 0.09 ^{aC} | 0.02 ^{aC} | 0.21 ^{cB} | | | | |

⁽¹⁾ RMSE: root mean square error ; ⁽²⁾ SL: Spontaneous lipolysis, mEq/100 g of fat^{a-c}: Means in the same row with no common superscript differ (P<0.05) for *DGAT-1*^{A-C}: Means in the same row with no common superscript differ (P<0.05) for *d*

Table 5. Effect of *DGAT-1* K232A polymorphism on milk composition upon upon milking frequency variations

| | KK | | | | | KA | | | | | AA | | | | | RMSE ⁽¹⁾ | Effects | | |
|---------------------------------------|--------------------|-------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------|--------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|---------|--------|----------|
| | TDM1 | d1 | d2 | d7 | d36 | TDM1 | d1 | d2 | d7 | d36 | TDM1 | d1 | d2 | d7 | d36 | | d | DGAT-1 | d×DGAT-1 |
| SCC ⁽³⁾ | 58 | 129 | 154 | 61 | 151 | 44 | 368 | 323 | 138 | 210 | 107 | 152 | 128 | 52 | 60 | 0.3 | <0.001 | 0.241 | 0.530 |
| Lactose ⁽⁴⁾ | 5.05 | 4.70 | 4.74 | 4.71 | 4.77 | 5.03 | 4.68 | 4.82 | 4.69 | 4.82 | 5.24 | 4.95 | 5.11 | 4.91 | 5.00 | 0.163 | <0.001 | 0.248 | 0.056 |
| <i>Milk fatty acid proportion (%)</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| SFA | 74.4 | 74.2 | 73.8 | 74.2 | 76.2 | 72.0 | 71.5 | 72.5 | 72.6 | 75.7 | 74.3 | 74.1 | 74.0 | 73.1 | 76.3 | 1.55 | <0.001 | 0.084 | 0.422 |
| MUFA | 23.8 | 21.4 | 22.0 | 22.4 | 20.7 | 25.3 | 22.8 | 23.3 | 23.1 | 21.5 | 24.7 | 21.4 | 22.4 | 23.5 | 21.1 | 1.51 | <0.001 | 0.239 | 0.870 |
| PUFA | 4.43 | 3.10 | 3.10 | 3.60 | 2.70 | 4.51 | 3.50 | 3.50 | 3.20 | 3.00 | 4.80 | 2.92 | 3.21 | 3.80 | 3.00 | 0.817 | <0.001 | 0.839 | 0.721 |
| C16:0 | 35.8 | 34.9 | 35.4 | 34.9 | 36.7 | 32.7 | 32.3 | 34.0 | 33.3 | 34.8 | 35.2 | 35.3 | 36.0 | 33.6 | 36.4 | 1.40 | <0.001 | 0.032 | 0.382 |
| C18:0 | 9.6 | 8.9 | 8.8 | 8.4 | 8.0 | 10.1 | 9.6 | 9.2 | 8.4 | 8.4 | 9.4 | 9.0 | 8.8 | 8.8 | 8.2 | 0.60 | <0.001 | 0.479 | 0.505 |
| C18:1 | 17.4 | 15.7 | 16.7 | 16.1 | 15.4 | 18.6 | 16.6 | 17.1 | 16.6 | 15.3 | 18.3 | 15.6 | 17.1 | 17.2 | 15.6 | 0.38 | <0.001 | 0.506 | 0.607 |
| <i>Milk protein content (g/L)</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Total CN | 26.3 | 25.5 | 24.7 | 26.6 | 28.0 | 25.9 | 24.8 | 24.6 | 26.0 | 28.2 | 23.8 | 23.2 | 23.7 | 25.1 | 25.9 | 0.94 | <0.001 | 0.152 | 0.305 |
| β-CN | 10.6 | 10.7 | 10.4 | 10.9 | 11.8 | 10.6 | 10.2 | 10.3 | 10.6 | 11.8 | 9.8 | 9.9 | 10.2 | 10.5 | 11.2 | 0.44 | <0.001 | 0.450 | 0.264 |
| αs1-CN | 8.4 | 8.2 | 8.2 | 8.9 | 9.1 | 8.2 | 8.0 | 8.1 | 8.8 | 9.0 | 7.5 | 7.4 | 7.6 | 8.3 | 8.3 | 0.32 | <0.001 | 0.078 | 0.575 |
| αs2-CN | 3.5 | 3.0 | 2.9 | 3.2 | 3.3 | 3.4 | 2.9 | 2.9 | 3.1 | 3.3 | 3.2 | 2.6 | 2.7 | 2.9 | 3.1 | 0.16 | <0.001 | 0.175 | 0.958 |
| κ-CN | 3.4 | 2.9 | 3.0 | 3.3 | 3.3 | 3.3 | 2.9 | 3.0 | 3.2 | 3.3 | 2.9 | 2.5 | 2.7 | 3.0 | 2.8 | 0.15 | <0.001 | 0.028 | 0.056 |
| <i>Milk protein proportion (%)</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Total CN | 83.0 ^{db} | 84.1 ^a | 82.3 ^c | 82.9 ^{db} | 83.7 ^{db} | 83.1 ^{db} | 85.0 ^a | 82.8 ^{db} | 83.1 ^{db} | 84.1 ^a | 82.7 ^b | 85.6 ^a | 83.6 ^{db} | 83.6 ^{db} | 83.8 ^{db} | 0.97 | <0.001 | 0.602 | 0.006 |
| β-CN | 33.5 | 35.1 | 34.7 | 34.0 | 35.0 | 33.9 | 34.8 | 34.7 | 34.0 | 35.3 | 34.1 | 36.5 | 35.8 | 35.0 | 36.2 | 0.34 | <0.001 | 0.043 | 0.170 |
| αs1-CN | 26.5 | 27.1 | 27.1 | 27.8 | 27.2 | 26.4 | 27.3 | 27.1 | 28.1 | 26.9 | 26.0 | 27.2 | 26.9 | 27.7 | 26.7 | 1.10 | <0.001 | 0.656 | 0.236 |
| αs2-CN | 11.0 | 9.7 | 9.7 | 10.0 | 10.0 | 11.0 | 9.8 | 9.7 | 9.9 | 9.9 | 11.2 | 9.6 | 9.6 | 9.8 | 9.9 | 0.62 | <0.001 | 0.753 | 0.740 |
| κ-CN | 10.8 | 9.7 | 10.0 | 10.3 | 9.9 | 10.5 | 9.8 | 10.0 | 10.1 | 9.8 | 10.0 | 9.2 | 9.7 | 9.8 | 9.2 | 0.34 | <0.001 | 0.002 | 0.087 |

⁽¹⁾ RMSE: root mean square error ; ⁽²⁾ SL, mEq/100 g of fat; ⁽³⁾ SCC, 10³/mL; ⁽⁴⁾ Lactose, %

^{a-d} Means in the same row with no common superscript differ (P<0.05) for d×DGAT-1

Table 7. Effect of *DGAT-1* K232A polymorphism on plasma parameters upon upon milking frequency variations

| | KK | | | | KA | | | | AA | | | | RMSE ⁽¹⁾ | Effects | | |
|------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|---------------------|---------|--------|----------|
| | TDM1 | d1 | d2 | d15 | TDM1 | d1 | d2 | d15 | TDM1 | d1 | d2 | d15 | | d | DGAT-1 | d×DGAT-1 |
| NEFA (μmol/L) | 85 | 118 | 83 | 103 | 112 | 95 | 74 | 76 | 92 | 106 | 65 | 107 | 39.5 | 0.088 | 0.870 | 0.441 |
| Urea (mg/dL) | 18.5 | 12.3 | 8.5 | 20.3 | 16.3 | 10.9 | 8.2 | 16.5 | 17.2 | 13.3 | 7.5 | 20.9 | 3.0 | <0.001 | 0.600 | 0.462 |
| BHBA (μmol/L) | 625 ^b | 540 ^b | 684 ^b | 750 ^{ab} | 832 ^a | 604 ^b | 804 ^a | 613 ^b | 535 ^b | 453 ^b | 666 ^b | 589 ^b | 126.9 | <0.001 | 0.201 | 0.014 |
| Acetate (mmol/L) | 1.04 | 0.92 | 1.20 | 1.21 | 1.30 | 0.91 | 1.20 | 1.20 | 1.23 | 0.94 | 1.47 | 1.10 | 0.273 | <0.001 | 0.496 | 0.390 |
| Glucose (mg/dL) | 67.2 | 73.3 | 65.9 | 67.2 | 62.2 | 74.4 | 63.9 | 66.2 | 65.1 | 72.2 | 61.9 | 69.4 | 6.25 | <0.001 | 0.680 | 0.450 |

⁽¹⁾ RMSE: root mean square error

^{a,b} Means in the same row with no common superscript differ (P<0.05) for d×DGAT-1.

Effect of DGAT-1 K232A polymorphism upon variations of milking frequency

Milk yield and milk composition. The effects of ODM on milk traits were not different according to DGAT1 K232A polymorphism. The effects of ODM on milk production and milk composition are consistent with the literature. Once daily milking is associated with lower milk production and higher fat concentration (Rémond et al., 2004; Pomiès et al., 2007; Stelwagen et al., 2013). Protein content decreased during the transition period of ODM (d 1 and 2), but was higher when the ODM equilibrium was reached (d 7 and 15; Rémond and Pomiès, 2005; Guinard-Flament et al., 2007). Few studies have evaluated the effect of ODM on milk fatty acid composition. Guinard-Flament et al. (2007) noticed no change in SFA proportion upon ODM. In our trial, the increase in SFA proportion could be linked to the potential improvement of energy status of the cows whose diet was formulated to cover TDM requirements even during ODM. The evolution of total casein percentage upon ODM was different according to DGAT1 K232A polymorphism: the K232 allele was associated with lower total casein percentage during ODM. The casein percentage transitorily decreased at d 2 for KK and KA genotypes of DGAT1, as traditionally observed in dairy cows (Stelwagen et al., 2013), but it increased for AA genotypes. The increase in total casein percentage for AA genotypes may be due to lower whey protein concentration in ODM. The increase in whey proteins during the first days of ODM is due to tight junction permeability, which causes an influx of blood serum derivative proteins (Stelwagen et al., 1997). The AA genotypes might be associated with higher mammary gland compliance. Otherwise, our results on the effect of ODM on total casein content were consistent with the literature: after a slight decrease in the transitory period, total casein increased upon ODM. Several studies reported an increase in total casein content by a concentration effect, a higher increase in whey protein content, and a decrease of the casein-to-whey protein ratio (Rémond and Pomiès, 2005; Guinard-Flament et al., 2007; Pomiès et al., 2007). β -Casein percentage increased and κ -CN percentage decreased upon ODM. Those results were consistent with the downregulation of κ -CN transcripts upon ODM, pointed out by Boutinaud et al. (2008, 2013). One week after the beginning of ODM, κ -CN transcripts decreased by 86%. Yang et al. (2005) and Littlejohn et al. (2010) also showed a downregulation of β -CN upon ODM, with a slighter decrease of the number of transcripts (20%).

Milk spontaneous lipolysis. Milk SL decreased upon ODM regardless of the DGAT1 K232A polymorphism, suggesting that LPL could become a limiting factor in ODM situations because of mammary gland activity downregulation. Otherwise, the decrease in SL upon ODM is consistent with the results of Rémond and Pomiès (2005) and Pomiès et al. (2007), who reported a 67% decrease in free fatty acid content in milk and a 27% decrease in lipolytic activity that would partly explain the decrease in free fatty acid content. A decrease in the number of LPL transcripts upon ODM has also

been reported by Littlejohn et al. (2010) and Boutinaud et al. (2013). No information is available, to our knowledge, about the effect of ODM on MFGM composition or LPL activators and inhibitors. Spontaneous lipolysis increased during the second period of TDM, and hierarchy between KK, KA, and AA genotypes had been re-established although SL rates remained sharply lower than in the first period of TDM, which indicates residual effects of ODM on SL. Although the residual effects of ODM after resume to TDM on milk yield had been studied (Stelwagen et al., 2013), few data on milk components evolution that could explain SL are available (Rémond and Pomiès, 2005).

Plasma parameters. Contrary to the literature (Guinard-Flament et al., 2007), plasma glucose and nonesterified fatty acids did not considerably change during ODM regardless of the DGAT1 K232A polymorphism. At d 15, BHB was not significantly different between groups, although the KA genotype was associated with a higher level of BHB in TDM1. Milk C18:1 was lower during ODM, whatever the DGAT1 K232A polymorphism. Judging from milk C18:1, lipid mobilization seemed to decrease upon ODM regardless of the DGAT1 K232A polymorphism. This would be consistent with the improvement of energy status during ODM previously noted (Stelwagen et al., 2013), but, as indicated by BHB, the decrease would be more accurate for KA cows. As the metabolic indicators were divergent, we might be prudent on these conclusions.

Implications

We showed that DGAT1 K232A polymorphism has major effects on milk traits, casein composition, and milk SL. In TDM situations, the KK genotype was associated with higher level of SL but also higher level of total fat and total casein; the AA genotype was associated with lower level of SL, total fat, and total casein; and the KA genotype was associated with lower level of SL and higher level of total fat and casein. According to the outlets of milk (i.e., drinking milk, butter, or cheese), specific characteristics are desirable. However, the KA genotype seems to be a good intermediate between milk fat quality and cheesemaking aptitude. A larger study should be done to associate milk composition and quality with genetics to lead to animal selection. We showed that ODM was associated with lower level of SL whatever the DGAT1 K232A genotype. Once daily milking is not commonly practiced in farms for economic reasons linked with milk losses. However, it has been shown that milk production does not differ when cows are milked once a day 8 wk before drying off (Ferris et al., 2008; Stelwagen et al., 2013) and that, in parallel, SL can dramatically increase during late lactation (Cartier and Chilliard, 1990). Once daily milking could be applied in late lactation to avoid the increase in SL.

CONCLUSION

The genotype KK of DGAT1 was associated with SL rates twice as high as than the KA and AA genotypes in TDM situations, suggesting that DGAT1 coding for the enzyme diglyceride acyltransferase 1 could also affect SL. It was not possible to clarify the causal mechanism at this stage. The trial also shows that the effect of DGAT1 K232A polymorphism on SL can be forced by husbandry practices, such as ODM, known to dramatically reduce SL.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the all staff (Sébastien Blandamour, Samuel Boulan, Bernard Camps, Yves Carbonnier, Jean-Luc Deust, Julien Gentil, Stéphane Gressin, Loïc Leloup, Denis Pichonat, and Laurent Vandenbroucke) of the experimental farm of le Pin-au-Haras (INRA, Domaine du Pin-au-Haras, Exmes, France) for the herd management and for their assistance with milk sampling. They are also grateful to LILANO (Laboratoire Interprofessionnel Laitier de Normandie, Saint-Lô, France) for technical assistance. Thanks are also due to the Join Technical Unit of Research and Ingeneering on dairy farming (UMT RIEL, Rennes, France) for the constructive exchanges. The authors also thank Gwen Christiansen [INRA-UMR Agroécologie innovation et territoire (AGIR), Castanet Tolosan, France] for herfine work correcting the English in the manuscript. This research received financial support from the CNIEL(Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière, Paris, France).

REFERENCES

Les références sont fournies pour l'ensemble du manuscrit dans la partie « références bibliographiques »

Chapitre 2 -Partie 2

Effets de concentrés riches en acide gras oméga 3 (lin, microalgues) sur la lipolyse spontanée du lait

Des effets de l'alimentation ont été mis en évidence sur la LS. Le plus souvent, les études ont concerné la restriction alimentaire et la nature du fourrage dans le cas d'affouragement en vert (herbe fraîche, foin ou ensilage), le plus courant dans les années 1970/1980 par les pays concernés (France, Irlande, Australie). Cependant, il n'y a pas eu d'étude sur l'effet des concentrés et suppléments lipidiques utilisés en élevage. Or, depuis une vingtaine d'années, des concentrés naturellement riches en AG oméga 3 sont introduits dans la ration des animaux d'élevage pour augmenter la valeur nutritionnelle des produits animaux. Chez la VL, plusieurs types de suppléments lipidiques ont été apportés sous plusieurs formes : par exemple le colza ou le lin, apportés en graine entière, graine extrudée, huile ou sous forme protégée. Plus récemment, des microalgues riches en acide docosahexaénoïque (DHA) ont été utilisées expérimentalement. Dans ce contexte, le programme ANR AGRALID a été mis en place. Son objectif principal est la proposition de menus répondant aux recommandations du Plan National Nutrition Santé notamment concernant les lipides, tout en conciliant le bien-être animal, la biodiversité agricole, et les impacts environnementaux de la production alimentaire. Des essais ont donc été conduits chez la VL pour évaluer l'impact de ces concentrés riches en oméga 3 (lin et microalgues) sur la qualité du lait, des fromages et des beurres. Les modifications ruminales ainsi que la modification de la composition des AG consécutives à l'ingestion de suppléments lipidiques chez la VL pourraient entraîner une modification de la susceptibilité à la LS du lait entraînant des conséquences sur la transformation du lait en produit finis (notamment le beurre) et sur leur appréciation sensorielle. Sur le domaine de Méjusseaume, trente-deux vaches ont donc été réparties en quatre groupes selon le type de supplément lipidique qu'elles recevaient : aucun, lin extrudé, microalgues et lin extrudé + microalgues, dans le cas d'une ration à base d'ensilage de maïs.

Ces travaux ont faits l'objet d'une soumission dans le Journal of Dairy Science, de deux communications orales au congrès des Journées Francophones de la Nutrition (9-11/12/2015, Marseille, France- [annexe 5 et 6](#)) ainsi que d'une affiche au congrès de la Fédération Internationale Laitière (20-24/09/2015, Vilnius, Lituanie – [annexe 7](#))

Dans la suite du manuscrit, on se réfèrera à cet essai comme à l'essai « suppléments lipidiques »

SOURCES OF N-3 FATTY ACID, DAIRY PRODUCT QUALITY

Effects of n-3 fatty acid sources on milk fatty acid profile, milk fat properties, butter and hard cooked cheese technological properties and sensory quality.

E. Vanbergue^{*†}, J.L. Peyraud^{*}, S. Buchin[‡], E. Beuvier[‡], G. Duboz[‡], and C. Hurtaud^{*1}

^{*}PEGASE, Agrocampus Ouest, INRA, 35590, Saint-Gilles, France.

[†] Institut de l'élevage, Monvoisin, 35910, Le Rheu, France

[‡]URTAL, INRA, 39800, Poligny, France

¹Corresponding author: Catherine Hurtaud, INRA-Agrocampus Ouest UMR1348 Physiologie, Environnement et Génétique pour l'Animal et les Systèmes d'Elevage (PEGASE), F-35590 Saint-Gilles, France

Phone: +33 (0)2 23 48 51 02; Fax: +33 2 23 48 50 80

Email: catherine.hurtaud@inra.fr

ABSTRACT

Fatty acid (FA) profile of ingested feedstuff has a strong impact on milk FA profile. So, improving transfer efficiency of FA which benefits human health, such n-3 FA, from feedstuff to milk, is an important issue. The aim of this trial was to assay the effects of a new n-3 FA source: microalgae DHA Gold[®] and its combination with extruded flaxseed on milk, butter and hard pressed cheese. Thirty two cows were divided into 4 groups according to the n-3 FA source of their diet. All the diets were based on corn silage, energy concentrate and soybean meal. The first group received a control diet (**CTRL**). The 3 other groups received respectively: extruded flaxseed (**F**), microalgae DHA Gold[®] (**ALG**) and a mixture of DHA Gold[®] and extruded flaxseed (**F/ALG**). Milk was collected from morning milking after six wk of trial. Butter and hard pressed cheese were processed for CTRL, F, ALG and F/ALG. For F, milk yield, fat and protein contents, fat globule size and spontaneous lipolysis were not significantly different compared to CTRL. For ALG and L/ALG feed intake was lower than for CTRL (respectively -4.8 and -3.9 kg/d). For ALG and F/ALG, milk yield decreased (respectively -2.8 and -6kg/d), fat content was halved, fat globules size was reduced (-1.46 and -1.31 μm respectively) compared to CTRL. Spontaneous lipolysis increased for ALG (+0.12 mEq/kg of milk) compared to CTRL. Alpha linolenic acid increased in F, and F/ALG (respectively +0.32; +0.26%) and docosahexaenoic acid increased in ALG and F/AGL (+0.43 and +0.15% respectively) compared to CTRL. Butter processing from ALG and F/ALG cream was not possible. Process parameters were not significantly different for F and CTRL. F butter had a less yellow color and tended to be softer. F butter had less rancid flavor and odor (respectively -1 and -1.2 points) and had a stronger cream flavour (0.5 points) compared to CTRL. F/ALG had higher fresh cheese yield (+0.52 kg/100 kg) but fat content in dry matter and curd dry matter were lower and fat content in whey was higher for ALG and F/ALG compared to CTRL. ALG and F/ALG cheeses were evaluated less colored, more open, less firm, more elastic, more granular and more pungent compared to CTRL. Investigation on technological process to protect microalgae DHA Gold[®] from rumen degradation associated with dose response relationships would be interesting.

Keywords: flaxseed, microalgae, dairy cows

INTRODUCTION

Alpha linolenic acid (**ALA**) is essential for the maintenance of normal health and nutrition. It cannot be synthesized by the body and thus has to be supplied by the diet (Calder and Yaqoob, 2009). It is the precursor for longer n-3 FA synthesis such as eicosapentaenoic acid (**EPA**) and docosahexaenoic acid (**DHA**). DHA plays a structural role in the central nervous system and DHA deficiency is known to impair nerve structure functions such as visual functions (Alessandri et al., 2004; Innis, 2008) and behavioural and cognitive functions (Kuratko et al., 2013). DHA and EPA are also precursors for lipid mediators which are important in platelet aggregation, and immune system and inflammation regulation (Chapkin et al., 2009; Martinez-Micaelo et al., 2015); they are involved in regulating the expression of genes, themselves involved in obesity and metabolic syndrome (Martinez-Fernandez et al., 2015). Finally, ALA, EPA and DHA can also benefit cardiovascular health.

Conversion factors from ALA are low for EPA and negligible for DHA (Plourde and Cunnane, 2007). So, recommendations are fixed for ALA, EPA and DHA intakes: respectively at 1.8 g/d, 0.25 g/d and 0.25 g/d, for a dietary energy intake of 2000 Kcal/d (ANSES, 2011). But, current intake of ALA, EPA and DHA is low in Western countries. In France, the average intakes are half that of current recommendations (Astorg et al., 2004). Therefore, increasing the average intake of n-3 fatty acid (**FA**) is a public health issue. To meet this goal, one strategy consists of feeding farm animals with feed with high n-3 FA content to enhance the n-3 FA content in meat, eggs, milk and milk products (Calder and Yaqoob., 2009; Hurtaud et al., 2014).

Several studies have been carried out on the impacts of n-3 FA supplementation in dairy cows on milk production traits and milk product nutritional and organoleptic quality. Linseed is particularly rich in ALA (representing more than 50% of FA) and has been widely studied in its different feed forms i.e., whole seed, micronized, heated or extruded seed, and oil (Gonthier et al. 2005; Mustafa et al., 2003; Martin et al., 2008). Whatever the feed form, it was shown that change in FA composition in milk is proportional to the level of linseed included in the diet (Hurtaud et al., 2010; Neveu et al., 2013). Short chain fatty acids (**SCFA**) decreased in favor of long chain fatty acids (**LCFA**) such as ALA, increasing the n-3/n-6 ratio (Akraim et al., 2007; Petit, 2015). However, transfer efficiency of n-3 FA from the diet to milk is very low and ranges from 2 to 3.5% (Bauman and Griinari, 2001; Chilliard et al., 2007; Gonthier et al., 2005; Hurtaud et al., 2010) due to rumen biohydrogenation (**RBH**).

Table 1. Chemical composition and nutritional value of feeds

| Item, g/kg of DM unless noted | Corn silage | Energy concentrate ¹ | Soybean meal 48 | Extruded Linseed ² | DHA Gold [®] | DHA Gold [®] / Extruded Linseed ³ | Urea | Minerals |
|-------------------------------|-------------|---------------------------------|-----------------|-------------------------------|-----------------------|---|------|----------|
| DM, % | 33.7 | 89.4 | 88.6 | 91.0 | 98.0 | 91.6 | 100 | 100 |
| NE _L , MJ/kg of DM | 6.33 | 7.62 | 8.26 | 9.96 | 12.88 | 9.61 | 0 | 0 |
| CP | 67 | 117 | 503 | 198 | 121 | 182 | 2875 | 0 |
| OM, g/kg | 964 | 945 | 932 | 956 | 898 | 948 | 0 | 0 |
| NDF | 399 | 225 | 141 | 296 | 11 | 262 | 0 | 0 |
| ADF | 218 | 89 | 65 | 99 | 3 | 91 | 0 | 0 |
| Starch | 247 | 466 | 36 | 78 | 1 | 78 | 0 | 0 |
| PDIE ⁴ | 63 | 106 | 398 | 168 | 49 | 114 | 0 | 0 |
| PDIN ⁵ | 41 | 81 | 429 | 163 | 86 | 133 | 1472 | 0 |
| Ca | 1.8 | 3.4 | 3.8 | 1.6 | 0.4 | 1.5 | 0 | 270 |
| P | 1.7 | 3.9 | 6.8 | 7.8 | 10.0 | 9.0 | 0 | 55 |
| Fat | 34 | 40 | 20 | 277 | 622 | 283 | 0 | 0 |
| n-3 FA | 3.74 | 1.60 | 1.60 | 147.42 | 298.56 | 144.33 | 0 | 0 |
| C18:2 | 15.64 | 21.78 | 10.56 | 53.67 | 2.92 | 42.11 | 0 | 0 |
| C18:3 | 3.19 | 1.28 | 1.57 | 144.74 | 0.43 | 104.25 | 0 | 0 |
| C20:5 | 0.0 | 0.07 | 0.03 | 0.0 | 5.53 | 0.73 | 0 | 0 |
| C22:6 | 0.05 | 0.0 | 0.0 | 1.64 | 280.8 | 37.89 | 0 | 0 |

¹ Energy concentrate on DM basis: 20% wheat, 20% corn, 20% barley, 20% beet pulp, 15% wheat bran, 3% cane molasses, 1% vegetal oil, 1% salts

² Extruded Linseed = 50% extruded linseed, 50% wheat bran; Valorex, Combourtillé, France

³ DHA Gold[®] / Extruded linseed = 37% extruded linseed, 13 %DHA Gold[®] and 50% wheat bran; Valorex, Combourtillé, France

⁴ PDIE = protein digested in the small intestine supplied by rumen-undegraded dietary protein and by microbial protein from rumen fermented OM (Institut National de la Recherche Agronomique, 1989)

⁵ PDIN = protein digested in the small intestine supplied by rumen-undegraded dietary protein and by microbial protein from rumen degraded N (Institut National de la Recherche Agronomique, 1989)

Plant sources of n-3 FA, such as linseed, rapeseed or sunflower, that are used in animal diets, do not contain DHA, of which the natural source is mainly seafood (Calder and Yaqoob, 2009). Ingredients such as fish oil have been added to the dairy cow diet to increase DHA content in milk and milk products (Chilliard and Doreau, 1997; Jones et al., 1998; Loor and Herbein, 2003). Feeding cows with unprotected fish oil increased milk DHA content but decreased dry matter intake (**DMI**), milk and protein yields, and milk fat content and yield because of RBH alteration (Loor et al., 2005a). As a consequence, protected fish oil in microcapsules was investigated but fish oil was still associated with milk fat depression (Lacasse et al., 2002; Palmquist and Griinari, 2006). Other sources of DHA, such as microalgae were studied: Abughazaleh et al. (2009) found that microalgae supplementation dropped fat content by 25% and increased cis-9 trans-11 C18:2 3.4 fold but no focus was made on milk DHA content. To our knowledge, the impacts of microalgae on the sensorial and organoleptic quality of milk products, such as butter or cheese have not yet been investigated.

The aim of our study was to assess and compare the impacts of two n-3 FA sources used in feed for cows: microalgae DHA Gold[®], extruded linseed, and a combination of microalgae DHA Gold[®] and extruded linseed. DHA Gold[®] is a product obtained by drum drying Schizochytrium algae which contain a large amount of DHA. Milk traits, milk fatty acid (FA) composition, milk fat globule (MFG) size, spontaneous lipolysis (SL), butter and hard cooked cheese's sensorial and technological properties were evaluated. The hypothesis of the study was that the doses of n-3 FA concentrate used were a good compromise between enriching milk in ALA and/or DHA and preserve cow's rumen, and butter and cheese for bad flavor due to FA oxidation.

MATERIAL AND METHODS

Protocol was approved by an ethics committee under number 01421.02.

Animals

Thirty-two multiparous (n=16) and primiparous (n=16) Holstein dairy cows in mid lactation were used. Lactation stage at the beginning of the trial was 100 ± 17.5 d. During the pre-experimental period, milk yield, milk solid content, and milk MUFA and PUFA percentages were evaluated to allocate the cows in 4 groups. Criteria for blocking were, in that order, milk yield, solid content, parity (primiparous, multiparous), lactation stage, DMI, and milk MUFA and PUFA percentages. Each group was composed by 4 primiparous and 4 multiparous cows. Mean values for control group were 33.4 ± 5.5 kg for milk yield, $3.55 \pm 0.362\%$ for milk fat content, $2.87 \pm 0.102\%$ for milk protein content, 99.3 ± 19.9 d for lactation stage, 22.3 ± 3.3 kg for DMI, $30.3 \pm 1.43\%$ for MUFA percentages and $3.8 \pm 0.3\%$ for PUFA percentages. Mean values for the extruded linseed group were 33.5 ± 5.7 kg for milk yield, $3.78 \pm 0.370\%$ for milk fat content, $2.85 \pm 0.150\%$ for milk protein content, 99.3 ± 18.4 d for lactation

stage, 21.8 ± 2.9 kg for DMI, $30.3 \pm 2.82\%$ for MUFA percentages and $3.9 \pm 0.6\%$ for PUFA percentages. Mean values for the microalgae group were 33.5 ± 5.9 kg for milk yield, $3.73 \pm 0.36\%$ for milk fat content, $2.89 \pm 0.180\%$ for milk protein content, 99.9 ± 16.1 d for lactation stage, 22.0 ± 4.2 kg for DMI, $29.7 \pm 3.07\%$ for MUFA percentages and $3.8 \pm 0.4\%$ for PUFA percentages. Mean values for the extruded linseed/microalgae group were 33.4 ± 5.4 kg for milk yield, $3.73 \pm 0.440\%$ for milk fat content, $2.87 \pm 0.185\%$ for milk protein content, 99.6 ± 20.3 d for lactation stage, 22.6 ± 3.4 kg for DMI, $31.2 \pm 2.76\%$ for MUFA percentages and $4.0 \pm 0.2\%$ for PUFA percentages.

All cows were kept indoors with an average area of 6.56 m^2 per cow. Cows were milked at 0700 h and 1700 h in a milking parlor. Cows were weighed after each milking.

Diet treatments

Four diet treatments were applied ([Table 2](#)). All diets were based on corn silage, a variable proportion of energy concentrate and n-3 FA sources, soybean meal, urea, minerals and vitamins distributed as a total mixed ration. The control diet (CTRL) contained 75.7% of DM of corn silage, 11.1% of DM of energy concentrate, 10.4% of DM of soybean meal, 1.7% of DM of minerals and 1.1% of DM of urea. The extruded linseed diet (L) contained 76.5% of DM of corn silage, 5.6% of DM of energy concentrate, 10% of DM of soybean meal, 5.1% of DM of a mixture of extruded linseed (50%) and wheat bran (50%) (VALOREX, Combourtillé, France), 1.7% of DM of minerals and 1.1% of DM of urea. The microalgae diet (ALG) contained 75.5% of DM of corn silage, 9.2% of DM of energy concentrate, 10% of DM of soybean meal, 1.8% of DM of DHA gold[®] (Schizochytrium, DSM, Deinze, Belgium), 2.0% of DM of minerals, 1.4% of DM of urea. The microalgae/extruded linseed diet (L/ALG) contained 76.1% of DM of corn silage, 5.3% of DM of energy concentrate, 9.9% of DM of soybean meal, 5.6% of DM of a mixture of extruded linseed (37%), DHA Gold[®] (13%) and wheat bran (50%) (VALOREX, Combourtillé, France), 1.9% of DM of minerals and 1.2% of DM of urea. Diets were formulated to meet the energy and protein requirements, based on milk production and milk solid content measured during the pre-experimental period) (Institut National de la Recherche Agronomique, 1989). The ingredients, chemical composition and nutritional value of the diets are given in [tables 1 and 2](#). Cows were fed ad libitum. Feeds were weighed and mechanically distributed twice daily at 0900 h and 1830 h.

Experimental design

The experiment was conducted over a continuous period of 10 wk, starting with 3 control wk followed by 1 wk of adaptation to the diet and 6 wk of full diet period, from January 13th to March 23rd, 2014.

Feed and refusals

During the whole experimental period, cows were individually fed via individual electronic gating and all refusals were collected and weighed every day to evaluate daily intake. To calculate DMI, refusals were assumed to have the same composition as the offered diet. To determine diet chemical and nutritional composition, samples of fresh corn silage were collected 5 times a wk and samples of energy concentrate, soybean meal, extruded linseed mixture, DHA Gold[®], DHA Gold[®]/extruded linseed mixture were collected every wk, during the whole experimental period. The samples were stored at -20°C and pooled to provide one sample per type of feed and per period. Samples were analyzed for DM, mineral matter (NF V17-101, 1977), crude protein (NF V18-100, 1977), crude fiber (NF V03-040, 1993), neutral detergent fiber, acid detergent fiber (Van Soest et al., 1991), starch (Thivend et al., 1965), organic matter, digestibility of OM (Aufrère et al., 1989), fat, FA profile (Apper-Bossard et al., 2006), phosphorus (NF V18-106, 1977) and calcium (NF 18-108, 1984).

Milk and fat characteristics

Milk. Milk yield was recorded individually every day at each milking. Milk fat content, protein content, lactose content, somatic cell count (**SCC**) were determined from 4 consecutive milkings every wk. These analyses were performed by mid-infrared spectrometry for fat, protein and lactose contents and by flow cytometry for SCC at the Laboratoire Interprofessionnel Laitier Loire Anjou Bretagne (LILLAB, Châteaugiron, France). Milk samples for total nitrogen content (**N**), non-protein nitrogen (**NPN**), non-casein nitrogen (**NCN**), total and soluble phosphorus, total and soluble calcium determinations were collected individually from milk cans from one morning milking and one evening milking and pooled in the 60:40 proportion, during the pre-experimental period and the last wk of the experimental period. Total nitrogen, NPN, NCN, CN and urea were determined according to the Kjeldahl methods described by Alais (1984). Total and soluble calcium were analyzed by atomic absorption spectroscopy on milk and milk ultrafiltrate, respectively (Brûlé et al., 1974). Total and soluble phosphorus were analyzed by spectroscopy on milk and milk ultrafiltrate, respectively, as described by Pien (1969).

Milk fatty acid profile. Milk samples for FA profile determination were collected individually from milk cans from one morning milking and one evening milking and pooled in the 60:40 proportion, during the pre-experimental period and the last wk of the experimental period. One vial per cow was collected each time and stored at -20°C until analyzed. FA composition was determined on 1 replicate by lipid extraction from a 0.5 mL sample of milk fat according to the method described in Bauchart and Duboisset (1983) using 0.5 mL of an ethanol/HCl [100:5 (vol/vol)] solution followed by 5 mL of hexane. Milk FA were esterified with 1.0 mL of a methanol/NaOH [100:2, (vol/vol)] solution followed by 1.0 mL of methanol boron trifluoride solution [(100:20(vol/vol)] and 2 mL of hexane

(methyl esters). These esters were extracted with 2 mL of n-hexane and injected into a CP-7890A GC (Agilent technologies, Les Ulis, France) equipped with an electron ionization detector. Methyl esters were separated on an CP-SII 88 capillary column (100 m × 0.25 mm i.d.; Interchim, Montluçon, France) starting at 50°C for 2 min, then increasing 7°C/min to reach 155°C, then increasing 3°C/min to reach 235°C, then held at 235°C for 10 min. Injector was at 240°C and detector was at 280°C. Carrier gas was hydrogen.

Table 2. Composition of experimental diets

| Item | CTRL | L | ALG | L/ALG |
|--|------|-------|------|-------|
| Ingredients, %DM | | | | |
| Corn silage | 75.7 | 76.5 | 75.5 | 76.1 |
| Energy concentrate | 11.1 | 5.6 | 9.2 | 5.3 |
| Soymeal | 10.4 | 10 | 10 | 9.9 |
| Extruded Linseed ¹ | 0 | 5.1 | 0 | 0 |
| DHA Gold ^{®2} | 0 | 0 | 1.8 | 0 |
| DHA Gold [®] /Extruded | 0 | 0 | 0 | 5.6 |
| Minerals (g) | 1.7 | 1.7 | 2.0 | 1.9 |
| Urea (g) | 1.1 | 1.1 | 1.4 | 1.2 |
| Chemical composition, g/kg of DM unless noted | | | | |
| DM, % | 45.4 | 44.3 | 44.4 | 42.4 |
| OM | 922 | 923 | 922 | 806 |
| CP | 151 | 144 | 141 | 154 |
| NDF | 338 | 342 | 335 | 368 |
| ADF | 180 | 181 | 179 | 185 |
| Starch | 241 | 222 | 235 | 222 |
| Fat | 32.0 | 43.9 | 39.3 | 35.9 |
| Total n-3 FA | 3.14 | 10.44 | 7.60 | 5.23 |
| MUFA ⁴ | 7.75 | 9.33 | 7.62 | 9.46 |
| PUFA ⁵ | 18.6 | 27.6 | 24.5 | 19.6 |
| C18:2 | 15.2 | 16.8 | 15.0 | 14.81 |
| C18:3, ALA | 2.70 | 9.87 | 2.68 | 5.28 |
| C20:5, EPA | 0.01 | 0.01 | 0.09 | 0.02 |
| C22:6, DHA | 0.04 | 0.12 | 4.25 | 0.76 |
| Nutritional value, g/kg of DM unless noted | | | | |
| NE _L , kJ/kg of DM | 6.5 | 6.5 | 6.5 | 6.2 |
| PDIE ⁶ | 102 | 102 | 98 | 96 |
| PDIN ⁷ | 106 | 106 | 102 | 98 |

¹ Extruded Linseed = 50% extruded linseed, 50% wheat bran; Valorex, Combourtillé, France

² DHA Gold[®]; DSM, Deinze, Belgium

³ DHA Gold[®]/Linseed HFC = 37% extruded linseed, 50% wheat bran, 13% DHA Gold[®]; Valorex, Combourtillé, Fr

⁴ MUFA = monounsaturated fatty acid ; ⁵ PUFA = polyunsaturated fatty acid

⁶ PDIE = protein digested in the small intestine supplied by rumen-undegraded dietary protein and by microbial protein from rumen fermented OM (Institut National de la Recherche Agronomique, 1989)

⁷ PDIN = protein digested in the small intestine supplied by rumen-undegraded dietary protein and by microbial protein from rumen degraded OM (Institut National de la Recherche Agronomique, 1989)

Milk fat globule size. Milk samples for MFG size determination were collected individually from milk cans from one morning milking during the last wk of the experimental period. Vials were kept at room temperature with potassium dichromate (Merck, Darmstadt, Germany) to evaluate MFG size distribution by laser light scattering (Mastersizer 3000, Malvern, UK). Samples were measured by diluting (1:6 vol) with EDTA/NaOH buffer (0.5M, pH=8) to dissociate casein micelles. The average diameters $d_{3,2} = \frac{\sum(Nixdi^3)}{\sum(Nixdi^2)}$; $d_{4,3} = \frac{\sum(Nixdi^4)}{\sum(Nixdi^3)}$ and median diameter d_{50} were calculated by the Malvern software.

Milk spontaneous lipolysis. SL was determined as in Vanbergue et al. (2016) on individual milk samples from milk cans collected during the last wk. of the experimental period on morning milks.

Blood samples

Tail blood samples were collected using 5 mL heparinized tubes (VT-050SHL, Venoject, Terumo Europe, Leuven, Belgium) after morning milking during the last wk of the experiment before the distribution of feed. Blood was centrifuged at $2.264 \times g$ for 15 min, and plasma was removed and stored at $-20^\circ C$ until analysis. Plasma lactose, glucose, urea, acetate, non-esterified fatty acids (NEFA) and BHBA contents were assayed using colorimetric enzymatic reaction on 2 replicates as reported in Delamaire and Guinard-Flament (2006).

Butter and cheese

Hard cooked cheese-making process. Cheese was manufactured during wk 5 and 6 of the experiment. Milk of all cows of the 4 groups was transferred to 4 individual tanks, each tank corresponding to a group. Milk was stored at $4^\circ C$. After 4 milkings, milk was pumped, stored in 2 cans of 68 L (full filled) by group, and then brought by refrigerated truck to INRA Unité de Recherches en Technologie et Analyses Laitières (URTAL, Poligny, France). Four series of manufacture by treatment were carried out for the cheeses. Milk fat: protein ratio was modified by skimming the milk to obtain the value of 0.80. A hundred liters of milk were used per vat to have a cheese of 9 to 10 kg with a diameter of 35 cm. The hard-cooked cheese manufacturing process was adapted from Charlet et al. (2009), with rennet (30-33 mL per vat of 520 mg/L rennet Marshall, Danisco, Vinay, France) and the use of lysozyme (10 mL per vat Delvozyme, Oenibrands, Montpellier, France). Starters were made of one strain of *Streptococcus thermophilus* (ST79), of *Lactobacillus helveticus* (FTL122) and of *Lactobacillus delbrueckii* (FTL139) from URTAL collection. The ripening temperature varied according to Charlet et al. (2009) and the total ripening time was 180 days.

Measurements on hard cooked cheese. Neutral volatile compounds were determined using Purge and Trap extraction coupled with GC-MS. Five grams of cheese were homogenized in 50 mL of UHQ-deodorized water by using an Ultra-Turrax homogenizer. The analysis was performed on 10 mL of this suspension as described by Di Cagno et al (2014). Volatile FA were analyzed by gas

chromatography after solvent extraction and saponification, as described by Di Cagno et al (2007). Aerobic mesophilic bacteria counts were determined in milk on plate count agar (Biokar, Beauvais, France) after incubation at 30 °C for 3 d, psychrotrophic bacteria on plate count agar (Biokar, Beauvais, France) after incubation at 7° C for 10 d and coliforms on Violet Red Bile Agar (Difco, Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) after aerobic incubation at 30° C for 24 h. Thermophilic lactobacilli, thermophilic streptococci, mesophilic lactobacilli and propionic acid bacteria were enumerated in milk inoculated with starter (for the first 2 microflora mentioned) and in cheese at the beginning and end of ripening according to Bouton et al. (2009). Compression measurements were performed at 15°C on slices of cheese after 6 months of storage with a texture analyzer TA-XT2 (RHEO, France) between 2 parallel plates. The tool movement speed was 0.8 mm/s until 80% of penetration of the total depth of the sample. The rheological parameters were the module of deformability MD (elasticity of the cheese), the point of apparent fracture characterized by the stress σ (Cf), the strain ϵ f (Df) and the work Wf at fracture. For sensory analysis, 4 half-cheeses per treatment stored at +7°C were sent to the INRA Unit of Magneraud (Surgères, France) by refrigerated transport 6 months after manufacture. Cheese slices were put in a chamber at the temperature of 14°C at least one hour before the beginning of the tasting. Cheeses were subjected to the sensory analysis panel composed of 12 trained panelists (AFNOR NF V 09 105). In single sessions, each panel member had to evaluate aspect (color, opening), behavior at cutting (firmness, sticky, and brittle), texture (elasticity, firmness, dry, sticky, grainy), flavor (total intensity, acid, bitter, salty, spicy, fruity, and abnormal), texture, giving a score between 0 and 10 (the more intense the criteria, the greater the score).

Butter production process. Butter was manufactured during wk 5 and 6 of the experiment. Milk of all cows of the 4 groups was transferred to 4 individual tanks, each tank corresponding to a group. Milk was stored at 4°C. After 4 milkings – different from cheese making process milk –, milk was pumped and stored in 2 cans of 68 L (full filled) by group, and then brought by refrigerated truck to the technology hall of Thère (Saint-Lô, France). Four series of manufacture by treatment were carried out for the butters. Milk was skimmed at 40°C using a cream separator (Elecrom 3, Elecrom, Châtillon, France). Cream was pasteurized by heating at 85°C for 50 s. The physical ripening was processed as follows: storage for about 16 h at 14°C and addition of ferment Danisco MM100 (3 units/100 L) to reduce pH to a value of 4.8-5.2. Ten L of cream were churned at 10°C in an experimental churn (Elba 30, Elecrom) until butter kernels formed. The buttermilk was separated from the butter kernels. Butter was washed twice with cold water (10°C) in the churn. Washed butter was worked in the churn into a homogeneous mass. Butter was packaged by hand into 250-g pats. Seven pats were conserved at –20°C for sensory analysis; 3 pats were conserved at 4°C for rheological properties.

Measurements on butter. Butter samples (one sample corresponds to a 6 cm × 6 cm × 3.5 cm parallelepiped of butter) were tested for resistance to penetration using a rheometer TA-XT2ia (Stable Micro Systems LTD, Godalming, UK) equipped with a P/45G 45° cone at 8°C. Measurements were taken on 3 pats of butter conserved at 4°C for 15 d. The butters were taken out of the cooler (at 4°C) just before measurement. One measurement per sample was performed. The 45° cone sank into the samples at 1 mm/s until 20 mm of penetration. The rheological parameters raised were the force of maximum strength of butter (firmness) and the area under the curve (etability).

For sensory analysis, 5 pats of butter per manufactured butter stored at -20°C were sent to the INRA Unit of Magneraud (Surgères, France) by refrigerated transport (-20°C) 2 wk after manufacture. Butter pads were taken out of the freezer the day before the sensory analysis, and placed in a refrigerator for slow thawing at + 4° C. Butters were subjected to the sensory analysis panel composed of 12 trained panelists (AFNOR NF V 09 105). In single sessions, each panel member had to evaluate spreadability at 4°C, odor (total intensity, rancid, cream, abnormal), flavor (total intensity, rancid, cream, grass, metal, and abnormal), aspect (color, homogeneity of cut butter), firmness, homogeneity and melting in the mouth giving a score between 0 and 10 (the more intense the criteria, the greater the score). Spreadability consisted in scoring the ease of spreading with a knife a homogeneous sample of butter at 4°C on a rusk.

Calculation and statistical analyses

All statistical analyses on the data set for the 32 cows were performed using SAS software (SAS 9.2 Institute Inc., Cary, NC). The statistical significance threshold was set to $P < 0.05$. Trend was set to $P < 0.10$. Normality of data was checked using the Shapiro-Wilk test of the SAS-package univariate procedure. The effects of the diets on milk yield, milk composition (except for SL and MFG size), blood composition, weight, DMI and energy and protein supplies and balances, were analyzed using the GLM procedure of SAS according to the statistical model: $Y_{ij} = \mu + \text{alim}_i + \text{Cov } Y_{ij} + \epsilon_{ij}$, where Y_{ij} is the dependent variable, μ is the mean, alim_i is the effect of the i diet treatments (CTRL, L, ALG, L/ALG), $\text{Cov } Y_{ij}$ is the covariable associated with Y_{ij} (ie the value of Y_{ij} during the pre-experimental period), and ϵ_{ij} is the residual error associated with the j -th repetition. Effects of the diets on MFG size were analyzed using the GLM procedure of SAS according to the statistical model: $\text{MFG size}_{ijk} = \mu + \text{alim}_i + \text{Fat}_i + \epsilon_{ijk}$, where MFG size_{ijk} is the dependent variable, μ is the mean, alim_i is the effect of the diet treatments (CTRL, L, ALG, L/ALG), Fat_i (ie fat content during the pre-experimental period) is the covariable associated with MFG size, and ϵ_{ijk} is the residual error associated with the k -th repetition. Effects of the diets on SL were analyzed using the GLM procedure of SAS according to the statistical model: $\text{SL}_{ij} = \mu + \text{alim}_i + \epsilon_{ij}$, where SL_{ij} is the dependent variable, μ is the mean, alim_i is the effect of the diet treatments (CTRL, L, ALG, L/ALG) and ϵ_{ij} is the residual error associated with the j -th repetition. For each model, comparisons were performed with the LSMEANS statement.

Effects of the diets on butter and hard cooked cheese sensory and technological properties were analyzed using the GLM procedure of SAS according to the statistical model: $\text{variijk} = \mu + \text{alimi} + \text{dayj} + \epsilon_{ijk}$, where variijk is the dependent variable, μ is the mean, alimi is the effect of the diet treatments (CTRL, L, ALG, L/ALG), dayj is the effect of day of manufacture and ϵ_{ijk} is the residual error associated with the k -th repetition.

RESULTS

Ingestion and nutrient supply and balance

Total DMI did not differ between L and CTRL but decreased for ALG and L/ALG. As a consequence, net energy for lactation, PDIE and PDIN did not differ between L and CTRL but were lower for ALG and L/ALG ($P < 0.001$). However net energy and metabolic protein balance stayed positive except PDIE balance for ALG compared to CTRL. C18:3 intake was higher for L and L/ALG compared to CTRL and was lower for ALG ($P < 0.001$). C22:6 intake did not differ between L and CTRL and was higher for ALG and F/ALG ($P < 0.001$) (Table 3).

Milk yield and milk protein and fat contents

Milk yield, milk fat content, milk fat yield and milk protein yield did not differ between L and CTRL and were lower for ALG and L/ALG compared to CTRL ($P < 0.001$). Milk protein content was not different between L, ALG and CTRL but was higher for L/ALG ($P < 0.001$). Lactose content did not differ between treatments ($P = 0.065$). SCS was not different between L and CTRL but tended to be higher for ALG and L/ALG compared to CTRL ($P = 0.063$) (Table 4).

Milk protein and mineral composition

Total protein content was lower for L compared to CTRL ($P = 0.049$). Total nitrogen, total CN, CN:protein ratio, soluble protein, total calcium, soluble calcium, colloidal calcium:CN ratio, colloidal phosphorus and soluble phosphorus did not differ between L and CTRL. Colloidal calcium was lower for L compared to CTRL ($P < 0.001$). ALG, did not differ from CTRL for total nitrogen and total protein contents, total calcium, colloidal calcium contents and colloidal calcium:CN ratio, but CN:protein ratio was lower ($P < 0.001$), soluble protein content was higher ($P < 0.001$), and soluble phosphorus content was lower ($P < 0.001$) compared to CTRL (Table 5). For L/ALG, total nitrogen, total protein and whey protein contents were higher ($P = 0.048$; $P = 0.049$; $P < 0.001$ respectively) compared to CTRL. Casein:protein ratio was lower ($P < 0.001$), total calcium, colloidal calcium contents, colloidal calcium:CN ratio and colloidal phosphorus were higher ($P = 0.001$; $P < 0.001$; $P = 0.001$; $P < 0.001$ respectively) and soluble phosphorus was lower ($P < 0.001$) compared to CTRL. Urea content was

higher for L, AGL, L/ALG compared to CTRL (P=0.024) CN, soluble calcium, citrate and total phosphorus contents were not affected by the treatments (Table 5).

Milk fatty acid profile

The FA profile was affected by the treatments, the effects being much greater for ALG and L/ALG than for L. Compared to CTRL, SFA percentage was lower for L, ALG, L/ALG (P<0.001), milk udder-synthesized FA percentage (C4-C14) was lower for L and ALG and even lower for L/ALG (P<0.001). C16:0 percentage was lower for L and L/ALG (P=0.005) but was not significantly different for ALG compared to CTRL. C18:0 percentage was higher for L and was sharply lower for ALG and L/ALG compared to CTRL (P<0.001). MUFA and PUFA percentages were higher for L than for CTRL and the differences were greater for ALG and L/ALG (P<0.001 for MUFA; P<0.001 for PUFA). Compared to CTRL, *trans*-9 C18:1 and *trans*-10 C18:1 percentages were not significantly different for L, but were much higher for ALG and L/ALG (respectively P=0.001, and P<0.001). *Trans*-11+ *cis*-7 C18:1 percentage was higher for L than for CTRL and was much higher for ALG and L/ALG (respectively P<0.001). *Cis*-9 C18:1 percentage was higher for L than for CTRL and was lower for ALG and L/ALG (P<0.001). *Trans*-15 + *cis*-11 C18:1 percentage was not significantly different for L compared to CTRL but was higher for ALG and L/ALG (P<0.001). *Cis*-12 + *cis*-13 C18:1 percentage was not significantly different for L but was lower for ALG and L/ALG (P<0.001) compared to CTRL. *Cis*-15 C18:1 percentage was not significantly different for ALG compared to CTRL but was higher for L and L/ALG (P<0.001). Rumenic acid (*cis*-9, *trans*-11 C18:2) percentage was higher for L and was much higher for ALG and L/ALG (P<0.001). Total *trans* C18:1 percentage was not significantly different between L and CTRL but was higher for ALG and much higher for L/ALG (P<0.001). Total odd FA percentage was lower for L compared to CTRL (P<0.001), did not differ between CTRL and ALG, and was higher for L/ALG (P<0.001). ALA percentage was higher for L and L/ALG (P<0.001) compared to CTRL and was not significantly different for ALG. DHA percentage was not significantly different between L and CTRL but was higher for L/ALG and was much higher for ALG (P<0.001). N-6/n-3 FA ratio was lower for L, ALG and L/ALG (P<0.001). C14:1/C14:0 and C16:1/C16:0 ratios were not significantly different between L and CTRL but were higher for ALG and were much higher for L/ALG (P<0.001, and P<0.001 respectively). C18:1/C16:0 ratio was higher for L and was lower for ALG and L/ALG (P<0.001) (Table 7). (Table 6).

Table 3. Effects of addition of extruded linseed, DHA Gold[®] and DHA Gold[®]/extruded linseed mixture on weight, DM, energy and protein intake and balance of dairy cows

| | CTRL | L | ALG | L/ALG | RMSE ¹ | Treatment effect |
|---------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------|------------------|
| Weight, kg | 613 | 610 | 593 | 601 | 13.62 | 0.052 |
| Ingestion, kg of DM/d | | | | | | |
| Total | 20.8 ^a | 19.6 ^a | 16.0 ^b | 16.9 ^b | 1.35 | < 0.001 |
| As forage | 15.8 ^a | 15.0 ^a | 12.1 ^b | 12.8 ^b | 1.05 | < 0.001 |
| As concentrate | 5.0 ^a | 4.6 ^a | 3.9 ^b | 4.1 ^b | 0.33 | < 0.001 |
| Supply, g/d unless noted | | | | | | |
| NEL, MJ/d | 7.17 ^a | 7.03 ^a | 5.58 ^b | 5.21 ^b | 0.347 | < 0.001 |
| PDIE2 | 2108 ^a | 2010 ^a | 1574 ^b | 1655 ^b | 139.6 | < 0.001 |
| PDIN3 | 2100 ^a | 2025 ^a | 1665 ^b | 1727 ^b | 124.4 | < 0.001 |
| CP | 2418 ^a | 2280 ^a | 1820 ^b | 2025 ^b | 302.0 | 0.001 |
| n-3 FA | 66.1 ^d | 203.9 ^a | 135.8 ^c | 191.5 ^b | 11.57 | <0.001 |
| C18:2 | 319.8 ^a | 327.1 ^a | 238.4 ^b | 283.9 ^a | 39.36 | < 0.001 |
| C18:3, ALA | 56.7 ^c | 192.7 ^a | 42.9 ^d | 145.6 ^b | 9.81 | < 0.001 |
| C20:5, EPA | 0.23 ^c | 0.13 ^d | 1.74 ^a | 0.81 ^b | 0.041 | < 0.001 |
| C22:6, DHA | 0.79 ^d | 2.3 ^c | 81.3 ^a | 36.9 ^b | 1.40 | < 0.001 |
| Balance, g/d unless noted | | | | | | |
| NEL, MJ/d | 0.58 ^b | 0.31 ^b | 0.43 ^b | 1.11 ^a | 0.329 | < 0.001 |
| PDIE2 | 281 ^a | 227 ^a | -76 ^c | 36 ^b | 107.6 | < 0.001 |
| PDIN3 | 274 ^a | 244 ^a | 12 ^b | 108 ^b | 98.7 | < 0.001 |

¹ Root mean square error

^{a-e} Means in the same row with no common superscript differ (P < 0.05)

² PDIE = protein digested in the small intestine supplied by rumen-undegraded dietary protein and by microbial protein from rumen fermented OM (Institut National de la Recherche Agronomique, 1989)

³ PDIN = protein digested in the small intestine supplied by rumen-undegraded dietary protein and by microbial protein from rumen degraded OM (Institut National de la Recherche Agronomique, 1989)

Table 4. Effects of addition of extruded linseed, DHA Gold[®] and DHA Gold[®]/extruded linseed mixture on milk yield and milk composition

| | CTRL | L | ALG | L/ALG | RMSE ¹ | Treatment effect |
|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|
| Milk yield, kg/d | 30.3 ^a | 31.5 ^a | 27.5 ^b | 24.7 ^c | 2.50 | < 0.001 |
| Fat content, % | 3.66 ^a | 3.45 ^a | 1.90 ^b | 1.81 ^b | 0.392 | < 0.001 |
| Protein content, % | 3.00 ^b | 2.87 ^b | 2.92 ^b | 3.26 ^a | 0.158 | < 0.001 |
| Fat yield, g/d | 1,118 ^a | 1,066 ^a | 515 ^b | 424 ^b | 124.0 | < 0.001 |
| Protein yield, g/d | 906 ^a | 899 ^a | 794 ^b | 793 ^b | 70.9 | 0.001 |
| Lactose, % | 4.71 | 4.79 | 4.80 | 4.71 | 1.052 | 0.065 |
| SCS ² | 2.00 | 2.03 | 2.30 | 2.45 | 0.414 | 0.063 |

¹Root mean square error; ²SCS: somatic cell score = log (SCC/1000); ^{a-c} Means in the same row with no common superscript differ (P < 0.05)

Table 5. Effects of addition of extruded linseed, DHA Gold[®] and DHA Gold[®]/extruded linseed mixture on milk protein and mineral composition

| | CTRL | L | ALG | L/ALG | RMSE ¹ | Treatment effect |
|-------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------|-------------------|------------------|
| N, g/kg | 31.4 ^{ab} | 30.4 ^b | 30.4 ^b | 32.7 ^a | 1.86 | 0.048 |
| Total protein, g/kg | 29.9 ^a | 28.7 ^b | 28.8 ^b | 30.9 ^a | 1.83 | 0.049 |
| Total CN, g/kg | 24.2 | 23.4 | 22.7 | 23.6 | 1.57 | 0.423 |
| CN:protein ratio, % | 80.8 ^a | 81.6 ^a | 78.9 ^b | 76.5 ^b | 1.57 | < 0.001 |
| Soluble protein, g/kg | 5.7 ^{bc} | 5.3 ^c | 6.1 ^b | 7.3 ^a | 0.57 | < 0.001 |
| Urea, mg/L | 25.3 ^c | 29.4 ^{ab} | 26.9 ^{bc} | 29.7 ^a | 4.07 | 0.024 |
| Total Ca, mg/kg | 1289 ^b | 1240 ^b | 1322 ^b | 1526 ^a | 123.3 | 0.001 |
| Colloidal Ca ² , mg/kg | 956 ^{bc} | 887 ^c | 1008 ^b | 1168 ^a | 115.6 | < 0.001 |
| Soluble Ca, mg/kg | 336 | 352 | 324 | 345 | 29.3 | 0.417 |
| Colloidal Ca ² /CN, mg/g | 39.4 ^{bc} | 37.6 ^c | 43.6 ^b | 50.4 ^a | 5.64 | 0.001 |
| Citrate, g/L | 1.57 | 1.70 | 1.49 | 1.66 | 0.154 | 0.128 |
| Total P, mg/kg | 976 | 931 | 919 | 985 | 47.67 | 0.073 |
| Colloidal P ³ , mg/kg | 627 ^{bc} | 590 ^c | 656 ^b | 744 ^a | 38.80 | < 0.001 |
| Soluble P, mg/kg | 346 ^a | 334 ^a | 262 ^b | 249 ^b | 26.64 | < 0.001 |

¹Root mean square error; ² Ca = calcium; ³ P = phosphorus; ^{a-c} Means in the same row with no common superscript differ (P < 0.05)

Table 6. Effects of addition of extruded linseed, DHA Gold[®] and DHA Gold[®]/extruded linseed mixture on milk fatty acids composition

| | CTRL | L | ALG | L/ALG | RMSE ¹ | Treatment effect |
|--|--------------------|---------------------|---------------------|--------------------|-------------------|------------------|
| C4:0 | 5.14 ^a | 4.41 ^b | 4.25 ^{bc} | 3.58 ^c | 0.712 | 0.002 |
| C5:0 | 0.04 | 0.02 | 0.02 | 0.03 | 0.017 | 0.198 |
| C6:0 | 3.01 ^a | 2.46 ^b | 2.07 ^{bc} | 1.81 ^c | 0.313 | < 0.001 |
| C7:0 | 0.04 ^a | 0.02 ^b | 0.01 ^b | 0.01 ^b | 0.017 | 0.021 |
| C8:0 | 1.46 ^a | 1.25 ^b | 0.93 ^c | 0.76 ^d | 0.152 | < 0.001 |
| C10:0 | 2.65 ^a | 2.35 ^a | 1.78 ^b | 1.30 ^c | 0.307 | < 0.001 |
| C10:1 | 0.25 ^a | 0.21 ^a | 0.14 ^b | 0.13 ^b | 0.036 | < 0.001 |
| C11:0 | 0.032 ^a | 0.020 ^{ab} | 0.012 ^{bc} | 0.000 ^c | 0.016 | 0.006 |
| C12:0 | 3.02 ^a | 2.73 ^{ab} | 2.43 ^b | 1.92 ^c | 0.327 | < 0.001 |
| C12:1 | 0.081 | 0.064 | 0.076 | 0.082 | 0.023 | 0.448 |
| C13:0 | 0.084 | 0.072 | 0.077 | 0.083 | 0.018 | 0.765 |
| C14:0 | 10.76 ^a | 10.22 ^a | 10.67 ^a | 9.25 ^b | 0.748 | 0.007 |
| iC15:0 | 0.157 | 0.154 | 0.156 | 0.153 | 0.021 | 0.226 |
| aiC15:0 | 0.339 ^b | 0.351 ^b | 0.384 ^a | 0.394 ^a | 0.031 | 0.002 |
| C14:1 | 1.15 ^c | 1.11 ^c | 1.54 ^b | 1.93 ^a | 0.239 | < 0.001 |
| C15:0 | 0.87 ^a | 0.76 ^b | 0.89 ^a | 0.87 ^a | 0.063 | < 0.001 |
| iC16:0 | 0.217 | 0.199 | 0.246 | 0.229 | 0.053 | 0.423 |
| C16:0 | 33.8 ^a | 29.2 ^c | 32.3 ^{ab} | 30.3 ^{bc} | 2.583 | 0.005 |
| iC17:0 | 0.083 ^b | 0.137 ^b | 0.289 ^a | 0.321 ^a | 0.084 | < 0.001 |
| C16:1 | 1.38 ^c | 1.24 ^c | 2.35 ^b | 3.02 ^a | 0.411 | < 0.001 |
| C17:0 | 0.45 ^b | 0.43 ^b | 0.49 ^a | 0.46 ^{ab} | 0.036 | 0.002 |
| C18:0 | 8.31 ^b | 9.83 ^a | 1.71 ^c | 1.95 ^c | 0.764 | < 0.001 |
| <i>Trans</i> -6+7+8 C18:1 | 0.194 | 0.319 | 0.337 | 0.256 | 0.136 | 0.403 |
| <i>Trans</i> -9 C18:1 | 0.254 ^b | 0.360 ^b | 0.719 ^a | 0.761 ^a | 0.260 | 0.001 |
| <i>Trans</i> -10 C18:1 | 0.47 ^c | 1.10 ^c | 11.05 ^b | 13.56 ^a | 1.313 | < 0.001 |
| <i>Trans</i> -11+ <i>cis</i> 7 C18:1 | 1.19 ^c | 2.48 ^b | 4.53 ^a | 4.66 ^a | 0.718 | < 0.001 |
| <i>Cis</i> -9 C18:1 | 16.8 ^b | 20.1 ^a | 9.9 ^c | 10.4 ^c | 1.675 | < 0.001 |
| <i>Trans</i> -15+ <i>cis</i> -11 C18:1 | 0.88 ^c | 1.14 ^{bc} | 1.26 ^{ab} | 1.47 ^a | 0.170 | < 0.001 |
| <i>Cis</i> -12+ <i>cis</i> -13 C18:1 | 0.42 ^a | 0.49 ^a | 0.05 ^b | 0.11 ^b | 0.089 | < 0.001 |
| <i>Cis</i> -15 C18:1 | 0.24 ^b | 0.45 ^a | 0.23 ^b | 0.39 ^a | 0.084 | < 0.001 |
| C19 | 0.14 ^a | 0.06 ^b | 0.03 ^b | 0.12 ^a | 0.056 | 0.002 |
| <i>Trans</i> -9 <i>trans</i> -12 C18:2 | 0.18 ^d | 0.31 ^{cd} | 0.40 ^{bc} | 0.58 ^a | 0.141 | < 0.001 |
| <i>Trans</i> -9 <i>cis</i> -12 C18:2 | 1.57 ^b | 1.50 ^b | 1.85 ^a | 1.62 ^b | 0.214 | 0.041 |
| C18:3 n-6 | 0.006 | 0.001 | 0.009 | 0.001 | 0.026 | 0.685 |
| C20:0 | 0.139 | 0.156 | 0.122 | 0.129 | 0.043 | 0.370 |
| C18:3 n-3 (ALA) | 0.19 ^b | 0.51 ^a | 0.25 ^b | 0.46 ^a | 0.086 | < 0.001 |
| <i>Trans</i> -11 C20:1 | 0.111 ^b | 0.103 ^b | 0.103 ^b | 0.184 ^a | 0.053 | 0.023 |
| <i>Cis</i> -9 <i>trans</i> -11 CLA | 0.50 ^c | 1.00 ^b | 1.42 ^a | 1.55 ^a | 0.338 | < 0.001 |
| C22:0 | 0.090 | 0.067 | 0.060 | 0.069 | 0.048 | 0.532 |
| C20:3 n-6 | 0.074 ^b | 0.080 ^b | 0.246 ^a | 0.086 ^b | 0.062 | < 0.001 |
| C20:5 n-6 | 0.008 | 0.008 | 0.013 | 0.001 | 0.023 | 0.947 |
| C22:1 n-11 | 0.000 | 0.000 | 0.013 | 0.023 | 0.026 | 0.059 |
| C20:5 n-3 | 0.015 ^b | 0.020 ^b | 0.205 ^a | 0.051 ^b | 0.045 | < 0.001 |
| C24:0 | 0.046 ^a | 0.021 ^b | 0.037 ^a | 0.006 ^b | 0.024 | 0.008 |
| C24:1 | 0.045 ^b | 0.015 ^b | 0.112 ^a | 0.145 ^a | 0.043 | < 0.001 |
| C22:5 n-3 | 0.054 ^c | 0.113 ^b | 0.208 ^a | 0.110 ^b | 0.038 | < 0.001 |
| C22:6 n-3 | 0.019 ^c | 0.008 ^c | 0.444 ^a | 0.170 ^b | 0.059 | < 0.001 |
| Unknown FA | 2.05 ^c | 2.34 ^c | 3.53 ^b | 4.39 ^a | 0.578 | < 0.001 |
| SFA | 70.7 ^a | 64.7 ^b | 58.8 ^c | 53.9 ^d | 3.24 | < 0.001 |
| MUFA | 23.6 ^d | 29.3 ^c | 32.3 ^b | 36.9 ^a | 2.58 | < 0.001 |
| PUFA | 2.72 ^c | 3.60 ^b | 5.13 ^a | 4.67 ^a | 0.600 | < 0.001 |
| C18:1/C16:0 ratio | 0.51 ^b | 0.71 ^a | 0.32 ^c | 0.34 ^c | 0.099 | < 0.001 |
| C14:1/C14:0 ratio | 0.108 ^c | 0.109 ^c | 0.149 ^b | 0.209 ^a | 0.024 | < 0.001 |
| C16:1/C16:0 ratio | 0.041 ^c | 0.042 ^c | 0.073 ^b | 0.099 ^a | 0.012 | < 0.001 |
| C18:1/C18:0 ratio | 2.02 ^b | 2.08 ^b | 5.73 ^a | 5.56 ^a | 0.408 | < 0.001 |
| <i>Cis</i> -9 <i>trans</i> -11 CLA/ <i>trans</i> -11 C18:1 ratio | 0.37 ^{ab} | 0.40 ^a | 0.31 ^b | 0.35 ^{ab} | 0.058 | 0.035 |
| Total <i>trans</i> C18:1 | 3.1 ^c | 5.4 ^c | 17.9 ^b | 20.4 ^a | 1.30 | < 0.001 |
| Total odd FA,% | 2.23 ^{bc} | 2.03 ^d | 2.35 ^{ab} | 2.44 ^a | 0.160 | < 0.001 |
| Short-chain FA, % | 15.7 ^a | 13.4 ^b | 11.7 ^b | 9.6 ^c | 1.33 | < 0.001 |
| n-6/n-3 FA ratio | 5.7 ^a | 2.7 ^{cd} | 2.2 ^d | 2.8 ^c | 0.51 | < 0.001 |

¹ Root mean square error

^{a-d} Means in the same row with no common superscript differ (P < 0.05)

Milk fat characteristics

Milk fat globule size. Compared to CTRL, median diameter d_{50} and average diameters $d_{4,3}$ and $d_{3,2}$ were not significantly different for L but were lower for ALG and L/ALG (respectively - 1.45 and - 1.31 μm for d_{50} ; - 1.31 and - 1.23 μm for $d_{4,3}$; - 2.16 and - 1.87 μm for $d_{3,2}$).

Milk free fatty acids. Initial FFA and SL, expressed in mEq/100 g fat, were not significantly different between L and CTRL but were higher for ALG and L/ALG (respectively + 0.55 and + 0.47 mEq/100 g of fat for initial FFA and + 0.88 and + 0.30 mEq/100 g of fat for SL). Initial FFA, expressed in mEq/kg of milk and in mEq/day, were not significantly different between treatments and SL, expressed in mEq/kg of milk and in mEq/day, was not significantly different for L and L/ALG but was significantly higher for ALG (+ 0.12 mEq/kg of milk and + 2.98 mEq/day) (Table 7).

Table 7. Effects of addition of extruded linseed, DHA Gold[®] and DHA Gold[®]/extruded linseed mixture on milk fat characteristics (milk fat globule size, milk spontaneous lipolysis)

| | CTRL | L | ALG | L/ALG | RMSE ¹ | Treatment effect |
|---------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|
| d_{50} , μm | 3.66 ^a | 3.25 ^a | 2.21 ^b | 2.35 ^b | 0.372 | < 0.001 |
| $d_{4,3}$, μm | 3.86 ^a | 3.41 ^a | 2.35 ^b | 2.63 ^b | 0.423 | < 0.001 |
| $d_{3,2}$, μm | 2.80 ^a | 2.36 ^a | 0.64 ^c | 0.93 ^b | 0.451 | < 0.001 |
| iFFA, mEq/100 g fat | 0.40 ^b | 0.45 ^b | 0.95 ^a | 0.87 ^a | 0.122 | < 0.001 |
| iFFA, mEq/kg milk | 0.14 | 0.16 | 0.17 | 0.16 | 0.105 | 0.435 |
| iFFA, mEq/day | 4.21 | 4.66 | 4.66 | 3.94 | 0.133 | 0.762 |
| SL ³ , mEq/100 g fat | 0.24 ^c | 0.25 ^c | 1.12 ^a | 0.54 ^b | 0.254 | < 0.001 |
| SL ³ , mEq/kg milk | 0.09 ^b | 0.08 ^b | 0.20 ^a | 0.10 ^b | 0.255 | 0.027 |
| SL ³ , mEq/day | 2.53 ^b | 2.57 ^b | 5.51 ^a | 2.52 ^b | 0.268 | 0.025 |

¹ Root mean square error; ² iFFA = initial free fatty acids; ³ SL = Spontaneous Lipolysis

^{a-c} Means in the same row with no common superscript differ ($P < 0.05$)

Plasma composition

Acetate, BHBA, NEFA and glucose contents were not significantly different among treatments. Total glycerol tended to be higher for L/ALG (+ 26.2 mg/L) than for CTRL and other treatments. Urea was higher for ALG (+ 65.1 mg/dL) and was not different between L, ALG and L/ALG. (Table 8).

Table 8. Effects of addition of extruded linseed, DHA Gold[®] and DHA Gold[®]/extruded linseed mixture on plasma composition

| | CTRL | L | ALG | L/ALG | RMSE ¹ | Treatment effect |
|--|------------------|-------------------|------------------|-------------------|-------------------|------------------|
| Total glycerol, mg/L | 89.7 | 99.1 | 95.6 | 115.9 | 16.22 | 0.076 |
| Acetate, mM/L | 0.87 | 0.93 | 0.88 | 1.11 | 0.230 | 0.122 |
| BHBA, $\mu\text{M}/\text{L}$ | 817 | 763 | 666 | 651 | 240.9 | 0.240 |
| NEFA ² , $\mu\text{M}/\text{L}$ | 151 | 135 | 127 | 118 | 81.4 | 0.616 |
| Glucose, mg/L | 725 | 727 | 708 | 747 | 42.8 | 0.527 |
| Urea, mg/L | 355 ^c | 406 ^{ab} | 420 ^a | 378 ^{ab} | 57.2 | 0.009 |

¹ Root mean square error; ^{a-c} Means in the same row with no common superscript differ ($P < 0.05$); ² NEFA = non-esterified fatty acids

Cheese making parameters and cheese characteristics

Compared to CTRL, milk pH was lower for L (- 0.03) and higher for ALG and L/ALG (respectively + 0.07 and + 0.09). Cheese parameters were not significantly different between L and CTRL. For ALG, clotting time was longer (+ 3 min), recovery coefficient of fat at molding, DM content at molding, solids-not-fat and cheese yield were lower (respectively - 16%, - 4.7%, - 1.0%, and - 0.5%) and whey fat was higher (+ 4.59 g/L). For L/ALG, solids-not-fat, cheese yields and whey fat were higher (respectively + 1.0%, + 0.52%, and 2.86 g/L). After ripening, for ALG and L/ALG compared to CTRL, fat in DM was lower (respectively - 5.7 and - 3.6%), moisture content in the fat-free cheese and calcium in DM were higher (respectively + 1.2 and +3.5%, and + 133 and + 313 mg/kg) (Table 9). Concerning cheese rheology, compared to CTRL, MD was significantly decreased for L/ALG (- 355 kPa). ϵF decreased in all group treatments but the effects were greater for L than for ALG and L/ALG (respectively - 51 vs -108). σF and Wf were lower for L, ALG and L/ALG than for CTRL and were not significantly different among those groups (Table 10).

Table 9. Effects of addition of extruded linseed, DHA Gold[®] and DHA Gold[®]/extruded linseed mixture on cheese making parameters

| | CTRL | L | ALG | L/ALG | RMSE ¹ | Treatment effect |
|--|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|
| Milk pH | 6.81 ^b | 6.78 ^c | 6.88 ^a | 6.90 ^a | 0.015 | < 0.001 |
| Clotting time, min | 27.1 ^b | 26.9 ^b | 30.1 ^a | 28.3 ^b | 0.97 | 0.004 |
| At molding | | | | | | |
| Recovery coefficient of fat, % | 86.8 ^a | 82.9 ^a | 70.8 ^b | 80.3 ^a | 3.52 | 0.001 |
| DM content at molding, % | 43.3 ^a | 42.3 ^a | 38.6 ^b | 42.4 ^a | 0.92 | < 0.001 |
| Solids not fat, % | 31.0 ^b | 30.7 ^b | 30.1 ^c | 32.0 ^a | 0.26 | < 0.001 |
| Cheese yield, % | 7.85 ^b | 7.91 ^b | 7.33 ^c | 8.37 ^a | 0.175 | < 0.001 |
| Whey fat, g/L | 3.13 ^c | 3.97 ^c | 7.72 ^a | 5.99 ^b | 0.803 | < 0.001 |
| After ripening | | | | | | |
| Fat in DM, % | 44.7 ^a | 43.5 ^a | 39.0 ^c | 41.1 ^b | 1.17 | < 0.001 |
| Moisture content in the fat-free cheese, % | 49.5 ^c | 49.6 ^c | 50.7 ^b | 52.7 ^a | 0.42 | < 0.001 |
| Ca in DM, mg/kg | 1657 ^c | 1592 ^c | 1790 ^b | 1970 ^a | 46.8 | < 0.001 |

¹ Root mean square error ; ^{a-c} Means in the same row with no common superscript differ (P < 0.05)

Table 10. Effects of addition of extruded linseed, DHA Gold[®] and DHA Gold[®]/extruded linseed mixture on cheese rheology

| | CTRL | L | ALG | L/ALG | RMSE ¹ | Treatment effect |
|---------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|-------------------|------------------|
| MD (module of deformability), kPa | 840 ^a | 660 ^a | 602 ^{ab} | 485 ^b | 134.1 | 0.028 |
| ϵF (breaking deformation), | 0.511 ^a | 0.460 ^b | 0.393 ^c | 0.412 ^{bc} | 0.0310 | 0.002 |
| σF (breaking stress), kPa | 528 ^a | 326 ^b | 225 ^b | 228 ^b | 75.5 | 0.001 |
| Wf (breaking work), kJ/m ³ | 124.0 ^a | 72.6 ^b | 46.8 ^b | 49.6 ^b | 17.38 | < 0.001 |

¹ Root mean square error; ^{a-c} Means in the same row with no common superscript differ (P < 0.05)

Microbiological characteristics of initial milks were equivalent between treatments. Inoculated milks had the same levels of lactic starters. Microbial populations of early ripening cheeses were equivalent, except for thermophilic streptococci (higher with ALG and L/ALG). Microbial populations at the end of ripening cheeses were equivalent. However, these counts did not give us any idea about the nature of the microbial strains involved. So overall for the measured microbial populations, there were no major differences between treatments. However, we could have had identical levels of microbial populations, but with different activities (results not shown).

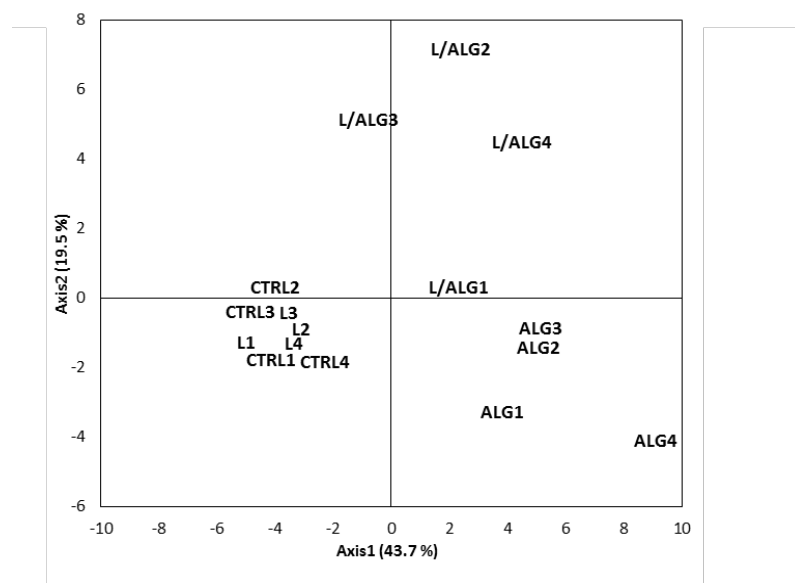
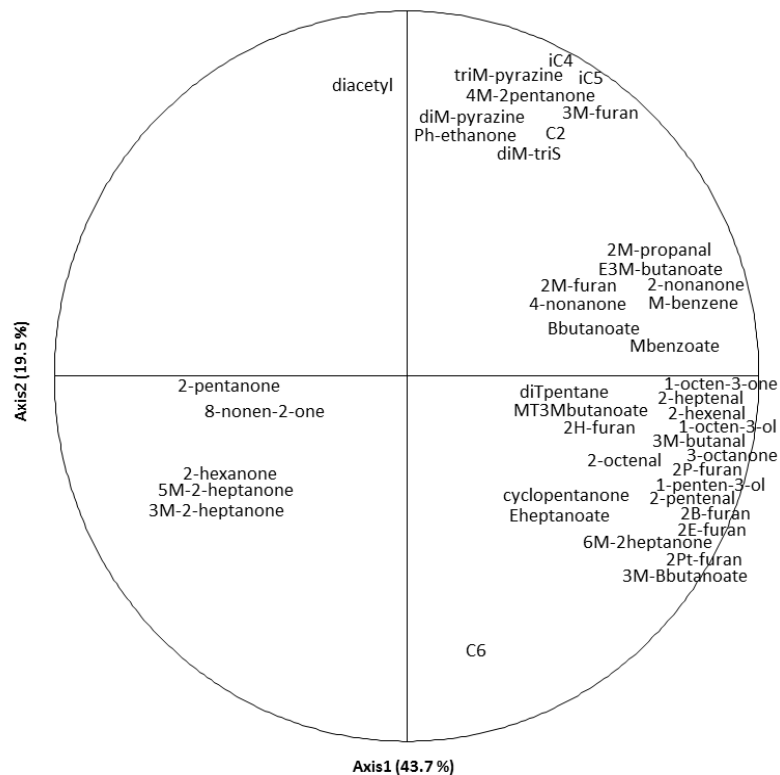
A total of 154 volatile compounds were identified, of which 44 were significantly affected by animal diet, as stated by variance analysis (not shown): 4 of the 7 FA, 5 of the 37 esters, 14 of the 34 ketones, 6 of the 22 aldehydes, 2 of the 22 alcohols, 3 of the 17 sulfur compounds, 7 of the 11 furans, 1 of the 2 pyrazines and 1 of the 2 miscellaneous compounds. These compounds were represented by a PCA graph (**Figure 1**). The first axis that accounted for 43.7% of total variance opposed ALG and L/ALG cheeses to L cheeses which were characterized by a higher content in 5 ketones (2-pentanone, 2-hexanone, 8-nonen-2-one, 3-methyl-2-heptanone, 5-methyl-2-heptanone). Higher levels of 4 esters, 7 ketones, the 2 alcohols, the 6 aldehydes, one sulfur compound, 6 furans, the 2 pyrazines and methyl-benzene were measured for ALG and L/ALG. 2-methyl-furan and dimethyl-trisulfide levels were lower for CTRL cheeses. These compounds were the only compound that distinguished L cheeses from the other treatments. The second axis accounted for 19.5% of total variance and distinguished ALG cheeses from L/ALG cheeses. Compared to ALG cheeses, higher levels of acids (acetic, isobutyric, isovaleric), 3-methyl-furan, and lower levels of caproic acid, 3-octanone, 6-methyl-2-heptanone, unsaturated compounds (1-octen-3-one, 1-penten-3-ol, 1-octen-3-ol), furans (2-ethyl-, 2-propyl-, 2-butyl-, 2-pentyl-) had been measured for L/ALG. The highest level of 3-methyl-butyl butanoate, cyclopentanone, 2,4-dithiapentane were measured for ALG and the highest level of diacetyl were measured for L/ALG.

Figure 1. Principal Component Analysis (PCA) of the 44 volatile compounds significantly affected by animal diet (as determined by variance analysis).

a. Correlation circle: Volatile fatty acids: acetic (C2), caproic (C6), isobutyric (iC4), isovaleric (iC5) acids; Esters: methyl benzoate (Mbenzoate), ethyl 3-methyl-butanoate (E3M-butanoate), ethyl heptanoate (Eheptanoate), butyl butanoate (Bbutanoate), 3-methyl-butyl butanoate (3M-Bbutanoate); Ketones: 2-pentanone, 2-hexanone, 3-octanone, 4-nonanone, 2-nonanone, 1-octen-3-one, 8-nonen-2-one, diacetyl, 4-methyl-2-pentanone (4M-2pentanone), 3-methyl-2-heptanone (3M-2heptanone), 5-methyl-2-heptanone (5M-2heptanone), 6-methyl-2-heptanone (6M-2heptanone), cyclopentanone, 1-phenyl-ethanone (Ph-ethanone); Aldehydes: 2-pentenal, 2-hexenal, 2-heptenal, 2-octenal, 2-methyl-propanal (2M-propanal), 3-methyl-butanal (3M-butanal); Alcohols: 1-penten-3-ol,

1-octen-3-ol; Sulfur compounds: dimethyl-trisulfide (diM-triS), 2,4-dithiapentane (diTpentane), S-methyl-thio-3-methyl-butanoate (MT-3M-butanoate); Furans: 2-methyl-furan (2M-furan), 3-methyl-furan (3M-furan), 2-ethyl-furan (2E-furan), 2-propyl-furan (2P-furan), 2-butyl-furan (2B-furan), 2-pentyl-furan (2Pt-furan), 2-hexyl-furan (2H-furan); Pyrazines: 2,5-dimethyl-pyrazine (diM-pyrazine), trimethyl-pyrazine (triM-pyrazine); Miscellaneous: methyl-benzene (M-benzene)

b. Representation of samples: Cheeses with Control diet (**CTRL**), extruded linseed diet (**L**), microalgae diet (**ALG**), microalgae/extruded linseed diet (**L/ALG**); number = period of cheese-making



Panelists found a lot of differences between the cheeses. Concerning the aspect, the color of ALG and L/ALG cheeses was less pronounced (- 0.9 and - 0.6) than for CTRL and L. The score of the cheese opening was higher for L, ALG and L/ALG (respectively + 0.5, + 0.8 and + 1.7). Concerning the behaviour of cheeses at cutting, firmness was lower for ALG and L/ALG (- 0.4 and - 0.5,) compared to CTRL and L did not differ from CTRL. The texture was more brittle (+ 0.5) for L/ALG cheeses than for the other 3 cheeses. Treatments had no effect on sticky texture at cutting. Concerning the texture of cheese, elasticity and firmness were lower for ALG and L/ALG and grainy texture was higher for ALG and L/ALG (respectively - 0.4, and - 0.5; - 0.7, and - 0.8; + 0.7, and + 0.8,) compared to L and CTRL and firmness was lower for L cheeses compared to CTRL. Cheese total intensity of flavor was lower for L. Spicy flavor was increased for ALG and L/ALG (+ 0.4 and + 0.7). Treatments had no significant effect on acid, bitter, fruity and abnormal flavors (Table 11).

Butter making parameters

It was not possible to make butter from ALG and L/ALG milk creams, using the technology described in materials and methods because no butter kernels were formed even after a long churning time. Churning time and butter yield were not different between CTRL and L. Firmness of butter decreased for L compared to CTRL. No effect of L on spreadability was measured by rheology (Table 12). Concerning the characteristics of butters determined by sensory analysis, almost all the criteria were significantly different between CTRL and L. Spreadability and homogeneity of cut butter increased for L and color decreased for L compared to CTRL (- 0.3). In mouth, firmness was lower (- 0.7) and homogeneity and melting were higher (respectively + 0.3, and + 0.6) for L compared to CTRL. Total intensity of odor, rancid and abnormal odors were lower (respectively - 0.4; - 1.0 and - 0.8,) for L while cream odor was higher (+ 0.5). Total intensity of flavor, rancid, and abnormal flavors were lower (respectively, - 0.3; - 1.2; and - 0.9,) and cream flavor was higher (+ 0.5) for L compared to CTRL. No effect of L on grass and metal flavors was detected (Table 13).

Table 11. Effects of addition of extruded linseed, on butter making parameters and rheology

| | CTRL | L | RMSE ¹ | Treatment effect |
|---------------------------------------|------|------|-------------------|------------------|
| Churning time, min | 23.3 | 37.0 | 15.1 | 0.385 |
| Butter yield, % | 42.1 | 39.8 | 2.50 | 0.375 |
| <u>Rheology</u> | | | | |
| Maximum strength (Firmness), N | 18.0 | 14.4 | 1.18 | 0.062 |
| Area under the curve (Spreadability), | 141 | 114 | 15.1 | 0.163 |

¹Root mean square error

Table 12. Effects of addition of extruded linseed, DHA Gold® and DHA Gold®/extruded linseed mixture on characteristics of cheeses determined by sensory analysis

| | CTRL | L | ALG | L/ALG | RMSE ¹ | Treatment effect |
|----------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|
| <u>Aspect</u> | | | | | | |
| Color | 3.8 ^a | 4.0 ^a | 2.9 ^c | 3.2 ^b | 0.80 | < 0.001 |
| Opening | 1.4 ^c | 1.9 ^b | 2.2 ^b | 3.1 ^a | 1.19 | < 0.001 |
| <u>Behavior at cutting</u> | | | | | | |
| Firmness | 4.6 ^a | 4.4 ^{ab} | 4.2 ^{bc} | 4.1 ^c | 0.79 | 0.002 |
| Sticky texture | 0.8 | 0.8 | 0.8 | 0.9 | 0.49 | 0.977 |
| Brittle texture | 1.0 ^{bc} | 0.9 ^c | 1.1 ^b | 1.5 ^a | 0.69 | < 0.001 |
| <u>Texture</u> | | | | | | |
| Elasticity | 2.2 ^a | 2.2 ^a | 1.8 ^b | 1.7 ^b | 0.84 | < 0.001 |
| Firmness | 3.6 ^a | 3.2 ^b | 2.9 ^c | 2.8 ^c | 0.79 | < 0.001 |
| Dry | 2.5 | 2.4 | 2.3 | 2.6 | 0.79 | 0.343 |
| Sticky | 1.1 | 1.1 | 1.1 | 1.2 | 0.53 | 0.769 |
| Grainy | 2.0 ^b | 2.1 ^b | 2.7 ^a | 2.8 ^a | 0.86 | < 0.001 |
| <u>Flavor</u> | | | | | | |
| Total intensity | 4.2 ^{ab} | 4.0 ^b | 4.3 ^a | 4.4 ^a | 0.62 | 0.005 |
| Acid | 0.7 | 0.7 | 0.8 | 0.7 | 0.48 | 0.971 |
| Bitter | 0.8 | 0.8 | 0.8 | 0.9 | 0.46 | 0.620 |
| Salty | 1.4 ^b | 1.3 ^b | 1.6 ^{ab} | 1.7 ^a | 0.50 | < 0.001 |
| Spicy | 1.7 ^b | 1.6 ^b | 2.1 ^a | 2.4 ^a | 0.90 | < 0.001 |
| Fruity | 1.6 | 1.5 | 1.6 | 1.4 | 0.66 | 0.184 |
| Abnormal | 0.5 | 0.5 | 0.6 | 0.6 | 0.38 | 0.137 |

¹ Root mean square error; ^{a-c} Means in the same row with no common superscript differ (P < 0.05)

Table 13. Effects of addition of extruded linseed on characteristics of butters determined by sensory analysis

| | CTRL | L | RMSE ¹ | Treatment effect |
|---------------------------|------------------|------------------|-------------------|------------------|
| Spreadability | 5.2 ^b | 6.0 ^a | 0.84 | < 0.001 |
| <u>Aspect</u> | | | | |
| Color | 3.9 ^a | 3.6 ^b | 0.73 | 0.010 |
| Homogeneity of cut butter | 1.4 ^c | 1.9 ^b | 1.19 | < 0.001 |
| <u>Behavior in mouth</u> | | | | |
| Firmness | 4.6 ^a | 3.9 ^b | 0.89 | < 0.001 |
| Homogeneity | 5.9 ^b | 6.2 ^a | 0.61 | 0.003 |
| Melting | 4.9 ^b | 5.5 ^a | 0.87 | < 0.001 |
| <u>Odor</u> | | | | |
| Total intensity | 4.6 ^a | 4.2 ^b | 0.92 | 0.008 |
| Rancid | 2.2 ^a | 1.2 ^b | 0.95 | < 0.001 |
| Cream | 0.7 ^b | 1.2 ^a | 0.87 | < 0.001 |
| Abnormal | 2.0 ^a | 1.2 ^b | 0.88 | < 0.001 |
| <u>Flavor</u> | | | | |
| Total intensity | 4.7 ^a | 4.4 ^a | 0.78 | 0.002 |
| Rancid | 2.3 ^a | 1.1 ^b | 1.18 | < 0.001 |
| Cream | 1.2 ^b | 1.7 ^a | 1.16 | 0.006 |
| Grass | 0.3 | 0.3 | 0.30 | 0.760 |
| Metal | 0.4 | 0.3 | 0.30 | 0.157 |
| Abnormal | 2.0 | 1.1 | 0.91 | < 0.001 |

¹ Root mean square error; ^{a-b} Means in the same row with no common superscript differ (P < 0.05)

DISCUSSION

Feeding L had no impact on milk yield and milk fat characteristics while ALG and L/ALG induced reduction of ingestion, halved milk fat content, led to a decrease in MFG size, an increase in milk SL and impaired milk transformation into butter and cheese abilities. This feed form of ALG had a deleterious effect on dairy cows.

Milk yield and milk fat and protein contents

Extruded linseed supplementation at 2.5% of DMI, regardless of the feed form, had no deleterious effect on milk yield, milk fat and protein contents and yields. Our results are consistent with Neveu et al. (2013), Livingstone et al. (2015) and Ferlay et al. (2013) but are not consistent with Chilliard et al. (2009) and Hurtaud et al. (2010) who observed a decrease in fat and/or protein yields, for similar extruded linseed doses in the diet (between 2.1% and 6.75% of DM). Impacts of extruded linseed on milk production and milk traits seem to be variable in the literature, depending on ruminal conditions (Hurtaud et al., 2010) and metabolism of provided lipids (Chilliard et al., 2007). In fact, LCFA digestion produces a series of intermediates known to inhibit milk fat synthesis (Bauman and Griinari, 2001; Looor et al., 2005b; Shingfield et al., 2010) such as *trans*-10 C18:1, and *trans*-10 *cis*-12 C18:2. In our study, no significant change was observed for *trans*-10 C18:1 however *trans*-11 C18:1, *cis*-9-C18:1 and *cis*-9 *trans*-11 C18:2 slightly increased: few changes in ruminal fermentative activity occurred during extruded linseed supplementation. Among other factors, extruded linseed doses, nature of forage and forage/concentrate ratio can modulate *trans*-10 C18:1, *trans*-11 C18:1 and *cis*-9 *trans*-11 C18:2 production and thus, milk fat yields (Hurtaud et al., 2010; Ferlay et al., 2013; Neveu et al., 2013). This would explain the differences observed among trials. Microalgae DHA Gold[®] supplementation led to a sharp decrease in milk yield due to a decrease in DMI, and to a drastic drop of fat content and fat and protein yields. Our results are consistent with Boeckeaert et al. (2008) and Abughazaleh et al. (2009). These effects are similar to the effects of fish oils (Chilliard et al., 2007). Indeed, *trans*-10 C18:1 sharply increased (+ 10.6%) and *trans*-11 C18:1 and *cis*-9 *trans*-11 C18:2 increased, leading to halving the milk fat yield. The observed decrease in protein yield in ALG and L/ALG, might be explained by the reduction of ingestion and thus the reduction in energetic and protein supplies. The decrease in microbial crude protein flow to duodenum and a decrease in microbial efficiency could also lower the amount of microbial nitrogen supply, as described by Gonthier et al. (2004). Combination of microalgae DHA Gold[®] and extruded linseed led to a larger decrease in milk yield and fat yield (although non-significant for fat yield) compared to microalgae DHA Gold[®] supplementation. *Trans*-10 C18:1 was effectively higher, which would explain a higher downregulation of milk fat synthesis.

Milk fat characteristics

Milk FA profile. As expected, L, ALG and L/ALG treatments led to a decrease in SFA percentage and an increase in MUFA and PUFA percentages. The decrease in SFA was similar to that reported by Hurtaud et al. (2010) in similar conditions. These modifications were even stronger when cows were supplemented with microalgae DHA Gold[®] and with a microalgae DHA Gold[®] and extruded linseed combination, mainly due to the significant decrease in C18:0. This is consistent with Boeckeaert et al. (2008). Faster rate of FA release into the rumen from microalgae DHA Gold[®] would explain a higher production of *trans* FA, to the detriment of C18:0 production in the rumen, leading to a higher inhibitory effect on de novo mammary lipogenesis (Chilliard et al., 2009; Ferlay et al., 2013). Short chain FA percentage was lower when cows were supplemented with extruded linseed and microalgae DHA Gold[®]. This is consistent with the literature (Hurtaud et al., 2010; Ferlay et al., 2013). Short FA percentage was even lower when cows were supplemented with a combination of microalgae DHA Gold[®] and extruded linseed. In this case, SCFA percentage was similar to that reported by Abughazaleh et al. (2009) with fish oil or microalgae supplementation. Indeed, as previously discussed, intermediates of BH such as *trans*-10 C18:1, *trans*-11 C18:1 and *cis*-9 *trans*-11 C18:2, which inhibit milk fat synthesis (Bauman and Griinari, 2001; Looor et al., 2005b; Shingfield et al., 2010) were present in a higher amount when cows were fed with the combination between microalgae DHA Gold[®] and extruded linseed. This would explain the lower SCFA percentage i.e. the lower FA synthesis in the mammary gland. Extruded linseed supplementation contributed to enriching milk in ALA and microalgae DHA Gold[®] supplementation contributed to enriching milk in DHA, as expected. This contributed to improving the n-6/n-3 FA ratio in milk. The enrichment in ALA was consistent with Hurtaud et al. (2010) in similar conditions. To our knowledge, no reference for microalgae DHA Gold[®] supplementation at the same doses as ours is available in the literature. C14:1/C14:0 and C16:1/C16:0 ratios, corresponding to Δ 9-desaturase activity, were higher when cows were supplemented with microalgae DHA Gold[®] and even higher when supplemented with a microalgae DHA Gold[®] and extruded linseed combination. As shown before by Hurtaud et al. (2010), LCFA supplementation can increase the desaturase activity in the mammary gland. C18:1/C16:0 ratio, corresponding to the spreadability index, increased with extruded linseed supplementation as in Hurtaud et al (2010). Its decrease with microalgae DHA Gold[®] with or without extruded linseed could be due to the large increase of isomers of C18:1 such as *trans*-10 C18:1.

Milk fat globule size. Extruded linseed supplementation had no impact on MFG size. This is consistent with Hurtaud et al. (2010) who found no impact of extruded linseed at 2.1% of DM on MFG size. On the other hand, microalgae DHA Gold[®] supplementation and a combination of microalgae DHA Gold[®] and extruded linseed induced a strong decrease in MFG size. Briard-Bion et al. (2008) found that *trans*-11 C18:1 was negatively correlated with fat globule size ($R^2=0.87$) and related

to milk fat depression. Smaller MFG have also been encountered in other trials associated with a decrease in fat content (Hurtaud et al., 2010). The decrease in milk fat content would induce smaller MFG synthesis as also reported in Couvreur and Hurtaud (2016).

Milk spontaneous lipolysis. Extruded linseed supplementation had no impact on milk SL. This is not consistent with Hurtaud et al. (2010) who found a higher level of SL linked to extruded linseed supplementation. Knowing that SL is more fluctuant and more susceptible to variations on evening milking (Vanbergue et al., 2015), this might be due to the fact that, in our trial, samples were collected on morning milkings whereas in Hurtaud et al. (2010) samples had been collected on morning and evening milking and pooled in 60:40 proportion. ALG and L/ALG treatments increased initial FFA and SL, expressed in mEq/100 g of fat. However, initial FFA, expressed in mEq/kg of milk, were not different between groups and SL only increased in ALG. These differences between both measures are due to the considerable decrease in fat content. To our knowledge, it is the first time that SL had been measured related to microalgae DHA Gold[®] supplementation. We showed that SL increased sharply beyond a certain threshold of microalgae DHA Gold[®] supplementation because SL (in mEq/kg of milk) was not different between L/ALG and CTRL. According to Cartier and Chilliard, (1990), MFGM integrity is an important factor determining SL susceptibility. Both ALG and L/ALG presented alteration of MFG with drastic size reduction although only ALG presented an increase in SL (in mEq/kg of milk). The LCFA profile of the MFGM could differ between ALG and L/ALG due to differences in the FA profile in the diet. These differences could lead to variations in MFGM integrity.

Cheese making and properties

Results obtained with L were no different than with CTRL as previously described by Oeffner et al. (2013). The increase in coagulation time with ALG treatment could be due to higher milk pH associated with a low ratio of colloidal Ca to CN. Milk coagulation depends on this ratio (Hurtaud et al. 2001). The effect of pH on firming time and firmness had been described (Martin and Coulon, 1995). It could reflect a lower activation of rennet at higher pH. The original pH of milk could also reflect some aspect of its composition: distribution of calcium and phosphorus between casein micelles and serum which may have an impact on the coagulation (Grandison et al., 1984). The lower cheese yield with ALG treatment associated with a greater loss of fat in whey could be a consequence of the small size of the fat globules and of a less structured curd (less casein, less calcium). The smaller fat globules may have been able to escape from the whey instead of being integrated into the cheese matrix. Cheese yield was higher with L/ALG but moisture of cheese was also higher. Curds from milk with small globules generate more MFGM rich in phospholipids whose negative impact on drainage is well established (Michalski et al., 2002).

The presence of microalgae DHA Gold[®] in the dairy cow diet was by far the most determinant factor on the composition of volatile compounds. Extruded linseed had little effect by itself but modulated

ALG effects, either by enhancing some effects, or by giving specific ones. With or without L, the presence of microalgae DHA Gold[®] seemed to favor the oxidation of unsaturated fatty acids (**UFA**) with production of unsaturated aldehydes, alcohols and ketone and furans (Mc Sweeney and Sousa, 2000; Carpino et al., 2004; Bugaud et al., 2001). It also affected the degradation of many types of AA, with the production of branched aldehydes, benzene-derived compounds, sulfur compounds and pyrazines (Mc Sweeney and Sousa, 2000; Baltés, 1982). With L, microalgae had a specific positive effect on some microbial fermentation activities, including fermentations as shown by increased acetic acid and diacetyl levels, and on branched AA catabolism, as shown by increased branched fatty acids. Without L, microalgae DHA Gold[®] specifically enhanced lipolysis indicated by caproic acid, and also oxidation of UFA indicated by unsaturated ketones and alcohols and by furans, and methionine catabolism indicated by sulfur compounds. The higher levels of UFA in milk with ALG were probably linked to the higher levels of related degradation products. An effect of feed on the generation of compounds from fat lipolysis or oxidation has been described in milk and in numerous cheese varieties (Urbach 1990; Bugaud et al., 2001; Sympoura et al., 2009; Hurtaud et al., 2009). The composition of fatty acids, the presence of antioxidants and the level of energy may be involved. The effect of ALG on AA degradation products seems to indicate an action on microbial activity. Such an effect was observed by Bugaud et al. (2001) and Hurtaud et al. (2012), with different feeding design. Without any information on the microbial composition of milk and cheese, we can suggest hypotheses: 1) about different microbial populations, possibly linked the enhancement modifications of substrates or cofactors, and 2) about the metabolism reorientation of some bacteria, all influenced by the presence of microalgae DHA Gold[®]. Besides, extruded linseed may modify the source of carbon to be used by microflora, inducing changes in the use of carbohydrates or FA. Cheeses from ALG and L/ALG treatments are less colored than the others. This result could be a consequence of the size of the fat globules. Indeed, according to Michalski et al. (2004), milks with small MFG appear to produce less yellow cheeses. They are also less firm. As for the butter, it is a consequence of the milk fatty acid profile (Hurtaud et al., 2010).

Butter making and properties

Concerning butter with L treatment, the results are the same as in Hurtaud et al. (2010) with different doses of extruded linseed. Instrument-measured butter firmness tended to be lower under L treatment and was well correlated to the firmness characteristics determined by the taster jury performing sensory analysis. Milk FA composition of L cream affected the butter texture by implementing the amount of fat in solid or liquid phase. The lack of taste and flavor defects in butters produced under L treatment was previously reported in Hurtaud et al. (2010). Despite the high content of UFA with L, no taste defects appeared.

CONCLUSION

Extruded linseed supplementation, at a dose of 2.5% of DMI, had no deleterious effect on milk fatty acid, mineral and protein compositions, fat characteristics, butter and cheese processing and cheese volatile compounds. Extruded linseed had a positive impact on the milk fatty acid profile, despite the low transfer efficiency of beneficial fatty acids from diet to milk. Microalgae supplementation at small doses (340 g/d and 156 g/d) had a deleterious effect on milk fatty acid, mineral, protein compositions and fat characteristics, and the effect was even more deleterious when microalgae were associated with extruded linseed. A drastic drop in milk fat content was observed due to an increase of intermediates of biohydrogenation of LCFA. *Trans* fatty acid content was also increased. Milk fat globules were smaller and spontaneous lipolysis was enhanced. Microalgae supplementation also had a deleterious effect on butter processing, and on cheese processing and sensory characteristics. Lipid supplementation to the dairy cow diet can increase valuable fatty acids in milk if protected from rumen biohydrogenation. Further investigation on protected microalgae and on doses of microalgae in the diet should be carried out to prevent the rumen modification and the consequent deleterious effects on milk fat characteristics.

ACKNOWLEDGMENTS

Mathieu Guillevic (Valorex, Combourtillé, France) and Jacques Mourot (PEGASE, Agrocampus Ouest, INRA, 35590, Saint-Gilles, France) are to be thanked for their valuable scientific collaboration. The authors also thank all the staff of the experimental farm of Méjusseume: G. Boulet, A. Cozien, J.B. Eon, A. Eveno, M. Fargetton, M. Guilloux, J. Lassalas, A. Mottin, J. Orinel, J. Parois, F. Pichot, P. Pichot, D. Sidaner, M. Texier, and G. Théaud (INRA, Domaine de Méjusseume, F-35650 Le Rheu, France) for the herd management and for their assistance with milk sampling. We are grateful to P. Debournoux, N. Huchet, Y. Jaguelin-Peyraud, C. Perrier, S. Philau, and T. Le Mouël, for their technical assistance. Thanks are also due to the Joint Technical Unit of Research and Engineering on dairy farming (UMT RIEL, Rennes, France) for the constructive exchanges. The authors also thank Jane Williams for her fine work correcting the English in the manuscript.

This research received financial support from the ANR ALID 12-0003-01 AGRALID program.

REFERENCES

Les références sont fournies pour l'ensemble du manuscrit dans la partie « références bibliographiques »

Chapitre 2 - Partie 3

Effet du stade de lactation/gestation sur les variations de la lipolyse spontanée du lait de vache

D'après l'essai 1 du Chapitre 1, nous pouvons supposer l'existence d'un effet du stade physiologique de lactation dans les troupeaux actuel : la LS est fortement susceptible d'augmenter en début et en fin de lactation. Cependant, les effets du stade physiologique sur la LS, dans les exploitations et dans l'essai 1, sont la combinaison des effets indissociables du stade de lactation, du stade de gestation et du niveau de PL. Des essais en ferme expérimentale ont été menés pour mieux comprendre le poids relatif de chacun des trois éléments (Chazal et al., 1986 et 1987). S'il est facile de dissocier l'effet du stade de lactation et du stade de gestation en travaillant avec des VL gestantes / non gestantes, il est plus difficile d'avoir des niveaux élevés de PL en fin de lactation/ gestation. L'augmentation de la LS en fin de lactation / gestation a donc été associée à un effet majeur du stade de gestation, à partir du 6^{ème} mois. Cependant dans les deux cas (vaches gestantes ou non), la PL était faible en fin de lactation. De plus, sur le terrain, ou lors d'essais expérimentaux sur la lactation complète, l'alimentation varie au cours de la lactation, ne permettant pas toujours d'isoler l'effet du stade physiologique. Nous avons donc suivi un essai mis en place dans le cadre du programme DEFFILAIT sur le troupeau de Méjusseaume. Dans cet essai, les VL étaient alimentées avec une ration unique sur l'ensemble de la lactation, permettant le maintien d'une persistance laitière élevée en fin de lactation.

Ce suivi a fait l'objet du stage de fin d'étude de **Clément Cirot** dont certaines parties du rapport ont été insérées dans cette partie de la thèse. J'ai été l'encadrante principale de son travail.

Ces travaux ont fait l'objet d'une affiche aux Rencontres Recherches Ruminants (7-8/12/2016, Paris, France - [annexe 8](#))

Dans la suite du manuscrit nous nous référerons à cet essai comme à l'essai « stade »

INTRODUCTION

Les facteurs de variations de la LS sont nombreux et il est très difficile de les isoler les uns des autres afin d'étudier leur importance (Cartier et Chilliard, 1990). Très souvent dans la littérature, les effets du stade de lactation, de gestation et du niveau de PL sur la LS sont confondus. La plupart des auteurs concluent à une augmentation de la LS au cours de lactation mais il est difficile d'attribuer cette augmentation au stade de lactation, au stade de gestation ou à la PL (Arhne et Björck, 1985 ; Chazal et Chilliard, 1986 ; Bachman et al., 1988). De plus, la plupart des études s'intéressant à la LS datent des années 1970-1980, et n'ont pas été réactualisées. Or, le potentiel génétique des VL a fortement évolué, et leur PL a augmenté. Il semble donc nécessaire de faire une mise à jour des résultats, notamment en ce qui concerne les facteurs de variations physiologiques, une évolution de la PL ayant pu entraîner une modification des réponses en fin de lactation. Il a été montré que la LS dépend de 3 facteurs biochimiques principaux : la LPL, l'intégrité des GG, et l'équilibre activateurs/inhibiteurs (Cartier et Chilliard, 1990 ; Sundheim et Olivecrona, 1987b), qui forment le SLi. Cependant le fonctionnement du SLi est très peu compris. Il semblerait qu'il n'existe pas de relation particulière entre la LS et les composants majeurs du lait. L'objectif de cette étude était donc d'analyser les variations de la LS au cours d'une lactation, dans le cadre d'une alimentation et d'une PL constantes. Chaque mois, des mesures de LS et des constituants majeurs du lait, incluant la taille des GG, comme indicateurs de l'intégrité des GG (Evers, 2004) ont été réalisées sur le lait de la traite du matin et du soir.

MATERIEL ET METHODES

Animaux

Vingt-neuf VL de race Prim'Holstein du troupeau « étable » de la ferme expérimentale de Méjusseume ont été utilisées. Les mesures de PL ont eu lieu pendant l'ensemble de la lactation. Les autres mesures ont eu lieu du deuxième au neuvième mois de lactation. La sélection des VL pour cet essai a été faite de façon à ce que leurs dates de vêlage soient les plus proches possibles, et qu'il y ait 15 primipares et 14 multipares. Les vêlages ont été répartis sur 14 jours, entre le 16/09/2015 et le 29/09/2015. Les VL ont été logées en étable exclusivement durant toute la durée de l'expérimentation, avec accès aux auges individuelles. La reproduction a été assurée par insémination artificielle. Les vaches n'ont pas été synchronisées : les inséminations fécondantes ont donc eu lieu sur toute la période de l'essai.

Traite

Les traites étaient réalisées à 7 h et 16 h. La PL a été mesurée à chaque traite. Les prélèvements de lait ont eu lieu sur bidons dérivateurs, 2 jours de suite par mois, d'octobre à juin 2014.

Alimentation

La ration était une ration complète unique sur toute la lactation pour toutes les vaches laitières. Elle était composée d'ensilage de maïs (64,7 % MSI), de concentré énergétique (20 % de blé, 20% d'orge, 20% de pulpe de betterave, 20% de maïs, 15% de son de blé, 3% de mélasse de canne à sucre, 1% d'huile végétale, 1% de sel minéraux ; 13,5 % MSI), de tourteau de soja (10,5 % MSI), de luzerne déshydratée (10 % MSI), de compléments minéraux vitaminés (CMV ; 1 % MSI) et de sulfate NH₃ (0,3 % MSI). L'alimentation était distribuée individuellement 2 fois par jour, matin et soir.

Mesures expérimentales

Mesures sur les aliments. Les quantités individuelles d'aliments distribués ont été pesées quotidiennement. Les refus ont été pesés avant la distribution. Les quantités individuelles ont été ajustées en fonction de la consommation des animaux. Des échantillons d'ensilage de maïs et de concentrés ont été prélevés respectivement 5 et 1 fois par semaine pour l'analyse des valeurs alimentaires des aliments ([Tableau 1](#)).

Tableau 1 : Composition chimique et valeur alimentaire de la ration.

| Composition chimique de la ration, g/kg MS | |
|--|------|
| MS, % | 53,0 |
| MO | 936 |
| MAT | 130 |
| CB | 173 |
| NDF | 345 |
| ADF | 196 |
| Amidon | 272 |
| MG | 32,9 |
| Valeur alimentaire de la ration | |
| UFL, /kg MS | 0,93 |
| PDIE, g/kg MS | 94 |
| PDIN, g/kg MS | 88 |
| PDIE/UFL | 101 |

Mesures sur le lait. Des prélèvements de lait ont été effectués deux jours par mois, matin et soir pour l'évaluation du TB, du TP, de la teneur en lactose, de la numération cellulaire, des AG majeurs, de la taille des GG et de la LS. Les mesures concernant le TB, le TP, la teneur en lactose, les cellules, les AG, les profils d'absorbance des laits en moyen infrarouge (spectres MIR) et les mesures d'AGL ont été effectués par ANALIS (Saint-Berthevin, 53). Les TP et TB, la teneur en lactose et les AG ont été

mesurés par spectrométrie moyen infrarouge (Milkoscan, Foss Electric, Danemark). Le comptage cellulaire a été réalisé par cytométrie de flux. La taille des GG a été mesurée par granulométrie laser (Mastersizer 3000, Malvern, Malvern, Royaume-Uni). Le diamètre moyen en volume : $d_{4,3} = \frac{\sum(N_i \times d_i^4)}{\sum N_i \times d_i^3}$, le diamètre moyen en surface : $d_{3,2} = \frac{\sum(N_i \times d_i^3)}{\sum N_i \times d_i^2}$, le diamètre médian : d_{50} ont été mesurés. La LS a été évaluée par différence entre la quantité d'AGL initialement présents dans le lait après la traite et la quantité d'AGL présents après 24 h de stockage à 4°C. Le dosage des AGL a été réalisé par la méthode des savons de cuivre (Shipe et al., 1980).

Autres mesures. Les VL ont été pesées après la traite matin et soir sur les 2 jours de prélèvement par période, à l'aide d'une bascule automatique. La note d'état corporelle (NEC) a été évaluée au début de chaque mois par 3 évaluateurs (Bazin et al., 1984). La valeur de NEC retenue était la moyenne des 3 notes.

Calculs et analyses statistiques

Les effets de la période de prélèvement sur la LS, le TB, le TP, la teneur en lactose, la numération cellulaire, les AG, et la taille de GG ont été évalués par analyse de la variance pour données répétées, grâce à la procédure MIXED pour données répétées du logiciel SAS® 9.4, en utilisant comme variable explicative le facteur période et comme unité expérimentale sujette aux mesures répétées, l'animal. Le modèle statistique utilisé était le suivant : $Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + e_{ij}$; avec Y_{ij} = Variable étudiée, μ = Moyenne de la population, α_i = Effet attribué au stade de lactation, β_j = Effet attribué à la vache j, e_{ij} = Erreur associée à chaque Y_{ij}

Les effets du moment de traite ont été évalués, pour l'ensemble de la lactation, par analyse de la variance via la procédure GLM de SAS® 9.4, en utilisant comme variables explicatives les facteurs moment de la traite et animal. Le modèle statistique utilisé était le suivant : $Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + e_{ij}$; Y_{ij} = Variable étudiée, μ = Moyenne de la population, α_i = Effet attribué à la VL i, β_j = Effet attribué à la traite j, e_{ij} = Erreur associée à chaque Y_{ij} . Les corrélations entre les variables ont été évaluées via la procédure CORR du logiciel SAS® 9.4.

RESULTATS

Evolution de la lipolyse spontanée et des composants du lait au cours de la lactation

Evolution de la production laitière. Sur l'ensemble de la lactation, la PL a été plus élevée sur les traites du matin que sur les traites du soir (**Tableau 2**). La PL des traites du matin a très peu évolué durant la lactation (**Figure 1**). En effet, on a observé une augmentation de la PL entre le 1^{er} et le 2^{ème} mois de lactation. Ensuite, seule la PL du dernier mois de lactation a été significativement plus faible que les autres. La PL du soir a très peu évolué, mais cette évolution a été significativement différente entre certains mois au cours de la lactation (**Figure 1**). Elle a été maximale aux 2^{ème} et 3^{ème} mois de

lactation, et a diminué faiblement par la suite, avec une diminution plus importante entre le 4^{ème} et le 5^{ème} mois de lactation. La variation de la PL étant très faible, les PL des 2 derniers mois de lactation n'ont été significativement différentes que des productions des 2, 3 et 4^{èmes} mois de lactation.

Tableau 2 : Effet du moment de la traite

| | matin | soir | <i>p-value</i> |
|---------------------------|-------|------|----------------|
| PL, kg | 18,9 | 11,5 | < 0,001 |
| TB, g/L | 35,3 | 44,5 | < 0,001 |
| TP, g/L | 32,8 | 33,0 | 0,239 |
| d _{4,3} , µm | 3,52 | 3,52 | 0,898 |
| d _{3,2} , µm | 2,20 | 2,12 | 0,024 |
| d ₅₀ , µm | 3,35 | 3,38 | 0,361 |
| Lactose, g/L | 50,8 | 51,0 | 0,186 |
| Cellules, log/mL | 1,65 | 1,90 | < 0,001 |
| AGL initiaux ¹ | 0,20 | 0,20 | 0,596 |
| AGL à t=24 h ¹ | 0,45 | 0,76 | < 0,001 |
| LS ¹ | 0,25 | 0,56 | < 0,001 |
| AGS, % | 68,5 | 67,3 | 0,001 |
| AGI, % | 31,5 | 32,7 | 0,001 |
| AGMI, % | 24,2 | 25,6 | < 0,001 |
| AGPI, % | 4,33 | 4,33 | 0,977 |
| C18:1, % | 20,8 | 22,5 | < 0,001 |
| C16:0, % | 30,7 | 29,2 | < 0,001 |

¹ Exprimé en mEq g/100 g de MG

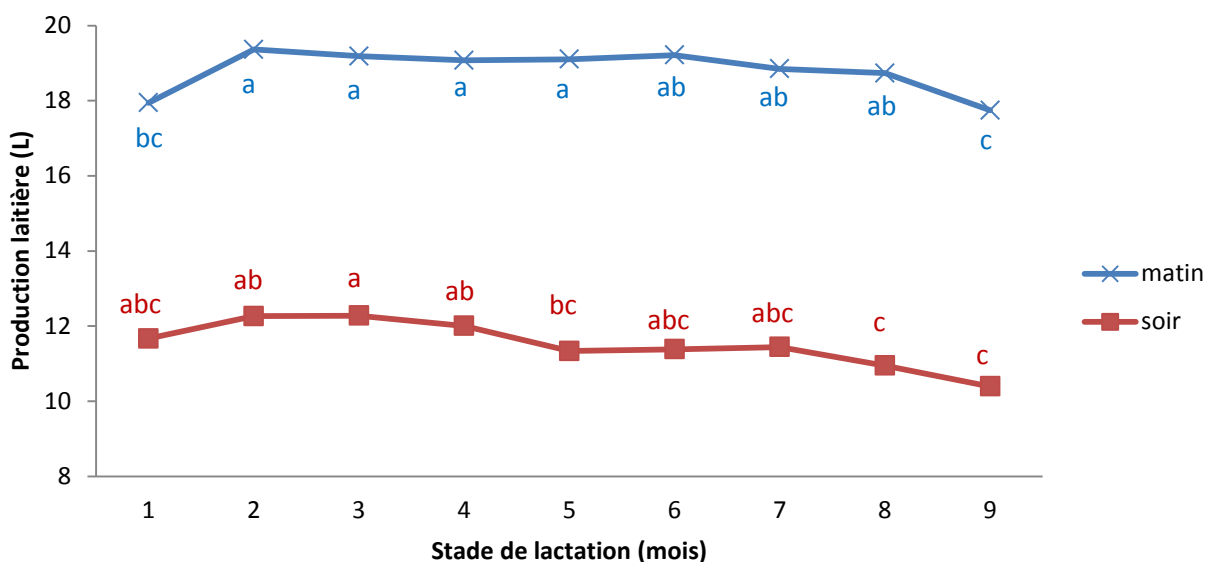


Figure 1 : Evolution de la production laitière au cours de la lactation pour les traites du matin et du soir.

Les valeurs ayant une lettre en commun (a, b, c) pour une même traite ne sont pas significativement différentes

Lipolyse spontanée. Tout au long de la lactation, la LS a été plus élevée dans les laits de la traite du soir que dans les laits de la traite du matin (**Tableau 2**). La corrélation a été peu importante entre la LS des traites du matin et la LS des traites du soir ($R^2 = 0,35$). Pour une meilleure lisibilité des résultats, bien que l'analyse statistique de l'évolution de la LS ait été réalisée avec les valeurs de LS transformées par logarithme, le **tableau 3** présente les moyennes de LS originales, avec les différences de significativité observées pour les valeurs transformées par logarithme. Concernant les laits de la traite du matin, seule la LS du 4^{ème} mois de lactation a été significativement supérieure à celles des 2^{ème} et 8^{ème} mois de lactation. Aucune différence significative n'a été observée entre les autres périodes. Pour les laits des traites du soir, la LS du 4^{ème} mois de lactation a été significativement plus élevée que celle des 2^{ème}, 7^{ème} et 8^{ème} mois de lactation. La LS n'a pas différé significativement entre les autres mois, malgré une évolution de la moyenne qui a été importante (**Tableau 3**). En effet, cette moyenne a masqué des variations interindividuelles très importantes. L'analyse graphique des évolutions individuelles a montré des pics de lipolyse ponctuels, qui ont eu lieu au même moment pour un nombre important de VL. Cela a été le cas au 3^{ème} mois de lactation, pour 9 animaux. Nous avons également observé une diminution de la LS pour 18 des 28 VL entre le 6^{ème} et le 7^{ème} mois de lactation. Une augmentation de la LS entre le 8^{ème} et le 9^{ème} mois de lactation a été observée pour 23 VL. Pour certaines VL, cette augmentation a été très importante, des valeurs de LS pouvant passer de 0,79 à 2,29 mEq/100 g de MG.

A partir d'observations graphiques, nous avons pu identifier 2 groupes de VL selon les valeurs de LS de leurs laits sur toute la lactation.

- 10 VL susceptibles dont le lait présente au moins deux pics de LS dépassant les 0,6 mEq/100g de MG sur l'ensemble des prélèvements
- 19 VL non susceptibles dont la LS n'a jamais dépassé 0,6 mEq/100g de MG sur l'ensemble des prélèvements.

Evolution de la matière grasse. Le TB des laits des traites du soir a été significativement plus élevé que celui des laits des traites du matin sur l'ensemble de la lactation (**Tableau 2**). Il n'y a pas eu de corrélation entre les TB des laits du matin et du soir. Pour les laits des traites du matin, le TB a été stable : il n'y a pas eu d'évolution significative au cours de la lactation (**Tableau 4**). Le TB a varié de façon plus importante pour les traites du soir pendant la lactation (**Tableau 5**). Ces variations ont été cependant irrégulières. Il n'y a pas eu de différence significative entre le début, le milieu et la fin de la lactation.

Tableau 3 : Evolution de la LS des laits au cours de la lactation

| Traite | LS ¹ | Stade de lactation | | | | | | | |
|--------|-----------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| | | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| Matin | LS ¹ | 0,24 ^b ± 0,19 | 0,28 ^{ab} ± 0,30 | 0,29 ^a ± 0,17 | 0,26 ^{ab} ± 0,19 | 0,22 ^{ab} ± 0,16 | 0,21 ^{ab} ± 0,17 | 0,20 ^b ± 0,22 | 0,27 ^{ab} ± 0,27 |
| Soir | LS ¹ | 0,38 ^b ± 0,27 | 0,58 ^{ab} ± 0,28 | 0,68 ^a ± 0,43 | 0,65 ^{ab} ± 0,50 | 0,59 ^{ab} ± 0,32 | 0,48 ^b ± 0,40 | 0,41 ^b ± 0,27 | 0,69 ^{ab} ± 0,59 |

Les moyennes des lignes avec des lettres différentes (a, b, c) sont significativement différentes ($P < 0,05$). Les valeurs affichées sont les moyennes \pm écart-type. ¹ Exprimés en mEq/100 g de MG.

Evolution de la taille des globules gras. Une très forte corrélation positive a été observée entre les mesures de d_{50} et de $d_{4,3}$ ($R^2 = 0,99$). Par conséquent, nous nous sommes uniquement intéressés aux mesures du $d_{4,3}$ et du $d_{3,2}$. L'étude de l'évolution de la taille des GG a commencé à partir du 3^{ème} mois de lactation. Dans les laits issus de la traite du soir, le $d_{4,3}$ a été plus élevé au 3^{ème} mois de lactation, et plus faible au 6^{ème} ($P < 0,001$). Pour les laits du matin, le $d_{4,3}$ a été significativement plus faible au 9^{ème} mois de lactation (**Tableaux 4 et 5**). Sur l'ensemble de la lactation, le $d_{3,2}$ a été significativement plus faible le soir (**Tableau 2**), indiquant une proportion plus importante de petits GG. Pour les laits issus de la traite du matin, le $d_{3,2}$ a diminué entre le 3^{ème} et le 4^{ème} mois de lactation, puis a augmenté entre le 5^{ème} et le 6^{ème} mois, et a diminué sur la fin de la lactation. Pour les laits de traite du soir, la diminution du $d_{3,2}$ a été beaucoup plus importante et constante entre le 3^{ème} et le 6^{ème} mois de lactation : la taille des GG a été quasiment divisée par deux. Ensuite, le $d_{3,2}$ a fortement augmenté entre le 6^{ème} et le 7^{ème} mois de lactation, avant de diminuer en fin de lactation. La taille des GG a donc été plus faible en fin de lactation qu'en début, mais elle n'a pas diminué pas de façon régulière (surtout le cas pour le $d_{3,2}$) (**Tableaux 4 et 5**).

Evolution de la composition en acides gras. Le pourcentage en AGS a été significativement plus faible dans les laits de traite du soir sur toute la lactation (**Tableau 2**). Le pourcentage en AGS du lait n'a pas été significativement différent entre le début et la fin de la lactation. Le pourcentage en C16:0 a été supérieur dans les laits de la traite du matin par rapport à celle du soir. Pour les laits de la traite du soir, sur les 6 premiers mois de lactation, le pourcentage de C16:0 n'a pas évolué significativement. Il a diminué entre le 6^{ème} et le 7^{ème} mois et a fluctué ensuite, tout en restant moins élevé qu'en début de lactation. Pour les laits du matin, il a augmenté entre le 3^{ème} et le 4^{ème} mois, puis a diminué jusqu'au 7^{ème} mois de lactation. Il a augmenté de nouveau en fin de lactation, sans toutefois atteindre les niveaux de début de lactation. Le pourcentage en AGMI a été sensiblement, mais significativement plus élevé dans les laits de la traite du soir. Après avoir été stable pendant les 6 premiers mois de lactation, il a augmenté jusqu'à la fin de la lactation. Le pourcentage en C18:1 a

été supérieur dans les laits de la traite du soir sur l'ensemble de la lactation. Il a évolué de façon irrégulière sur les 6 premiers mois de lactation. A partir du 7^{ème} mois de lactation, le pourcentage en C18:1 a augmenté significativement, jusqu'à la fin de l'essai. Le pourcentage en AGPI n'a pas été significativement différent entre les laits de la traite du matin et celle du soir. Son évolution est irrégulière, mais le pourcentage en AGPI a été plus élevé en fin de lactation qu'en début (**Tableaux 4 et 5**).

Liens entre la lipolyse spontanée et les composants du lait. Aucune relation n'a été observée entre la LS et le TB, le TP, la teneur en lactose, les CCS, les AG, la PL, le poids ou la NEC.

Liens entre lipolyse spontanée et facteurs extérieurs. Aucune corrélation n'a été établie entre la MSI, le débit de traite, le poste de traite, la durée de traite, la température extérieure, les dates de chaleurs et les dates d'insémination fécondante.

Tableau 4 : Evolution des caractéristiques de la matière grasse du lait de traite du matin au cours de la lactation

| | Stade de lactation | | | | | | | |
|-----------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| TB, g/L | 35,3 ± 7,0 | 35,2 ± 5,6 | 35,6 ± 8,1 | 35,6 ± 5,3 | 35,4 ± 5,2 | 34,7 ± 6,1 | 35,6 ± 5,1 | 35,2 ± 6,2 |
| AGS, % | 68,1 ^{cde} ± 3,8 | 69,4 ^b ± 3,2 | 68,5 ^{bcd} ± 3,8 | 70,8 ^a ± 3,0 | 68,8 ^{bc} ± 3,0 | 66,6 ^e ± 3,5 | 67,2 ^{de} ± 3,1 | 68,3 ^{bcd} ± 2,7 |
| AGI, % | 32,0 ^{abc} ± 3,8 | 30,7 ^d ± 3,2 | 31,6 ^{bcd} ± 3,8 | 29,3 ^e ± 3,0 | 31,3 ^{cd} ± 3,0 | 33,5 ^a ± 3,5 | 32,9 ^{ab} ± 3,1 | 31,8 ^{bcd} ± 2,7 |
| AGMI, % | 23,3 ^{de} ± 2,7 | 23,0 ^e ± 2,4 | 22,0 ^f ± 2,7 | 24,2 ^{cd} ± 2,9 | 22,9 ^{ef} ± 2,4 | 24,9 ^c ± 2,8 | 25,9 ^b ± 2,4 | 28,4 ^a ± 2,9 |
| AGPI, % | 3,22 ^d ± 0,63 | 4,49 ^c ± 0,68 | 3,33 ^d ± 0,47 | 4,79 ^b ± 0,64 | 4,21 ^c ± 0,39 | 4,94 ^b ± 0,58 | 4,36 ^c ± 0,52 | 5,49 ^a ± 0,49 |
| C18:1, % | 20,2 ^d ± 2,5 | 20,2 ^d ± 2,1 | 18,8 ^e ± 2,3 | 20,7 ^{cd} ± 2,6 | 19,0 ^e ± 2,3 | 21,3 ^c ± 2,6 | 22,6 ^b ± 2,1 | 24,8 ^a ± 2,5 |
| C16:0, % | 31,1 ^{bc} ± 2,7 | 31,3 ^b ± 2,6 | 32,5 ^a ± 2,4 | 31,2 ^b ± 2,1 | 31,0 ^{bc} ± 1,8 | 28,4 ^d ± 2,1 | 30,3 ^{bc} ± 1,9 | 29,8 ^c ± 1,9 |
| d _{4,3} , µm | | 3,78 ^a ± 0,37 | 3,53 ^b ± 0,32 | 3,50 ^{bc} ± 0,32 | 3,59 ^b ± 0,26 | 3,48 ^{bc} ± 0,44 | 3,37 ^{cd} ± 0,28 | 3,31 ^d ± 0,41 |
| d _{3,2} , µm | | 2,28 ^{ab} ± 0,18 | 2,10 ^{cd} ± 0,21 | 2,08 ^{cd} ± 0,21 | 2,33 ^a ± 0,26 | 2,35 ^a ± 0,31 | 2,18 ^{bc} ± 0,26 | 1,98 ^d ± 0,35 |
| d _{5,0} , µm | | 3,60 ^a ± 0,37 | 3,38 ^b ± 0,31 | 3,36 ^b ± 0,30 | 3,41 ^b ± 0,24 | 3,31 ^{bc} ± 0,40 | 3,21 ^{cd} ± 0,25 | 3,16 ^d ± 0,38 |

Les moyennes des lignes avec des lettres différentes (a, b, c) sont significativement différentes (P < 0,05). Les valeurs affichées sont les moyennes ± écart-type.

Tableau 5 : Evolution des caractéristiques de la matière grasse du lait de traite du soir au cours de la lactation

| | Stade de lactation | | | | | | | |
|-----------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| TB, g/L | 45,5 ^{ab} ± 6,4 | 46,5 ^a ± 6,6 | 42,4 ^c ± 7,8 | 44,4 ^{abc} ± 6,5 | 44,6 ^{abc} ± 6,1 | 44,2 ^{abc} ± 8,0 | 46,3 ^a ± 7,5 | 42,8 ^{bc} ± 7,3 |
| AGS, % | 67,6 ^{bc} ± 4,0 | 67,6 ^{bc} ± 3,8 | 66,9 ^{bcd} ± 4,1 | 69,7 ^a ± 3,2 | 68,2 ^b ± 3,5 | 65,8 ^d ± 3,5 | 66,3 ^{cd} ± 3,3 | 66,3 ^{cd} ± 2,9 |
| AGI, % | 32,5 ^{bc} ± 4,0 | 32,5 ^{bc} ± 3,8 | 33,2 ^{abc} ± 4,1 | 30,4 ^d ± 3,2 | 31,9 ^c ± 3,5 | 34,3 ^a ± 3,5 | 33,8 ^{ab} ± 3,3 | 33,8 ^{ab} ± 2,9 |
| AGMI, % | 24,8 ^{cde} ± 3,1 | 25,2 ^{cd} ± 3,2 | 24,0 ^e ± 3,1 | 25,1 ^{cd} ± 2,7 | 24,3 ^{de} ± 2,5 | 25,9 ^{bc} ± 2,5 | 26,8 ^b ± 2,4 | 29,7 ^a ± 3,0 |
| AGPI, % | 3,69 ^d ± 0,60 | 4,45 ^c ± 0,54 | 3,49 ^d ± 0,53 | 4,27 ^c ± 0,42 | 4,35 ^c ± 0,47 | 4,79 ^b ± 0,34 | 4,27 ^c ± 0,31 | 5,41 ^a ± 0,37 |
| C18:1, % | 21,8 ^{cde} ± 2,9 | 22,6 ^{bc} ± 2,9 | 21,0 ^{de} ± 2,8 | 21,9 ^{cd} ± 2,6 | 20,7 ^e ± 2,4 | 22,6 ^c ± 2,5 | 23,8 ^b ± 2,2 | 26,5 ^a ± 2,9 |
| C16:0, % | 30,2 ^a ± 3,2 | 29,8 ^a ± 3,3 | 30,3 ^a ± 3,3 | 30,0 ^a ± 2,7 | 29,5 ^a ± 2,5 | 27,5 ^b ± 2,4 | 28,7 ^a ± 2,3 | 27,7 ^b ± 2,1 |
| d _{4,3} , µm | | 4,06 ^a ± 0,34 | 3,50 ^b ± 0,32 | 3,47 ^{bc} ± 0,33 | 3,29 ^c ± 0,18 | 3,53 ^b ± 0,43 | 3,37 ^{bc} ± 0,25 | 3,38 ^{bc} ± 0,35 |
| d _{3,2} , µm | | 2,77 ^a ± 0,17 | 2,22 ^b ± 0,18 | 1,94 ^c ± 0,17 | 1,59 ^d ± 0,25 | 2,31 ^b ± 0,21 | 2,01 ^c ± 0,20 | 1,99 ^c ± 0,28 |
| d ₅₀ , µm | | 3,85 ^a ± 0,33 | 3,36 ^b ± 0,30 | 3,35 ^b ± 0,32 | 3,21 ^b ± 0,16 | 3,37 ^b ± 0,38 | 3,22 ^b ± 0,23 | 3,23 ^b ± 0,32 |

Les moyennes des lignes avec des lettres différentes (a, b, c) sont significativement différentes (P < 0,05). Les valeurs affichées sont les moyennes ± écart-type.

DISCUSSION

Une alimentation constante sur la lactation et une persistance élevée

Lors de cet essai, une ration unique a été distribuée à toutes les VL, sur la totalité de la lactation. Ceci a permis de supprimer l'effet de l'alimentation sur la LS observée par Chilliard et Lamberet (1984). La courbe de lactation moyenne a été atypique. En effet, les VL ont eu une très bonne persistance de lactation : elles ont produit en moyenne plus de 28 kg de lait par jour à la fin du 9^{ème} mois de lactation. De plus, nous avons observé une courbe de lactation avec un très faible pic de lactation contrairement aux courbes classiquement observées (Silvestre et al., 2009). L'alimentation a probablement été une des causes de cette courbe de lactation atypique, la ration étant restée la même sur toute la durée de la lactation. Les apports azotés de la ration étaient relativement faibles, ce qui a limité le potentiel de production des vaches en début de lactation, empêchant l'expression d'un pic de lactation (Broderick, 2003). La persistance de lactation a probablement été améliorée par plusieurs facteurs. D'une part, la ration n'a pas été modifiée en fin de lactation, et n'a donc pas été limitante pour la PL. D'autre part, la forte proportion de primipares (50 % dans notre essai, contre 33 % dans des élevages classiques, Institut de l'élevage et France Conseil élevage, 2014) a pu également contribuer à cette bonne persistance de lactation. En effet, la persistance de lactation des primipares est plus importante que celle des multipares (Roumeas et al., 2014 ; Brocard et al., 2010).

L'alimentation étant constante, l'évolution de la PL étant négligeable, nous avons pu considérer dans cet essai que les stades de lactation et de gestation ont été les facteurs physiologiques les plus susceptibles d'avoir un effet sur l'évolution de la LS.

Evolution de la quantité, de la composition et de la structure de la matière grasse

Aucune évolution du TB n'a pu être observée sur l'ensemble de la lactation. Pourtant, classiquement, le TB, après une chute pendant quelques jours après la parturition, augmente tout au long de la lactation. Cette augmentation du TB intervient en parallèle d'une diminution de la PL (Coulon et Rémond, 1991), qui n'a pas été observée dans cet essai. L'absence de variation du TB observée au cours de la lactation pourrait s'expliquer par la persistance de la PL. La taille des GG a diminué entre les 3^{ème} et 4^{ème} mois de lactation confirmant les résultats de Couvreur et al. (2006) et Huppertz et Kelly (2006), qui ont observé une diminution linéaire de la taille des GG après le pic de lactation. Nous n'avons pas observé de relation entre la LS et la taille des GG, en accord avec les précédents résultats de la thèse, alors que certaines études suggéraient l'existence d'une relation entre ces 2 mesures (Wiking et al., 2006). Les pourcentages en AGS ont varié significativement au cours de cet essai, mais de façon irrégulière. Stoop et al. (2009) avaient observé une augmentation régulière du pourcentage d'AGS pendant la première moitié de la lactation, avant leur diminution dans la 2^{ème} moitié de la lactation. Le pourcentage de C18:1 était plus élevé dans les laits de la traite du soir et le pourcentage de C16:0, moins élevé. Ferlay et al. (2010) avaient déjà observé des pourcentages d'AG issus de la circulation sanguine plus importants dans les laits du soir. Cette différence pourrait venir de la différence de l'allocation de l'énergie entre la journée et la nuit, liée à l'activité de la VL et à une lipomobilisation plus importante le jour. Nous n'avons pas observé de corrélation entre les pourcentages d'AGI et la LS, invalidant l'hypothèse de Chilliard (1982) qui suggérait que les AGI avaient un effet stimulateur sur la LS.

Evolution de la lipolyse spontanée au cours de la lactation, selon le moment de la traite

La lipolyse spontanée est plus élevée dans les laits du soir. Comme Ahrné et Bjorck (1985) et Jensen (1959), nous avons observé des valeurs de LS significativement plus élevées dans les laits issus de la traite du soir. Dans notre essai, comme pour les études citées ci-dessus, l'intervalle de traite entre le matin et le soir était plus court que l'intervalle entre le soir et le matin. On ne peut donc pas séparer l'effet intervalle de traite de l'effet matin/soir. Il est possible que la différence observée entre le matin et le soir soit entièrement due aux durées d'intervalles de traite. En effet, Bachman et al. (1988) n'ont pas observé de différence de LS entre les traites du matin et les traites du soir, avec des intervalles égaux entre les deux traites. Cependant, cette différence pourrait aussi être le reflet de la variation de la composition du lait selon les rythmes circadiens (Gianetto et Piccione, 2009 ; Ruf et Arnold, 2015).

Peu d'évolution de la lipolyse spontanée au cours de la lactation, mais des variations interindividuelles importantes. Nous avons classé les VL en deux groupes selon la susceptibilité de leur lait à la LS : « susceptibles » et « non susceptibles ». L'existence d'une susceptibilité à la LS variable selon les VL avait déjà été observée (Cartier et al., 1990 ; Chazal et Chilliard, 1986 ; Ray et al., 2013). Selon Deeth (2006), les VL produisant un lait « normal » produisent toujours ce même type de lait, et les VL produisant un lait sensible à la LS produisent toujours un lait sensible. Dans notre étude nous avons également eu des VL dont le lait avait toujours les mêmes caractéristiques concernant les niveaux de LS. Cependant, nous avons également observé que des VL produisant régulièrement un lait « normal » avaient également pu ponctuellement produire un lait sensible à la LS, et inversement. Certains animaux seraient donc capables de produire des laits avec des SLi différents à différentes périodes, indépendamment du stade de lactation.

Peu de variations moyennes de LS ont été observées au cours de la lactation contrairement aux observations de Chilliard (1982), Deeth (2006) et Ray et al. (2013). Cette observation peut être justifiée par le faible nombre de VL susceptibles à la LS et par l'importance des variations individuelles (Chazal et Chilliard, 1986). Au 4^{ème} mois de lactation, des animaux dont le lait était sensible à la LS ont eu une LS significativement plus élevée. Ce pic de LS n'a pas pu être relié à des variations d'autres paramètres laitiers, ni à d'autres paramètres environnementaux (température extérieure, durée du jour, durée de traite, débit de traite). Cependant leur survenue simultanée nous encourage à penser qu'il existe un facteur environnemental responsable. La LS a augmenté numériquement le 9^{ème} mois de lactation. Ce résultat a déjà été mis en évidence par Chazal et Chilliard (1986), Arhné et Bjork (1985), Bachman et al. (1988) et Jurczak (1995). Des mesures de LS le 10^{ème} et 11^{ème} mois de lactation auraient été pertinentes pour valider ou invalider cette observation. L'augmentation de la LS en fin de lactation pourrait donc être imputable au stade de gestation/lactation si elle était confirmée. Cela serait en accord avec les hypothèses de Chazal et al. (1986) et Jurczak (1995). Sur l'ensemble de la lactation, on observe des évolutions des variations individuelles de la LS très différentes entre les animaux. Il en résulte des amplitudes parfois importantes de niveau de LS entre deux mois consécutifs. Ces amplitudes sont comparables à celles que l'on peut observer avec des mesures de LS effectuées sur plusieurs jours consécutifs.

Pas de relation entre la lipolyse spontanée et les paramètres laitiers. Dans notre essai, nous n'avons mis en évidence aucune relation entre la LS et les autres paramètres laitiers étudiés. Pour le TB, le TP et le nombre de cellules, nos résultats confirment ceux de Cartier et Chilliard (1990). En revanche, nous n'avons pas mis en évidence de relation entre la LS et la taille des GG, comme le suggéraient Wiking et al. (2006).

CONCLUSION

Nous avons observé peu d'effets du stade de lactation sur la LS avec une PL maintenue constante. La LS n'a pas augmenté significativement en fin de lactation. Cependant, elle a augmenté numériquement le 9^{ème} mois suggérant le rôle prépondérant du stade de gestation/lactation par rapport aux niveaux de PL. Une évaluation sur une lactation plus longue aurait été pertinente pour valider cette hypothèse. Les variations de LS observées surtout dans les laits du soir sont essentiellement dues à des variations individuelles non expliquées. Deux groupes de VL ont pu être identifiés selon leur susceptibilité à la LS, sans pour autant avoir pu être caractérisés à l'aide d'autres variables. Il n'y a pas eu d'effet du stade de gestation, en cohérence avec Chazal et al. (1986), mais il y avait avec peu d'animaux au-delà de 6 mois de gestation.

REMERCIEMENTS

Merci à tout le personnel de Méjusseume, en particulier l'équipe de traite pour leur aide : Michel FARGETTON Jean PAROIS, Matthieu MOTTIN, Joseph ORINEL, Mathieu GUILLOUX, Françoise et Patrick PICHOT, David SIDANER. Merci également à Ginette THEAUD pour son travail et ses nombreux transferts de données. Merci aux techniciens impliqués dans les analyses de laboratoire : Cécile PERRIER, Nicole HUCHET.

REFERENCES

Les références sont fournies pour l'ensemble du manuscrit dans la partie « références bibliographiques »

Chapitre 2 -Partie 4

Effet de la nature du fourrage et d'une restriction alimentaire sur la lipolyse spontanée du lait de vache

Bien que l'alimentation soit un facteur clé pour l'élevage des VL, peu de données sont disponibles sur la relation entre les pratiques d'alimentation et la LS. L'impact de la restriction alimentaire a été beaucoup étudié dans le passé car on pensait qu'elle pouvait induire des variations importantes de LS. Cependant, la restriction alimentaire a été surtout étudiée dans le cadre d'une alimentation à base d'herbe conservée ou au pâturage. L'impact de la nature du fourrage ne concernait également que l'herbe fraîche et conservée. Une seule étude a porté sur l'ensilage de maïs alors que ce fourrage est aujourd'hui largement utilisé en élevage. De plus, très souvent, l'effet de la restriction alimentaire et celui de la nature du fourrage ont pu être confondus, à cause de la mauvaise qualité de certains fourrages. Cette confusion est également présente dans l'essai 1 du chapitre 1, où il est impossible d'associer les variations de LS observées en début de lactation à la nature du fourrage ou à la restriction alimentaire ou encore à l'interaction entre les deux facteurs. Un essai a donc été mis en place sur le domaine de Méjusseume sur trente-deux VL pour évaluer l'impact d'une restriction alimentaire dans le cas de l'ensilage de maïs et de l'herbe conservée comme fourrages principaux. Cet essai a également été utilisé pour travailler sur les mécanismes biochimiques de la LS. C'est pourquoi l'ensemble de l'essai est présenté en Chapitre 3 de la thèse. Seul l'abstract est présenté en partie 4 du chapitre 2.

Ces travaux ont fait l'objet d'une soumission dans le Journal of Dairy Science ainsi que d'une communication au 67^{ème} congrès de l'European Federation of Animal Science (29/08/2016-2/09/2016, Belfast, Irlande – [annexe 9](#))

Dans la suite du manuscrit, nous nous référerons à cet essai comme à l'essai « alimentation »

Effects of feeding restriction and nature of forage on milk lipolytic system.

E. Vanbergue^{†}, J.L. Peyraud^{*}, A. Ferlay[‡], G. Miranda[§], P. Martin[§], C. Hurtaud^{*1}**

^{*} PEGASE, INRA, Agrocampus Ouest, 35590, Saint-Gilles, France.

[†] Institut de l'élevage, Monvoisin, 35910 Le Rheu, France.

[‡] UMR1213 Herbivores, INRA, Vetagro Sup, 63122, Saint-Genès-Champanelle, France

[§]. GABI, AgroParisTech, INRA, Université Paris-Saclay, 78350, Jouy-en-Josas, France

¹Corresponding author: Catherine Hurtaud, INRA-Agrocampus Ouest UMR1348 PEGASE, F-35590 Saint-Gilles
Phone: +33 (0)2 23 48 51 02; Fax: +33 2 23 48 50 80 ; Email: Catherine.Hurtaud@rennes.inra.fr

ABSTRACT

Spontaneous lipolysis (SL) is responsible for technological and sensory properties impairment of milk and dairy products. Husbandry factors and particularly nutritional factors are known to modulate SL levels although biochemical mechanisms remain unclear. The aim of the trial was to study the effects of nature of forage and feeding restriction levels on SL mechanisms. Thirty two cows were divided into 4 groups according to their treatment. Diets were based on corn silage or haylage and dehydrated grass. Two levels of feed restriction were applied: “non-restricted” with cows fed at 100% of ad libitum dry matter intake (DMI) and “restricted” with cows fed at 75% of ad libitum DMI. The trial was conducted in a reverse design on feeding restriction level. Cows were followed during 12 wk 3 control wk and 2 period of 3 experimental wk. Milk samples were collected from morning and evening milkings at the end of each period for milk traits, fat globule size, protein and fatty acid profiles, lipoprotein lipase (LPL) activity and SL determinations. Data were analyzed with SAS GLM and CORR procedures. No statistical interaction of nature of forage and feeding restriction were shown on SL. When cows were restricted, SL was higher in morning milks (0.36 vs 0.26 mEq/100g fat) and even higher in evening milks (0.88 vs 0.60 mEq/100g fat). When cows were fed with corn silage, SL was higher in morning milk (0.41 vs 0.21 mEq/100g fat) but no effect of nature of forage was observed in evening milks. About feeding restriction, no effect has been observed on fat content, milk fat globule size, LPL activity and protein profile. About nature of forage, corn silage was associated with lower fat content (3.53 vs 3.91%), smaller fat globules (d_{50} : 3.25 vs 3.55 μm), higher β -CN and $\alpha\text{s}2$ -CN percentages and lower proteose peptone 5 and proteose peptone 8S percentages, but no effect on LPL activity was observed. We showed strong negative correlation ($R^2=0.71$) between proteose peptone 5 and SL and low negative correlation ($R^2=0.21$) between SL and fat globule size. Some milk components are thus identified as modulator of SL. Medium correlations had been shown between C18:0, C18:1/C18:0 and SL suggesting a link between tissue mobilization, mammary metabolism and SL when cows are fed with corn silage.

Keywords: free fatty acids, maize silage, feeding systems

Dans ce chapitre, nous avons mis évidence et /ou confirmé l'impact de plusieurs facteurs sur les variations de la LS :

- la génétique : un effet du génotype *DGAT-1* a été mis en évidence, le variant KK étant associé à une LS plus élevée. Une étude sur une population plus grande serait cependant nécessaire pour confirmer cet effet et potentiellement identifier d'autres génotypes impliqués dans le déterminisme de la LS.

D'un point de vue des mécanismes impliqués, on suspecte que la modulation du SLi se fait via l'existence d'un déséquilibre de liaison avec un ou des gènes impliqués dans le SLi et/ou via une évaluation de la taille des GG et la composition de la MFGM différente selon les variants *DGAT-1*.

- le stade physiologique : nous avons montré qu'à PL pratiquement constante, la LS suivait une évolution en cloche au cours de la lactation, l'augmentation de la LS les 3^{ème}, 4^{ème} et 5^{ème} mois étant due à des pics individuels de LS qui n'ont pas pu être expliqués. Malgré la valeur élevée de la PL en fin de lactation/gestation, la LS semble augmenter au cours de la lactation. Des mesures le 10^{ème} et 11^{ème} mois de lactation auraient été pertinentes pour valider cette observation. L'augmentation de la LS en fin de lactation/gestation serait due aux effets hormonaux et physiologiques (ouverture des jonctions serrées notamment) liés au stade physiologique de l'animal. Le design du schéma expérimental ne permettait ni d'évaluer l'effet du stade de gestation (< 6 mois), ni de le dissocier clairement du stade de lactation.

- le moment de la traite : la LS était supérieure dans les laits issus de la traite de soir. Un changement de la composition de la MFGM selon des rythmes circadiens pourrait expliquer ces variations.

- la fréquence de traite : nous avons confirmé la diminution de la LS lors de la diminution de la fréquence de traite. D'un point de vue des mécanismes, la régulation négative de la LPL, pourrait rendre l'enzyme limitante dans la réaction de lipolyse.

- l'interaction génétique x fréquence de traite : la LS des VL ayant le variant KK de *DGAT-1* était supérieure à la LS des autres VL uniquement lorsque que ces VL étaient traitées deux fois par jour. Lors de la monotraite, aucune différence entre les variants *DGAT-1* n'a été mise en évidence relativement à la LS.

- l'alimentation :

- concentrés riches en oméga 3 : l'incorporation de lin extrudé à dose modérée dans la ration n'a pas eu d'effet sur la LS des laits issus de la traite du matin, a diminué la LS des laits de tank à destination des fabrications beurrières et a diminué la présence d'AGL dans les beurres ainsi que la saveur « rance ». Le lin extrudé serait donc associé à des niveaux de LS plus faibles. Cet effet pourrait être

rapproché de celui du pâturage de printemps ; un changement du profil en AG de l'aliment entraînerait un changement du profil en AG des MFGM, qui pourrait influencer le SLi. En revanche, l'incorporation de microalgues dans notre essai a eu un effet délétère sur la santé ruminale et la qualité du lait, augmentant la LS, potentiellement à cause de synthèses incomplètes de MG par la GM.

- Fourrages: La LS a été plus importante lorsque les VL ont été nourries à base d'ensilage de maïs comparativement à l'ensilage d'herbe. L'effet de la nature du fourrage a été observé uniquement dans les laits issus de la traite du matin. Une modification de la taille des GG et de la composition de la MFGM ainsi qu'une modification de la quantité des cofacteurs pourraient expliquer ces différences. Les mécanismes seront détaillés dans la partie 3 du manuscrit.
- Restriction alimentaire: La restriction alimentaire a entraîné une augmentation des valeurs de LS dans les laits issus de la traite du matin et du soir. La LS a tendance à être encore plus importante dans les lots recevant de l'herbe conservée. Une modification de la composition de la MFGM consécutivement au déséquilibre énergétique et protéique des rations pourrait expliquer ces variations. L'ensemble des mécanismes sera envisagé dans la partie 3.

Chapitre 3

Etude des mécanismes biochimiques de la lipolyse en fonction de la nature du fourrage distribué en association ou non avec une restriction alimentaire.

L'objectif de ce chapitre est de comprendre les mécanismes biochimiques de la LS dans le cadre d'un changement d'alimentation. Dans les années 1980, plusieurs équipes ont focalisé leur travail sur l'étude de la LPL et l'identification de ses cofacteurs par ajouts dosés dans des échantillons de lait. Cette approche a permis d'arriver à un consensus sur l'identification de PP3 comme inhibiteur de la LPL et des apolipoprotéines et héparanes sulphate comme activateurs de la LPL. Le rôle d'autres protéines telles que PP5 ou la BSA reste à préciser. Cependant ces études se sont déroulées avec très peu d'échantillons et il n'a jamais été établi de corrélation directe entre la LS des laits individuels et la concentration en ces cofacteurs et leur équilibre. De plus, la structure et la composition du GG qui protège les TG, substrats de la LPL n'ont jamais été prises en compte. Autrement dit, l'équilibre entre la LPL, ses cofacteurs et son substrat n'ont jamais été étudiés simultanément afin de pondérer la part de chacun des composants dans l'explication de la variabilité de la LS. Enfin, l'étude du SLi s'est toujours faite indépendamment des facteurs d'élevage. Dans le chapitre 3, nous avons pris en compte simultanément les trois composantes du SLi : la LPL, ses cofacteurs et le GG, en termes de paramètres explicatifs des variations de la LS sous l'influence de facteurs d'élevage. L'essai permettant de dissocier l'impact de la restriction alimentaire, de la nature du fourrage et de leur interaction sur les niveaux de LS, décrit dans la partie 4 du chapitre 2 nous a servi de base pour travailler sur les composants du SLi. Nous avons travaillé sur l'AcL, la taille des GG et les cofacteurs protéiques. Cet essai nous a fourni des réponses partielles sur le mécanisme de fonctionnement du SLi et a permis d'émettre de nouvelles hypothèses permettant d'identifier d'autres composants influençant la LS.

Effects of feeding restriction and nature of forage on milk lipolytic system.

E. Vanbergue^{}, J.L. Peyraud^{*}, A. Ferlay[‡], G. Miranda[§], P. Martin[§], C. Hurtaud^{*1}**

^{*} PEGASE, INRA, Agrocampus Ouest, 35590, Saint-Gilles, France.

[†] Institut de l'élevage, Monvoisin, 35910 Le Rheu, France.

[‡] UMR1213 Herbivores, INRA, Vetagro Sup, 63122, Saint-Genès-Champanelle, France

[§] GABI, AgroParisTech, INRA, Université Paris-Saclay, 78350, Jouy-en-Josas, France

¹Corresponding author: Catherine Hurtaud, INRA-Agrocampus Ouest UMR1348 Physiologie, Environnement et Génétique pour l'Animal et les Systèmes d'Élevage (PEGASE), F-35590 Saint-Gilles, France

Phone: +33 (0)2 23 48 51 02; Fax: +33 2 23 48 50 80

Email: Catherine.Hurtaud@rennes.inra.fr

INTRODUCTION

Milk spontaneous lipolysis (**SL**) is the hydrolysis of triglycerides, the major components of milk fat globules (**MFG**), by a native milk enzyme, the lipoprotein lipase (**LPL**), in the presence of its cofactors, which leads to an accumulation of partial glycerides and free fatty acids (**FFA**) (Cartier and Chilliard, 1990). The presence of these reaction's products impairs technological and sensory properties of milk and dairy products (Deeth, 2006).

Spontaneous lipolysis occurs in the absence of mechanical and thermal shocks during milking and storage (Cartier and Chilliard, 1990) and depends on genetics, physiological and breeding factors. Nutritional factors, and particularly nature of forage and feeding restriction, had been frequently shown to modulate SL levels. Feeding restriction (-10 to -20% of dry matter intake (**DMI**)) was associated with higher SL levels, particularly in early (Vanbergue et al., submitted) and late lactation (Stobbs et al., 1973; Deeth and Fitzgerald, 1976; Connolly, 1978; Jellema, 1986; O'Brien et al., 1996). However, the main forage was grazed and conserved grass in most of these studies. Conserved grass has been shown to lead to higher SL than pasture (Chazal and Chilliard, 1987; Ferlay et al., 2006). Only one study tested the impacts of corn silage on SL and it appeared that this forage was associated with lower SL than conserved grass (Ferlay et al., 2006). Further studies are needed to precise and separate the effects of feeding restriction and nature of forage on SL. Besides, SL is known to be higher in evening milks, compared to morning milks (Murphy et al., 1979; Ahrné and Björck, 1985) but the impact of feeding strategies according to time of milking have not been studied.

At the biochemical level, we defined the lipolytic system (**LiS**) as the whole components involved in milk SL, i.e. LPL, its cofactors (activators and inhibitors), its substrate (triglycerides in MFG), its products (FFA and partial glycerides), and their interactions (Ferlay et al., 2006). Reorganization of LiS's components and alterations of milk fat globule membrane (**MFGM**) upon cooling seem to be necessary to activate milk LiS (Bengtsson and Olivecrona, 1982; Cartier and Chilliard, 1990; Dickow et al., 2011). According to Cartier and Chilliard (1990) and Sundheim and Bengtsson-Olivecrona (1987b), among the biochemical factors, (1) proportion of LPL linked to the MFGM (2) MFGM integrity and (3) balance between LPL activators and inhibitors are the best correlated to SL. However, most of LPL cofactors in milk are not clearly identified in literature. Proteose peptone 3 (PP3), a MFGM protein, also known as lactophorine or GlyCAM1, had been clearly identified as a SL inhibitor by several authors (Anderson, 1981; Sundheim and Bengtsson-Olivecrona 1987a and b) but the role of the other potential cofactors is more controversial. For example, proteose peptone 5 (**PP5**), a product of β -CN degradation, had been identified to act as an activator of LPL in one trial (Chilliard et al., 1986) and to act as an inhibitor of LPL in another (Anderson, 1981) and BSA has been shown to activate LPL *in vitro*

or/and by addition of extra physiological doses but no direct relation has been found in milk matrix (Murphy et al., 1979; Bengtsson and Olivecrona, 1980).

The aim of our study was to induce variations on the LiS through nutritional factors such as nature of forage, feeding restriction and time of milking in order to precise the role of these factors at a zootechnical level and to understand the biochemical mechanisms of SL. The focus was on LPL activity, MFG integrity by evaluation of MFG size, and on the identification of protein cofactors by establishing milk protein profiles.

MATERIAL AND METHODS

Animals and experimental design

Thirty-two multiparous Holstein cows in mid lactation were used according to a 2 x 2 factorial design experiment combining 2 effects (nature of forage and restriction level). Cows were genotyped at the DGAT1 locus for K232A polymorphism with the Illumina Infinium BovineLD BeadChip® (Boichard et al., 2012). At the beginning of the experimental period, on average, DIM was 88 ± 17 d, cows produced 35.2 ± 3.4 kg of milk/d characterized by $3.75 \pm 0.38\%$ fat content and $2.74 \pm 0.15\%$ protein content. All cows were kept indoors with an average area of 6.56 m² per cow. Four diet treatments were used, characterized by the nature of forage and the level of feed restriction. Cows were allocated in 4 groups according to the following criteria, in that order: genotype at DGAT1 K232A locus, SL, gestation stage, lactation stage, milk yield, milk fat and protein contents, C18:1 content, weight and DMI. Diets were based on corn silage or conserved grass. Two levels of feed restriction were applied: “non-restricted” with cows fed at 100% of ad libitum DMI and “restricted” with cows fed at 75% of ad libitum DMI. The trial was conducted in a reverse design on feeding restriction level during 11 wk from April to June 2015 which represented 4 control wk and 2 experimental periods of 3 wk separated by 1 transition wk. During period 1, cows received in each group: corn silage based diet at 100% of ad libitum DMI (**Corn100**), corn silage based diet at 75% of ad libitum DMI (**Corn75**), conserved grass based diet at 100% of ad libitum DMI (**Grass100**), and conserved grass based diet at 75% of ad libitum DMI (**Grass75**). During period 2, in each group, cows received the same forage based diets but level of feeding restriction was reversed (**Figure1**).

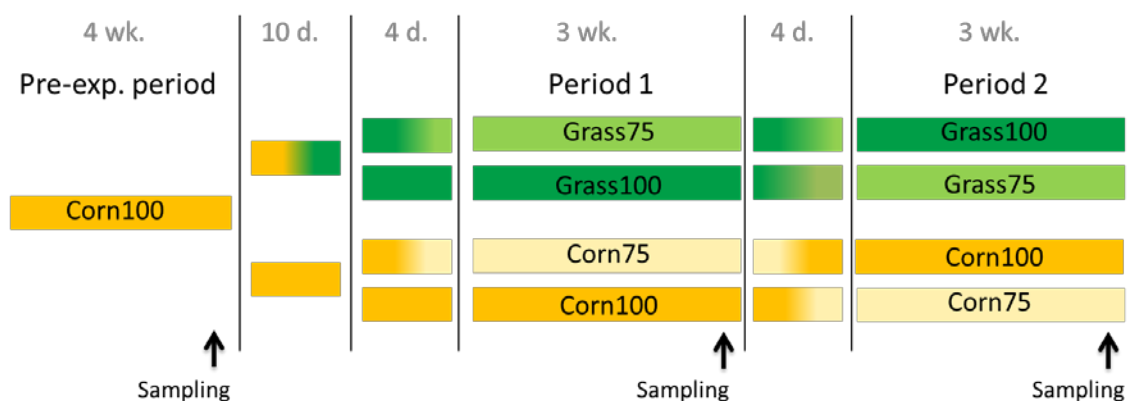


Figure 1: Experimental design

Treatments and feeding

Corn silage-based diets were composed, on a dry matter basis, of 64.7% of corn silage, 13.5% of energy concentrate (20% wheat, 20% corn, 20% barley, 20% beet pulp, 15% wheat bran, 3% cane molasses, 1% vegetable oil, 1% salts), 10.5% of soya bean meal, 10% of dehydrated alfalfa, 1% of mineral and 0.3% of NH₃ sulphate. Conserved grass-based diets were composed, on a dry matter basis, of 40% of dehydrated meadow fescue, 35% of haylage, 15% of energy concentrate (20% wheat, 20% corn, 20% barley, 20% beet pulp, 15% wheat bran, 3% cane molasses, 1% vegetal oil, 1% salts), 10% of soya bean meal, 1% of minerals, 1% of calcium carbonate and 0.3% of NH₃ sulphate. Cows were fed with corn silage-based diet during 3 wk of pre-experimental period. Cows allocated in both Grass100 and Grass75 groups were in a 10-d dietary transition to turn out into conserved grass based-diet and afterwards, cows allocated in Grass75 and Corn75 were in a 4-d transition period to turn out into restricted diet before the beginning of the first experimental period. For the second experimental period, level of feeding restriction was reversed. Cows allocated in Grass75 and Corn75 were in a 4-d transition period to turn out into restricted diet before the beginning of the second experimental period. Cows allocated in Corn100 and Grass100 received the equivalent of their DMI during their last ad libitum period. Diets were formulated to meet the energy and protein requirements when distributed ad libitum (Institut National de la Recherche Agronomique, 2007). Ingredients, chemical composition and nutritional value of the diets are given in [tables 1 and 2](#).

Measures, sample collection and laboratory analysis

Feed and refusal. During the whole experimental period, cows were fed via individual electronic gating twice daily at 0900 h and 1830 h and all refusals were collected and weighed every day to evaluate each cow net DMI. To calculate DMI, refusals were assumed to have the same composition as the offered diet. To determine diet chemical and nutritional composition, samples of fresh corn

silage and haylage were collected 5 times a wk and samples of energy concentrate, soybean meal, dried alfalfa and dried meadow fescue were collected every wk, during the whole experimental period. The samples were stored at -20°C and pooled to provide one sample by type of feed and by period. Samples were lyophilized and analyzed for DM, mineral matter (NF V17-101, 1977), crude protein (NF V18-100, 1977), crude fiber (NF V03-040, 1993), neutral detergent fiber, acid detergent fiber (Van Soest et al., 1991), starch (Thivend et al., 1965), organic matter, digestibility of OM (Aufrère et al., 1989), fat, fatty acid (FA) profile (Apper-Bossard, 2006), phosphorus (NF V18-106, 1977) and calcium (NF 18-108, 1984).

Milk yield. Cows were milked every day at 0630 and 1630 h at milking parlor and milk yield was recorded individually at each milking.

Milk traits. Milk fat content, protein content, lactose content, somatic cell count (SCC) were determined from 4 consecutive milkings every wk. These analyses were performed by mid-infrared spectrometry for fat, protein and lactose contents and by flow cytometry for SCC at the Laboratoire Interprofessionnel Laitier Loire Anjou Bretagne (MYLAB, Châteaugiron, France).

Milk spontaneous lipolysis. Milk samples for SL determination were collected individually on milk cans from each milking (morning and evening), 2 consecutive d, during the control period and at the end of each period of the experimental phase. Two vials per cow were collected to calculate SL by the difference between FFA contents after 24 h of storage at 4°C and initial FFA contents. Immediately after milking, a 50 mL sample was heated in a water bath at 100°C during 2.5 min to stop lipase activity, and then kept at 4°C. A second sample was stored at 4°C for 24 h, then heated at 100°C and kept at 4°C in the same way. FFA analyses were performed on both samples by copper soap method (Shipe et al., 1980; Vanbergue et al., 2016).

Lipoprotein lipase activity. Milk samples for LPL activity determination were collected individually on milk cans from morning and evening milkings, during the control period and at the end of each period of the experimental phase. One vial per cow was collected at each milking and stored at -20°C until analyzed. Analyses were performed as described in Faulconnier et al. (1994).

Milk fatty acid profile. Milk samples for FA profile determination were collected individually from morning and evening milkings at the end of each experimental phase. One vial per cow was collected at each time and stored at -20°C until analyzed. FA composition was determined on 1 replicate by lipid extraction from a 0.5 mL sample of milk fat according to the method described in Bauchart and Duboisset (1983) using 0.5 mL of an ethanol/HCl [100:5 (vol/vol)] solution followed by 5 mL of hexane. Milk FA were esterified with 1.0 mL of a methanol/NaOH [100:2, (vol/vol)] solution followed by 1.0 mL of methanol boron trifluoride solution [(100:20(vol/vol))] and 2 mL of hexane (methyl esters). These esters were extracted with 2 mL of n-hexane and injected into a CP-7890A GC (Agilent technologies, Les Ulis, France) equipped with an electron ionization detector. Methyl esters were

separated on an CP-SII 88 capillary column (100 m × 0.25 mm i.d.; Interchim, Montluçon, France) starting at 50°C for 2 min, then increasing 7°C/min to reach 155°C, then increasing 3°C/min to reach 235°C, then held at 235°C for 10 min. Injector was at 240°C and detector was at 280°C. Carrier gas was hydrogen.

Milk fat globule size. Milk samples for MFG size determination were collected individually on milk cans from morning and evening milkings during the control period and at the end of each experimental phase. Vials were kept at room temperature with potassium dichromate (Merck, Darmstadt, Germany) to evaluate MFG size distribution by laser light scattering (Mastersizer 3000, Malvern, UK). Samples were measured by diluting (1:6 vol) with EDTA/NaOH buffer (0.5M, pH=8) to dissociate casein micelles. The average diameter $d_{4,3} = \frac{\sum(Nixdi^4)}{\sum(Nixdi^3)}$ was calculated by the Malvern software.

Milk protein profile. Milk samples for milk protein profile determination were collected individually on milk cans from morning and evening milkings at the end of each experimental phase. Protein profile was determined by LC-MS (Miranda et al., 2013) on milk and whey obtained by isoelectric precipitation as describe in Jensen et al. (2012).

Plasma metabolites. Tail blood samples were collected using 5 mL heparinized tubes (VT-050SHL, Venoject, Terumo Europe, Leuven, Belgium) after morning milking at the end of each experimental phase. Blood was centrifuged at $2,264 \times g$ for 15 min, and plasma was removed and stored at - 20° C until analysis. Plasma glucose, urea, acetate, non-esterified fatty acids (**NEFA**) and BHB contents were assayed using colorimetric enzymatic reaction on 2 replicates as reported in Delamaire and Guinard-Flament (2006).

Calculation and statistical analyses

All statistical analyses on the data set for the 32 cows were performed using SAS software (SAS 9.2 Institute Inc., Cary, NC). The statistical significance threshold was set to $P < 0.05$. Trend was set to $P < 0.10$. Normality of data was checked using the Shapiro-Wilk test of the SAS-package univariate procedure.

The effect of time of milking on FA profile, MFG size, and SL was evaluated by using the MIXED procedure of SAS according the statistical model: $Y_{ijkl} = \mu + TM_i + Forage_j + Restriction_k + Forage_j \times Restriction_k + \epsilon_{ijkl}$ with the cows treated as a random effect among Forage, where Y_{ijkl} is the dependent variable, μ is the mean, TM_i is the time of milking (morning vs evening milking), $Forage_j$ is the nature of forage (corn silage vs conserved grass), $Restriction_k$ is the level of restriction (100% DMI vs 75% DMI), $Forage_j \times Restriction_k$ is the interaction between $Forage_j$ and $Restriction_k$ and ϵ_{ijkl} is the residual error associated with each ijkl observation.

The effects of nature of forage and level of restriction were evaluated on daily values for DMI, energy and protein digested in the small intestine (PDI) supplies and balances, weight, milk traits and plasma parameters and on twice daily values for LS, MFG size, FA profile. For milk traits daily values were obtained by calculating the average of morning and evening values weighted by milk yield. The statistical model used was the MIXED procedure of SAS with cows treated as a random effect among Forage: $Y_{ijk} = \mu + \text{Forage}_i + \text{Restriction}_j + \text{Forage}_i \times \text{Restriction}_j + \text{Cov}_{ijk} + \varepsilon_{ijk}$, with the effects defined above and Cov_{ijk} , the covariable associated with Y_{ijk} (ie the value of Y_{ijk} during the pre-experimental period).

The effects of nature of forage and restriction on milk protein profile were evaluated separately by using the GLM procedure of SAS according the statistical models, with the same effects as defined above: $Y_{ij} = \mu + \text{Forage}_i + \varepsilon_{ij}$, $Y_{ij} = \mu + \text{Restriction}_i + \varepsilon_{ij}$.

Pearson and Spearman correlations between quantitative variables were tested with CORR procedure of SAS, among all values, among Forage, among Restriction, among Forage \times Restriction and among cows sensitive to SL (superior to 1 mEq/100 g fat).

Table 1. Chemical composition and nutritional value of feeds

| Item, g/kg of DM unless noted | Corn silage | Haylage | Dried fescue | Energy concentrate ¹ | Soybean meal 48 | Dried alfalfa | Minerals |
|-------------------------------|-------------|---------|--------------|---------------------------------|-----------------|---------------|----------|
| DM, % | 35.3 | 72.0 | 90.0 | 91.2 | 92.2 | 92.8 | 100 |
| NE _L , MJ/kg of DM | 7.00 | 6.15 | 7.17 | 8.38 | 8.88 | 4.60 | 0 |
| N | 66 | 130 | 160 | 108 | 489 | 166 | 0 |
| OM, g/kg | 961 | 879 | 905 | 955 | 927 | 888 | 0 |
| NDF | 376 | 562 | 520 | 223 | 119 | 467 | 0 |
| ADF | 201 | 300 | 274 | 93 | 67 | 358 | 0 |
| Starch | 370 | 0 | 5 | 473 | 49 | 32 | 0 |
| PDIE ² | 68 | 87 | 117 | 105 | 252 | 91 | 0 |
| PDIN ³ | 41 | 85 | 111 | 75 | 358 | 112 | 0 |
| Ca | 1.8 | 3.7 | 4.5 | 0.30 | 0.37 | 18.1 | 270 |
| P | 1.8 | 3.4 | 2.9 | 0.36 | 0.67 | 2.8 | 55 |
| Fat | 35.0 | 23.0 | 31.0 | 48.0 | 25.0 | 22.0 | 0 |

¹ Energy concentrate on DM basis: 20% wheat, 20% corn, 20% barley, 20% beet pulp, 15% wheat bran, 3% cane molasses, 1% vegetable oil, 1% salts

² PDIE = protein digested in the small intestine supplied by rumen-undegraded dietary protein and by microbial protein from rumen fermented OM (Institut National de la Recherche Agronomique, 1989)

³ PDIN = protein digested in the small intestine supplied by rumen-undegraded dietary protein and by microbial protein from rumen degraded N (Institut National de la Recherche Agronomique, 1989)

Table 2. Composition of experimental diets

| Item | Corn Ctrl + P1 | Corn P2 | Grass P1 | Grass P2 |
|---|----------------|---------|----------|----------|
| Ingredients, %DM | | | | |
| Corn silage | 64.7 | 64.7 | 0 | 0 |
| Haylage | 0 | 0 | 35.0 | 35.0 |
| Dried meadow fescue | 0 | 0 | 40.0 | 40.0 |
| Energy concentrate | 13.5 | 13.5 | 15.0 | 15.0 |
| Soymeal | 10.5 | 10.5 | 10.0 | 10.0 |
| Dried alfalfa | 10 | 10 | 0 | 0 |
| Minerals (g) | 250 | 250 | 250 | 250 |
| Chemical composition, g/kg of DM unless noted | | | | |
| DM, % | 55.1 | 55.8 | 85.2 | 85.1 |
| OM | 937 | 937 | 901 | 911 |
| CP | 125 | 127 | 173 | 177 |
| NDF | 333 | 329 | 447 | 453 |
| ADF | 185 | 189 | 235 | 235 |
| Starch | 311 | 305 | 78 | 78 |
| Fat | 34.0 | 32.7 | 29.8 | 30.5 |
| Nutritional value, g/kg of DM unless noted | | | | |
| NEL, kJ/kg of DM | 7.05 | 7.01 | 7.13 | 7.20 |
| PDIE ¹ | 93.7 | 93.7 | 117.2 | 119.2 |
| PDIN ² | 85.4 | 86.1 | 119.8 | 122.6 |

¹PDIE = protein digested in the small intestine supplied by rumen-undegraded dietary protein and by microbial protein from rumen fermented OM (Institut National de la Recherche Agronomique, 1989)

²PDIN = protein digested in the small intestine supplied by rumen-undegraded dietary protein and by microbial protein from rumen degraded N (Institut National de la Recherche Agronomique, 1989)

RESULTS

Description of energy and protein balances of diets and the effect on DMI and cows' weight

Description of energy and protein balances of cows and the effect of diets on DMI and cow weight

Total DMI, forage and concentrate intakes were lower for restricted cows than for non-restricted cows (- 5.2 kg; - 3.9 kg; -1.4 kg of DM/d respectively) and equal for both Corn75 and Grass75 (Table 3). Total DMI for Corn100 was lower than for Grass100 (-1.5 kg/d) due to lower ingestion of forage (- 1.1 kg/d) and concentrate (-0.4 kg/d). According to the experimental design, energy, PDIE (protein digested in the small intestine supplied by RUP and by microbial protein from rumen-fermented OM, INRA, 1989) and PDIN (protein digested in the small intestine supplied by RUP and by microbial protein from rumen-degraded dietary N, INRA, 1989) intakes were lower for restricted cows (respectively, for Corn75 compared to Corn100, - 39.7 MJ/d, - 639 and - 639 g/d and for Grass75 compared to Grass100, - 34.7 MJ/d, - 468 and - 432 g/d). Energy, PDIE and PDIN balances were lower for restricted than for non-restricted cows (for Corn75 compared to Corn100, - 20.6 MJ/d, -199 and - 164 g/d and for Grass75 compared to Grass100, - 20.9 MJ/d, -333 and - 334 g/d, respectively) (Table 3). Energy, PDIE and PDIN intakes were lower for corn-silage based diets than for grass-silage based

Table 3. Weight, DM, energy and protein intake of dairy cows according to feeding treatments

| | Corn100 | Corn75 | Grass100 | Grass75 | RMSE ¹ | Effects | | |
|---------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------|------------|-----------------|--------|
| | | | | | | Forage (F) | Restriction (R) | F×R |
| Weight, kg | 659 ^x | 628 ^y | 652 ^x | 596 ^z | 32.2 | 0.107 | <0.001 | 0.034 |
| Ingestion, kg of DM/d | | | | | | | | |
| Total | 22.9 ^y | 18.1 ^z | 24.4 ^x | 18.8 ^z | 0.64 | 0.006 | <0.001 | 0.002 |
| As forage | 16.7 ^y | 13.1 ^z | 17.8 ^x | 13.6 ^z | 0.53 | 0.007 | <0.001 | 0.002 |
| As concentrate | 6.2 ^{Ba} | 4.9 ^{Bb} | 6.6 ^{Aa} | 5.2 ^{Ab} | 0.15 | 0.006 | <0.001 | 0.106 |
| Intake, g/d unless noted | | | | | | | | |
| NE _L , MJ/d | 159.5 ^x | 124.8 ^z | 171.0 ^w | 131.3 ^y | 4.46 | <0.001 | <0.001 | <0.001 |
| PDIE | 2166 ^y | 1698 ^z | 2833 ^x | 2194 ^y | 60.9 | <0.001 | <0.001 | <0.001 |
| PDIN | 2017 ^y | 1585 ^z | 2916 ^w | 2277 ^x | 57.8 | <0.001 | <0.001 | <0.001 |
| Balance, g/d unless noted | | | | | | | | |
| NE _L , MJ/d | 13.6 ^{Ba} | -7.0 ^{Bb} | 22.5 ^{Aa} | 1.6 ^{Ab} | 9.224 | <0.001 | <0.001 | 0.222 |
| PDIE | 131 ^y | -68 ^z | 855 ^w | 522 ^x | 82.3 | <0.001 | <0.001 | <0.001 |
| PDIN | -16 ^y | -180 ^z | 938 ^w | 604 ^x | 79.4 | <0.001 | <0.001 | <0.001 |

¹ Root mean square error^{a-b} Means in the same row with no common superscript differ (P<0.05) for forage effects^{a-b} Means in the same row with no common superscript differ (P<0.05) for restriction effects^{w-z} Means in the same row with no common superscript differ (P<0.05) for forage × restriction effects

Table 4. Milk yield and milk composition according to feeding treatments

| | Corn100 | Corn75 | Grass100 | Grass75 | RMSE ¹ | Effects | | |
|--------------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------|------------|-----------------|-------|
| | | | | | | Forage (F) | Restriction (R) | F×R |
| Milk yield, kg/d | 34.4 ^{Aa} | 30.2 ^{Ab} | 32.3 ^{Ba} | 27.8 ^{Bb} | 1.15 | 0.015 | <0.001 | 0.384 |
| Fat content, % | 3.31 ^a | 3.45 ^a | 3.76 ^b | 3.75 ^b | 0.239 | 0.002 | 0.119 | 0.076 |
| Protein content, % | 3.01 ^a | 2.89 ^b | 3.07 ^a | 2.93 ^b | 0.597 | 0.195 | <0.001 | 0.203 |
| Fat yield, g/d | 1,134 ^b | 1,036 ^c | 1,213 ^a | 1,040 ^c | 69.8 | 0.136 | <0.001 | 0.003 |
| Protein yield, g/d | 1,041 ^{Aa} | 879 ^{Ab} | 989 ^{Ba} | 810 ^{Bb} | 33.6 | 0.008 | <0.001 | 0.188 |
| Lactose, % | 5.01 ^y | 5.01 ^y | 4.95 ^{yz} | 4.91 ^z | 0.04 | 0.020 | 0.008 | 0.002 |
| SCS ² | 1.97 | 1.97 | 1.93 | 1.93 | 0.40 | 0.543 | 1.000 | 1.000 |

¹ Root mean square error² SCS: somatic cell score = log SCC^{A-B} Means in the same row with no common superscript differ (P<0.05) for forage effects^{a-b} Means in the same row with no common superscript differ (P<0.05) for restriction effects^{w-z} Means in the same row with no common superscript differ (P<0.05) for forage × restriction effects**Table 5.** Effect of time of milking (morning vs evening) on milk SL, lipase activity and fat globule size

| | Morning milkings | Evening milkings | RMSE ⁽²⁾ | p-value |
|---|------------------|------------------|---------------------|---------|
| SL ⁽¹⁾ , mEq/100 g fat | 0.29 | 0.72 | 0.052 | <0.001 |
| LPL activity, nmol/min/L ⁽³⁾ | 807 | 811 | 50.758 | 0.662 |
| d ₄₃ , μm | 3.41 | 3.69 | 0.163 | <0.001 |

¹ Root mean square error² SL = Spontaneous lipolysis³ LPL activity = lipoprotein lipase activity, nmol/min per mL

diets (for Corn100 compared to Grass100 - 11.5 MJ/d, - 667 and - 899 g/d and, for Corn75 compared to Grass75 - 6.5 MJ/d, - 496 and - 692 g/d, respectively). Energy, PDIE and PDIN balances were lower for corn silage than for conserved grass based diets (Corn100 compared to Grass100, -8.9 MJ/d, -724 and - 954 g/d; and for Corn75 compared to Grass75, -8.6MJ/d, - 590 and -784 g/d, respectively) (Table 3). Energy, PDIE and PDIN balances were negative for Corn75 (- 7.0 MJ/d, - 68 and - 180 g/d) and PDIN balance was negative for Corn100 (- 15 g/d). Energy, PDIE and PDIN balances were positive for Grass100 and Grass75 (Table 3). Bodyweight was lower when cows were restricted and was much lower for Grass75 compared to Grass100 (-56 kg) than for Corn75 compared to Corn100 (- 21 kg) (Table 3).

Effects of nature of forage and feeding restriction on milk traits

When cows were fed with corn silage based diet, compared to conserved grass, milk yield was higher (+ 2.3 kg/d) with lower fat content (- 0.38%) and higher protein yield (+ 60 g/d). No effect of nature of forage on fat yield and protein content had been observed. Lactose content was lower for Grass 75 compared to Grass100 but no effect of feeding restriction on lactose content has been observed with the corn silage based diet. No significant effect of feeding treatments was observed on milk SCS. When cows were restricted, when compared to non-restricted cows, milk yield was lower (- 4.4 kg/d) with lower protein content (- 0.13%) and yield (- 171 g/d) and lower fat yield with a stronger effect for Grass75 than for Corn75 (- 98 g/d and - 173 g/d for Corn75 and Grass75 compared to Corn100 and Grass100, respectively). No effect of feeding restriction had been observed on fat content (Table 4).

Effects of nature of forage, feeding restriction and time of milking on spontaneous lipolysis, LPL activity and milk fat globule size.

Spontaneous lipolysis was higher in evening milks than in morning milks (+ 0.43 mEq/100 g of fat) (Table 5). SL was higher in milks of restricted cows with a major impact of feeding restriction in evening milks (+ 0.10 and + 0.28 mEq/100 g of fat for morning and evening milks, respectively). SL was higher in morning milks of cows fed with corn based diets (+ 0.20 mEq/100 g of fat), but no effect of nature of forage was detected in evening milks. However, no effect of time of milking, nature of forage and feeding restriction was detected on LPL activity. (Table 5 and 6)

MFG were larger in evening milks than in morning milks (+ 0.28 μm) (Table 5). No effect of feeding restriction was detected on MFG size. MFG were smaller when cows were fed with corn silage based diets (d43: - 0.33 and - 0.26 μm for morning and evening milks, respectively) (Tables 5 and 6).

Effect of time of milking, feeding restriction and nature of forage, on milk fatty acid profile

The percentages of de novo synthesized SFA such as C8:0, C10:0, C12:0, C14:0 and C16:0 were higher in morning than in evening milks (+ 0.10, + 0.22, + 0.18, + 0.48, +1.43 unit percent, respectively) (Table 7). C18:0 percentage was lower in morning than in evening milks (- 0.31 unit percent).

Table 6. Milk fat characteristics (milk fat globule size, milk spontaneous lipolysis) and lipoprotein lipase activity according to feeding treatments

| | | Corn100 | Corn75 | Grass100 | Grass75 | RMSE ¹ | Effects | | |
|-----------------------------------|-----------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------|------------|-------------|-------|
| | | | | | | | Forage (F) | Restriction | F×R |
| SL ³ , mEq/100 g fat | MM ⁵ | 0.35 ^{Ab} | 0.46 ^{Aa} | 0.17 ^{Bb} | 0.25 ^{Ba} | 0.030 | <0.001 | 0.004 | 0.594 |
| | EM ⁶ | 0.68 ^b | 0.86 ^a | 0.51 ^b | 0.90 ^a | 0.024 | 0.447 | <0.001 | 0.080 |
| LPL activity ⁴ | MM ⁵ | 818 | 819 | 786 | 804 | 50.6 | 0.433 | 0.442 | 0.508 |
| | EM ⁶ | 815 | 831 | 784 | 813 | 54.5 | 0.395 | 0.134 | 0.652 |
| d ₄₃ , μm ² | MM ⁵ | 3.24 ^B | 3.32 ^B | 3.66 ^A | 3.56 ^A | 0.205 | <0.001 | 0.815 | 0.112 |
| | EM ⁶ | 3.56 ^B | 3.56 ^B | 3.82 ^A | 3.82 ^A | 0.044 | <0.001 | 1.000 | 1.000 |

¹ Root mean square error

² $d_{4,3} = \frac{\sum(N_i \times d_i^4)}{\sum(N_i \times d_i^3)}$, volume weighted diameter, where N_i is the number of fat globules in a size class of diameter d_i

³ SL = Spontaneous lipolysis

⁴ LPL activity = lipoprotein lipase activity, nmol/min per mL

^{A-B} Means in the same row with no common superscript differ (P<0.05) for forage effects

^{a-b} Means in the same row with no common superscript differ (P<0.05) for restriction effects

⁵ MM = Morning milking

⁶ EM = Evening milking

1 Consequently, short-chain fatty acid (SCFA) percentage was higher in morning than in evening milks
2 (+ 0.18 unit percent). Monounsaturated fatty acid percentage was lower in morning than in evening
3 milks (- 2.62 unit percent), particularly due to long chain MUFA percentages such as cis9 C16:1 (- 0.17
4 unit percent), cis9 C18:1 (- 2.31 unit percent), and cis15 C18:1. Polyunsaturated fatty acid percentage
5 was lower in morning than in evening milks (- 0.24 unit percent). The ratios of cis9 C18:1/C16:0, cis9
6 C14:1/C14:0, cis9 C16:1/C16:0, and cis9 C18:1/C18:0 were lower in morning milks (- 0.11; - 0.01; -
7 0.01; and - 0.22 unit percent, respectively) (Table 7).

8 For most of the FA, no interaction between nature of forage and feeding restriction was significant.
9 Consequently, for these FA, we described separately the effects of nature of forage and feeding
10 restriction. Besides, the effects of nature of forage and restriction were the same for morning and
11 evening milks. Illustrative values are given respectively for morning and evening milks in that order,
12 FA after FA.

13 Saturated FA and SCFA percentages were lower in milk of restricted cows compared to non-restricted
14 cows (- 1.60 and - 2.71 unit percent; - 1.05 and - 1.76 unit percent, respectively) Indeed, C8:0 (only in
15 evening milk), C10:0, C12:0, C14:0 percentages were lower in milks of restricted cows compared to
16 non-restricted cows (- 0.18 unit percent; - 0.39 and - 0.52 unit percent; - 0.57 and - 0.64 unit percent;
17 - 0.59 and - 0.85 unit percent, respectively). Monounsaturated FA percentage was consequently
18 higher in milk of restricted cows (+ 1.15 and + 2.50 unit percent). Although cis9 C10:1, cis9 C12:1 and
19 cis9 C14:1 percentages were lower in milk of restricted cows, trans10+cis7 C18:1, cis9 C18:1
20 percentages were much higher (- 0.03 and - 0.05 unit percent; - 0.015 and - 0.025 unit percent; -
21 0.21 and - 0.21 unit percent; + 0.34 and + 0.31 unit percent; + 1.25 and + 2.56 unit percent,
22 respectively). In evening milks, PUFA percentage was higher in milk of restricted cows compared to
23 non-restricted cows (+ 0.22 unit percent). The cis9 C18:1/C16:0 ratio was higher in milk of restricted
24 cows (+ 0.06 and + 0.11 unit percent). C18:1/C18:0 ratio was higher in milk of restricted cows only in
25 evening milks (+ 0.27 unit percent). No significant difference according to feeding restriction was
26 observed for C14:1/C14:0 and C16:1/C16:0 ratios (Tables 8 and 9).

27 The SFA and SCFA percentages in milk were lower with corn silage than with conserved grass based
28 diets (- 2.44 and - 3.48 unit percent; - 1.79 and - 1.99 unit percent, respectively). Indeed, C6:0, C8:0,
29 C10:0, C12:0, C14:0, C18:0, and C20:0 percentages in milk were lower with corn silage than with
30 conserved grass based diets (- 0.37 and - 0.43 unit percent; - 0.19 and - 0.25 unit percent; - 0.40 and -
31 0.47 unit percent; - 0.38 and -0.50 unit percent; - 0.63 and - 0.92 unit percent; - 1.92 and - 2.03 unit
32 percent; - 0.05 and -0.05 unit percent, respectively unit percent). Only milk C16:0 percentage tended
33 to be higher with corn silage based diets (+ 2.17 p = 0.052 and + 1.82 unit percent p = 0.063).
34 Monounsaturated FA percentage in milk was consequently higher with corn silage than with
35 conserved grass based diets (+ 2.67 and + 4.01 unit percent). Indeed, cis9 C10:1, cis9 C16:1,

Table 7. Effect of time of milking (morning vs evening) on fatty acid profile

| | Morning | Evening | RMSE ¹ | Effect |
|-------------------|---------|---------|-------------------|--------|
| C4:0 | 4.23 | 4.12 | 0.953 | 0.488 |
| C5:0 | 0.02 | 0.02 | 0.013 | 0.125 |
| C6:0 | 2.66 | 2.48 | 0.536 | 0.057 |
| C7:0 | 0.03 | 0.04 | 0.040 | 0.347 |
| C8:0 | 1.40 | 1.30 | 0.215 | 0.013 |
| C10:0 | 2.79 | 2.57 | 0.357 | <0.001 |
| C10:1 | 0.27 | 0.27 | 0.037 | 0.885 |
| C11:0 | 2.79 | 2.57 | 0.024 | 0.437 |
| C12:0 | 3.18 | 3.00 | 0.442 | 0.022 |
| C12:1 | 0.08 | 0.08 | 0.020 | 0.092 |
| C13:0 | 0.09 | 0.09 | 0.040 | 0.736 |
| C14:0 | 11.51 | 11.03 | 0.683 | <0.001 |
| iC15:0 | 0.23 | 0.24 | 0.032 | 0.093 |
| aiC15:0 | 0.25 | 0.27 | 0.234 | 0.778 |
| C14:1 | 1.33 | 1.42 | 0.282 | 0.100 |
| C15:0 | 0.95 | 0.94 | 0.215 | 0.796 |
| iC16:0 | 0.20 | 0.20 | 0.027 | 0.563 |
| C16:0 | 33.34 | 31.91 | 1.870 | <0.001 |
| iC17:0 | 0.10 | 0.08 | 0.096 | 0.303 |
| C16:1 | 1.62 | 1.79 | 0.253 | <0.001 |
| C17:0 | 0.48 | 0.50 | 0.069 | 0.128 |
| C18:0 | 7.50 | 7.81 | 0.750 | 0.019 |
| t6+7+8 C18:1 | 0.23 | 0.23 | 0.068 | 0.837 |
| t9 C18:1 | 0.25 | 0.25 | 0.059 | 0.710 |
| t10 C18:1 | 0.64 | 0.67 | 0.334 | 0.598 |
| t11+c7 C18:1 | 1.50 | 1.44 | 0.292 | 0.256 |
| c9 C18:1 | 16.36 | 18.67 | 2.057 | <0.001 |
| t15+ c11 C18:1 | 0.80 | 0.85 | 0.226 | 0.122 |
| c12+c13 C18:1 | 0.33 | 0.34 | 0.079 | 0.379 |
| c15 C18:1 | 0.27 | 0.29 | 0.038 | 0.015 |
| C19 | 0.10 | 0.11 | 0.041 | 0.235 |
| t9t12 C18:2 | 0.16 | 0.15 | 0.053 | 0.119 |
| t9c12 C18:2 | 1.44 | 1.62 | 0.137 | <0.001 |
| C18:3 n-6 | 0.05 | 0.06 | 0.055 | 0.174 |
| C20:0 | 0.12 | 0.11 | 0.036 | 0.513 |
| C18:3 n-3 (ALA) | 0.67 | 0.65 | 0.092 | 0.376 |
| t11 C20:1 | 0.05 | 0.07 | 0.042 | 0.068 |
| c9 t11 CLA | 0.71 | 0.76 | 0.144 | 0.065 |
| C22:0 | 0.05 | 0.03 | 0.036 | <0.001 |
| C20:3 n-6 | 0.13 | 0.12 | 0.025 | 0.748 |
| C20:4 n-6 | 0.03 | 0.04 | 0.040 | 0.356 |
| C22:1 n-11 | 0.02 | 0.03 | 0.017 | 0.184 |
| C20:5 n-3 | 0.03 | 0.03 | 0.033 | 0.455 |
| C24:1 | 0.01 | 0.01 | 0.019 | 0.576 |
| C22:5 n-3 | 0.08 | 0.101 | 0.025 | <0.001 |
| Unknown FA | 3.48 | 2.99 | 1.037 | 0.010 |
| SFA ² | 69.3 | 66.9 | 2.46 | <0.001 |
| MUFA ³ | 23.8 | 26.4 | 2.47 | <0.001 |
| PUFA ⁴ | 3.38 | 3.62 | 0.279 | <0.001 |
| C18:1/C16:0 ratio | 0.62 | 0.73 | 0.099 | <0.001 |
| C14:1/C14:0 ratio | 0.12 | 0.13 | 0.025 | 0.004 |
| C16:1/C16:0 ratio | 0.05 | 0.06 | 0.008 | <0.001 |
| C18:1/C18:0 ratio | 2.88 | 3.10 | 0.287 | <0.001 |
| Total C18:1 | 20.39 | 22.77 | 2.329 | <0.001 |
| Total odd FA | 1.83 | 1.85 | 0.464 | 0.809 |
| Short-chain FA, | 14.70 | 13.90 | 1.894 | 0.018 |

¹ Root mean square error

38 **Table 8.** Morning milk fatty acid composition according to feeding treatments

| | Corn100 | Corn75 | Grass100 | Grass75 | RMSE ¹ | Effects | | |
|-------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|-------------------|---------|-------------|------------------|
| | | | | | | Forage | Restriction | F×R ² |
| C4:0 | 3.98 | 4.07 | 4.46 | 4.42 | 0.921 | 0.086 | 0.906 | 0.780 |
| C5:0 | 0.03 ^A | 0.03 ^A | 0.02 ^B | 0.02 ^B | 0.014 | 0.042 | 0.660 | 0.141 |
| C6:0 | 2.45 ^B | 2.49 ^B | 2.84 ^A | 2.84 ^A | 0.594 | 0.017 | 0.892 | 0.882 |
| C7:0 | 0.03 | 0.03 | 0.02 | 0.04 | 0.036 | 0.704 | 0.439 | 0.365 |
| C8:0 | 1.34 ^B | 1.26 ^B | 1.52 ^A | 1.46 ^A | 0.237 | <0.001 | 0.229 | 0.880 |
| C10:0 | 2.80 ^{Ba} | 2.36 ^{Bb} | 3.15 ^{Aa} | 2.81 ^{Ab} | 0.286 | 0.002 | <0.001 | 0.534 |
| C10:1 | 0.27 ^{Ba} | 0.23 ^{Bb} | 0.29 ^{Aa} | 0.27 ^{Ab} | 0.029 | 0.029 | <0.001 | 0.173 |
| C11:0 | 0.059 ^a | 0.029 ^b | 0.038 ^a | 0.028 ^b | 0.022 | 0.159 | 0.001 | 0.077 |
| C12:0 | 3.28 ^{Ba} | 2.70 ^{Bb} | 3.65 ^{Aa} | 3.09 ^{Ab} | 0.306 | 0.004 | <0.001 | 0.922 |
| C12:1 | 0.09 ^a | 0.07 ^b | 0.09 ^a | 0.08 ^b | 0.016 | 0.966 | <0.001 | 0.186 |
| C13:0 | 0.11 ^a | 0.07 ^b | 0.09 ^a | 0.08 ^b | 0.046 | 0.737 | 0.052 | 0.135 |
| C14:0 | 11.47 ^{Ba} | 10.93 ^{Bb} | 12.15 ^{Aa} | 11.52 ^{Ab} | 0.578 | 0.027 | <0.001 | 0.756 |
| iC15:0 | 0.16 ^B | 0.17 ^B | 0.30 ^A | 0.28 ^A | 0.037 | <0.001 | 0.550 | 0.211 |
| aiC15:0 | 0.20 ^b | 0.17 ^b | 0.32 ^a | 0.33 ^a | 0.118 | <0.001 | 0.850 | 0.601 |
| C14:1 | 1.62 ^a | 1.28 ^b | 1.26 ^a | 1.19 ^b | 0.255 | 0.110 | 0.003 | 0.052 |
| C15:0 | 1.15 ^y | 0.77 ^z | 0.97 ^z | 0.91 ^z | 0.227 | 0.727 | <0.001 | 0.007 |
| iC16:0 | 0.18 ^b | 0.20 ^a | 0.21 ^b | 0.21 ^a | 0.029 | 0.107 | 0.035 | 0.211 |
| C16:0 | 33.96 | 34.89 | 32.80 | 31.71 | 2.146 | 0.052 | 0.887 | 0.071 |
| iC17:0 | 0.08 | 0.12 | 0.06 | 0.13 | 0.130 | 0.834 | 0.094 | 0.607 |
| C16:1 | 1.87 | 1.70 | 1.46 | 1.47 | 0.277 | 0.037 | 0.220 | 0.192 |
| C17:0 | 0.507 | 0.446 | 0.482 | 0.500 | 0.071 | 0.412 | 0.245 | 0.032 |
| C18:0 | 6.52 ^B | 6.57 ^B | 8.23 ^A | 8.69 ^A | 0.607 | <0.001 | 0.112 | 0.182 |
| t6+7+8 C18:1 | 0.32 ^A | 0.33 ^A | 0.14 ^B | 0.15 ^B | 0.081 | <0.001 | 0.595 | 0.963 |
| t9 C18:1 | 0.34 ^A | 0.32 ^A | 0.17 ^B | 0.18 ^B | 0.064 | <0.001 | 0.817 | 0.379 |
| t10 C18:1 | 1.17 ^A | 0.93 ^A | 0.23 ^B | 0.26 ^B | 0.388 | <0.001 | 0.275 | 0.171 |
| t11+c7 C18:1 | 1.45 ^y | 2.03 ^x | 1.20 ^z | 1.30 ^z | 0.205 | <0.001 | <0.001 | <0.001 |
| c9 C18:1 | 15.98 ^b | 16.72 ^a | 15.48 ^b | 17.25 ^a | 1.454 | 0.981 | 0.002 | 0.167 |
| t15+ c11 C18:1 | 0.96 ^A | 0.90 ^A | 0.62 ^B | 0.69 ^B | 0.182 | <0.001 | 0.838 | 0.160 |
| c12+c13 C18:1 | 0.46 ^A | 0.46 ^A | 0.20 ^B | 0.20 ^B | 0.090 | <0.001 | 0.945 | 0.814 |
| c15 C18:1 | 0.29 ^a | 0.27 ^b | 0.28 ^a | 0.25 ^b | 0.027 | 0.268 | 0.005 | 0.612 |
| C19 | 0.11 | 0.10 | 0.10 | 0.11 | 0.029 | 0.593 | 0.933 | 0.183 |
| t9t12 C18:2 | 0.20 ^A | 0.17 ^A | 0.15 ^B | 0.13 ^B | 0.058 | 0.007 | 0.176 | 0.797 |
| t9c12 C18:2 | 1.57 ^A | 1.64 ^A | 1.24 ^B | 1.30 ^B | 0.132 | <0.001 | 0.066 | 0.866 |
| C18:3 n-6 | 0.05 | 0.04 | 0.05 | 0.07 | 0.040 | 0.153 | 0.734 | 0.190 |
| C20:0 | 0.08 ^B | 0.10 ^B | 0.13 ^A | 0.15 ^A | 0.039 | <0.001 | 0.191 | 0.659 |
| C18:3 n-3 (ALA) | 0.38 ^B | 0.42 ^B | 0.96 ^A | 0.90 ^A | 0.092 | <0.001 | 0.697 | 0.039 |
| t11 C20:1 | 0.06 | 0.05 | 0.06 | 0.07 | 0.033 | 0.586 | 0.497 | 0.451 |
| c9 t11 CLA | 0.77 | 0.99 | 0.53 | 0.55 | 0.143 | <0.001 | 0.002 | 0.013 |
| C22:0 | 0.060 | 0.05 | 0.06 | 0.04 | 0.040 | 0.572 | 0.318 | 0.615 |
| C20:3 n-6 | 0.12 | 0.12 | 0.13 | 0.14 | 0.027 | 0.078 | 0.338 | 0.963 |
| C20:4 n-6 | 0.01 ^B | 0.02 ^B | 0.06 ^A | 0.04 ^A | 0.024 | <0.001 | 0.612 | 0.092 |
| C22:1 n-11 | 0.01 ^B | 0.01 ^B | 0.03 ^A | 0.04 ^A | 0.013 | <0.001 | 0.364 | 0.584 |
| C20:5 n-3 | 0.02 | 0.03 | 0.04 | 0.03 | 0.026 | 0.169 | 0.885 | 0.235 |
| C24:1 | 0.01 | 0.01 | 0.02 | 0.01 | 0.014 | 0.263 | 0.792 | 0.142 |
| C22:5 n-3 | 0.08 | 0.09 | 0.08 | 0.08 | 0.028 | 0.430 | 0.165 | 0.725 |
| Unknown FA | 3.18 | 3.42 | 3.49 | 3.81 | 0.749 | 0.075 | 0.142 | 0.835 |
| SFA | 68.6 ^{Ba} | 67.6 ^{Bb} | 71.6 ^{Aa} | 69.4 ^{Ab} | 2.31 | 0.016 | 0.011 | 0.303 |
| MUFA | 24.9 ^{ab} | 25.3 ^{Aa} | 21.5 ^{Bb} | 23.4 ^{Ba} | 2.09 | 0.003 | 0.036 | 0.171 |
| PUFA | 3.26 ^z | 3.59 ^y | 3.32 ^{yz} | 3.33 ^{yz} | 0.237 | 0.433 | 0.009 | 0.012 |
| C18:1/C16:0 ratio | 0.63 ^b | 0.65 ^a | 0.56 ^b | 0.65 ^a | 0.088 | 0.410 | 0.018 | 0.184 |
| C14:1/C14:0 ratio | 0.14 ^{Aa} | 0.12 ^{Ab} | 0.10 ^{Ba} | 0.10 ^{Bb} | 0.024 | 0.044 | 0.044 | 0.067 |
| C16:1/C16:0 ratio | 0.06 | 0.05 | 0.04 | 0.05 | 0.009 | 0.142 | 0.284 | 0.087 |
| C18:1/C18:0 ratio | 3.39 ^A | 3.52 ^A | 2.24 ^B | 2.36 ^B | 0.257 | <0.001 | 0.060 | 0.881 |
| Total C18:1 | 21.0 ^{Ab} | 22.0 ^{Aa} | 18.3 ^{Bb} | 20.3 ^{Ba} | 1.87 | 0.009 | 0.004 | 0.296 |
| Total odd FA | 1.96 ^y | 1.50 ^z | 1.93 ^y | 1.95 ^y | 0.379 | 0.051 | 0.027 | 0.017 |
| Short-chain FA, | 14.3 ^{Ba} | 13.3 ^{Bb} | 16.1 ^{Aa} | 15.1 ^{Ab} | 1.73 | 0.002 | 0.023 | 0.973 |

39 ¹ Root mean square error ; ² F×R: Forage Restriction × effects ; ^{A-B} Means in the same row with no common
40 superscript differ (P<0.05) for forage effects ; ^{a-b} Means in the same row with no common superscript differ
41 (P<0.05) for restriction effects ; ^{w-z} Means in the same row with no common superscript differ (P<0.05) for
42 forage × restriction effects

43 **Table 9.** Evening milk fatty acids composition according to feeding treatments

| | Corn100 | Corn75 | Grass100 | Grass75 | RMSE ¹ | Effects | | |
|-------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|-------------------|---------|-------------|------------------|
| | | | | | | Forage | Restriction | F×R ² |
| C4:0 | 3.82 | 4.10 | 4.51 | 4.04 | 0.903 | 0.258 | 0.68 | 0.111 |
| C5:0 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.010 | 0.577 | 0.145 | 0.460 |
| C6:0 | 2.32 ^B | 2.20 ^B | 2.85 ^A | 2.52 ^A | 0.492 | 0.003 | 0.080 | 0.364 |
| C7:0 | 0.05 | 0.03 | 0.03 | 0.03 | 0.040 | 0.459 | 0.537 | 0.578 |
| C8:0 | 1.26 ^{Ba} | 1.08 ^{Bb} | 1.51 ^{Aa} | 1.33 ^{Ab} | 0.189 | <0.001 | <0.001 | 0.995 |
| C10:0 | 2.61 ^{Ba} | 2.05 ^{Bb} | 3.03 ^{Aa} | 2.56 ^{Ab} | 0.280 | <0.001 | <0.001 | 0.557 |
| C10:1 | 0.27 ^{Ba} | 0.21 ^{Bb} | 0.31 ^{Aa} | 0.27 ^{Ab} | 0.033 | 0.003 | <0.001 | 0.222 |
| C11:0 | 0.06 ^y | 0.02 ^z | 0.03 ^z | 0.03 ^z | 0.020 | 0.173 | <0.001 | 0.004 |
| C12:0 | 3.08 ^{Ba} | 2.41 ^{Bb} | 3.55 ^{Aa} | 2.94 ^{Ab} | 0.327 | <0.001 | <0.001 | 0.707 |
| C12:1 | 0.09 ^a | 0.06 ^b | 0.09 ^a | 0.07 ^b | 0.013 | 0.833 | <0.001 | 0.076 |
| C13:0 | 0.10 ^z | 0.07 ^y | 0.09 ^{yz} | 0.10 ^z | 0.032 | 0.276 | 0.394 | 0.006 |
| C14:0 | 11.02 ^{Ba} | 10.11 ^{Bb} | 11.88 ^{Aa} | 11.09 ^{Ab} | 0.653 | 0.007 | <0.001 | 0.740 |
| iC15:0 | 0.17 ^B | 0.17 ^B | 0.31 ^A | 0.31 ^A | 0.031 | <0.001 | 0.809 | 0.936 |
| aiC15:0 | 0.19 ^B | 0.18 ^B | 0.34 ^A | 0.35 ^A | 0.128 | <0.001 | 0.992 | 0.679 |
| C14:1 | 1.70 ^y | 1.37 ^z | 1.35 ^z | 1.26 ^z | 0.213 | 0.160 | <0.001 | 0.030 |
| C15:0 | 1.06 ^y | 0.78 ^z | 0.98 ^y | 0.95 ^y | 0.165 | 0.482 | <0.001 | 0.005 |
| iC16:0 | 0.18 ^B | 0.20 ^B | 0.22 ^A | 0.22 ^A | 0.025 | 0.008 | 0.054 | 0.277 |
| C16:0 | 32.52 | 33.11 | 31.69 | 30.30 | 2.085 | 0.063 | 0.449 | 0.067 |
| iC17:0 | 0.08 ^y | 0.12 ^x | 0.06 ^z | 0.07 ^{yz} | 0.022 | <0.001 | <0.001 | 0.046 |
| C16:1 | 2.01 ^A | 1.98 ^A | 1.56 ^B | 1.60 ^B | 0.270 | 0.017 | 0.887 | 0.574 |
| C17:0 | 0.52 ^{yz} | 0.47 ^z | 0.49 ^z | 0.53 ^y | 0.064 | 0.271 | 0.861 | 0.009 |
| C18:0 | 6.80 ^z | 6.80 ^z | 8.45 ^y | 9.21 ^x | 0.723 | <0.001 | 0.046 | 0.044 |
| t6+7+8 C18:1 | 0.33 ^A | 0.32 ^A | 0.13 ^B | 0.14 ^B | 0.066 | <0.001 | 0.955 | 0.612 |
| t9 C18:1 | 0.35 ^A | 0.32 ^A | 0.17 ^B | 0.19 ^B | 0.063 | <0.001 | 0.769 | 0.183 |
| t10 C18:1 | 1.21 ^A | 0.99 ^A | 0.24 ^B | 0.27 ^B | 0.398 | <0.001 | 0.349 | 0.204 |
| t11+c7 C18:1 | 1.41 ^y | 1.91 ^x | 1.16 ^z | 1.27 ^{yz} | 0.203 | <0.001 | <0.001 | <0.001 |
| c9 C18:1 | 17.95 ^b | 20.23 ^a | 16.84 ^b | 19.68 ^a | 1.930 | 0.389 | <0.001 | 0.569 |
| t15+ c11 C18:1 | 1.02 ^A | 1.02 ^A | 0.64 ^B | 0.73 ^B | 0.170 | <0.001 | 0.312 | 0.292 |
| c12+c13 C18:1 | 0.52 ^{Aa} | 0.47 ^{Ab} | 0.20 ^{Ba} | 0.19 ^{Bb} | 0.056 | <0.001 | 0.048 | 0.216 |
| c15 C18:1 | 0.30 | 0.28 | 0.29 | 0.28 | 0.037 | 0.687 | 0.152 | 0.428 |
| C19 | 0.12 | 0.11 | 0.11 | 0.11 | 0.039 | 1.000 | 0.406 | 0.371 |
| t9t12 C18:2 | 0.19 ^A | 0.17 ^A | 0.12 ^B | 0.11 ^B | 0.054 | <0.001 | 0.479 | 0.697 |
| t9c12 C18:2 | 1.80 ^A | 1.91 ^A | 1.36 ^B | 1.42 ^B | 0.164 | <0.001 | 0.043 | 0.667 |
| C18:3 n-6 | 0.05 ^b | 0.06 ^a | 0.06 ^b | 0.08 ^a | 0.034 | 0.165 | 0.044 | 0.971 |
| C20:0 | 0.09 ^B | 0.09 ^B | 0.12 ^A | 0.15 ^A | 0.035 | <0.001 | 0.199 | 0.092 |
| C18:3 n-3 (ALA) | 0.37 ^B | 0.36 ^B | 0.93 ^A | 0.95 ^A | 0.084 | <0.001 | 0.906 | 0.460 |
| t11 C20:1 | 0.08 | 0.07 | 0.06 | 0.07 | 0.031 | 0.300 | 0.968 | 0.326 |
| c9 t11 CLA | 0.83 ^y | 1.05 ^x | 0.55 ^z | 0.59 ^z | 0.110 | <0.001 | <0.001 | 0.004 |
| C22:0 | 0.03 | 0.02 | 0.04 | 0.03 | 0.026 | 0.226 | 0.255 | 0.702 |
| C20:3 n-6 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.13 | 0.027 | 0.528 | 0.718 | 0.418 |
| C20 :4 n-6 | 0.01 ^B | 0.02 ^B | 0.07 ^A | 0.06 ^A | 0.032 | <0.001 | 0.785 | 0.233 |
| C22:1 n-11 | 0.02 ^B | 0.01 ^B | 0.04 ^A | 0.04 ^A | 0.020 | <0.001 | 0.310 | 0.063 |
| C20:5 n-3 | 0.04 | 0.03 | 0.04 | 0.03 | 0.026 | 0.962 | 0.176 | 0.740 |
| C24:1 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.013 | 0.214 | 0.771 | 0.629 |
| C22:5 n-3 | 0.11 | 0.10 | 0.10 | 0.10 | 0.023 | 0.265 | 0.621 | 0.956 |
| Unknown FA | 2.91 | 2.62 | 3.08 | 3.36 | 0.524 | 0.004 | 0.960 | 0.042 |
| SFA ³ | 66.2 ^{Ba} | 64.2 ^{Bb} | 70.4 ^{Aa} | 66.9 ^{Ab} | 2.62 | 0.002 | <0.001 | 0.281 |
| MUFA ⁴ | 27.2 ^{Ab} | 29.2 ^{Aa} | 23.0 ^{Bb} | 26.0 ^{Ba} | 2.25 | <0.001 | <0.001 | 0.380 |
| PUFA ⁵ | 3.61 ^{Ab} | 3.89 ^{Aa} | 3.42 ^{Bb} | 3.57 ^{Ba} | 0.268 | 0.046 | 0.003 | 0.343 |
| C18:1/C16:0 ratio | 0.72 ^b | 0.80 ^a | 0.63 ^b | 0.76 ^a | 0.103 | 0.171 | <0.001 | 0.310 |
| C14:1/C14:0 ratio | 0.15 ^A | 0.13 ^A | 0.11 ^B | 0.11 ^B | 0.022 | 0.038 | 0.078 | 0.087 |
| C16:1/C16:0 ratio | 0.06 | 0.06 | 0.05 | 0.05 | 0.009 | 0.050 | 0.634 | 0.296 |
| C18:1/C18:0 ratio | 3.59 ^{Ab} | 3.98 ^{Aa} | 2.35 ^{Bb} | 2.49 ^{Ba} | 0.300 | <0.001 | 0.001 | 0.103 |
| Total C18:1 | 23.10 ^{Ab} | 25.56 ^{Aa} | 19.68 ^{Bb} | 22.76 ^{Ba} | 2.136 | 0.003 | <0.001 | 0.562 |
| Total odd FA | 1.89 ^y | 1.50 ^z | 2.00 ^y | 2.01 ^y | 0.300 | 0.002 | 0.017 | 0.012 |
| Short-chain FA | 13.6 ^A | 12.2 ^A | 16.0 ^B | 13.8 ^B | 1.74 | <0.001 | <0.001 | 0.401 |

44 ¹ Root mean square error ; ² F×R: Forage Restriction × effects ; ^{A-B} Means in the same row with no common
45 superscript differ (P<0.05) for forage effects ; ^{a-b} Means in the same row with no common superscript differ
46 (P<0.05) for restriction effects ; ^{w-z} Means in the same row with no common superscript differ (P<0.05) for
47 forage × restriction effects

48 trans6+7+8 C18:1, trans9 C18:1, trans10 C18:1, trans15 + cis11 C18:1, cis12 + cis13 C18:1
49 percentages were higher with corn silage than with conserved grass based diets (+ 0.01 and + 0.05
50 unit percent; + 0.32 and + 0.42 unit percent; + 0.18 and + 0.46 unit percent; + 0.16 and + 0.16 unit
51 percent; + 0.80 unit percent and + 0.85 unit percent; + 0.28 and + 0.34 unit percent; + 0.26 and + 0.30
52 unit percent, respectively). C14:1/C14:0 and C18:1/C18:0 ratios were higher with corn silage based
53 diets (+ 0.03 and +0.03 unit percent; + 1.16 and + 1.37 unit percent). No significant difference
54 according to nature of forage was observed for C18:1/C16:0 and C16:1/C16:0 ratios (Tables 8 and 9).
55 In evening milks, PUFA percentage was higher with corn silage compared to conserved grass based
56 diets (+ 0.25 unit percent). The milk trans9 cis12 C18:2, trans9 trans12 C18:2 percentages were
57 higher with cows fed corn silage than conserved grass based diets (+ 0.05 and + 0.07 unit percent; +
58 0.35 and + 0.47 unit percent). C18:3 n-3 percentage was lower with cows fed with corn silage than
59 conserved grass based diets (- 0.54 and - 0.58 unit percent). Significant interactions between nature
60 of forage and feeding restriction were observed for PUFA in morning milks and odd FA percentages.
61 In morning milks, PUFA percentage was higher for Corn100 compared to Corn75 (+ 0.33 unit
62 percent). Cis9 trans11 C18:2 percentage was higher for Corn75 compared to Corn100 (+ 0.22 and +
63 0.22 unit percent) but no difference was found between Grass75 and Grass100. Total odd FA
64 percentage was lower for Corn75 compared to Corn100, Grass75 and Grass100 (- 0.46, - 0.45, and -
65 0.43 unit percent and - 0.39, - 0.50, - 0.51 unit percent respectively) (Tables 8 and 9).

66 ***Effect of feeding restriction and nature of forage on protein profile in evening milks and wheys***

67 No effect of feeding restriction was observed on milk protein profile in milk and whey. The milk β -CN
68 and α 2-CN percentages of cows receiving corn silage were higher (+ 6.05 and + 1.22%), and milk
69 immunoglobulin G3 and proteose peptone 5 (PP5) percentages were lower (- 1.21 and -1.90%) than
70 those of cows receiving conserved grass. The milk α 1-CN, κ -CN, glycosylated κ -CN, β -LG, α -LA,
71 proteose peptone 8s (PP8s), and immunoglobulin G1 and G2 percentages were not significantly
72 different in milk according to nature of forage. The whey percentages of PP5, PP8s, and
73 immunoglobulin G2 percentages were lower (- 1.93; - 1.01; and - 0.99%), and β -LG percentage
74 tended to be higher (+ 7.45 %) than those of cows fed with conserved grass. The whey percentages
75 of α -LA, BSA, and immunoglobulin G3 were not significantly different according to nature of forage
76 (Table 10 and 11).

77 ***Effect of feeding restriction and nature of forage on plasma parameters***

78 The plasma NEFA, total glycerol and acetate were higher for restricted cows than for non-restricted
79 cows (+ 184 μ M/L; + 17.5 mg/L; and + 0.04 mM/L respectively). No effect of feeding restriction was
80 found on plasma urea. When cows were fed with corn silage, plasma urea and acetate were lower
81 (respectively - 132 mg/dL and - 0.06 mM/L) compared to cows fed with conserved grass. No effect of
82 nature of forage was found on plasma NEFA and total glycerol. Significant interactions between

83

84

85 **Table 10.** Protein composition in milk and whey, according to main distributed forage, in evening
 86 milks (N=12)

| | Corn | Grass | RMSE ¹ | Effect |
|-------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------|
| In milk, % | | | | |
| β-CN | 30.9 | 24.8 | 3.30 | 0.014 |
| αs1-CN | 25.0 | 25.5 | 1.97 | 0.736 |
| αs2-CN | 5.52 | 4.30 | 0.775 | 0.029 |
| κ-CN | 5.61 | 4.34 | 1.340 | 0.152 |
| κ-glyco-CN ² | 6.91 | 7.69 | 1.044 | 0.243 |
| β-LG | 7.87 | 7.30 | 0.794 | 0.268 |
| α-LA | 1.59 | 1.90 | 0.497 | 0.328 |
| PP8s ³ | 0.48 | 0.66 | 0.256 | 0.330 |
| PP5 ⁴ | 0.86 | 2.76 | 2.539 | 0.046 |
| G1 ⁵ | 1.45 | 2.76 | 1.200 | 0.105 |
| G2 ⁶ | 1.28 | 2.58 | 1.253 | 0.145 |
| G3 ⁷ | 1.74 | 2.95 | 0.642 | 0.013 |
| In whey, % | | | | |
| β-LG | 51.9 | 44.4 | 5.73 | 0.060 |
| α-LA | 15.3 | 17.8 | 3.367 | 0.247 |
| β-CN | 2.24 ^a | 1.00 ^b | 0.464 | <0.001 |
| κ-CN | 1.06 | 1.22 | 0.267 | 0.354 |
| κ-glyco-CN ² | 1.87 | 1.13 | 0.889 | 0.205 |
| PP8s ³ | 1.37 | 2.38 | 0.641 | 0.028 |
| PP5 ⁴ | 2.70 ^b | 4.63 ^a | 0.859 | 0.005 |
| G2 ⁶ | 0.53 | 1.52 | 0.406 | 0.005 |
| G3 ⁷ | 0.13 | 0.15 | 0.055 | 0.833 |
| BSA | 0.53 | 1.14 | 0.326 | 0.134 |

87 ¹ Root mean square error88 ^{a-b} Means in the same row with no common superscript differ (P<0.05) for forage effects89 ² κ-glyco-CN: Glycosylated κ-CN90 ³ PP8: proteose peptone 891 ⁴ PP5: proteose peptone 592 ⁵ G1: immunoglobulin G193 ⁶ G2: immunoglobulin G294 ⁷ G3: immunoglobulin G3

95

96

97

Table 11. Protein composition in milk and whey, according to restriction level, in evening milks (N=12).

| | 100 | 75 | RMSE ¹ | Effect |
|-------------------------|------|------|-------------------|--------|
| In milk, % | | | | |
| β-CN | 28.7 | 27.7 | 4.65 | 0.346 |
| αs1-CN | 25.4 | 25.2 | 1.98 | 0.856 |
| αs2-CN | 5.37 | 4.62 | 0.937 | 0.216 |
| κ-CN | 4.94 | 4.89 | 1.511 | 0.965 |
| κ-glyco-CN ² | 6.71 | 7.72 | 0.985 | 0.124 |
| β-LG | 7.62 | 7.61 | 0.853 | 0.992 |
| α-LA | 1.64 | 1.81 | 0.516 | 0.577 |
| PP8s ³ | 0.54 | 0.62 | 0.272 | 0.690 |
| PP5 ⁴ | 2.07 | 1.44 | 1.681 | 0.552 |
| G1 ⁵ | 1.81 | 2.25 | 1.380 | 0.611 |
| G2 ⁶ | 1.37 | 2.08 | 1.390 | 0.457 |
| G3 ⁷ | 2.19 | 2.37 | 0.919 | 0.764 |
| In whey, % | | | | |
| β-LG | 45.1 | 50.1 | 6.48 | 0.230 |
| α-LA | 15.7 | 17.5 | 3.51 | 0.418 |
| β-CN | 1.58 | 1.68 | 0.778 | 0.854 |
| κ-CN | 1.22 | 1.08 | 0.270 | 0.405 |
| κ-glyco-CN ² | 1.74 | 1.23 | 0.934 | 0.384 |
| PP8s ³ | 1.95 | 1.90 | 0.849 | 0.926 |
| PP5 ⁴ | 4.15 | 3.42 | 1.308 | 0.381 |
| G2 ⁶ | 1.05 | 1.02 | 0.686 | 0.942 |
| G3 ⁷ | 0.12 | 0.19 | 0.015 | 0.167 |
| BSA | 0.62 | 0.88 | 0.474 | 0.580 |

¹ Root mean square error

² κ-glyco-CN: Glycosylated κ-CN

³ PP8: proteose peptone 8

⁴ PP5: proteose peptone 5

⁵ G1: immunoglobulin G1

⁶ G2: immunoglobulin G2

⁷ G3: immunoglobulin G3

feeding restriction and nature of forage were observed for glucose and BHB. Glucose was higher when cows were fed with corn silage compared to conserved grass (+ 47 mg/dL). Glucose was lower for Grass75 compared to Grass100 (- 22 mg/dL), but no significant difference was found between Corn75 and Corn100. Beta-hydroxybutyrate was lower in cows fed with corn silage (- 212 μ M/L). Beta-hydroxybutyrate was higher for Corn75 compared to Corn100 (+ 139 μ M/L), but no significant difference was found between Grass75 and Grass100 (Table 12).

Correlations between spontaneous lipolysis and milk characteristics.

Poor correlations inter-treatments and intra-treatments, ($R^2 < 0.16$) were found between SL and milk yield and milk composition (i.e., fat content, protein content, SCS, lactose content).

Good linear negative correlation was found between SL and logarithm of PP5 percentage in whey (Log PP5) ($R^2 = 0.71$; Figure 2). Medium negative correlation was found between SL and BHBA in morning milks of high sensitive cows to SL ($R^2 = 0.42$). Medium positive correlation was found between SL and C18:1/C18:0 ratio and negative with SL and C18:0 percentage in milk of cows fed with corn silage ($R^2=0.37$ and $R^2 = 0.35$ respectively). Small negative correlation were found between d4,3 and SL ($R^2 = 0.23$) among cows fed with corn silage.

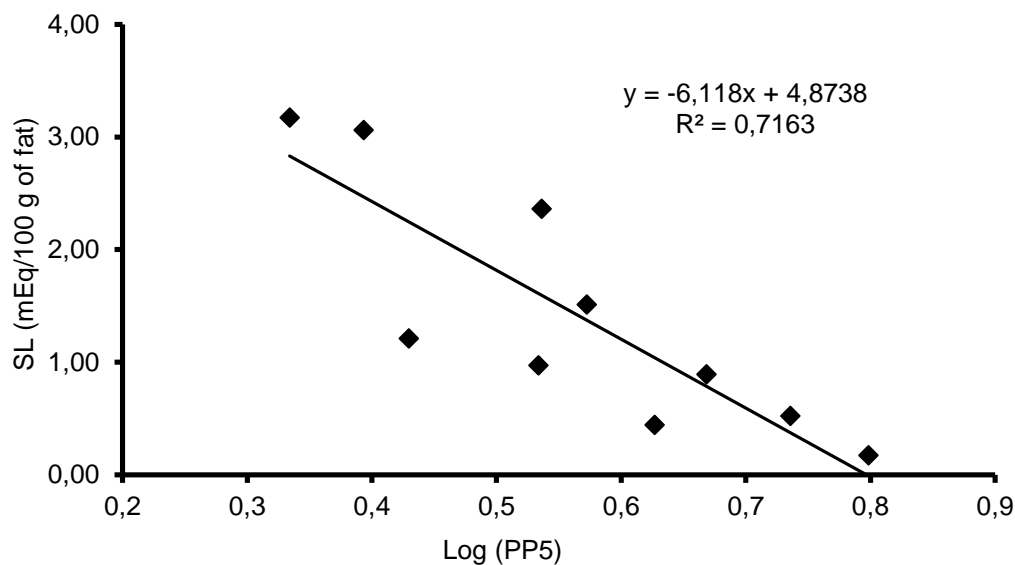


Figure 2: Correlation between spontaneous lipolysis and log[proteose peptone 5 (PP5)] in milk whey (N=10) in evening milks.

Table 12. Plasma composition according to feeding treatments

| | Corn100 | Corn75 | Grass100 | Grass75 | RMSE ¹ | Effects | | |
|----------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------|------------|-----------------|--------|
| | | | | | | Forage (F) | Restriction (R) | F×R |
| Total glycerol, mg/L | 89.0 ^b | 106.1 ^a | 87.3 ^b | 105.1 ^a | 20.24 | 0.813 | <0.001 | 0.923 |
| Acetate, mM/L | 0.24 ^{Bb} | 0.27 ^{Ba} | 0.29 ^{Ab} | 0.33 ^{Aa} | 0.052 | 0.015 | <0.001 | 0.660 |
| BHB, μM/L | 444 ^x | 583 ^y | 712 ^z | 739 ^z | 87.9 | <0.001 | <0.001 | <0.001 |
| NEFA, μM/L | 191 ^b | 386 ^a | 178 ^b | 350 ^a | 125.1 | 0.598 | <0.001 | 0.608 |
| Glucose, mg/dL | 724 ^z | 730 ^z | 690 ^y | 668 ^x | 25.7 | <0.001 | 0.080 | 0.003 |
| Urea, mg/dL | 227 ^B | 221 ^B | 360 ^A | 352 ^A | 53.6 | <0.001 | 0.471 | 0.949 |

¹ Root mean square error^{A-B} Means in the same row with no common superscript differ (P<0.05) for forage effects^{a-b} Means in the same row with no common superscript differ (P<0.05) for restriction effects^{w-z} Means in the same row with no common superscript differ (P<0.05) for forage × restriction effects

DISCUSSION

Feeding restriction and nature of forage modulated zootechnical, metabolic and milk traits.

Feeding restriction. As expected, feeding restriction was associated with lower milk yield, lower protein content and lower protein yield (Hurtaud et al., 2009; Delaby et al., 2009; Burke et al., 2010). The plasma NEFA and total glycerol contents were higher during feeding restriction due to lipomobilization, as previously observed in various trials (de Boer et al., 1985; Emery et al., 1992; Grummer, 1993; Chilliard et al., 1998; Guinard-Flament et al., 2006; Gross et al., 2013). The plasma BHB was higher during feeding restriction only in the group of cows receiving corn silage. Corn75 had negative protein and energy balances contrary to Grass75, due to initial under-estimation of nutritional value of conserved grass. Cows' weight was slightly lower when cows were restricted as already described (Gross et al., 2011; Gabbi et al., 2016). Milk de novo-synthesized FA percentage was lower and MUFA percentage was higher during restriction in accordance with van Knegsel et al. (2005), Stoop et al. (2009) and Gross et al. (2011). In our trial, effects of feeding restriction on zootechnical, metabolic and milk traits were consistent with literature.

Nature of forage. Corn silage was associated with higher milk yield as already observed in many trials, as reviewed by Khan et al. (2014). Fat content and fat yields were lower with corn silage than with conserved grass, as expected (Khan et al., 2014) and protein content and yield were not higher with corn silage than with conserved grass based diets, according to Khan et al. (2014). That could be explained by the fact that cows fed with conserved grass had better energy and protein intakes and balances than cows fed with corn silage in our trial. Corn silage was associated with higher levels of plasma glucose, lower levels of acetate and BHB which could be explained by chemical composition of diets. Corn silage based diets contain more slowly digestible starch, which would lead to less acetate, more propionate and more glucose contents in blood (McCarthy et al., 1989; Harmon, 1992) and less water-soluble sugars that lead to less ruminal butyrate and thus less BHB production (Dijkstra, 1994; Beck et al., 1984). When cows were fed with corn silage, de novo -synthesized FA and C18:3 (n-3) percentages were lower, MUFA (including total C18:1) and C18:2 (n-6) percentages were higher, as already described by Chilliard et al. (2001), and Hart et al. (2015). In our trial, although relative milk solid contents were slightly lower than expected due to diet formulation, effects of corn based diets on zootechnical, metabolic and milk traits were consistent with literature.

Feeding restriction, nature of forage and time of milking modulated the lipolytic system

(spontaneous lipolysis, lipoprotein lipase activity, milk fat globule integrity and protein profile).

Spontaneous lipolysis. Spontaneous lipolysis was higher in evening milks than in morning milks as previously shown in various trials in literature (Jensen, 1959; Murphy et al., 1979; Jellema, 1975; Ahrné and Björck 1985; Vanbergue et al., submitted). This could be explained by the longer interval

between evening and morning milkings than between morning and evening milkings, as suggested by Bachman et al. (1988) who did not find any difference between morning and evening milks in term of SL levels with identical milking intervals (12 / 12 h). These differences could also be explained, at a biochemical level, by circadian variations of the milk LiS components such as MFGM composition, as observed by Ruf and Arnold (2015) in human cell membranes. The determinants of this daily remodeling are not fully understood but as said by these authors, several membrane functions could be affected by changes in membrane phospholipid composition and the interaction between milk fat globule membrane (MFGM) and LPL could be one of them. In our trial, we showed for the first time that the impact of nature of forage on SL was different on morning and evening milks. Spontaneous lipolysis was higher when cows were fed with corn silage than with conserved grass, but this effect was only observed in morning milks and no effect of nature of forage was detected in evening milks. This is in contradiction with Ferlay et al. (2006) who found higher level of SL with corn silage. This could be explained by the use of different breed in both trials (Holstein vs Tarentaise and Montbéliarde). Spontaneous lipolysis was higher when cows were restricted, which is consistent with literature (Stobbs et al., 1973; Deeth and Fitzgerald, 1976, Connolly, 1978; Jellema, 1986; O'Brien, 1996) but this effect was much higher in evening milks compared to morning milks.

Lipoprotein lipase activity. Total LPL activity did not vary according to time of milking, in accordance with Ahrné and Björck (1985) but contrary to Murphy et al. (1979) and Sundheim (1988) who found higher levels of total LPL activity in evening milks. LPL activity did not vary according to feeding restriction and nature of forage in accordance with Ferlay et al. (2006). No significant correlation between LPL activity and SL has been shown between cows. Total LPL activity did not seem to modulate SL variations as also observed by Cartier and Chilliard (1990) and Sundheim and Bengtsson-Olivecrona (1987b). LPL activity in milk fat fraction would have been interesting to evaluate as it is an important determinant of SL according to Cartier and Chilliard (1990) and Sundheim and Bengtsson-Olivecrona (1987b). Indeed, Ahrné and Björck (1985) found higher LPL activity in milk fat fraction in evening milks than in morning milks and this could explain, at least in part, observed differences of SL between milkings.

Milk fat globule integrity. Milk fat globule integrity has been evaluated by MFG size evaluation (Evers, 2004). Milk fat globule size was not affected by feeding restriction in accordance with Couvreur et al. (2004) and Graves et al. (2007) but varied according to nature of forage and time of milking. Milk fat globules were larger in evening milks of cows fed with corn silage as demonstrated by Murphy et al. (1979) in relation to the fat:protein contents ratio (Couvreur and Hurtaud, in press). No significant correlation has been shown between MFG size and SL in the whole data set, so MFG size did not seem to be related to SL in the case of time of milking variations. However, we found a small negative correlation between MFG size and SL in cows susceptible to SL fed with corn silage

(data not shown); milks containing smaller MFG were associated with higher SL levels. MFG size seemed to be an uncertain indicator of MFG integrity but could reflect MFGM variations. Indeed, several studies had linked MFG size and MFGM composition (Lopez et al., 2010; Logan et al., 2014; Lu et al., 2016) and MFGM could have a key role to explain SL variations. According to Lu et al. (2016), smaller MFG would contain fewer levels of PP3, which is known to act as an inhibitor of LPL (Anderson, 1981; Sundheim and Bengtsson-Olivecrona 1987a and b). Besides, energy balance had been shown to modulate MFGM composition (Lu et al., 2013) and daily cycle variations in phospholipids composition of human cell membranes had been observed by Ruf and Arnold (2015). A lot of interactions between LPL and MFGM and alterations upon cooling could be modified by changes in membrane composition, leading to SL levels modulation according to nature of forage, feeding restriction and time of milking.

Protein profiles. Protein profiles have been done on evening milks to identify potential cofactors of LPL. We found a negative correlation with logarithm of PP5 and SL. Thus PP5 was suspected to behave as an inhibitor of SL. This is consistent with Anderson (1981) but not consistent with Cartier and Chilliard (1986) who both used purified preparations of PP5 fraction to study the role of potential LPL cofactors. Although BSA has been suspected to act as an activator of SL by Bengtsson and Olivecrona (1980), no statistically significant correlation between BSA and SL has been observed. Unfortunately, PP3, already identified as an inhibitor of LPL activity (Anderson, 1981; Sundheim and Bengtsson-Olivecrona 1987a and b) has not been detected. Protein profiles varied according to nature of forage. Percentage of PP5, which could be an inhibitor of SL, was lower when cows were fed with corn silage than when cows were fed with conserved grass. This could partly explain the higher levels of SL when cows were fed with corn silage. Protein profile had been evaluated only on few evening milks samples and further investigations should be done to consolidate the results of nature of forage and feeding restriction and to assess the impact of milking time on protein profile.

Biochemical mechanisms of spontaneous lipolysis variations based on cow's metabolism

Links between SL and cow's metabolic status, particularly involving adipose tissue mobilization, had been assumed by Vanbergue et al. (submitted). So in this paper, we used several indicators of cow lipomobilization such as serum NEFA and BHB and milk cis9 C18:1/C18:0 ratio (Garcia et al., 2011) to assess the link between lipomobilization and milk SL. No correlation had been found between NEFA levels and SL. However, among corn silage fed cows, a small positive correlation (data not shown, $R^2=0.37$) has been found between milk cis9 C18:1/C18:0 ratio and SL. This would confirm that adipose tissue mobilization would induce an increase in SL although the mechanisms of this action would still be unclear. Finally, on the contrary, we showed a medium negative correlation between BHB and SL among sensitive cows ($SL > 1$ mEq/100 g fat) in morning milks. Relations with these indicators and SL in this trial seemed to be contradictory. These contradictions could be explained by

the lack of specificity of serum BHB and milk cis9 C18:1/C18:0 ratio to evaluate lipomobilization. Indeed, milk cis9 C18:1/C18:0 ratio is also influenced by the biohydrogenation of MUFA in the rumen and the delta 9 desaturase activity in the mammary gland. BHB content also varies with the level of butyrate produced by the rumen.

CONCLUSION

As expected, spontaneous lipolysis was higher in evening milks. Spontaneous lipolysis was enhanced with corn silage based diets in morning milks and with feeding restriction in morning and evening milks with a stronger effect in evening milks, suggesting different biochemical mechanisms according to time of milking. At milk level, lipolytic system analyses confirmed that LPL activity in milk is not correlated with spontaneous lipolysis. Logarithm of proteose peptone 5 was shown to be negatively correlated with spontaneous lipolysis. Among corn silage fed cows, small positive correlation was found between milk fat globule size and spontaneous lipolysis. These parameters gave us clues to understand some mechanisms although, at this stage, there still remain a lot of assumptions about the roles of lipolytic system. Milk fat globule membrane composition in relation to circadian variations, cows' energy balance, or nature of forage, are assumed to play an important role in spontaneous lipolysis variations. Adipose and mammary tissues metabolisms are also suspected to explain a part of these variations. Metabolomics approaches in blood and milk would be able to detect the possible links between cow's metabolic status and milk SL.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the all staff of the experimental farm of Méjusseaume: G. Boulet, A. Cozien, J. B. Eon, A. Eveno, M. Fargetton, M. Guilloux, J. Lassalas, A. Mottin, J. Orinel, J. Parois, F. Pichot, P. Pichot, D. Sidaner, M. Texier, G. Théaud (INRA, Domaine de Méjusseaume, F-35650 Le Rheu, France) for the herd management and for their assistance with milk sampling. They are also grateful to P. Debournoux, N. Huchet, J. Jaguelin, C. Perrier, S. Philau, T. Le Mouël (UMR1348 PEGASE) for their technical assistance and to C. Labonne (UMR1213 Herbivores) for analysis of milk LPL activity. Thanks are also due to the Join Technical Unit of Research and Engineering on dairy farming (UMT RIEL, Rennes, France) for the constructive exchanges. This research received financial support from the CNIEL (Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière, Paris, France).

Cette partie a été consacrée à l'étude des mécanismes biochimiques de la LS dans un cas précis : la variation de la nature du fourrage distribué aux VL (ensilage de maïs vs herbe conservée) et la variation du niveau de restriction alimentaire. Les variations de LS en fonction du moment de la traite ont également été analysées.

Dans cet essai, la LS a été plus élevée lorsque les VL ont été nourries à base d'ensilage de maïs comparativement à l'ensilage d'herbe. L'effet de la nature du fourrage a été observé uniquement dans les laits issus de la traite du matin. La restriction alimentaire a entraîné une augmentation des valeurs de LS dans les laits issus de la traite du matin et du soir. Cet effet était plus marqué dans les laits issus de la traite du soir. La LS a eu tendance à être encore plus élevée dans les lots recevant de l'herbe conservée et en restriction alimentaire.

Les éléments du SLi mesurés ont été les suivants : l'AcL dans le lait total, la taille des GG, le profil protéique des laits dans une partie des laits issus de la traite du soir. Des indicateurs de l'équilibre énergétique des VL ont également été évalués dans le lait et dans le sang (AGNE, BHBA, C18:1 / C18:0). Ces éléments ont permis d'avoir des conclusions partielles sur les mécanismes impliqués.

L'AcL mesurée dans le lait total n'a varié ni selon la nature du fourrage, ni selon le niveau de restriction alimentaire, ni selon le moment de la traite. Une mesure de l'AcL dans la fraction grasse pourrait permettre d'évaluer la fraction de la LPL liée aux GG et potentiellement d'expliquer les variations de LS observées. La taille des GG n'a pas permis d'expliquer les variations de la LS lors de la restriction alimentaire et en fonction du moment de la traite. Cependant, au sein du lot de VL susceptibles à la LS alimentées avec de l'ensilage de maïs, une faible corrélation négative a été établie entre la LS et la taille des GG. Enfin, le profil protéique a permis de mettre en évidence une corrélation négative entre la PP5 et la LS suggérant le rôle inhibiteur de la PP5. Des ajouts dosés de PP5 dans le lait permettraient de vérifier cette hypothèse. Les niveaux de PP5 supérieurs dans les laits des VL nourries avec de l'herbe conservée permettraient d'expliquer une partie des différences observées. Enfin, il s'avère que la composition de la MFGM pourrait également expliquer une partie des variations de LS observées en fonction du fourrage distribué, de la restriction alimentaire, et du moment de la traite. Une évaluation de la composition protéique et lipidique de la MFGM serait donc à envisager. Enfin, les indicateurs du déséquilibre énergétique des animaux, témoins de la lipomobilisation du tissu adipeux, ont donné des résultats variables. Une approche protéomique permettrait d'étudier le lien éventuel entre la lipomobilisation du tissu adipeux et la LS du lait.

Discussion

Cette thèse avait pour but de réévaluer l'impact des facteurs de variation de la LS : effet de la génétique des animaux, de la race, du stade physiologique en lien avec le niveau de production laitière, de la parité, de la fréquence de traite et de l'alimentation et d'étudier des modalités de ces facteurs susceptibles de modifier la LS. Nous avons émis l'hypothèse que l'augmentation du potentiel laitier des animaux et par conséquent le changement de leur mode d'alimentation pouvaient avoir modifié l'impact des facteurs de variations identifiés dans le passé. Cartier et Chilliard (1990) et Sundheim et Bengtsson-Olivecrona (1987b) avaient recensé les principaux déterminants de la LS dans le lait : l'activité lipasique à la surface des globules gras, l'intégrité des globules gras et l'équilibre entre les activateurs et inhibiteurs. L'objectif de cette thèse était de faire le lien entre les approches zootechniques et les mécanismes mis en œuvre dans le lait par l'étude de l'équilibre entre les composants du lait impliqués dans la LS : la lipoprotéine lipase, ses cofacteurs et les triglycérides au sein des globules gras. Les axes prioritaires de recherche de la partie biochimie étaient l'identification de cofacteurs et la mise en relation entre la taille des globules gras et la LS en faisant l'hypothèse que l'intégrité des globules gras pourrait dépendre de leur taille (Wiking et al., 2006).

Cinq essais et une enquête en élevage ont été conduits pendant la thèse pour répondre aux objectifs :

Essai « système » : effets de la race, de la parité, du stade de lactation et de la stratégie alimentaire sur la LS du lait de VL

Enquête en élevage : effets des pratiques d'élevage sur la lipolyse du lait chez la VL

Essai « DGAT-1 x monotraite » : effets du polymorphisme K232A du gène *DGAT-1* sur la LS du lait de VL dans un contexte de variation de la fréquence de traite

Essai « supplément lipidique » : effets de concentrés riches en oméga 3 (lin, microalgues) sur la LS du lait

Essai « stade » : effet du stade de lactation/gestation sur les variations de la LS du lait de vache

Essai « alimentation » : étude des mécanismes biochimiques de la LS en fonction de la nature du fourrage distribué en association ou non avec une restriction alimentaire.

Une première partie de la discussion sera consacrée à la mise en perspective de l'impact des facteurs d'élevage sur la LS, une seconde partie sera dédiée à l'étude du système lipolytique et une troisième partie s'intéressera aux implications pratiques pour maîtriser le taux de LS dans les élevages.

I. Les facteurs d'élevage ont un effet sur la LS

A. La génétique intra race ou inter race semble définir le potentiel lipolytique des VL

1. Il existe deux phénotypes de susceptibilité à la LS

Comme déjà souligné par Heuchel et Chilliard (1988), l'effet individu est important dans l'explication de la variabilité de la LS. Dans les deux essais de la thèse menés sur une lactation complète (essai « système » et essai « stade »), nous avons pu identifier deux phénotypes concernant la susceptibilité des VL à la LS : « non susceptible » et « susceptible ». Nous avons défini la notion de susceptibilité à la LS comme la probabilité pour une VL de produire du lait avec un niveau « moyen » ou « élevé » de LS lors d'un prélèvement donné au cours de la lactation. Les VL « non susceptibles » présentaient des niveaux de LS inférieurs à 0,60 mEq / 100 g de MG sur l'ensemble des prélèvements de lait réalisés sur toute la lactation. Les VL « susceptibles » présentaient des niveaux de LS « moyens », c'est-à-dire entre 0,60 et 0,89 mEq / 100 g de MG et/ou « élevés », c'est-à-dire supérieurs à 0,89 mEq / 100 g de MG sur plus de 10 % des prélèvements de la lactation. Sur l'essai « système », les VL « non susceptibles » représentaient 16 VL sur les 66 suivies, soit 24 % du troupeau, et sur l'essai « stade », 16 VL sur les 29 VL suivies soit 55 % du troupeau. Le phénotypage des VL sur ce critère n'a été réalisé que sur les essais conduits sur lactation complète afin d'avoir un grand nombre de données. Le pourcentage de VL non susceptibles, plus important sur le troupeau de Méjusseaume, pourrait être expliqué par les choix de sélection dans ce troupeau (forte proportion de VL « AA » au locus de *DGAT-1*) ou par la stabilité des facteurs de variations qui n'ont pas permis aux VL « d'exprimer leur potentiel de LS » et donc d'être détectées comme susceptibles. Parmi les VL susceptibles, 10 à 80 % des prélèvements de lait présentaient une LS « moyenne » ou « élevée » sur l'ensemble de la lactation pour l'essai « système » et 10 à 70 % des prélèvements pour l'essai « stade ». Le fait que des animaux soumis à des variations environnementales importantes expriment un phénotype constant « non susceptible », et le fait que l'expression de ce phénotype soit répétable d'une lactation sur l'autre nous permet de penser à l'existence un déterminisme génétique de la susceptibilité à la LS (Heuchel et Chilliard, 1988).

2. Le déterminisme génétique de la LS

La susceptibilité à la LS varie selon la race des VL. Nous avons montré dans l'essai « système » que les VL de race Normande étaient moins susceptibles à la LS que les VL de race Holstein. Cet effet race avait déjà été démontré dans la littérature (Bachman et al., 1988 ; Ferlay et al., 2006). L'effet de la race pourrait être associé à des génotypes bien précis, propres à la race.

Le travail mené sur les variants du gène *DGAT-1* suggère que le génotype KK du gène *DGAT-1* serait associé à des niveaux de LS plus élevés que les génotypes KA et AA. L'action de *DGAT-1* sur la

LS pourrait être « directe » via les différences engendrées au niveau du système lipolytique ou « indirecte » via d'éventuels autres gènes polymorphiques, en déséquilibre de liaison avec *DGAT-1*. Si le rôle de *DGAT-1* était confirmé par une étude sur un plus grand effectif, la différence de fréquence de l'allèle K de *DGAT-1* au sein des VL Holstein et Normande (37 % vs 13 %) pourrait être l'un des éléments explicatifs de l'effet race (Gautier et al., 2007).

Un travail permettant de relier phénotype et génotype permettrait de valider ou d'invalider l'implication de *DGAT-1* et potentiellement d'identifier d'autres gènes polymorphiques gouvernant la susceptibilité à la LS. Le programme national PhénoFinLait qui visait à caractériser précisément la composition lipidique et protéique du lait et à identifier les leviers génétiques et alimentaires permettant de maîtriser cette composition, a fourni une large base de données qui pourrait être mise à profit dans le cas de l'étude de la LS. Cette base de données rassemble des données spectrales issues de l'analyse de laits, des données de génotypage de 8444 VL de race Holstein, Normande et Montbéliarde et des données sur l'alimentation des VL. L'utilisation des spectres stockés dans la base de données PhénoFinLait pour déterminer les valeurs de LS nécessite cependant la création d'une nouvelle équation MIR. En effet, les équations existantes sont bornées entre 0,4 et 1,2 mEq / 100 g de MG et leur précision est de 0,3 meq / 100 g de MG, ce qui n'est pas suffisamment précis pour faire le lien entre phénotype et génotype.

B. Chez les VL susceptibles, nous avons confirmé l'existence de plusieurs facteurs de variations de la LS

1. Importance du moment de la traite

Lorsque nous avons mesuré la LS dans les laits du matin et dans les laits du soir, avec un intervalle de traite 10 h/14 h, nous avons observé que la LS était plus importante dans les laits issus de la traite du soir que dans les laits issus de la traite du matin, confirmant ainsi les résultats de Jensen (1959), Murphy et al. (1979), Jellema (1975) et Arhné et Björck (1985) (intervalle de traite 10 h/14 h pour ces auteurs). Bachman et al. (1988), n'ayant pas observé de différence de LS entre les laits issus de la traite du soir et les laits issus de la traite du matin lors d'un intervalle de traite 12 h/12 h imputaient la différence mise en évidence par les auteurs précédents à l'intervalle de traite non identique entre les traites. La mise en place d'un essai, avec les VL des troupeaux actuels comprenant des intervalles de traite différents : 12 h/12 h, 10 h/14 h et 14 h/10 h permettrait de vérifier cette hypothèse. Dans nos essais, nous avons également montré que l'impact de certains facteurs de variations était différent selon le moment de la traite. En effet, l'effet de la parité dans l'essai « système » n'a été constaté que dans les laits issus de la traite du soir. Dans l'essai « alimentation », l'effet de la nature du fourrage n'a été constaté que dans les laits issus de la traite du matin. L'effet de la restriction alimentaire a été constaté uniquement dans les laits issus de la traite

du soir dans l'essai « système » et a été plus importante dans les laits issus de la traite du soir dans l'essai « alimentation ». L'effet du stade de lactation a été également plus important dans les laits issus de la traite du soir. Ces résultats suggèrent l'existence de mécanismes différents expliquant les variations de LS observées le matin et le soir dans ces laits (ou lors de leur synthèse).

2. La parité et le stade physiologique : des facteurs intrinsèques à l'animal qui modulent les niveaux de LS.

Chez les VL susceptibles, dans les essais « système » et « stade », l'augmentation de la LS en fin de lactation/gestation a été systématique après 9 à 10 mois de lactation. Cela confirme les observations de plusieurs auteurs (Chazal et Chilliard, 1986 ; Arhné et Bjork, 1985 ; Bachman et al., 1988 ; Jurczak, 1995). Dans les élevages, l'effet du stade de lactation est difficilement dissociable du stade de gestation et de la diminution de la PL. Il est donc difficile d'imputer l'augmentation de la LS à l'un ou l'autre de ces facteurs ou à plusieurs d'entre eux. Cependant, dans l'essai « stade » dans lequel la PL était presque constante sur la lactation, nous avons observé une augmentation de la LS à partir du 9ème mois de lactation. Une évaluation de la LS sur une lactation plus longue aurait été intéressante. Ce résultat nous permet donc d'émettre l'hypothèse que l'augmentation de la LS en fin de lactation est un effet lié au stade physiologique de l'animal plutôt qu'un effet dû à la chute de PL mais nos données ne permettent pas de dissocier clairement l'effet du stade de lactation et du stade de gestation. D'après les travaux de Chazal et Chilliard (1986), le stade de gestation est le principal responsable de l'augmentation de la LS en fin de lactation. Les hormones de gestation pourraient être reliées à cette augmentation de la LS (Jurczak, 1995). Une évaluation du statut hormonal de l'animal au cours de la lactation/gestation aurait été intéressante dans la compréhension des mécanismes sous-jacents. L'étude de lactations longues (18 mois) serait également intéressante.

Dans l'essai « système », nous avons constaté une augmentation de la LS en début de lactation pour les VL de race Holstein appartenant au lot à bas niveau d'apport alimentaire. Cette augmentation n'a pas été relevée dans les autres lots de l'essai « système », ni dans l'essai « stade ». La sensibilité du début de lactation n'avait pas encore été mise en évidence dans la littérature. L'augmentation du potentiel de PL, surtout chez les races productives du type Holstein, pourrait être à l'origine de cette augmentation de sensibilité du début de lactation, aux alentours du pic de production. En effet, la priorisation de la fonction de lactation lors de l'allocation de l'énergie chez ces VL peut conduire à un bilan énergétique négatif qui favoriserait la LS, surtout dans le cas d'une alimentation restreinte (McNamara et al., 1987 ; Berry et al., 2008 ; Delaby et al., 2009). Ces résultats montrent donc que le début de lactation semble être également une période critique pour la LS car il peut être associé à des déficits énergétiques importants chez les VL à haut potentiel. Cet effet a été plus marqué chez les VL multipares (+ 0,20 mEq / 100 g de MG en moyenne) à cause d'une PL plus

importante et donc d'un déficit énergétique accentué chez ces VL (McNamara et al., 1987 ; Berry et al., 2008 ; Delaby et al., 2009).

En milieu et fin de lactation, les multipares de l'essai « système » ont été moins sensibles à la LS que les primipares (- 0,17 mEq / 100 g de MG en moyenne), ce qui est en accord avec les observations de Connolly (1978) et Chilliard et Lamberet (1984). Dans l'essai « stade », aucun effet de la parité sur la LS n'a été observé.

3. La LS est modulée par des facteurs d'élevage (fréquence de traite, alimentation) et des facteurs environnementaux (saison)

La fréquence de traite. Dans l'essai « DGAT-1 x monotraite », conduit en milieu de lactation sur des VL Holstein x Normande, nous avons montré qu'une réduction de la fréquence de traite diminuait les niveaux de LS pour toutes les VL de l'essai, qu'elles soient susceptibles ou non à la LS. Cette observation est en accord avec Pomiès et al. (2007) et Dutreuil et al. (2016) qui relevaient également une diminution moyenne de la LS en monotraite. Au contraire, l'augmentation de la fréquence de traite (x 3/j à x 4/j) serait associée à une augmentation de la LS (Wiking et al., 2006). La fréquence de traite module les enzymes impliquées dans la synthèse du lait, telles que la LPL, ce qui expliquerait les différences observées. La fréquence de traite a un impact important sur les VL « susceptibles » à la LS puisque la monotraite entraîne une diminution des niveaux de LS pour l'ensemble de ces VL.

L'alimentation. Dans la thèse, le volet alimentation a été envisagé sous différents aspects : nature du fourrage, restriction alimentaire, et supplémentation en concentrés lipidiques.

- Nous avons montré dans l'essai « alimentation » que l'ensilage de maïs était associé à des niveaux de LS plus élevés comparé à l'herbe conservée, dans les laits issus de la traite du matin. Ces résultats ne sont pas en accord avec Ferlay et al. (2006) qui observaient une LS plus faible chez des VL nourries à base d'ensilage de maïs comparé à des VL nourries à base d'herbe conservée. Cette différence pourrait peut-être s'expliquer par la race de VL utilisée. En effet, nous avons des VL Holstein alors que Ferlay et al. (2006) avaient des VL Montbéliarde et Tarentaise et avaient mis en évidence l'existence d'une interaction entre la race et la nature du fourrage sur la LS.

- Nous avons confirmé que le pâturage en début et milieu de lactation était associé à des niveaux de LS faibles, en accord avec Kuzdzal-Savoie et al. (1975), Deeth et Fitzgerald (1976) et Chazal et al. (1987).

- Nous avons montré que la restriction alimentaire (-20 % à -25 % de l'ingéré) entraînait une augmentation de la LS, quel que soit le stade de lactation, dans les essais « système » et « alimentation ». Les enquêtes en élevage ont confirmé ce résultat. Ceci est en accord avec la littérature (Stobbs et al., 1973 ; Jellema et al., 1975 ; Deeth et Fitzgerald, 1976 ; Connolly, 1978 ;

Chilliard, 1986 ; O'Brien, 1996). Selon ces auteurs, les effets étaient surtout marqués en fin de lactation. Dans nos essais, l'augmentation de la LS a été plus importante dans les laits de la traite du soir et son amplitude a varié selon le fourrage distribué. En effet, dans l'essai « alimentation », l'effet de la restriction alimentaire avait tendance à être plus important lorsque les VL étaient alimentées à base d'herbe conservée. Dans l'essai « système », il n'y a pas eu d'effet de la restriction alimentaire au pâturage (Ø concentrés vs 4 kg/j concentrés). Ceci est en accord avec les observations de Thomson et al. (2005) qui n'observaient pas d'incidence sur la LS d'une réduction de 38 % d'accès à la pâture mais qui observaient une augmentation de la LS après une réduction plus drastique de l'accès à la pâture (-63 %). L'herbe fraîche, qui semble être un fourrage associé à des niveaux de LS bas, pourrait également entraîner une tolérance plus importante en termes de LS lors d'une réduction des apports alimentaires.

- Nous avons mis en évidence que les suppléments lipidiques ont eu un effet variable sur la LS. Cet effet semble dépendre de l'impact de ces suppléments lipidiques sur le fonctionnement ruminal. En effet, la supplémentation en lin extrudé à 2,5 % de la MSI a eu un effet préventif sur les niveaux de LS mesurés au niveau du tank et du beurre (données non présentées). Ces résultats ne sont pas en accord avec les observations de Hurtaud et al. (2010) qui constataient une augmentation de la LS individuelle lors d'une supplémentation avec du lin extrudé. Ces différences pourraient s'expliquer par un équilibre fermentaire du rumen plus fragile chez les VL utilisées par Hurtaud et al. (2010). En effet, dans cet essai, la supplémentation lipidique a entraîné des déviations fermentaires, la production d'AG intermédiaires de biohydrogénation et une diminution de la synthèse de matière grasse par la glande mammaire, ce qui n'a pas été le cas dans notre essai avec la supplémentation en lin extrudé. La supplémentation en microalgues a également entraîné d'importantes modifications ruminales, plus marquées que dans Hurtaud et al. (2010). Ces modifications ruminales seraient responsables de l'inhibition de la synthèse de novo et donc des synthèses incomplètes de la matière grasse du lait (triglycérides, phospholipides), et donc d'une plus grande sensibilité des globules gras à la LS.

La saison. L'enquête en élevage nous a permis de mettre en évidence des niveaux de lipolyse plus élevés en été. Ce constat est également fait par l'interprofession laitière (Le Guénic et al., 2008 ; CNIEL ; Philippe Roussel, communication personnelle). Or, les effets de la saison sont multiples (température, photopériode, hygrométrie...) et indissociables. L'augmentation de la LS étant surtout décrite les mois de juin, juillet, août, l'effet de la variation de température apparaît plus probable que celle de la photopériode qui augmente de janvier à juin et diminue de juillet à décembre. Un essai permettant de valider cette hypothèse pourrait être mis en place pour mieux caractériser les effets de la température et de la photopériode sur les variations de la LS.

II. Les mécanismes biochimiques de la LS

Une partie de la thèse a été dédiée à la compréhension des mécanismes biochimique de la LS. Cartier et Chilliard (1990) et Sundheim et Bengtsson-Olivecrona (1987b) avaient décrit le système lipolytique d'une façon globale. Selon eux, trois facteurs biochimiques déterminaient la sensibilité d'un lait à la LS : 1) L'activité lipasique à la surface des globules gras, 2) L'intégrité des globules gras, et 3) L'équilibre entre facteurs activateurs et facteurs inhibiteurs de la LPL. L'ensemble de ces paramètres seraient modulés directement ou indirectement par l'animal, les facteurs d'élevage et les facteurs environnementaux. Dans la thèse, la priorité a été donnée à l'identification de nouveaux cofacteurs protéiques de la LS et sur l'évaluation de l'intégrité des globules gras.

L'essai « alimentation » nous a permis d'explorer les mécanismes de la LS dans le cas d'une restriction alimentaire, d'un changement de nature de fourrage et selon le moment de la traite. Dans cet essai, nous avons mesuré une partie des indicateurs du système lipolytique dans le lait soit la taille des globules gras, l'activité lipasique dans le lait total, et le profil en protéines des laits dans le but d'identifier des cofacteurs de la LPL. Notre travail a apporté quelques informations nouvelles sur les mécanismes explicatifs des variations de la LS. Cependant, il demeure beaucoup d'inconnues. En lien avec les systèmes d'élevage, nous allons discuter de l'impact des trois déterminants majeurs de la LS et de la membrane des globules gras, identifiée au cours de la thèse comme potentiellement importante dans l'équilibre du système lipolytique.

A. L'activité lipasique : une importante variable dans l'explication de la LS selon les facteurs d'élevage ?

L'activité lipasique dans le lait total n'a pas varié selon la nature du fourrage, ni avec la restriction alimentaire, ni selon le moment de la traite. Ces résultats sont en accord avec Arhné et Björck (1985) et Ferlay et al. (2006) qui n'avaient pas observé de variations de l'activité lipasique dans le lait total avec ces mêmes facteurs. L'activité lipasique dans le lait total n'expliquerait donc pas les variations de LS observées dans le cas de modifications de l'alimentation (nature du fourrage, restriction alimentaire) et du moment de la traite.

En revanche, dans la littérature, les hypothèses explicatives des variations de LS en relation avec la modulation de la fréquence de traite et la race impliquent la LPL. En effet, Pomiès et al. (2007) et Rémond et Pomiès (2005) ont décrit une diminution de l'activité lipasique dans le lait total de 27 % consécutivement à la réduction de la fréquence de traite (monotraite vs bitraite). Boutinaud et al. (2013) et Littlejohn et al. (2010) ont montré une diminution du nombre de transcrits pour le gène de la LPL également lors de la réduction de la fréquence de traite. Ferlay et al. (2006) ont également relevé des variations d'activité lipasique selon la race lors d'une alimentation à base de

fourrages conservés. L'activité lipasique dans le lait totale pourrait expliquer des variations de la LS en relation avec la race ou la génétique des VL. Les mesures d'activité lipasique en fonction du stade de lactation/gestation sont contradictoires dans la littérature (Hileman et Courtney, 1935 ; Murphy et al., 1979) et nous n'avons pas trouvé d'études concernant les variations de l'activité lipasique selon la parité.

L'activité lipasique mesurée dans le lait total pourrait expliquer les variations de LS en lien avec certains facteurs. Néanmoins, il semble que l'activité lipasique dans la fraction grasse du lait serait un meilleur indicateur de LS (Chilliard et Cartier, 1990 ; Sundheim et Bengtsson-Olivecrona, 1987b). A titre d'exemple, Arhné et Björck (1985) ont mis en évidence des variations d'activité lipasique dans la fraction grasse du lait selon le moment de la traite. Par la suite, il pourrait donc être intéressant d'évaluer l'activité lipasique dans le lait total et dans la fraction grasse pour l'ensemble des facteurs étudiés. Cette double mesure nous renseignerait également sur le pourcentage d'activité lipasique à la surface des globules gras relativement au lait total.

Un travail sur les déterminants de la migration de la LPL depuis les micelles de caséines jusqu'aux globules gras sous l'effet du refroidissement, permettrait de comprendre les variations du pourcentage d'activité lipasique mesuré à la surface des globules gras. L'affinité de la LPL avec la membrane des globules gras pourrait dépendre de sa composition. L'évaluation de la composition protéique, lipidique et glucidique de la membrane des globules gras serait pertinente dans ce contexte.

B. L'intégrité des globules gras, un indicateur difficile à évaluer.

Dans la littérature, il n'existe pas de méthode consensuelle pour évaluer l'intégrité des globules gras. Evers (2004) a donc proposé une revue sur les méthodes existantes. Parmi ces méthodes, la mesure de la taille des globules gras, par spectrométrie laser a été décrite. Elle n'est pas reconnue comme une mesure absolue attestant de l'intégrité des globules gras. Elle permet d'évaluer l'évolution de l'intégrité des globules gras d'un même lait suite à certains traitements mécaniques ou thermiques. En effet, une perte d'intégrité du globule gras est accompagnée d'une variation de sa taille (Michalski et al., 2002 ; Evers, 2004). Plusieurs auteurs ont donc émis l'hypothèse que l'intégrité des globules gras pourrait dépendre de leur taille, les globules gras les plus gros étant les plus fragiles (Wiking et al., 2006).

Dans la thèse, nous avons utilisé la mesure de la taille des globules gras pour appuyer deux hypothèses :

- il existe une relation entre la LS et la taille des globules gras car il y a un lien entre la taille des globules gras et l'intégrité des globules gras.

- le refroidissement du lait entraîne des modifications au niveau des globules gras (perte d'intégrité) qui peuvent être évaluées par mesure de la différence de leur taille avant et après refroidissement du lait.

Une évaluation systématique de la taille des globules gras a donc été réalisée pour l'ensemble des essais de la thèse. La taille des globules gras du lait ne semble pas être un facteur explicatif de la sensibilité des vaches à la LS. En effet, dans l'essai « alimentation », nous avons observé une faible corrélation négative ($R^2 = 0,23$) entre la LS et la taille des globules gras au sein des VL susceptibles à la LS, alimentées avec de l'ensilage de maïs. Cependant, nous n'avons pas retrouvé cette corrélation pour le lot alimenté à l'ensilage de maïs en début de lactation dans l'essai du Pin-au-Haras, ni les VL suivies tout au long de la lactation dans l'essai « stade ». La taille des globules gras semble être un indicateur trop peu précis de l'intégrité des globules gras. La faible corrélation obtenue entre la taille des globules gras et la LS dans l'essai « alimentation » pourrait être une conséquence des variations de la composition de la membrane des globules gras. En effet, Lopez et al. (2010) et Lu et al. (2016) ont montré que la membrane des globules gras pouvait varier en fonction de la taille des globules gras et lors de restriction alimentaire.

La mesure de la taille des globules gras avant et après refroidissement dans l'essai « Système » n'a pas permis non plus d'établir de corrélation avec la LS (données non publiées).

Nous avons donc essayé de mesurer l'intégrité des globules gras par une autre technique : la microscopie confocale via une méthode colorimétrique et un processus de comptage (Evers, 2004 ; Lopez et al., 2011). Cependant, cette technique est très fastidieuse et la représentativité de l'échantillon peut poser problème car les mesures sont faites sur très peu de globules gras (environ cinquante).

En définitive, la technique qui paraît la plus adaptée à la mesure de l'intégrité des globules gras serait la mesure du potentiel de matière grasse lipolysable du lait par dosage des AGL après ajout de LPL et d'activateurs de LPL dans le lait (Evers, 2004). En effet, cette mesure permettrait de connaître de façon indirecte la quantité de triglycérides accessible à la LPL, qui refléterait l'intégrité des globules gras.

C. Equilibre entre les cofacteurs de la LPL

L'équilibre entre activateurs et inhibiteurs de la LS est supposé jouer un rôle important dans l'explication de la variabilité de la LS (Chilliard et Cartier, 1990 ; Sundheim et Bengtsson-Olivecrona 1987b).

Dans les laits du soir de l'essai « alimentation », nous avons mis en évidence une corrélation négative entre le logarithme du pourcentage de PP5 et la LS pour 12 VL représentatives de l'ensemble des lots. Le PP5 aurait donc un rôle inhibiteur de la LS ce qui confirme les conclusions

d'Anderson (1981) mais n'est pas en accord avec celles de Chilliard (1986). Des ajouts dosés de PP5 dans le lait permettraient de confirmer cette hypothèse. Aucune autre corrélation n'a été mise en évidence entre la LS et les autres protéines ou fragments protéiques détectés par LC-MS-MS. Ces résultats mériteraient d'être consolidés sur un nombre plus important d'échantillons. Le lait des VL nourries à base d'herbe conservée contenait un pourcentage de PP5 plus élevé que le lait des VL nourries à base d'ensilage de maïs : cela pourrait expliquer un niveau de LS moins important obtenu avec l'herbe conservée comparativement à l'ensilage de maïs. L'alimentation de la VL entraînerait donc des modifications de l'équilibre entre les cofacteurs de la LPL.

Dans la littérature, d'autres facteurs d'élevage semblent également moduler l'équilibre entre les cofacteurs de la LPL. En effet, l'ouverture des jonctions serrées qui a lieu avec la progression de la gestation et en fin de lactation suite à l'action de différentes hormones (Nguyen et al., 2001) pourrait entraîner un échange entre le lait et le sang favorisant le passage de molécules telles que la BSA ou des apolipoprotéines lipases, susceptibles d'activer le système lipolytique. Le pourcentage de certains fragments peptidiques impliqués dans la régulation de la LS pourrait dépendre, en partie, de la génétique de la VL. En effet, le programme PhénoFinLait a permis de faire le lien entre la génétique des VL, impliquant plusieurs Quantitative Trait Loci, et le profil protéique des laits (protéines majeures, α -lactalbumine, β -lactoglobuline) (Boichard et al., 2014). Nous n'avons pas trouvé d'études permettant de faire le lien entre la fréquence de traite, le moment de la traite et l'équilibre entre les cofacteurs de la LPL.

La détermination des activateurs et inhibiteurs protéiques de la LPL a été réalisée par LC-MS-MS sur douze d'échantillons et a permis l'identification de PP5 comme potentiel inhibiteur de la LS. Cette technique est longue et fastidieuse et la limite de détection de cette méthode ne permet pas d'identifier l'ensemble des peptides du lait (ex : PP3). D'autres techniques de protéomique permettraient d'avoir un plus haut débit et d'identifier ces fragments peptidiques. Enfin, le PP5 étant un produit de la protéolyse des caséines β par la plasmine (Pâquet, 1989), il pourrait y avoir un antagonisme entre la diminution de la LS et la préservation du potentiel coagulant du lait. Cet antagonisme éventuel entre potentiel de coagulation et réduction du risque de LS mériterait d'être approfondi. En pratique, un taux de protéolyse plus élevé pourrait être accepté dans le cas de transformation beurrière et de consommation de lait boisson mais moins facilement dans le cas de transformation fromagère.

D. La membrane, déterminante de l'intégrité des globules gras et de l'interaction avec la lipoprotéine lipase

Dans plusieurs essais de la thèse (*DGAT-1* x monotraite ; système ; alimentation ; suppléments lipidiques), des hypothèses fortes ont été émises concernant le rôle de la membrane

des globules gras dans le maintien de leur intégrité, dans les interactions avec la LPL et dans l'équilibre entre activateurs et inhibiteurs de la LPL. En effet, plusieurs travaux ont relié les variations de la LS à des modifications de la composition de la membrane des globules gras, considérée de ce fait comme un élément majeur du système lipolytique. En effet, la composition de la membrane des globules gras est affectée par plusieurs facteurs de variation de la LS :

- La proportion relative des phospholipides au sein de la membrane des globules gras varie en fonction du génotype de *DGAT-1*, le génotype KK étant associé à une proportion de sphingomyéline inférieure et une proportion de phosphatidylcholine et phosphatidylsérine supérieure par rapport aux génotypes KA et AA (Argov-argaman et al., 2013). La composition de la membrane des globules gras serait également différente selon la race de VL, les globules gras des VL Holstein seraient plus riches en sphingomyéline que les globules gras des VL Jersiaise (Graves et al., 2007).

- La teneur en sphingomyéline de la membrane des globules gras augmente au cours de la lactation (Graves et al., 2007).

- La teneur en différents phospholipides des membranes cellulaires est modifiée chez l'Homme en fonction des rythmes circadiens (Ruf et Arnold, 2015). Cette modification liée aux rythmes circadiens pourrait également exister chez la VL et expliquer les variations observées selon le moment de la traite.

- La teneur en cholestérol et en stomatine de la membrane des globules gras est inférieure chez les VL dont le bilan énergétique est négatif (Lu et al., 2013 ; Lopez et al., 2010).

- La teneur en sphingomyéline et en lipides polaires est plus élevée lorsque les VL sont nourries à l'herbe et/ou avec du lin extrudé (Lopez et al., 2008 et 2014).

Les modifications de la composition de la membrane des globules gras peuvent dépendre de la race/génétique, du stade de lactation, du moment de la traite et de l'alimentation (nature du fourrage, restriction énergétique). Nous n'avons pas trouvé d'information sur le lien entre parité, fréquence de traite et composition de la membrane des globules gras.

Les variations de la composition lipidique et protéique de la membrane des globules gras jouent un rôle dans sa fluidité, sa plasticité et sa déformabilité (Nicolas, 1992). Ces propriétés physiques pourraient influencer l'intégrité du globule gras, les interactions avec la lipoprotéine lipase, la réponse à la réfrigération et donc la réponse à la LS. De plus, la membrane des globules gras contient un inhibiteur de la LS : le PP3 (Anderson, 1981; Sundheim et Bengtsson-Olivecrona 1987 a et b), jouant ainsi un rôle dans l'équilibre activateur/inhibiteur de la LS. Une approche métabolomique pourrait permettre d'identifier l'ensemble des composants de la membrane des globules gras et les mettre en relation avec la LS.

La réponse de la membrane des globules gras au refroidissement serait également un paramètre important à étudier pour expliquer la LS. En effet, l'absorption et la désorption des composants lipidiques et protéiques par la membrane, consécutivement au refroidissement, pourraient influencer l'intégrité des globules gras (Dickow et al., 2011). Ce phénomène est variable selon les VL (Dickow et al., 2011) et pourrait entraîner des susceptibilités différentes à la LS. Une évaluation de la composition lipidique et protéique de la membrane des globules gras avant et après refroidissement serait pertinente.

III. Implications pratiques des résultats de la thèse pour maîtriser les taux de LS dans la filière laitière.

En élevage, la mesure de la lipolyse ne permet pas de dissocier la LS, qui dépend de l'animal et des facteurs d'élevage, de la lipolyse induite, qui est consécutive des chocs mécaniques et thermiques qui ont lieu pendant la traite et le stockage du lait, et d'éventuellement la lipolyse microbienne. C'est donc le « couple » LS - lipolyse induite qui doit être pris en compte, lorsque le troupeau ne présente pas de soucis sanitaire. La part de la LS et de la lipolyse induite est variable selon les élevages et dépend du niveau de LS, des installations de traite et de stockage du lait qui vont engendrer la lipolyse induite (Chilliard et Lamberet, 1984) et de « l'interaction » entre la LS et lipolyse induite.

Dans les exploitations où la lipolyse pose problème, la première étape serait de déterminer l'impact de la LS relativement à la lipolyse totale. Selon les résultats de LS individuelle, l'attention se porterait sur les facteurs relatifs à la LS, ou sur l'équipement de traite et de stockage, ou sur l'ensemble des deux. Concernant la LS, l'éleveur peut maîtriser plusieurs facteurs de variations : choix de la race, gestion de la reproduction, de l'alimentation, de la fréquence de traite. Ces choix sont bien sûr en lien avec une réflexion plus globale concernant le système d'élevage et les leviers à actionner peuvent être différents selon les systèmes de production. Nous allons envisager les principaux systèmes d'exploitation laitiers en essayant d'identifier les risques et les leviers possibles en relation avec la LS. L'institut de l'élevage et le CNIEL (Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière), publient, tous les trois ans, grâce au réseau Inosys, un observatoire de l'alimentation des VL. Les systèmes décrits ci-après correspondent aux systèmes majeurs identifiés dans ce document.

A. L'évaluation de la lipolyse individuelle en élevage demanderait des adaptations des acteurs de la filière

Pour l'instant, l'évaluation de la susceptibilité de chaque VL à la LS, ne peut se faire que par dosage des acides gras libres présents dans le lait, à différents moments de la lactation, par la

méthode des savons de cuivre ou par MIR. C'est pourquoi il serait intéressant que les organismes de contrôle de performance évaluent la lipolyse des laits au même titre que les autres paramètres laitiers. Cela permettrait, d'une part, de détecter les VL à problèmes et d'autre part, d'enrichir la base nationale de données génétiques qui met en lien les caractéristiques des troupeaux et la génétique des VL, pour éventuellement indexer les VL et les sélectionner sur ce critère.

Par la suite, d'autres approches pourraient éventuellement identifier les VL susceptibles à la LS :

- L'acquisition de connaissances plus complètes sur la biochimie de la LS pourrait donner lieu à la caractérisation de biomarqueurs de la LS présents dans le lait par des méthodes à haut débit (métabolomique, protéomique). L'existence de tels bio-indicateurs pourrait donner lieu à la mise en place d'outils facilement utilisables en élevage tels que des bandelettes de test immunochromatographique à tremper dans le lait. Le fonctionnement de ces bandelettes reposerait sur la détection du/des biomarqueurs via des anticorps monoclonaux.

- L'éventuelle identification de gènes polymorphiques responsables du déterminisme de la LS pourrait permettre une intégration de ces nouvelles données aux outils de génotypage des VL et des génisses déjà disponibles pour les éleveurs. Les éleveurs utilisant cette technologie auraient un aperçu du potentiel lipolytique de leur troupeau et la possibilité d'un choix des génisses de renouvellement en fonction de ce critère.

B. La LS en élevage, des solutions diverses selon les systèmes d'élevage

1. Les points communs

Pour l'ensemble des systèmes d'élevage, des analyses individuelles de LS ou l'existence d'index génétique sur ce critère, pourraient permettre une meilleure gestion du renouvellement du troupeau et le remplacement des VL dont la LS est systématiquement élevée. En cas de traite robotisée, une attention particulière doit être portée sur la fréquence de traite. Le robot de traite doit être réglé pour que le nombre de traites par jour ne soit pas supérieur à deux (Klei et al., 1997 ; Wiking et al., 2006) et pour que l'intervalle entre traite ne soit pas inférieur à 8 h. En fin de lactation, il pourrait être conseillé de tarir plus précocement les VL identifiées comme susceptibles pour éviter l'augmentation de LS. Plusieurs autres solutions, dont l'efficacité n'a pas été testée, peuvent être proposées pour gérer la fin de lactation, comme le 1) le passage des VL en monotraite, si les pénalités sur la lipolyse sont supérieures à la perte monétaire due à la baisse de PL dans le cas de vente du lait à une laiterie, ou si les niveaux de lipolyse entraînent des défauts de goût caractéristiques dans le cas de transformation à la ferme ou 2) le pâturage si le système et la saison le permettent. Ces recommandations sont valables pour tout type d'élevage. Nous allons voir les recommandations spécifiques à chaque système d'élevage dans les paragraphes ci-après.

2. Les particularités

Dans les élevages de plaine spécialisés ou de polyculture élevage associés à des rations à part variable d'ensilage de maïs et d'herbe conservée et incluant une part, plus ou moins importante, d'herbe au printemps et en été, la traite est souvent biquotidienne, les VL sont majoritairement des Holstein mais les Normande et les Montbéliarde sont aussi représentées. Ces systèmes représentent 33,4 % des exploitations laitières et 38 % du volume de lait produit. Lorsque la lipolyse du lait est trop élevée dans ces élevages, l'intégration d'une part plus importante de VL Normande et/ou une augmentation de la part du pâturage permettraient de réduire la présence de LS. Mais dans ces systèmes la part du pâturage tend à diminuer et la population de vaches Normande est plutôt en réduction. Le choix d'animaux à faible taux de LS est donc une voie de progrès potentiel.

Dans les élevages laitiers de montagne et de piémonts ou de plaine, qui reposent sur une alimentation essentiellement herbagère (herbe pâturée, foin, ensilage d'herbe), la traite est majoritairement biquotidienne et les VL présentes dans ces types d'exploitation sont des Montbéliarde principalement (60 %), sinon des VL de races locales, et des VL Holstein. Ces élevages représentent 16 % des exploitations françaises et 11 % du volume de lait. La « susceptibilité » à la LS des vaches Montbéliarde actuelles n'est pas connue, ni celle des races plus locales. Cependant, les systèmes basés sur l'herbe sont moins susceptibles à la LS. Il faudra veiller à satisfaire les besoins énergétiques des VL, surtout dans le cas des Holstein à haut potentiel.

Dans les systèmes intensifs associés à une alimentation à base d'ensilage de maïs/concentrés et à une traite au roto ou au robot 2 à 3 fois / j, les VL sont bien souvent des VL Holstein à haut potentiel laitier. Ces systèmes semblent cumuler de nombreux facteurs de risque concernant les LS : fréquence de traite supérieure à 2 fois / j, race Holstein, maximisation du potentiel de la VL, et dans une moindre mesure, utilisation d'ensilage de maïs comme fourrage principal. Dans ce type d'élevage, il est important de veiller à couvrir les besoins énergétiques et protéiques des VL surtout en début de lactation pour éviter la LS. Les vêlages sont souvent étalés dans ces systèmes ce qui minimise l'effet « fin de lactation ». Le choix de VL « non susceptibles » paraît être d'importance majeure dans ce type de système. C'est sans doute dans ce type d'élevage que la sélection de VL non-susceptibles aurait le plus d'intérêt. En France, de tels systèmes sont peu présents sur le territoire.

C. De meilleures connaissances sur les laits de mélange pour une meilleure compréhension des mécanismes à l'échelle du tank.

Les réponses individuelles des VL aux facteurs de variation de la LS ont été abordées et permettent de donner le plus souvent des conseils à l'échelle du troupeau et à l'échelle individuelle

dans le meilleur des cas. Cependant très peu de travaux se sont intéressés aux évolutions des laits de mélange dans le tank. En effet, dans le tank, il se crée un équilibre entre l'ensemble des laits des VL du troupeau, sur plusieurs traites et plusieurs jours consécutifs. Il y a donc un mélange de laits plus ou moins sensibles à la lipolyse. D'un point de vue biochimique, les causes de sensibilité peuvent être différentes selon les laits : défaut d'intégrité du globule gras, activité lipasique élevée dans la fraction grasse, présence d'activateurs de la LPL. L'équilibre qui se crée entre l'ensemble de ces composants n'est, en l'état des connaissances actuelles, pas prédictible (Chilliard, 1982 ; Deeth, 2006). Autrement dit, l'impact d'un (ou plusieurs) lait sensible à la LS dans un mélange de laits n'est pas connu. Au sein d'un même troupeau, les facteurs d'élevage (fréquence de traite ou alimentation) sont généralement constants. Cependant, la variabilité des facteurs intrinsèques au sein d'un troupeau tels que la génétique, la parité, le stade de lactation, pouvant, par exemple, engendrer des bilans alimentaires différents, entraîne la production de laits aux caractéristiques biochimiques différentes, complexifiant les équilibres qui se créent dans le tank. Il est alors difficile dans l'état des connaissances actuelles de proposer une gestion individualisée des VL susceptibles à la lipolyse en fonction de l'équilibre des composants de leur lait relativement aux composants des laits des autres VL du troupeau. Des travaux devront être menés en ce sens pour faciliter la gestion individuelle des VL des troupeaux.

Conclusion générale

Cette thèse a permis de confirmer l'effet, sur la lipolyse spontanée, de plusieurs facteurs en lien avec l'animal et les systèmes d'élevage et d'apporter des éléments de compréhension au niveau du fonctionnement du système lipolytique.

Les vaches laitières ont pu être classées en deux groupes selon leur phénotype: « susceptible » et « non susceptible » à la lipolyse spontanée, confirmant l'importance de l'effet individu. La race/génétique, le stade physiologique, la parité, le moment de la traite, la fréquence de traite et l'alimentation ont eu un effet sur la lipolyse spontanée chez les vaches « susceptibles ». L'effet de la saison / du climat n'a pas été étudié dans la thèse mais on peut supposer que ce facteur a un effet sur la lipolyse spontanée d'après les constats de l'Interprofession laitière. En effet, une augmentation de la lipolyse a été observée l'été dans les élevages, mais les causes de cette augmentation ne sont pas connues et sont probablement multi-factorielles (alimentation, variations climatiques...). L'effet saison englobe plusieurs facteurs, notamment la température et la photopériode. Il serait intéressant de tester leur impact sur les variations de la lipolyse spontanée. Dans la thèse, l'étude du déterminisme génétique de la lipolyse spontanée a été approchée via la relation avec les génotypes de *DGAT-1*. Mais ce facteur « génétique » a été étudié sur un faible nombre d'animaux. Un travail de plus grande ampleur permettant de relier phénotype et génotype permettrait de valider ou d'invalider l'implication de *DGAT-1* et potentiellement d'identifier d'autres gènes polymorphiques gouvernant la susceptibilité à la lipolyse spontanée. Les résultats de ce travail pourraient éventuellement être intégrés aux outils de génotypage des vaches laitières et des génisses, donnant ainsi aux éleveurs utilisant cette technologie un aperçu du potentiel lipolytique de leur troupeau et la possibilité d'un choix des génisses de renouvellement en fonction de ce critère. L'interaction entre le génotype des VL et les facteurs d'élevage (fréquence de traite, alimentation) serait également pertinent à évaluer. Enfin, une hiérarchisation plus globale de l'impact de l'ensemble ou d'une partie des facteurs de variation de la lipolyse spontanée pourrait être réalisée pour améliorer le conseil en élevage.

Les mécanismes biochimiques de la lipolyse spontanée ont été étudiés dans le cadre d'une variation de la nature du fourrage et d'une restriction alimentaire et en fonction du moment de la traite (matin, soir). Les mesures d'activité lipasique dans le lait total, du profil protéique du lait, de la taille des globules gras et d'indicateurs de l'équilibre énergétique (AGNE, BHBA, C18:1 / C18:0) ont permis de conclure que l'activité lipasique dans le lait total n'expliquait pas les variations de la lipolyse spontanée et que la protéose peptone 5 aurait un rôle d'inhibiteur de la lipolyse spontanée. Enfin, les résultats de la thèse permettent de penser que la membrane des globules gras a un rôle central dans le phénomène de lipolyse spontanée car elle pourrait intervenir au niveau des trois déterminants majeurs de la lipolyse spontanée : activité lipasique au niveau de la fraction grasse, intégrité du globule gras et équilibre entre les cofacteurs. L'identification des cofacteurs protéiques de la

lipoprotéine lipase dans le lait par des mesures de protéomique, plus précises et à plus haut débit permettrait une meilleure compréhension des équilibres entre activateurs et inhibiteurs de la lipoprotéine lipase. Le lien entre le bilan énergétique de l'animal et le lait pourrait également être étudié par dosage et mise en relation de l'ensemble des métabolites du lait et du sang (métabolomique). Des mesures simultanées de l'activité lipasique dans la fraction grasse, du potentiel de matière grasse lipolysable, témoin de l'intégrité des globules gras, de la composition de la membrane des globules gras et des cofacteurs de la lipoprotéine lipase pourraient permettre une hiérarchisation de l'impact des déterminants de la lipolyse spontanée. Un projet pluri-partenaires a été déposé à l'ANR pour approfondir les connaissances sur les mécanismes biochimiques régissant la lipolyse spontanée. L'étude mécanistique des équilibres se créant lors des mélanges de lait à sensibilités variables à la lipolyse spontanée permettrait une meilleure compréhension des niveaux de lipolyse spontanée mesurée dans le tank à lait en fonction des laits individuels.

La thèse a porté uniquement sur les facteurs de variation de la lipolyse spontanée. Or en élevage, la lipolyse spontanée, en lien avec l'animal et les systèmes d'élevage n'est pas dissociable de la lipolyse induite, en lien avec le système de traite et le stockage du lait. Les facteurs de variation de la lipolyse induite sont abordés dans un projet porté par l'Institut de l'élevage et leur étude est également prévue dans le projet soumis à l'ANR. La part de la lipolyse spontanée dans la lipolyse totale est certainement très variable, et elle dépend de l'ensemble des facteurs impliqués dans la lipolyse spontanée et dans la lipolyse induite mais elle serait intéressante à définir dans plusieurs cas- types. L'étude des mécanismes biochimiques en lien avec la lipolyse induite est également prévue dans le cadre du projet déposé à l'ANR. Un focus est prévu sur la mesure de l'intégrité des globules gras et sur la distribution de la lipoprotéine lipase dans le lait. En effet, les chocs mécaniques et thermiques pourraient entraîner une perte d'intégrité des globules gras accrue et une modification de la répartition de la lipoprotéine lipase.

Ma thèse a permis de faire le point en 2016 sur les facteurs de variation de la lipolyse spontanée et sur ses mécanismes pour répondre à des questions de l'Interprofession laitière. Ses résultats prometteurs mériteraient d'avoir une suite qui se concrétisera peut-être sous la forme d'un projet ANR.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AbuGhazaleh, A. A., R. B. Potu, et S. Ibrahim. 2009. Short communication: The effect of substituting fish oil in dairy cow diets with docosahexaenoic acid-micro algae on milk composition and fatty acids profile. *Journal of Dairy Science* 92(12):6156-6159.

AFNOR NF V 09 105 « Analyse sensorielle – Directives générales pour l’implantation de locaux destinés à l’analyse sensorielle »

AFNOR NF V18-101 « Dosage des cendres brutes »

AFNOR NF V 18-100 « Dosage de l'azote en vue du calcul de la teneur en protéines brutes »

AFNOR NF V 03-040 « Détermination de la cellulose brute »

AFNOR NF V 18-106 « Phosphore: Détermination du phosphore total, méthode spectrophotométrique »

AFNOR NF 18-108 « Calcium : Dosage du calcium, méthode par spectrométrie d'absorption atomique »

Ahnadi, C. E., N. Beswick, L. Delbecchi, J. J. Kennelly, et P. Lacasse. 2002. Addition of fish oil to diets for dairy cows. II. Effects on milk fat and gene expression of mammary lipogenic enzymes. *Journal of Dairy Research* 69(04):521-531.

Ahrné, L. et L. Björck. 1985. Lipolysis and the distribution of lipase activity in bovine milk in relation to stage of lactation and time of milking. *Journal of Dairy Research* 52(01):55-64.

Akraim, F., M. C. Nicot, P. Juaneda, et F. Enjalbert. 2007. Conjugated linolenic acid (CLnA), conjugated linoleic acid (CLA) and other biohydrogenation intermediates in plasma and milk fat of cows fed raw or extruded linseed. *Animal* 1(06):835-843.

Alais, C. 1984. *Science du lait: principes des techniques laitières*. 4ième édition, Sepale, Paris.

Alessandri, J.-M., P. Guesnet, S. Vancassel, P. Astorg, I. Denis, B. Langelier, S. Aïd, C. Poumès-Ballihaut, G. Champeil-Potokar, et M. Laviaille. 2004. Polyunsaturated fatty acids in the central nervous system: evolution of concepts and nutritional implications throughout life. *Reproduction Nutrition Development* 44(6):509-538.

Altenhofer, C., W. Holz Müller, F. Wolfertstetter, D. Wolfschoon Ribeiro, U. Kulozik, M. W. Pfaffl, et E. Viturro. 2015. Temporal variation of milk fat globule diameter, fat and cholesterol content and milk epithelial cell gene expression in dairy cows. *International Journal of Dairy Technology*. 68(4):519-526.

Anderson, M. 1979. Enzyme immunoassay for measuring lipoprotein lipase activator in milk. *Journal of Dairy Science* 62(9):1380-1383.

Anderson, M. 1981. Inhibition of lipolysis in bovine milk by proteose peptone. *Journal of Dairy Research* 48(2):247-252.

- Anderson, M. 1982. Factors affecting the distribution of lipoprotein lipase activity between serum and casein micelles in bovine milk. *Journal of Dairy Research* 49(01):51-59.
- Anderson, M., G. C. Cheeseman, W. F. Shipe, et D. J. Knight. 1972. Effect of aging cooled milk on composition of fat globule membrane. *Journal of Dairy Research* 39(1):95-105.
- Anderson, M. et E. C. Needs. 1983. Serum lipoprotein stimulation of lipolysis and its relevance to free fatty acid development in bovine milk. *Journal of Dairy Research* 50(03):309-319.
- Andrews, A. T. 1979. The formation and structure of some proteose-peptone components. *Journal of Dairy Research* 46(02):215-218.
- Andrews, A. T. 1983. Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins. *Journal of Dairy Research* 50(01):45-55.
- Agence National de Sécurité Sanitaire, alimentation, environnement, travail (ANSES). 2011. Actualisation des apports nutritionnels conseillés pour les acides gras. Paris, France.
- Apper-Bossard, E., J. L. Peyraud, P. Faverdin, et F. Meschy. 2006. Changing dietary cation-anion difference for dairy cows fed with two contrasting levels of concentrate in diets. *Journal of Dairy Science* 89(2):749-760.
- Arasaradnam, M., L. Morgan, J. Wright, et R. Gama. 2002. Diurnal variation in lipoprotein lipase activity. *Annals of Clinical Biochemistry* 39(2):136-139.
- Argov-Argaman, N., R. Mesilati-Stahy, Y. Magen, et U. Moallem. 2014. Elevated concentrate-to-forage ratio in dairy cow rations is associated with a shift in the diameter of milk fat globules and remodeling of their membranes. *Journal of Dairy Science* 97(10):6286-6295.
- Argov-Argaman, N., K. Mida, B.-C. Cohen, M. Visker, et K. Hettinga. 2013. Milk fat content and DGAT-1 genotype determine lipid composition of the milk fat globule membrane. *PLoS ONE* 8(7):e68707.
- Astorg, P., N. Arnault, S. Czernichow, N. Noisette, P. Galan, et S. Hercberg. 2005. Dietary intakes and food sources of n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids in the French adult population. Niveaux d'apport et sources alimentaires des principaux acides gras polyinsaturés n-6 et n-3 dans la population adulte en France. *Cahiers de Nutrition et de Diététique* 40(5):260-269.
- Aufrère, J., D. Graviou, C. Demarquilly, R. Vérité, B. Michalet-Doreau, et P. Chapoutot. 1989. Aliments concentrés pour ruminants: prévision de la valeur azotée PDI à partir d'une méthode enzymatique standardisée. *INRA Productions Animales* 2(4):249-254.
- Avalli, A. et G. Contarini. 2005. Determination of phospholipids in dairy products by SPE/HPLC/ELSD. *Journal of Chromatography A* 1071(1):185-190.
- Avramis, C., H. Wang, B. McBride, T. Wright, et A. Hill. 2003. Physical and processing properties of milk, butter, and Cheddar cheese from cows fed supplemental fish meal. *Journal of Dairy Science* 86(8):2568-2576.
- Bachman, K. 1982. Effect of exogenous estradiol and progesterone upon lipase activity and spontaneous lipolysis in bovine milk. *Journal of Dairy Science* 65(6):907-914.

- Bachman, K. C., M. J. Hayen, D. Morse, et C. J. Wilcox. 1988. Effect of pregnancy, milk yield, and somatic cell count on bovine milk fat hydrolysis. *Journal of Dairy Science* 71(4):925-931.
- Bachman, K. C. et C. J. Wilcox. 1990. Effect of blood and high density lipoprotein preparations upon lipase distribution and spontaneous lipolysis in bovine milk. *Journal of Dairy Science* 73(12):3393-3401.
- Badaoui, B., J. M. Serradilla, A. Tomas, B. Urrutia, J. L. Ares, J. Carrizosa, A. Sanchez, J. Jordana, et M. Amills. 2007. Short communication: Identification of two polymorphisms in the goat lipoprotein lipase gene and their association with milk production traits. *Journal of Dairy Science* 90(6):3012-3017.
- Badings, H. T. et J. J. G. Van der Pol. 1973. Effect of cooling milk on the heat-release of hydrogen sulphide from the fat-globule membrane. *Netherland Milk and Dairy Journal*. 27:45-53
- Bailey, A. E. 1933. Sulphur, bitter milk, and enzymes. *Milk Plant Monthly* 22: 31.
- Baltes, W. 1982. Chemical changes in food by the Maillard reaction. *Food Chemistry* 9(1):59-73.
- Banos, G., J. A. Woolliams, B. W. Woodward, A. B. Forbes, et M. P. Coffey. 2008. Impact of single nucleotide polymorphisms in leptin, leptin receptor, growth hormone receptor, and diacylglycerol acyltransferase (DGAT-1) gene loci on milk production, feed, and body energy traits of UK dairy cows. *Journal of Dairy Science* 91(8):3190-3200.
- Barber, M. C., R. A. Clegg, M. T. Travers, et R. G. Vernon. 1997. Lipid metabolism in the lactating mammary gland. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism* 1347(2):101-126.
- Barry, J. G. et W. J. Donnelly. 1981. Casein compositional studies: II. The effect of secretory disturbance on casein composition in freshly drawn and aged bovine milks. *Journal of Dairy Research* 48(03):437-446.
- Bauchart, D. et F. Duboisset. 1983. Utilisation des colonnes capillaires de verre pour l'analyse des acides gras du lait. *Cah. Techn. INRA* 1:37-46.
- Bauer, H. 1972. Ultrastructural observations on the milk fat globule envelope of cow's milk. *Journal of Dairy Science* 55(10):1375-1387.
- Bauman, D. E. et J. M. Griinari. 2001. Regulation and nutritional manipulation of milk fat: low-fat milk syndrome. *Livestock Production Science* 70(1-2):15-29.
- Baumrucker, C. et T. Keenan. 1973. Membranes of mammary gland. VII. Stability of milk fat globule membrane in secreted milk. *Journal of Dairy Science* 56(8):1092-1094.
- Bazin, S., P. Augeard, M. Carteau, H. Champion, Y. Chilliard, G. Cuyille, C. Disenhaus, G. Durand, R. Espinasse, et A. Gascoin. 1984. Grille de notation de l'état d'engraissement des vaches pie-noires. RNED bovin, Paris, France.
- Beck, U., B. Emmanuel, et D. Giesecke. 1984. The ketogenic effect of glucose in rumen epithelium of ovine (*ovis aries*) and bovine (*bos taurus*) origin. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 77(3):517-521.

- Bell, L. I. et J. G. Parsons. 1977. Factors affecting lipase flavor in butter. *Journal of Dairy Science* 60(1):117-122.
- Ben-Zeev, O., M. H. Doolittle, R. C. Davis, J. Elovson, et M. C. Schotz. 1992. Maturation of lipoprotein lipase. Expression of full catalytic activity requires glucose trimming but not translocation to the cis-Golgi compartment. *Journal of Biological Chemistry* 267(9):6219-6227.
- Bendall, J. G. 2001. Aroma compounds of fresh milk from New Zealand cows fed different diets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(10):4825-4832.
- Bengtsson-Olivecrona, G., T. Olivecrona, et H. Jörnvall. 1986. Lipoprotein lipases from cow, guinea-pig and man. *European Journal of Biochemistry* 161(2):281-288.
- Bengtsson, G. et T. Olivecrona. 1980. Lipoprotein lipase: Some effects of activator proteins. *European Journal of Biochemistry* 106(2):549-555.
- Bengtsson, G. et T. Olivecrona. 1982. Activation of lipoprotein lipase by apolipoprotein CII. *FEBS Letters* 147(2):183-187.
- Bergo, M., G. Olivecrona, et T. Olivecrona. 1996. Diurnal rhythms and effects of fasting and refeeding on rat adipose tissue lipoprotein lipase. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 271(6):E1092-E1097.
- Bernard, L., C. Leroux, M. Bonnet, J. Rouel, P. Martin, et Y. Chilliard. 2005a. Expression and nutritional regulation of lipogenic genes in mammary gland and adipose tissues of lactating goats. *Journal of Dairy Research* 72(02):250-255.
- Bernard, L., J. Rouel, C. Leroux, A. Ferlay, Y. Faulconnier, P. Legrand, et Y. Chilliard. 2005b. Mammary lipid metabolism and milk fatty acid secretion in alpine goats fed vegetable lipids. *Journal of Dairy Science* 88(4):1478-1489.
- Bernard, L., M. Bonnet, C. Leroux, K. J. Shingfield, et Y. Chilliard. 2009a. Effect of sunflower-seed oil and linseed oil on tissue lipid metabolism, gene expression, and milk fatty acid secretion in Alpine goats fed maize silage based diets. *Journal of Dairy Science* 92(12):6083-6094.
- Bernard, L., C. Leroux, Y. Faulconnier, D. Durand, K. J. Shingfield, et Y. Chilliard. 2009b. Effect of sunflower-seed oil or linseed oil on milk fatty acid secretion and lipogenic gene expression in goats fed hay-based diets. *Journal of Dairy Research* 76(2):241-248.
- Berry, D., J. Roche, et M. Coffey. 2008. Body condition score and fertility—more than just a feeling. *Proceedings of Fertility in Dairy Cows—bridging the gaps*. British Society of Animal Science, Cambridge University Press, Cambridge, UK, p 107-118
- Beswick, N. S. et J. J. Kennelly. 2000. Influence of bovine growth hormone and growth hormone-releasing factor on messenger RNA abundance of lipoprotein lipase and stearoyl-CoA desaturase in the bovine mammary gland and adipose tissue. *Journal of Animal Science* 78(2):412-419.
- Bhavadasan, M. et N. Ganguli. 1980. Free and membrane-bound xanthine oxidase in bovine milk during cooling and heating. *Journal of Dairy Science* 63(3):362-367.

- Bijl, E., R. de Vries, H. van Valenberg, T. Huppertz, et T. van Hooijdonk. 2014. Factors influencing casein micelle size in milk of individual cows: Genetic variants and glycosylation of κ -casein. *International Dairy Journal* 34(1):135-141.
- Bills, D. D., R. A. Scanlan, R. C. Lindsay, et L. Sather. 1969. Free fatty acids and the flavor of dairy products. *Journal of Dairy Science* 52(8):1340-1345.
- Bitman, J. et D. Wood. 1990. Changes in milk fat phospholipids during lactation. *Journal of Dairy Science* 73(5):1208-1216.
- Blackberg, L., O. Hernell, G. Bengtsson, et T. Olivecrona. 1979. Colipase enhances hydrolysis of dietary triglycerides in the absence of bile salts. *Journal of Clinical Investigation* 64(5):1303-1308.
- Boeckert, C., B. Vlaeminck, J. Dijkstra, A. Issa-Zacharia, T. Van Nespén, W. Van Straalen, et V. Fievez. 2008. Effect of dietary starch or microalgae supplementation on rumen fermentation and milk fatty acid composition of dairy cows. *Journal of Dairy Science* 91(12):4714-4727.
- Boichard, D., H. Chung, R. Dasonneville, X. David, A. Eggen, S. Fritz, K. J. Gietzen, B. J. Hayes, C. T. Lawley, T. S. Sonstegard, C. P. Van Tassell, P. M. VanRaden, K. A. Viaud-Martinez, et G. R. Wiggans. 2012. Design of a bovine low-density SNP array optimized for imputation. *PLoS ONE* 7(3):e34130.
- Boichard, D., A. Govignon-Gion, H. Larroque, C. Maroteau, I. Palhiere, G. Tosser-Klopp, R. Rupp, M. P. Sanchez, et M. Brochard. 2014. Genetic determinism of milk composition in fatty acids and proteins in ruminants, and selection potential. *INRA Productions Animales* 27(4):283-298.
- Bourne, Y., C. Martinez, B. Kerfelec, D. Lombardo, C. Chapus, et C. Cambillau. 1994. Horse pancreatic lipase: the crystal structure refined at 2.3 Å resolution. *Journal of Molecular Biology* 238(5):709-732.
- Boutinaud, M., M. H. Ben Chedly, E. Delamaire, et J. Guinard-Flament. 2008. Milking and feed restriction regulate transcripts of mammary epithelial cells purified from milk. *Journal of Dairy Science* 91(3):988-998.
- Boutinaud, M., L. Galio, V. Lollivier, L. Finot, S. Wiart, D. Esquerre, et E. Devinoy. 2013. Unilateral once daily milking locally induces differential gene expression in both mammary tissue and milk epithelial cells revealing mammary remodeling. *Physiological Genomics* 45(20):973-985.
- Bouton, Y., S. Buchin, G. Duboz, S. Pochet, et E. Beuvier. 2009. Effect of mesophilic lactobacilli and enterococci adjunct cultures on the final characteristics of a microfiltered milk Swiss-type cheese. *Food Microbiology* 26(2):183-191.
- Bovenhuis, H., M. Visker, H. J. F. van Valenberg, A. J. Buitenhuis, et J. A. M. van Arendonk. 2015. Effects of the DGAT-1 polymorphism on test-day milk production traits throughout lactation. *Journal of Dairy Science* 98(9):6572-6582.
- Boyaval, P., C. Corre, C. Dupuis, et E. Roussel. 1995. Effect of free fatty acids on propionic acid bacteria. *Lait* 75(1):17-29.
- Braun, J. E. et D. L. Severson. 1992. Regulation of the synthesis, processing and translocation of lipoprotein lipase. *Biochemical Journal* 287(Pt 2):337-347.

- Briard-Bion, V., P. Juaneda, R. Richoux, E. Guichard, et C. Lopez. 2008. trans-C18:1 isomers in cheeses enriched in unsaturated fatty acids and manufactured with different milk fat globule sizes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(20):9374-9382.
- Briard, V., N. Leconte, F. Michel, et M. C. Michalski. 2003. The fatty acid composition of small and large naturally occurring milk fat globules. *European Journal of Lipid Science and Technology* 105(11):677-682.
- Briggs, G. E. et J. B. S. Haldane. 1925. A note on the kinetics of enzyme action. *Biochemical Journal* 19(2):338.
- Brocard, V., G. Trou, B. Portier, J. François, M. Le Guénic, D. Jouanne, C. Disenhaus, et A. Larue. 2010. En vêlages groupés, allonger la lactation pour un vêlage tous les 18 mois: quelles conséquences sur les performances laitières ? *Rencontres Recherches Ruminants* 17:164.
- Broderick, G. 2003. Effects of varying dietary protein and energy levels on the production of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 86(4):1370-1381.
- Brulé, G., J. Maubois, et J. Fauquant. 1974. Étude de la teneur en éléments minéraux des produits obtenus lors de l'ultrafiltration du lait sur membrane. *Lait* 54(539-540):600-615.
- Buchanan, R. A. 1965. Lipolysis and the frothing of milk. *Australian Journal of Dairy Technology*. 20:62-66.
- Bugaud, C., S. Buchin, A. Hauwuy, et J.-B. Coulon. 2001. Relationships between flavour and chemical composition of Abondance cheese derived from different types of pastures. *Lait* 81(6):757-773.
- Burke, C. R., Y. J. Williams, L. Hofmann, J. K. Kay, C. V. C. Phyn, et S. Meier. 2010. Effects of an acute feed restriction at the onset of the seasonal breeding period on reproductive performance and milk production in pasture-grazed dairy cows. *Journal of Dairy Science* 93(3):1116-1125.
- Calder, P. C. et P. Yaqoob. 2009. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and human health outcomes. *BioFactors* 35(3):266-272.
- Camps, L., M. Reina, M. Llobera, S. Vilaro, et T. Olivecrona. 1990. Lipoprotein lipase: cellular origin and functional distribution. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 258(4):C673-C681.
- Carpino, S., S. Mallia, S. La Terra, C. Melilli, G. Licitra, T. Acree, D. Barbano, et P. Van Soest. 2004. Composition and aroma compounds of Ragusano cheese: native pasture and total mixed rations. *Journal of Dairy Science* 87(4):816-830.
- Carroll, S., E. DePeters, S. Taylor, M. Rosenberg, H. Perez-Monti, et V. Capps. 2006. Milk composition of Holstein, Jersey, and Brown Swiss cows in response to increasing levels of dietary fat. *Animal Feed Science and Technology* 131(3):451-473.
- Cartier, P. et Y. Chilliard. 1986. Effects of different skim milk fractions on activity of cow milk purified lipoprotein lipase. *Journal of Dairy Science* 69(4):951-955.

- Cartier, P. et Y. Chilliard. 1989. Lipase redistribution in cows' milk during induced lipolysis: I. Activation by agitation, temperature change, blood serum and heparin. *Journal of Dairy Research* 56(05):699-709.
- Cartier, P. et Y. Chilliard. 1990. Spontaneous lipolysis in bovine milk: combined effects of nine characteristics in native milk. *Journal of Dairy Science* 73(5):1178-1186.
- Cases, S., S. J. Smith, Y.-W. Zheng, H. M. Myers, S. R. Lear, E. Sande, S. Novak, C. Collins, C. B. Welch, A. J. Lusic, S. K. Erickson, et R. V. Farese. 1998. Identification of a gene encoding an acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95(22):13018-13023.
- Castberg, H. et P. Solberg. 1974. Lipoprotein lipase and the lipolysis in bovine milk. *Meieriposten* 63 : 961-975.
- Chapkin, R. S., W. Kim, J. R. Lupton, et D. N. McMurray. 2009. Dietary docosahexaenoic and eicosapentaenoic acid: Emerging mediators of inflammation. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 81(2-3):187-191.
- Chazal, M.-P. et Y. Chilliard. 1986. Effect of stage of lactation, stage of pregnancy, milk yield and herd management on seasonal variation in spontaneous lipolysis in bovine milk. *Journal of Dairy Research* 53(04):529-538.
- Chazal, M.-P., Y. Chilliard, et J.-B. Coulon. 1987. Effect of nature of forage on spontaneous lipolysis in milk from cows in late lactation. *Journal of Dairy Research* 54(01):13-18.
- Chazal, M. et Y. Chilliard. 1985. The effect of animal factors on milk lipolysis. *Proceedings Dairy Science Abstracts* 364.
- Chazal, M. P. et Y. Chilliard. 1987. Effect of breed of cow (Friesian and Montbeliarde) on spontaneous and induced lipolysis in milk. *Journal of Dairy Research* 54(1):7-11.
- Chen, C. et J. Tobias. 1972. Migration of copper between different fractions of milk. *Journal of Dairy Science* 55(6):759-764.
- Cheng, H. F. 2010. Volatile flavor compounds in yogurt: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 50(10):938-950.
- Chilliard, Y. 1982. Variations physiologiques des activités lipasiques et de la lipolyse spontanée dans les laits de vache, de chèvre et de femme: revue bibliographique. *Lait* 62(611-612):1-31.
- Chilliard, Y. 1986. Revue bibliographique: Variations quantitatives et métabolisme des lipides dans les tissus adipeux et le foie au cours du cycle gestation-lactation. 1re partie: chez la ratte. *Reproduction Nutrition Development* 26(5A):1057-1103.
- Chilliard, Y., M. P. Chazal, et P. Cartier. 1986. Données récentes sur la lipolyse du lait de vache. *Revue des ENIL* 112 : 12-19

- Chilliard, Y., F. Bocquier, et M. Doreau. 1998. Digestive and metabolic adaptations of ruminants to undernutrition, and consequences on reproduction. *Reproduction Nutrition Development* 38(2):131-152.
- Chilliard, Y., P. Cartier, D. Leveux, et A. Ollier. 1997. Effects of estradiol and progesterone injections on milk yield, composition and lipolysis in the non-pregnant cow. in Proc. 4. Rencontres autour des recherches sur les ruminants, Paris (France), 4-5 Dec 1997. Institut de l'Elevage.
- Chilliard, Y. et A. Ferlay. 2004. Dietary lipids and forages interactions on cow and goat milk fatty acid composition and sensory properties. *Reproduction Nutrition Development* 44(5):467-492.
- Chilliard, Y., A. Ferlay, et M. Doreau. 2001. Effect of different types of forages, animal fat or marine oils in cow's diet on milk fat secretion and composition, especially conjugated linoleic acid (CLA) and polyunsaturated fatty acids. *Livestock Production Science* 70(1-2):31-48.
- Chilliard, Y., A. Ferlay, J. Rouel, et G. Lamberet. 2003. A review of nutritional and physiological factors affecting goat milk lipid synthesis and lipolysis. *Journal of Dairy Science* 86(5):1751-1770.
- Chilliard, Y., F. Glasser, A. Ferlay, L. Bernard, J. Rouel, et M. Doreau. 2007. Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat. *European Journal of Lipid Science and Technology* 109(8):828-855.
- Chilliard, Y. et G. Lamberet. 1984. Milk lipolysis - various types, mechanisms, factors of variation, practical significance. *Lait* 64(645):544-578.
- Chilliard, Y., C. Martin, J. Rouel, et M. Doreau. 2009. Milk fatty acids in dairy cows fed whole crude linseed, extruded linseed, or linseed oil, and their relationship with methane output. *Journal of Dairy Science* 92(10):5199-5211.
- Chilliard, Y., P. G. Toral, K. J. Shingfield, J. Rouel, C. Leroux, et L. Bernard. 2014. Effects of diet and physiological factors on milk fat synthesis, milk fat composition and lipolysis in the goat: A short review. *Small Ruminant Research* 122(1-3):31-37.
- Chouinard, Y., M. Villeneuve, Y. Lebeuf, G. F. Tremblay, et R. Gervais. 2012. « Facteurs alimentaires modulant le profil aromatique du lait chez la vache. » In 36^{ème} Symposium sur les bovins laitiers.
- Collins, Y. F., P. L. H. McSweeney, et M. G. Wilkinson. 2003. Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *International Dairy Journal* 13(11):841-866.
- Connolly, J. 1978. Recent findings on lipolysis in Ireland. The impact of environment and nutrition on free fatty acids and flavour in milk and dairy products. In Proc. 20th International Dairy Congress, Paris (France), 26 Juin 1978.
- Connolly, J. F., J. J. Murphy, C. B. O'Connor, et D. R. Headon. 1979. Relationship between lipolysed flavour and free fatty acid levels in milk and butter. *Irish Journal of Food Science and Technology* 3(2):79-92.
- Coulon, J. B. et B. Rémond. 1991. Variations in milk output and milk protein content in response to the level of energy supply to the dairy cow: A review. *Livestock Production Science* 29(1):31-47.

- Couvreur, S., C. Hurtaud, L. Delaby, J.L. Peyraud. 2004. Effect of haylage or maize silage based diets with or without energy restriction on milk fat properties. In: Land use systems in grassland dominated regions (p. 1142-1144). Grassland Science in Europe, 9. Presented at 20th General Meeting of the European Grassland Federation, Luzern, CHE (2004-06-21 - 2004-06-24). Zurich.
- Couvreur, S., C. Hurtaud, C. Lopez, L. Delaby, et J. L. Peyraud. 2006. The linear relationship between the proportion of fresh grass in the cow diet, milk fatty acid composition, and butter properties. *Journal of Dairy Science* 89(6):1956-1969.
- Couvreur, S., C. Hurtaud, P. G. Marnet, P. Faverdin, et J. L. Peyraud. 2007. Composition of milk fat from cows selected for milk fat globule size and offered either fresh pasture or a corn silage-based diet. *Journal of Dairy Science* 90(1):392-403.
- Couvreur, S. et C. Hurtaud. 2007. Le globule gras du lait: sécrétion, composition, fonctions et facteurs de variation. *INRA Productions Animales* 20:365-382.
- Couvreur, S. et C. Hurtaud. 2016. Relationships between milks differentiated on native milk fat globule characteristics and fat, protein and calcium compositions. *Animal*:sous presse.
- Csiszar, J. 1933. Fat-splitting properties of milk as the cause of rancid milk. *Milchwirtschaftliche Forschungen*, 14:288.
- Davies, D. T. et A. J. Law. 1983. Variation in the protein composition of bovine casein micelles and serum casein in relation to micellar size and milk temperature. *Journal of Dairy Research* 50(01):67-75.
- de Boer, G., A. Trenkle, et J. W. Young. 1985. Glucagon, insulin, growth hormone, and some blood metabolites during energy restriction ketonemia of lactating cows. *Journal of Dairy Science* 68(2):326-337.
- de Vries, M. J. et R. F. Veerkamp. 2000. Energy balance of dairy cattle in relation to milk production variables and fertility. *Journal of Dairy Science* 83(1):62-69.
- Deeth, H. et C. Fitzgerald. 1976. Lipolysis in dairy products: A review. *Australian Journal of Dairy Technology* 31(2):53-64.
- Deeth, H.C et R.A.D. Smith. 1983. Lipolysis and other factors affecting the steam frothing capacity of milk. *Australian Journal of Dairy Technology*, 38:14–19
- Deeth, H.C et C.H Fitzgerald. 1995. Lipolytic enzyme and hydrolytic rancidity in milk and milk products. In advanced dairy chemistry vol 2: lipids 2nd ed. (Fox, P.F., ed) pp 247-308 Chapman & Hall, London.
- Deeth, H. C. 1997. The role of phospholipids in the stability of milk fat globules. *Australian Journal of Dairy Technology* 52(1):44-46.
- Deeth, H. C. 2006. Lipoprotein lipase and lipolysis in milk. *International Dairy Journal* 16(6):555-562.
- Delaby, L., P. Faverdin, G. Michel, C. Disenhaus, et J. L. Peyraud. 2009. Effect of different feeding strategies on lactation performance of Holstein and Normande dairy cows. *Animal* 3(06):891-905.

- Delamaire, E. et J. Guinard-Flament. 2006. Longer milking intervals alter mammary epithelial permeability and the udder's ability to extract nutrients. *Journal of Dairy Science* 89(6):2007-2016.
- Dewettinck, K., R. Rombaut, N. Thienpont, T. T. Le, K. Messens, et J. Van Camp. 2008. Nutritional and technological aspects of milk fat globule membrane material. *International Dairy Journal* 18(5):436-457.
- Di Cagno, R., S. Buchin, S. De Candia, M. De Angelis, P. Fox, et M. Gobbetti. 2007. Characterization of Italian cheeses ripened under nonconventional conditions. *Journal of Dairy Science* 90(6):2689-2704.
- Di Cagno, R., I. De Pasquale, M. De Angelis, S. Buchin, C. Rizzello, et M. Gobbetti. 2014. Use of microparticulated whey protein concentrate, exopolysaccharide-producing *Streptococcus thermophilus*, and adjunct cultures for making low-fat Italian Caciotta-type cheese. *Journal of Dairy Science* 97(1):72-84.
- Dickow, J. A., L. B. Larsen, M. Hammershøj, et L. Wiking. 2011. Cooling causes changes in the distribution of lipoprotein lipase and milk fat globule membrane proteins between the skim milk and cream phase. *Journal of Dairy Science* 94(2):646-656.
- Dijkstra, J. 1994. Production and absorption of volatile fatty acids in the rumen. *Livestock Production Science* 39(1):61-69.
- Dillon, P., F. Buckley, P. O'Connor, D. Hegarty, et M. Rath. 2003. A comparison of different dairy cow breeds on a seasonal grass-based system of milk production 1. Milk production, live weight, body condition score and DM intake. *Livestock Production Science* 83(1):21-33.
- Dillon, P., J. Roche, L. Shalloo, et B. Horan. 2005. Optimising financial return from grazing in temperate pastures. *Utilisation of grazed grass in temperate animal systems* (ed. JJ Murphy):131-147.
- Donahoo, W. T., D. R. Jensen, T. Y. Shepard, et R. H. Eckel. 2000. Seasonal variation in lipoprotein lipase and plasma lipids in physically active, normal weight humans. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 85(9):3065-3068.
- Doreau, M. et Y. Chilliard. 1997. Effects of ruminal or postruminal fish oil supplementation on intake and digestion in dairy cows. *Reproduction Nutrition Development* 37(1):113-124.
- Dorner, W. et A. Widmer. 1932. Homogenization and milk rancidity. *Milk Plant Monthly* 21(7):50.
- Downey, W. K. 1980. Flavour impairment of milk and milk products due to lipolysis II risks from pre- and post-manufacture lipolysis. *Bulletin of the International Dairy Federation*. 118:4-18.
- Driessen, F. 1989. Inactivation of lipases and proteinases (indigenous and bacterial). *Bulletin of the International Dairy Federation* 238:71-93.
- Duncan, S. E., G. L. Christen, et M. P. Penfield. 1991. Rancid flavor of milk, relationship of acid degree value, free fatty acids and sensory perception. *Journal of Food Science* 56(2):394-397.

- Dutreuil, M., J. Guinard-Flament, M. Boutinaud, et C. Hurtaud. 2016. Effect of duration of milk accumulation in the udder on milk composition, especially on milk fat globule. *Journal of Dairy Science* 99(5):3934-3944.
- Earley, R. R. et A. P. Hansen. 1982. Effect of process and temperature during storage on ultra-high temperature steam-injected milk. *Journal of Dairy Science* 65(1):11-16.
- Emery, R. S., J. S. Liesman, et T. H. Herdt. 1992. Metabolism of long chain fatty acids by ruminant liver. *The Journal of Nutrition* 122(3 Suppl):832-837.
- Evers, J. M. 2004. The milkfat globule membrane—methodologies for measuring milkfat globule (membrane) damage. *International Dairy Journal* 14(9):747-760.
- Evers, J. M., R. G. Haverkamp, S. E. Holroyd, G. B. Jameson, D. D. S. Mackenzie, et O. J. McCarthy. 2008. Heterogeneity of milk fat globule membrane structure and composition as observed using fluorescence microscopy techniques. *International Dairy Journal* 18(12):1081-1089.
- Fan, T. Y., D. H. Hwang, et J. E. Kinsella. 1976. Methyl ketone formation during germination of *Penicillium roqueforti*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 24(3):443-448.
- Farkye, N. Y., S. A. Madkor, et H. G. Atkins. 1995. Proteolytic abilities of some lactic acid bacteria in a model cheese system. *International Dairy Journal* 5(7):715-725.
- Faucon, F. 2009. Identification, chez les ruminants, des gènes ou réseaux de gènes impliqués dans la différenciation et le fonctionnement de la glande mammaire. PhD.
- Faulconnier, Y., M. Thévenet, J. Fléchet, et Y. Chilliard. 1994. Lipoprotein lipase and metabolic activities in incubated bovine adipose tissue explants: effects of insulin, dexamethasone, and fetal bovine serum. *Journal of Animal Science* 72(1):184-191.
- Ferlay, A., M. Doreau, C. Martin, et Y. Chilliard. 2013. Effects of incremental amounts of extruded linseed on the milk fatty acid composition of dairy cows receiving hay or corn silage. *Journal of Dairy Science* 96(10):6577-6595.
- Ferlay, A., B. Martin, S. Lerch, M. Gobert, P. Pradel, et Y. Chilliard. 2010. Effects of supplementation of maize silage diets with extruded linseed, vitamin E and plant extracts rich in polyphenols, and morning v. evening milking on milk fatty acid profiles in Holstein and Montbéliarde cows. *Animal* 4(04):627-640.
- Ferlay, A., B. Martin, P. Pradel, J. B. Coulon, et Y. Chilliard. 2006. Influence of grass-based diets on milk fatty acid composition and milk lipolytic system in tarentaise and Montbeliarde cow breeds. *Journal of Dairy Science* 89(10):4026-4041.
- Ferrand-Calmels, M., I. Palhière, M. Brochard, O. Leray, J. M. Astruc, M. R. Aurel, S. Barbey, F. Bouvier, P. Brunschwig, H. Caillatt, M. Douguet, F. Faucon-Lahalle, M. Gelé, G. Thomas, J. M. Trommschlager, and H. Larroque. 2014. Prediction of fatty acid profiles in cow, ewe, and goat milk by mid-infrared spectrometry. *Journal of Dairy Science* 97(1):17-35.

- Ferris, C. P., J. P. Frost, C. S. Mayne, M. A. McCoy, et D. J. Kilpatrick. 2008. A comparison of the direct and residual response of dairy cows to once or twice-daily milking, in late lactation. *Livestock Science* 114(2–3):305-314.
- Fleming, M. 1980. Mechanical factors associated with milk lipolysis in bovine milk. *International Dairy Federation*. 118:41-52.
- Fong, B. Y. et C. S. Norris. 2009. Quantification of milk fat globule membrane proteins using selected reaction monitoring mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(14):6021-6028.
- Fong, B. Y., C. S. Norris, et A. K. MacGibbon. 2007. Protein and lipid composition of bovine milk-fat-globule membrane. *International Dairy Journal* 17(4):275-288.
- Fouts, E. L. 1940. Relationship of acid number variations to the qualities and flavor defects of commercial butter. *Journal of Dairy Science* 23(2):173-179.
- Fox, P., M. Yaguchi, et N. Tarassuk. 1966. Distribution of lipase in milk proteins dissociation from kappa casein by dimethylformamide. in *Proceedings Journal of Dairy Science*. New York, USA, 707
- Fox, P.F., J. Law, P.L.H. McSweeney, et Wallace, J.1993. Biochemistry of cheese ripening. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol 1: General Aspects, 2nd ed. 389 – 438. Fox P F, ed. London:Chapman & Hall.
- Fox, P. F., T. K. Singh, et P. L. H. McSweeney. 1995. Biogenesis of flavour compounds in cheese. Pages 59-98 in *Chemistry of Structure-Function Relationships in Cheese*. E. L. Malin and M. H. Tunick, ed. Springer US, Boston, MA.
- Friggens, N. C., P. Berg, P. Theilgaard, I. R. Korsgaard, K. L. Ingvarsen, P. Lovendahl, et J. Jensen. 2007. Breed and parity effects on energy balance profiles through lactation: Evidence of genetically driven body energy change. *Journal of Dairy Science* 90(11):5291-5305.
- Gabbi, A. M., C. M. McManus, M. B. Zanela, M. T. Stumpf, R. S. Barbosa, V. Fruscalso, A. T. Neto, F. A. Schmidt, et V. Fischer. 2016. Milk traits of lactating cows submitted to feed restriction. *Tropical Animal Health and Production* 48(1):37-43.
- Gaffney, P., W. Harper, et I. Gould. 1962. Lipase activity of fractionated casein extracts. *Proceedings of Journal of Dairy Science* 646.
- Garcia, A. M. B., F. C. Cardoso, R. Campos, D. X. Thedy et F. H. D. González. 2011. Metabolic evaluation of dairy cows submitted to three different strategies to decrease the effects of negative energy balance in early postpartum. *Pesquisa Veterinaria Brasileira* 31:11-17.
- Gautier, M., A. Capitan, S. Fritz, A. Eggen, D. Boichard, et T. Druet. 2007. Characterization of the DGAT-1 K232A and variable number of tandem repeat polymorphisms in French dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 90(6):2980-2988.
- Gelé, M., S. Minery, J. M. Astruc, P. Brunschwig, M. Ferrand-Calmels, G. Lagriffoul, H. Larroque, J. Legarto, O. Leray, P. Martin, G. Miranda, I. Palhière, P. Trossat, et M. Brochard. 2014. Large scale

- phenotyping and genotyping of milk fine composition in the cow, goat and ewe. *INRA Productions Animales* 27(4):255-268.
- Giannetto, C. et G. Piccione. 2009. Daily rhythms of 25 physiological variables in *Bos taurus* maintained under natural conditions. *Journal of applied biomedicine* 7(1):55-61.
- Girardet, J.-M., G. Linden, S. Loye, J.-L. Courthaudon, et D. Lorient. 1993. Study of mechanism of lipolysis inhibition by bovine milk proteose-peptone component 3. *Journal of Dairy Science* 76(8):2156-2163.
- Gonthier, C., A. F. Mustafa, R. Berthiaume, H. V. Petit, R. Martineau, et D. R. Ouellet. 2004. Effects of feeding micronized and extruded flaxseed on ruminal fermentation and nutrient utilization by dairy cows. *Journal of Dairy Science* 87(6):1854-1863.
- Gonthier, C., A. F. Mustafa, D. R. Ouellet, P. Y. Chouinard, R. Berthiaume, et H. V. Petit. 2005. Feeding micronized and extruded flaxseed to dairy cows: effects on blood parameters and milk fatty acid composition. *Journal of Dairy Science* 88(2):748-756.
- Gonzalez-Cordova, A. F. et B. Vallejo-Cordoba. 2003. Detection and prediction of hydrolytic rancidity in milk by multiple regression analysis of short-chain free fatty acids determined by solid phase microextraction gas chromatography and quantitative flavor intensity assessment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(24):7127-7131.
- Grandison, A. S., G. D. Ford, A. J. Owen, et D. Millard. 1984. Chemical composition and coagulating properties of renneted Friesian milk during the transition from winter rations to spring grazing. *Journal of Dairy Research* 51(01):69-78.
- Graves, E. L. F., A. D. Beaulieu, et J. K. Drackley. 2007. Factors affecting the concentration of sphingomyelin in bovine milk. *Journal of Dairy Science* 90(2):706-715.
- Grisart, B., W. Coppieters, F. Farnir, L. Karim, C. Ford, P. Berzi, N. Cambisano, M. Mni, S. Reid, P. Simon, R. Spelman, M. Georges, et R. Snell. 2002. Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: identification of a missense mutation in the bovine DGAT-1 gene with major effect on milk yield and composition. *Genome Research* 12(2):222-231.
- Gripon, J. C. 1993. Mould-ripened cheeses. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol 2: Major Cheese Groups, 2nd ed, pp 111–136. Fox P F, ed. London:Chapman & Hall.
- Gross, J., H. A. van Dorland, R. M. Bruckmaier, et F. J. Schwarz. 2011. Milk fatty acid profile related to energy balance in dairy cows. *Journal of Dairy Research* 78(04):479-488.
- Gross, J. J., F. J. Schwarz, K. Eder, H. A. van Dorland, et R. M. Bruckmaier. 2013. Liver fat content and lipid metabolism in dairy cows during early lactation and during a mid-lactation feed restriction. *Journal of Dairy Science* 96(8):5008-5017.
- Grummer, R. R. 1993. Etiology of lipid-related metabolic disorders in periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science* 76(12):3882-3896.

- Gui, L., C. Jia, Y. Zhang, C. Zhao, et L. Zan. 2016. Association studies on the bovine lipoprotein lipase gene polymorphism with growth and carcass quality traits in Qinchuan cattle. *Molecular and Cellular Probes* 30(2):61-65.
- Guinard-Flament, J., E. Delamaire, P. Lambertson, et J. L. Peyraud. 2007. Adaptations of mammary uptake and nutrient use to once-daily milking and feed restriction in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 90(11):5062-5072.
- Guinard-Flament, J., E. Delamaire, S. Lemosquet, M. Boutinaud, et Y. David. 2006. Changes in mammary uptake and metabolic fate of glucose with once-daily milking and feed restriction in dairy cows. *Reproduction Nutrition Development* 46(5):589-598.
- Güler, Z. 2007. Changes in salted yoghurt during storage. *International Journal of Food Science and Technology* 42(2):235-245.
- Hagrass, A., A. Asker, S. Hafez, et A. Shehata. 1983. Some factors affecting the nitrogen distribution of Friesian cow milk. *Annals of Agricultural Science, Ain-Shams Univ., Cairo (Egypt)*.
- Harmon, D. L. 1992. Impact of nutrition on pancreatic exocrine and endocrine secretion in ruminants: a review. *Journal of Animal Science* 70(4):1290-1301.
- Hart, K. J., J. A. Huntington, R. G. Wilkinson, C. G. Bartram, et L. A. Sinclair. 2015. The influence of grass silage-to-maize silage ratio and concentrate composition on methane emissions, performance and milk composition of dairy cows. *Animal* 9(06):983-991.
- Harvatiné, K. J. et D. E. Bauman. 2006. SREBP1 and thyroid hormone responsive spot 14 (S14) are involved in the regulation of bovine mammary lipid synthesis during diet-induced milk fat depression and treatment with CLA. *The Journal of Nutrition* 136(10):2468-2474.
- Hawke, J. C. et M. W. Taylor. 1983. Influence of Nutritional Factors on the Yield, Composition and Physical Properties of Milk Fat. Pages 37-81 in *Developments in Dairy Chemistry—2: Lipids*. P. F. Fox, ed. Springer Netherlands, Dordrecht.
- Hayashi, R., S. Tajima, et A. Yamamoto. 1986. Purification and characterization of lipoprotein lipase from human postheparin plasma and its comparison with purified bovine milk lipoprotein lipase. *Journal of Biochemistry* 100(2):319-331.
- Heid, H. W. et T. W. Keenan. 2005. Intracellular origin and secretion of milk fat globules. *European Journal of Cell Biology* 84(2–3):245-258.
- Henson, A., G. Holdsworth, et R. Chandan. 1971. Physicochemical analyses of the bovine milk fat globule membrane. II. Electron microscopy. *Journal of Dairy Science* 54(12):1752-1763.
- Heuchel, V. et Y. Chilliard. 1988. Le point sur la lipolyse du lait de vache. Institut Technique de l'Élevage Bovin, France.
- Hileman, J. et E. Courtney. 1935. Seasonal variations in the lipase content of milk. *Journal of Dairy Science* 18(4):247-257.

- Hocquette, J.-F., B. Graulet, et T. Olivecrona. 1998. Lipoprotein lipase activity and mRNA levels in bovine tissues. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 121(2):201-212.
- Hohe, K. A., P. S. Dimick, et A. Kilara. 1985. Milk lipoprotein lipase distribution in the major fractions of bovine milk. *Journal of Dairy Science* 68(5):1067-1073.
- Humbert, G., M.-F. Guingamp, et G. Linden. 1997. Method for the measurement of lipase activity in milk. *Journal of Dairy Research* 64(03):465-469.
- Huppertz, T. et A. Kelly. 2006. Physical chemistry of milk fat globules. Pages 173-212 in *Advanced Dairy Chemistry Volume 2 Lipids*. Springer.
- Hurtaud, C., S. Buchin, F. Berodier, G. Duboz, et E. Beuvier. 2012. Effet de combinaisons d'aliments riches en acides gras oméga 3 sur le profil en acides gras du lait et les caractéristiques physico-chimiques et sensorielles d'un fromage de type pâte pressée cuite. *Rencontres Recherches Ruminants* 19:418-418.
- Hurtaud, C., S. Buchin, B. Martin, I. Verdier-Metz, J. Peyraud, et Y. Noël. 2001. La qualité des laits et ses conséquences sur la qualité des produits de transformation: quelques techniques de mesure dans les essais zootechniques. *Rencontres Recherches Ruminants* 8:35-42.
- Hurtaud, C., L. Delaby, J. Peyraud, J. Durand, J. Emile, C. Huyghe, et G. Lemaire. 2002. The nature of conserved forage affects milk composition and butter properties. Pages 576-577 in *Proc. Multi-function grasslands: quality forages, animal products and landscapes. Proceedings of the 19th General Meeting of the European Grassland Federation, La Rochelle, France, 27-30 May 2002.*
- Hurtaud, C., M. Dutreuil, M. Coppa, C. Agabriel, et B. Martin. 2014. Characterization of milk from feeding systems based on herbage or corn silage with or without flaxseed and authentication through fatty acid profile. *Dairy Science and Technology* 94(2):103-123.
- Hurtaud, C., F. Faucon, S. Couvreur, et J. L. Peyraud. 2010. Linear relationship between increasing amounts of extruded linseed in dairy cow diet and milk fatty acid composition and butter properties. *Journal of Dairy Science* 93(4):1429-1443.
- Hurtaud, C., J. L. Peyraud, G. Michel, D. Berthelot, et L. Delaby. 2009. Winter feeding systems and dairy cow breed have an impact on milk composition and flavour of two Protected Designation of Origin French cheeses. *Animal* 3(9):1327-1338.
- Hussein, M., K. H. Harvatine, W. M. P. B. Weerasinghe, L. A. Sinclair, et D. E. Bauman. 2013. Conjugated linoleic acid-induced milk fat depression in lactating ewes is accompanied by reduced expression of mammary genes involved in lipid synthesis. *Journal of Dairy Science* 96(6):3825-3834.
- Ingr I., B. Suchánek, et M. Polášek. 1972. The effects of diet and lactation stage on the composition and characteristics of cow's milk fat. *Milchwissenschaft*, 27, 691-695.
- Innis, S. M. 2008. Dietary omega 3 fatty acids and the developing brain. *Brain Research* 1237:35-43.
- Institut National de la Recherche Agronomique (INRA). 2007. Ruminant nutrition: Recommended allowances and feed tables (ed. R. Jarrige), John Libbey, London, UK.

- Iverius, P. H. et A. M. Ostlund-Lindqvist. 1976. Lipoprotein lipase from bovine milk. Isolation procedure, chemical characterization, and molecular weight analysis. *Journal of Biological Chemistry* 251(24):7791-7795.
- Iverson, S. J., M. Hamosh, et W. D. Bowen. 1995. Lipoprotein lipase activity and its relationship to high milk fat transfer during lactation in grey seals. *Journal of Comparative Physiology B* 165(5):384-395.
- Jellema, A. 1975. Note on susceptibility of bovine milk to lipolysis. *Netherlands Milk and Dairy Journal* 29(2-3):145-152.
- Jellema, A., A. Helsper, et B. Slaghuis. 1986. Partitioning of substances affecting lipolysis in milk. In *Milk the vital force*. International Dairy Congress:51.
- Jensen, D. R., S. Gavigan, V. Sawicki, D. L. Witsell, R. H. Eckel, et M. C. Neville. 1994. Regulation of lipoprotein lipase activity and mRNA in the mammary gland of the lactating mouse. *Biochemical Journal* 298(2):321-327.
- Jensen, H. B., N. A. Poulsen, H. S. Møller, A. Stensballe, et L. B. Larsen. 2012. Comparative proteomic analysis of casein and whey as prepared by chymosin-induced separation, isoelectric precipitation or ultracentrifugation. *Journal of Dairy Research* 79(4):451-458.
- Jensen, R. 1959. Spontaneous lipolysis in milk throughout the stages of lactation of individual cows. *Journal of Dairy Science* 42(9):1619-1621.
- Jones, D. F., W. P. Weiss, D. L. Palmquist, et T. C. Jenkins. 1998. Dietary fish oil for dairy cows: 1. Effects on milk fatty acid production and composition. *Special Circular - Ohio Agricultural Research and Development Center* (163):101-104.
- Jurczak, M. E. 1995. The effect of genetic factors, stage of lactation, season and feeding system on fat lipolysis in raw milk of Black-and-White cows and F 1 crosses of that breed with bulls of 4 varieties of Friesian cattle. *Annals of Warsaw Agricultural University, Animal Science* (31):17.
- Karray, N. L., S. Danthine, C. Blecker, et H. Attia. 2006. Contribution to the study of camel milk fat globule membrane. *International Journal of Food Science and Nutrition* 57(5-6):382-390.
- Kastli, P. 1973. Effect of oestrogens and pituitary gonadotrophins on milk. *Weiner Tierärztliche Monatsschrift* 60:43.
- Keenan, T. et D. Dylewski. 1995. Intracellular origin of milk lipid globules and the nature and the structure of the milk lipid membrane. *Advanced Dairy Chemistry-2: Lipids* 2:89.
- Keenan, T., T.-W. Moon, et D. Dylewski. 1983. Lipid globules retain globule membrane material after homogenization. *Journal of Dairy Science* 66(2):196-203.
- Keenan, T., D. J. Morr e, D. E. Olson, W. Yunghans, et S. Patton. 1970. Biochemical and morphological comparison of plasma membrane and milk fat globule membrane from bovine mammary gland. *The Journal of Cell Biology* 44(1):80-93.

- Khan, N. A., P. Q. Yu, M. Ali, J. W. Cone, et W. H. Hendriks. 2014. Nutritive value of maize silage in relation to dairy cow performance and milk quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 95(2):238-252.
- Kinsella, J. 1970. The milk fat globule membrane. A natural ready-made package. *American Dairy Review* 32(6):46-73.
- Kinsella, J. E. et G. Houghton. 1975. Phospholipids and fat secretion by cows on normal and low fiber diets: lactational trends. *Journal of Dairy Science* 58(9):1288-1293.
- Klei, L. R., J. M. Lynch, D. M. Barbano, P. A. Oltenacu, A. J. Lednor, et D. K. Bandler. 1997. Influence of milking three times a day on milk quality. *Journal of Dairy Science* 80(3):427-436.
- Knegsel, A. T. M. v., H. V. D. Brand, J. Dijkstra, S. Tamminga, et B. Kemp. 2005. Effect of dietary energy source on energy balance, production, metabolic disorders and reproduction in lactating dairy cattle. *Reproduction Nutrition Development* 45(6):665-688.
- Kolver, E., J. Roche, M. De Veth, P. d. Thorne, et A. Napper. 2002. Total mixed rations versus pasture diets: Evidence for a genotype x diet interaction in dairy cow performance. *Proceedings of New Zealand Society of Animal Production*. 199: 246-251.
- Kuratko, C. N., E. C. Barrett, E. B. Nelson, et S. Norman. 2013. The relationship of docosahexaenoic acid (DHA) with learning and behavior in healthy children: A review. *Nutrients* 5(7):2777-2810.
- Kuzdzal-Savoie, S., J. Auclair, R. Mourgues, et D. Langlois. 1975. La lipolyse dans le lait refroidi. *Lait* 55(548):530-543.
- Lacasse, P., J. J. Kennelly, L. Delbecchi, et C. E. Ahnadi. 2002. Addition of protected and unprotected fish oil to diets for dairy cows. I. Effects on the yield, composition and taste of milk. *Journal of Dairy Research* 69(4):511-520.
- Le Gall, A., E. Beguin, J. Dollé, V. Manneville, et A. Pflimlin. 2009. Nouveaux compromis techniques pour concilier efficacité économique et environnementale en élevage herbivore. *Fourrages* 198(1314):151.
- Le Guénic M., avec la collaboration de l'Institut de l'Élevage .2008. Lipolyse spontanée : quelques éclairages sur les risques estivaux. *Chambre d'agriculture de Bretagne*. N°26 juillet août.
- Leitch. 1932. Flavors in milk. *Scottish Journal of Agriculture* 15:167
- Littlejohn, M. D., C. G. Walker, H. E. Ward, K. B. Lehnert, R. G. Snell, G. A. Verkerk, R. J. Spelman, D. A. Clark, et S. R. Davis. 2010. Effects of reduced frequency of milk removal on gene expression in the bovine mammary gland. *Physiology Genomics* 41(1):21-32
- Livingstone, K. M., D. J. Humphries, P. Kirton, K. E. Kliem, D. I. Givens, et C. K. Reynolds. 2015. Effects of forage type and extruded linseed supplementation on methane production and milk fatty acid composition of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 98(6):4000-4011.
- Logan, A., M. Auldist, J. Greenwood, et L. Day. 2014. Natural variation of bovine milk fat globule size within a herd. *Journal of Dairy Science* 97(7):4072-4082.

- Loor, J. J. et J. H. Herbein. 2003. Reduced fatty acid synthesis and desaturation due to exogenous trans10, cis12-CLA in cows fed oleic or linoleic oil. *Journal of Dairy Science* 86(4):1354-1369.
- Loor, J. J., A. Ferlay, A. Ollier, K. Ueda, M. Doreau, et Y. Chilliard. 2005a. High-concentrate diets and polyunsaturated oils alter trans and conjugated isomers in bovine rumen, blood, and milk. *Journal of Dairy Science* 88(11):3986-3999.
- Loor, J. J., K. Ueda, A. Ferlay, Y. Chilliard, et M. Doreau. 2005b. Intestinal flow and digestibility of trans fatty acids and conjugated linoleic acids (CLA) in dairy cows fed a high-concentrate diet supplemented with fish oil, linseed oil, or sunflower oil. *Animal Feed Science and Technology* 119(3-4):203-225.
- Lopez, C., V. Briard-Bion, et O. Menard. 2014. Polar lipids, sphingomyelin and long-chain unsaturated fatty acids from the milk fat globule membrane are increased in milks produced by cows fed fresh pasture based diet during spring. *Food Research International* 58:59-68.
- Lopez, C., V. Briard-Bion, O. Ménard, E. Beaucher, F. Rousseau, J. Fauquant, N. Leconte, et B. Robert. 2011. Fat globules selected from whole milk according to their size: Different compositions and structure of the biomembrane, revealing sphingomyelin-rich domains. *Food Chemistry* 125(2):355-368.
- Lopez, C., V. Briard-Bion, O. Menard, F. Rousseau, P. Pradel, et J.-M. Besle. 2008. Phospholipid, sphingolipid, and fatty acid compositions of the milk fat globule membrane are modified by diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(13):5226-5236.
- Lopez, C., M.-N. Madec, et R. Jimenez-Flores. 2010. Lipid rafts in the bovine milk fat globule membrane revealed by the lateral segregation of phospholipids and heterogeneous distribution of glycoproteins. *Food Chemistry* 120(1):22-33.
- Lu, J., E. Antunes Fernandes, A. E. Páez Cano, J. Vinitwatanakhun, S. Boeren, T. van Hooijdonk, A. van Kneegsel, J. Vervoort, et K. A. Hettinga. 2013. Changes in milk proteome and metabolome associated with dry period length, energy balance, and lactation stage in postparturient dairy cows. *Journal of Proteome Research* 12(7):3288-3296.
- Lu, J., N. Argov-Argaman, J. Anggrek, S. Boeren, T. van Hooijdonk, J. Vervoort, et K. A. Hettinga. 2016. The protein and lipid composition of the membrane of milk fat globules depends on their size. *Journal of Dairy Science* 99(6):4726-4738.
- Lu, J., S. Boeren, T. van Hooijdonk, J. Vervoort, et K. Hettinga. 2015. Effect of the DGAT-1 K232A genotype of dairy cows on the milk metabolome and proteome. *Journal of Dairy Science* 98(5):3460-3469.
- Maarse, H. et C. A. Visscher. 1990. Volatile compounds in food: qualitative and quantitative data: supplement and cumulative index. TNO-CIVO Food Analysis Institute, Zeist, Netherlands.
- Maass. 1909. Extracts from the fourth annual report of the Dairy Research Laboratories at Jaroslav. *Milchwirtschaftliches Zentralblatt* 5: 329.

MacLeod, P., E.O. Anderson, L.R. Dowd, A.C. Smith, et L.R. Glazier. 1957. The effect of various pipeline milking conditions on the acid degree and flavor score of milk. *Journal of Milk and Food Technology* 20:185-188.

Mallia, S., F. Escher, et H. Schlichtherle-Cerny. 2008. Aroma-active compounds of butter: A review. *European Food Research Technology* 226(3):315-325.

Martin, B. et J. Coulon, B. 1995. Milk production and cheese characteristics. I. Influence of milk production conditions on herd milk clotting ability. *Lait* 75(1):61-80.

Martin, C., J. Rouel, J. P. Jouany, M. Doreau, et Y. Chilliard. 2008. Methane output and diet digestibility in response to feeding dairy cows crude linseed, extruded linseed, or linseed oil. *Journal of Animal Science* 86(10):2642-2650.

Martinez-Fernandez, L., L. M. Laiglesia, A. E. Huerta, J. A. Martinez, et M. J. Moreno-Aliaga. 2015. Omega-3 fatty acids and adipose tissue function in obesity and metabolic syndrome. *Prostaglandins and other lipid mediators* 121(Pt A):24-41.

Martinez-Micaelo, N., N. Gonzalez-Abuin, M. Mulero, M. Pinent, A. Ardevol, et M. Blay. 2015. Procyanidins and docosahexaenoic acid suppress inflammation and boost immune system in cafeteria diet-fed rats. *Journal of Functional Foods* 15:61-71.

Martini, M., F. Cecchi, C. Scolozzi, F. Salari, F. Chiatti, S. Chessa, et A. Caroli. 2006a. The influence of K-casein genetic polymorphism on morphometric characteristics of milk fat globules in Italian Friesian dairy cow. In: 8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. Belo Horizonte, Brazil.

Martini, M., F. Cecchi, C. Scolozzi, F. Salari, F. Chiatti, S. Chessa, et A. Caroli. 2006b. Morphometric characteristics of milk fat globules in Italian Friesian dairy cow. In: 8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. Belo Horizonte, Brazil.

Martini, M., F. Salari, et I. Altomonte. 2016. The macrostructure of milk lipids: the fat globules. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 56(7):1209-1221.

Mather, I. H. et T. W. Keenan. 1998. Origin and secretion of milk lipids. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 3(3):259-273.

McCarthy, R. D., T. H. Klusmeyer, J. L. Vicini, J. H. Clark, et D. R. Nelson. 1989. Effects of source of protein and carbohydrate on ruminal fermentation and passage of nutrients to the small intestine of lactating cows. *Journal of Dairy Science* 72(8):2002-2016.

McDaniel, M. R., L. A. Sather, et R. C. Lindsay. 1969. Influence of free fatty acids on sweet cream butter flavor. *Journal Food Science* 34(3):251-254.

McLean, D. M., E. B. Graham, R. W. Ponzoni, et H. A. McKenzie. 1984. Effects of milk protein genetic variants on milk yield and composition. *Journal of Dairy Research* 51(04):531-546.

McManaman, J. L., T. D. Russell, J. Schaack, D. J. Orlicky, et H. Robenek. 2007. Molecular determinants of milk lipid secretion. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 12(4):259-268.

- McNamara, J. P., D. C. McFarland, et S. Bai. 1987. Regulation of bovine adipose tissue metabolism during lactation. 3. Adaptations of hormone sensitive and lipoprotein lipases. *Journal of Dairy Science* 70(7):1377-1384.
- McNeill, G. P., A. O'Donoghue, et J. F. Connolly. 1986. Quantification and identification of flavour components leading to lipolytic rancidity in stored butter. *Irish Journal of Food Science and Technology* 10(1):1-10.
- McPherson, A. V. et B. J. Kitchen. 1983. Reviews of the progress of dairy science: The bovine milk fat globule membrane—its formation, composition, structure and behaviour in milk and dairy products. *Journal of Dairy Research* 50(01):107-133.
- McSweeney, P. L. 2004. Biochemistry of cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology*. 57(2-3):127-144.
- McSweeney, P. L. H. et M. J. Sousa. 2000. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. *Lait* 80(3):293-324.
- Ménard, O., S. Ahmad, F. Rousseau, V. Briard-Bion, F. Gaucheron, et C. Lopez. 2010. Buffalo vs. cow milk fat globules: Size distribution, zeta-potential, compositions in total fatty acids and in polar lipids from the milk fat globule membrane. *Food Chemistry* 120(2):544-551.
- Mesilati-Stahy, R. et N. Argov-Argaman. 2014. The relationship between size and lipid composition of the bovine milk fat globule is modulated by lactation stage. *Food Chemistry* 145:562-570.
- Michalski, M. C., R. Cariou, F. Michel, et C. Garnier. 2002. Native vs. damaged milk fat globules: membrane properties affect the viscoelasticity of milk gels. *Journal of Dairy Science* 85(10):2451-2461.
- Michalski, M. C., M. Ollivon, V. Briard, N. Leconte, et C. Lopez. 2004. Native fat globules of different sizes selected from raw milk: thermal and structural behavior. *Chemistry and Physics of Lipids* 132(2):247-261.
- Moio, L., J. Dekimpe, P. Etievant, et F. Addeo. 1993. Neutral volatile compounds in the raw milks from different species. *Journal of Dairy Research* 60(02):199-213.
- Mondy, B. L. et T. Keenan. 1993. Butyrophilin and xanthine oxidase occur in constant molar proportions in milk lipid globule membrane but vary in amount with breed and stage of lactation. *Protoplasma* 177(1-2):32-36.
- Mulder, H. et P. Walstra. 1974. The milk fat globule. Emulsion science as applied to milk products and comparable foods. No. 4. Wageningen, Netherlands, Centre for Agricultural Publishing and Documentation.
- Murphy, J. J., J. F. Connolly, et D. R. Headon. 1979. A study of factors associated with free fatty acid development in milk. *Irish Journal of Food Science and Technology* 3(2):131-149.
- Mustafa, A. F., P. Y. Chouinard, et D. A. Christensen. 2003. Effects of feeding micronised flaxseed on yield and composition of milk from Holstein cows. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83(9):920-926.

- Needs, E. C., M. Anderson, et S. V. Morant. 1986. Interaction of factors which influence the extent of lipolysis during milking and storage of raw milk. *Journal of Dairy Research* 53(02):203-210.
- Neveu, C., B. Baurhoo, et A. Mustafa. 2013. Effect of feeding extruded flaxseed with different forage:concentrate ratios on the performance of dairy cows. *Journal of Dairy Science* 96(6):3886-3894.
- Nguyen, D., N. Beeman, et M. C. Neville. 2001. Regulation of tight junction permeability in the mammary gland. *Journal of Endocrinology*. 170:395-414.
- Nguyen, H. T. H., M. N. Madec, L. Ong, S. E. Kentish, S. L. Gras, et C. Lopez. 2016. The dynamics of the biological membrane surrounding the buffalo milk fat globule investigated as a function of temperature. *Food Chemistry* 204:343-351.
- Nicolas, C. 1992. Caractérisation de la membrane plasmique adipocytaire chez le porc. Influence des lipides alimentaires, de la castration et de la localisation du dépôt adipeux sur la structure membranaire et les activités adénylate cyclase et 5 nucléotidase. PhD.
- Nursten, H. E. 1997. The flavour of milk and dairy products .1. Milk of different kinds, milk powder, butter and cream. *International Journal of Dairy Technology*. 50(2):48-56.
- O'Brien, B., S. Crosse, et P. Dillon. 1996. Effects of offering a concentrate or silage supplement to grazing dairy cows in late lactation on animal performance and on milk processability. *Irish Journal of Agricultural and Food Research* 35(2):113-125.
- Oeffner, S. P., Y. Qu, J. Just, N. Quezada, E. Ramsing, M. Keller, G. Cherian, L. Goddick, et G. Bobe. 2013. Effect of flaxseed supplementation rate and processing on the production, fatty acid profile, and texture of milk, butter, and cheese. *Journal of Dairy Science* 96(2):1177-1188.
- Oikonomou, G., K. Angelopoulou, G. Arsenos, D. Zygoiannis, et G. Banos. 2009. The effects of polymorphisms in the DGAT-1, leptin and growth hormone receptor gene loci on body energy, blood metabolic and reproductive traits of Holstein cows. *Animal Genetics* 40(1):10-17.
- Olivecrona, T. 1980. Biochemical aspects of lipolysis in bovine milk. *Bulletin of the International Dairy Federation*. Doc 118:19.
- Olivecrona, T. et G. Bengtsson-Olivecrona. 1987. Lipoprotein lipase from milk-the model enzyme in lipoprotein lipase research. *Lipoprotein lipase: Evener Publishers, Chicago*. p 15-58.
- Olivecrona, T. et U. Lindahl. 1969. The occurrence of a heparin-like glycosaminoglycan in bovine milk and its possible association with lipoprotein lipase. *Acta Chemica Scandinavica* 23(10): 3587-3589
- Olivecrona, T., S. Vilaro, et G. Olivecrona. 2003. Lipases in milk. in *Advanced Dairy Chemistry—1 Proteins*. Springer, Berlin. p 473-494
- Ollivier-Bousquet, M. 2002. Milk lipid and protein traffic in mammary epithelial cells: joint and independent pathways. *Reproduction Nutrition Development* 42(2):149-162.
- Osborne, J. C., G. Bengtsson-Olivecrona, N. S. Lee, et T. Olivecrona. 1985. Studies on inactivation of lipoprotein lipase: role of the dimer to monomer dissociation. *Biochemistry* 24(20):5606-5611.

- Palmer. 1920. The enzymes of milk and their relations to abnormal flavors. Missouri Agricultural Experiment Station, Bulletin 172.
- Palmquist, D. L. et J. M. Griinari. 2006. Milk fatty acid composition in response to reciprocal combinations of sunflower and fish oils in the diet. *Animal Feed Science and Technology* 131(3-4):358-369.
- Pâquet, D. 1989. Review: the proteose-peptone fraction of milk. *Lait* 69:1-21
- Park, Y. W. 2009. Bioactive components in milk and dairy products. Ed John Wiley & Sons, New York, USA.
- Patton, S. 1964. Flavor thresholds of volatile fatty acids. *Journal of Food Science* 29(5):679-680.
- Patton, S., C. Long, et T. Sooka. 1980. Effect of storing milk on cholesterol and phospholipid of skim milk. *Journal of Dairy Science* 63(5):697-700.
- Payens, T., J. Koops, et M. K. Mogot. 1965. Adsorption of euglobulin on agglutinating milk fat globules. *Biochimica and Biophysica Acta (BBA)-Biophysics including Photosynthesis* 94(2):576-578.
- Peterson, D. G., E. A. Matitashvili, et D. E. Bauman. 2003. Diet-induced milk fat depression in dairy cows results in increased trans-10, cis-12 CLA in milk fat and coordinate suppression of mRNA abundance for mammary enzymes involved in milk fat synthesis. *The Journal of Nutrition* 133(10):3098-3102.
- Petit, H. V. 2015. Milk production and composition, milk fatty acid profile, and blood composition of dairy cows fed different proportions of whole flaxseed in the first half of lactation. *Animal Feed Science and Technology* 205:23-30.
- Peyraud, J. L. et R. Delagarde. 2013. Managing variations in dairy cow nutrient supply under grazing. *Animal* 7(1):57-67.
- Pflimlin, A., P. Faverdin, et C. Béranger. 2009. Un demi-siècle d'évolution de l'élevage bovin, Bilan perspectives. *Fourrages* 200:429-464.
- Pien, J. 1969. Dosage du phosphore dans le lait. *Lait* 49(483-484):175-188.
- Pierre, A. et M. Douin. 1984. Eléments d'étude du procédé Bridel de fabrication de caséine à partir de lait décactionisé par échanges d'ions (EI). *Lait* 64(645-646):521-536.
- Plaut, K. et T. Casey. 2012. Does the circadian system regulate lactation? *Animal* 6(3):394-402.
- Plourde, M. et S. C. C. Cunnane. 2007. Extremely limited synthesis of long chain polyunsaturates in adults: implications for their dietary essentiality and use as supplements. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism* 32(4):619-634.
- Pomiès, D., B. Martin, Y. Chilliard, P. Pradel, et B. Rémond. 2007. Once-a-day milking of Holstein and Montbéliarde cows for 7 weeks in mid-lactation. *Animal* 1(10):1497-1505.

- Posner, I. et J. Desanctis. 1987. The effects of bovine serum albumine and oleic acid on rat pancreatic lipase and bovine milk lipoprotein lipase. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 87(1):137-141.
- Raison, C., H. Chambault, A. Le Gall, et A. Pflimlin. 2008. Impact du système fourrager sur la qualité des eaux. *Enseignements issus du projet Green Dairy. Fourrages* 193:3-18.
- Ray, P., K. Chatterjee, C. Chakraborty, et P. Ghatak. 2013. Lipolysis of milk: A review. *International Journal of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine* 1(1):58-74.
- Reinhardt, T. A. et J. D. Lippolis. 2006. Bovine milk fat globule membrane proteome. *Journal of Dairy Research* 73(04):406-416.
- Rémond, B. et D. Pomiès. 2005. Once-daily milking of dairy cows: a review of recent French experiments. *Animal Research*. 54(6):427-442.
- Rémond, B., D. Pomiès, D. Dupont, et Y. Chilliard. 2004. Once-a-day milking of multiparous Holstein cows throughout the entire lactation: milk yield and composition, and nutritional status. *Animal research* 53(3):201-212.
- Renner, E. 1983. Milk and dairy products in human nutrition. *Volkswirtschaftlicher Verlag, Munich*, p190-216.
- Rombaut, R. et K. Dewettinck. 2006. Properties, analysis and purification of milk polar lipids. *International Dairy Journal* 16(11):1362-1373.
- Roumeas, A., N. Gaudillière, F. Dubief, H. Adam, P. Belot, et L. Delaby. 2014. Pic de lactation, persistance et lien avec les performances de reproduction de vaches Montbéliarde en Franche-Comté. *Rencontres Recherches Ruminants* 21:277-280.
- Ruf, T. et W. Arnold. 2015. Daily and seasonal rhythms in human mucosa phospholipid fatty acid composition. *Journal of Biological Rhythms* 30(4):331-341.
- Russell, T. D., C. A. Palmer, D. J. Orlicky, A. Fischer, M. C. Rudolph, M. C. Neville, et J. L. McManaman. 2007. Cytoplasmic lipid droplet accumulation in developing mammary epithelial cells: roles of adipophilin and lipid metabolism. *Journal of Lipid Research* 48(7):1463-1475.
- Rychlik, M., M. Sax, et P. Schieberle. 2006. On the role of short-chain free fatty acids for the development of a cheese-like off-note in pasteurized yoghurt. *Food Science and Technology* 39(5):521-527.
- Salih, A. M. A. et M. Anderson. 1979. Effect of diet and stage of lactation on bovine milk lipolysis. *Journal of Dairy Research* 46(4):623-631.
- Santos, M. V., Y. Ma, Z. Caplan, et D. M. Barbano. 2003. Sensory threshold of off-flavors caused by proteolysis and lipolysis in milk. *Journal of Dairy Science* 86(5):1601-1607.
- SAS 2005. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

- Scanlan, R. A., L. A. Sather, et E. A. Day. 1965. Contribution of free fatty acids to flavor of rancid milk. *Journal of Dairy Science* 48(12):1582-1584
- Schaar, J. 1985. Plasmin activity and proteose-peptone content of individual milks. *Journal of Dairy Research* 52(03):369-378.
- Schennink, A., W. M. Stoop, M. H. P. W. Visker, J. M. L. Heck, H. Bovenhuis, J. J. Van Der Poel, H. J. F. Van Valenberg, et J. A. M. Van Arendonk. 2007. DGAT-1 underlies large genetic variation in milk-fat composition of dairy cows. *Animal Genetics* 38(5):467-473.
- Schopen, G. C. B., M. H. P. W. Visker, P. D. Koks, E. Mullaart, J. A. M. v. Arendonk, et H. Bovenhuis. 2011. Whole-genome association study for milk protein composition in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 94(6):3148-3158.
- Scow, R. O. et S. S. Chernick. 1987. Role of lipoprotein lipase during lactation. *Lipoprotein lipase*:149-185.
- Scow, R. O. et T. Olivecrona. 1977. Effect of albumin on products formed from chylomicron triacylglycerol by lipoprotein lipase in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism* 487(3):472-486.
- Sehayek, E., T. Olivecrona, G. Bengtsson-Olivecrona, I. Vlodaysky, H. Levkovitz, R. Avner, et S. Eisenberg. 1995. Binding to heparan sulfate is a major event during catabolism of lipoprotein lipase by HepG2 and other cell cultures. *Atherosclerosis* 114(1):1-8.
- Shand, J., H West, David, W. 1989. Co-ordinate diurnal variations in the activities of cholesterol-metabolizing enzymes in the rat mammary gland. *Biochemical Society Transactions* 17(6):1081-1082.
- Shields, S. L., P. Rezamand, D. L. Sevier, K. S. Seo, W. Price, et M. A. McGuire. 2011. Effects of increased milking frequency for the first 21 days post partum on selected measures of mammary gland health, milk yield and milk composition. *Journal of Dairy Research* 78(03):301-307.
- Shimizu, M., H. Miyaji, et K. Yamauchi. 1982. Inhibition of lipolysis by milk fat globule membrane materials in model milk fat emulsion. *Agricultural and Biological Chemistry* 46(3):795-799.
- Shimizu, M., N. Uryu, et K. Yamauchi. 1981. Presence of heparan sulfate in the fat globule membrane of bovine and human milk. *Agricultural and Biological Chemistry* 45(3):741-745.
- Shingfield, K. J., L. Bernard, C. Leroux, et Y. Chilliard. 2010. Role of trans fatty acids in the nutritional regulation of mammary lipogenesis in ruminants. *Animal* 4(7):1140-1166.
- Shipe, W. F., R. Bassette, D. D. Deane, W. L. Dunkley, E. G. Hammond, W. J. Harper, D. H. Kleyn, M. E. Morgan, J. H. Nelson, et R. A. Scanlan. 1978. Off flavors of milk: nomenclature, standards, and bibliography. *Journal of Dairy Science* 61(7):855-869.
- Shipe, W. F., G. F. Senyk, et K. B. Fountain. 1980. Modified copper soap solvent extraction method for measuring free fatty acids in milk. *Journal of Dairy Science* 63(2):193-198.
- Silvestre, A. M., A. M. Martins, V. A. Santos, M. M. Ginja, et J. A. Colaço. 2009. Lactation curves for milk, fat and protein in dairy cows: A full approach. *Livestock Science* 122(2-3):308-313.

- Singer, S. et G. L. Nicolson. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Membranes and Viruses in Immunopathology*; Day, SB, Good, RA, Eds:7-47.
- Spelman, R. J., C. A. Ford, P. McElhinney, G. C. Gregory, et R. G. Snell. 2002. Characterization of the DGAT-1 gene in the New Zealand dairy population. *Journal of Dairy Science* 85(12):3514-3517.
- Stadhouders, J. 1972. Technological aspects of the quality of raw milk. NIZO-Verslagennr, Ede. 136.
- Stadnik, L., J. Duchacek, R. Tousova, J. Beran, M. Ptacek, et L. Kourimska. 2015. Relations between basic milk components and free fatty acid content in Holstein cow milk as lipolysis parameter. *Mljekarstvo* 65(1):18-25.
- Stelwagen, K., V. C. Farr, H. A. McFadden, C. G. Prosser, et S. R. Davis. 1997. Time course of milk accumulation-induced opening of mammary tight junctions, and blood clearance of milk components. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 273(1):R379-R386.
- Stelwagen, K., C. V. C. Phyn, S. R. Davis, J. Guinard-Flament, D. Pomies, J. R. Roche, et J. K. Kay. 2013. Reduced milking frequency: Milk production and management implications. *Journal of Dairy Science* 96(6):3401-3413.
- Stobbs, T. H., H. C. Deeth, et C. H. Fitz-Gerald. 1973. Effect of energy intake on spontaneous lipolysis in milk from cows in late lactation. *Australian Journal of Dairy Technology* 28(4):170-172.
- Stoop, W. M., H. Bovenhuis, J. M. L. Heck, et J. A. M. van Arendonk. 2009. Effect of lactation stage and energy status on milk fat composition of Holstein-Friesian cows. *Journal of Dairy Science* 92(4):1469-1478.
- Sundheim, G. 1988a. Spontaneous lipolysis in bovine milk with special reference to lipoprotein lipase et its mode of action in milk. Spontaneous lipolysis in bovine milk with special reference to lipoprotein lipase and its mode of action in milk.:8 pp.
- Sundheim, G. 1988b. Spontaneous lipolysis in bovine milk: combined effects of cream, skim milk, and lipoprotein lipase activity. *Journal of Dairy Science* 71(3):620-626.
- Sundheim, G. et G. Bengtsson-Olivecrona. 1985. Lipolysis in milk induced by cooling or by heparin: comparisons of amount of lipoprotein lipase in the cream fraction and degree of lipolysis. *Journal of Dairy Science* 68(3):589-593.
- Sundheim, G. et G. Bengtsson-Olivecrona. 1987. Isolated milk fat globules as substrate for lipoprotein lipase: study of factors relevant to spontaneous lipolysis in milk. *Journal of Dairy Science* 70(3):499-505.
- Sundheim, G. et G. Bengtsson-Olivecrona. 1987a. Hydrolysis of bovine milk fat globules by lipoprotein lipase: inhibition by proteins extracted from milk fat globule membrane. *Journal of Dairy Science* 70(9):1815-1821.
- Sundheim, G. et G. Bengtsson-Olivecrona. 1987b. Methods to assess the propensity of milk fat globules toward lipolysis and the ability of skim milk to inhibit lipolysis. *Journal of Dairy Science* 70(10):2040-2045.

- Sundheim, G. et G. Bengtsson-Olivecrona. 1987c. Isolated milk fat globules as substrate for lipoprotein lipase- study of factors relevant to spontaneous lipolysis in milk. *Journal of Dairy Science* 70(3):499-506.
- Sundheim, G., T. L. Zimmer, et H. N. Astrup. 1983. Induction of milk lipolysis by lipoprotein components of bovine blood serum. *Journal of Dairy Science* 66(3):400-406.
- Sympoura, F., A. Cornu, P. Tournayre, T. Massouras, J. Berdagué, et B. Martin. 2009. Odor compounds in cheese made from the milk of cows supplemented with extruded linseed and α -tocopherol. *Journal of Dairy Science* 92(7):3040-3048.
- Tarassuk, N. et E. Frankel. 1957. The specificity of milk lipase. IV. Partition of the lipase system in milk. *Journal of Dairy Science* 40(4):418-430.
- Thaller, G., W. Kramer, A. Winter, B. Kaupe, G. Erhardt, et R. Fries. 2003. Effects of DGAT-1 variants on milk production traits in German cattle breeds. *Journal Animal Science* 81(8):1911-1918.
- Thiam, A. R., R. V. Farese Jr, et T. C. Walther. 2013. The biophysics and cell biology of lipid droplets. *Nature reviews Molecular cell biology* 14(12):775-786.
- Thivend, P., C. Mercier, et A. Guilbot. 1965. Dosage de l'amidon dans les milieux complexes. Pages 513-526 in *Proc. Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique*. EDP Sciences.
- Thompson, M., J. Brunner, C. Stine, et K. Lindquist. 1961. Lipid components of the fat-globule membrane. *Journal of Dairy Science* 44(9):1589-1596.
- Thomson, N. A., W. C. Van der Poel, M. W. Woolford, et M. J. Auldist. 2005. Effect of cow diet on free fatty acid concentrations in milk. *New Zealand Journal Agric. Res.* 48(3):301-310.
- Toušová, R., L. Stádník, et J. Ducháček. 2013. Effect of season and the time of milking on spontaneous and induced lipolysis in bovine milk fat. *Czech Journal of Food Science* 31(1):20-26.
- Urbach, G. 1990. Effect of feed on flavor in dairy foods. *Journal of Dairy Science* 73(12):3639-3650.
- van Knegsel, A. T., H. Van den Brand, J. Dijkstra, S. Tamminga, et B. Kemp. 2005. Effect of dietary energy source on energy balance, production, metabolic disorders and reproduction in lactating dairy cattle. *Reproduction Nutrition Development* 45(6):665-688.
- Van Soest, P. v., J. Robertson, et B. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* 74(10):3583-3597.
- Vanbergue, E., L. Delaby, S. Colette, Y. Gallard, et C. Hurtaud. 2015. Effect of breed, energy level of diet, and lactation stage on the evolution of milk lipolysis in dairy cow. In: 2015 Joint annual meeting abstract book (p. 552). *Journal of dairy science* 98. Suppl. 2. ADSA-ASAS Joint Annual Meeting, Orlando, USA.
- Vanbergue, E., J. L. Peyraud, J. Guinard-Flament, C. Charton, S. Barbey, R. Lefebvre, Y. Gallard, et C. Hurtaud. 2016. Effects of DGAT-1 K232A polymorphism and milking frequency on milk composition and spontaneous lipolysis in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 99(7):5739-5749.

- Wagh, P. V. et T. Olivecrona. 1978. The in vitro inhibition of bovine milk lipoprotein lipase by a glycoprotein preparation from human atherosclerotic intima. *Atherosclerosis* 29(2):195-204.
- Wal, J. M. 1998. Cow's milk allergens. *Allergy* 53(11):1013-1022.
- Walsh, S., F. Buckley, K. Pierce, N. Byrne, J. Patton, et P. Dillon. 2008. Effects of breed and feeding system on milk production, body weight, body condition score, reproductive performance, and postpartum ovarian function. *Journal of Dairy Science* 91(11):4401-4413.
- Walstra, P. et R. Jenness. 1984. *Dairy chemistry and physics*. John Wiley & Sons. New York, USA.
- Wang, L. et H. Randolph. 1978. Activation of lipolysis. I. Distribution of lipase activity in temperature activated milk. *Journal of Dairy Science* 61(7):874-880.
- Wang, X. P., Z. M. Luoreng, F. Li, J. R. Wang, N. Li, et S. H. Li. 2012. Genetic polymorphisms of lipoprotein lipase gene and their associations with growth traits in Xiangxi cattle. *Molecular Biology Reports* 39(12):10331-10338.
- Wiking, L., J. H. Nielsen, A. K. Båvius, A. Edvardsson, et K. Svennersten-Sjaunja. 2006. Impact of milking frequencies on the level of free fatty acids in milk, fat globule size, and fatty acid composition. *Journal of Dairy Science* 89(3):1004-1009.
- Wilkinson, M. G. 2007. Lipolysis and cheese flavour development. in *Improving the Flavour of Cheese*. B. C. Weimer, ed. Woodhead Publ Ltd, Cambridge. pp 102-120.
- Woo, A., S. Kollodge, et R. Lindsay. 1984. Quantification of major free fatty acids in several cheese varieties. *Journal of Dairy Science* 67(4):874-878.
- Woo, A. et R. Lindsay. 1984. Concentrations of major free fatty acids and flavor development in Italian cheese varieties. *Journal of Dairy Science* 67(5):960-968.
- Woo, A. H. et R. C. Lindsay. 1983. Statistical correlation of quantitative flavor intensity assessments and individual free fatty acid measurements for routine detection and prediction of hydrolytic rancidity off-flavors in butter. *Journal of Food Science*. 48(6):1761-1766.
- Wooding, F. 1971a. The mechanism of secretion of the milk fat globule. *Journal of Cell Science* 9(3):805-821.
- Wooding, F. 1971b. The structure of the milk fat globule membrane. *Journal of Ultrastructure Research* 37(3-4):388-400.
- Wuthrich, S., R. Richterich et H Hostettler. 1963. Untersuchungen über Milchenzyme. 1. Enzyme in Kuhmilch und Frauenmilch. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* 124, 336-348.
- Yaqoob, P. 2009. The nutritional significance of lipid rafts. *Annual review of nutrition*, 29, 257-282.
- Yaguchi, M. et N. Tarassuk. 1963. Distribution of lipase in milk proteins. *Proceedings of Journal of Dairy Science* 46(6):597.
- Yang, J., B. Zhao, V. Baracos, et J. Kennelly. 2005. Effects of bovine somatotropin on β -casein mRNA levels in mammary tissue of lactating cows. *Journal of Dairy Science* 88(8):2806-2812.

Ye, A., H. Singh, M. W. Taylor, et S. Anema. 2002. Characterization of protein components of natural and heat-treated milk fat globule membranes. *International Dairy Journal* 12(4):393-402.

Annexes

Annexe 1

ADSA – Orlando, Florida, USA – 2015/07/13-16

Effect of breed, energy level of diet, and lactation stage on the evolution of milk lipolysis in dairy cow.

E. Vanbergue^{1,2}, L. Delaby¹, S. Colette³, Y. Gallard³, and C. Hurtaud¹

¹INRA-Agrocampus Ouest, UMR1348 PEGASE, F-35590 SAINT-GILLES, France, ²Institut de l'Élevage, Monvoisin, F-35650 LE RHEU, France, ³INRA, Domaine du Pin-au-Haras, F-61310 EXMES, France

Spontaneous lipolysis is the result of the activity of a native milk enzyme, the lipoprotein lipase. Lipolysis leads to a release of free fatty acids (FFA) that cause rancid flavor in milk products. A trial was carried out to study the effects of breed, energy levels, and lactation stage on milk spontaneous lipolysis in dairy cows. Sixty-four cows were used through a year of lactation. Cows were divided into 4 homogenous groups according to their breed (Holstein (HO) or Normande (NO)) and to their feeding system: the intensive system, with a high energy diet (HED) (in winter, corn silage with 30% concentrate; otherwise, pasture with 4 kg/d of concentrate) and the grass system (GS) (in winter, conserved grass with no concentrate; otherwise, pasture with no concentrate). The period of calving was synchronized between January and March. Individual milk samples were collected every month from both morning and evening milkings. The FFA levels were determined by the difference between the FFA levels after milking and the FFA after 24 h of storage at 4° C. Data were analyzed using SAS mixed procedure. We showed that FFA levels were higher in the evening milks (0.45 vs 0.25 mEq/100 g of fat, $p < 0.001$) and that evening milks were more susceptible to lipolysis variations. HO cows were more susceptible to lipolysis than NO (0.34 vs 0.20 mEq/100 g of fat, in morning milks; 0.62 vs 0.33 mEq/100 g of fat in evenings milks, $p < 0.001$). There was no effect of the feeding system on morning milks lipolysis but GS had a tendency to increase milk lipolysis in evening milks (0.41 vs 0.55 mEq/100 g of fat, $p = 0.06$). Lipolysis was higher in early and late lactation stage, particularly in the GS group. Conserved grass may also impact the lipolysis rate. The energy status in early and late lactation stage is frequently negative so the cows may be more susceptible to a low energy diet. No correlation was found between lipolysis and milk fat content. Poor correlations ($r < 0.4$, $p < 0.001$) were found between lipolysis and milk production, fat globule size, proportion of fatty acid and protein composition, body condition and weight.

Key words: spontaneous milk lipolysis, production factors

Annexe 2

Questionnaire « enquête en élevage » : effets des pratiques d'élevage sur la lipolyse du lait chez la vache laitière

ENQUETE SUR LA LIPOLYSE DU LAIT

Questionnaire destiné aux adhérents au contrôle laitier

1) Nom :
.....

Effet vache / lactation / stade de gestation

2) Combien de vaches laitières avez-vous ?
Primipares :
Multipares :

3) Quelles races possédez-vous ?
 Normandes, Nb : Holstein, Nb : Autres, Nb :

4) Quel est le volume de lait produit par an ?
.....

5) A partir de quel seuil de production tarissez-vous vos vaches ?
.....

6) Tableau par mois et Alimentation / santé 2^{ème} page

Pratique de la traite

7) Système de traite :
 Roto Epis TPA Nb de places :
.....

8) Combien de traites par jour ?
.....

Pratiquez-vous la monotraite au moins une fois dans la semaine ?
 Oui Non

Si oui, quand ?
.....

9) Heure début et fin de la première traite ?
.....

10) Heure début et fin de la deuxième traite ?
.....

11) En quelle année avez-vous construit votre salle de traite ?

Année de construction : Dernière rénovation :

Hygiène de traite

12) Utilisation de lavettes individuelles ?
 Oui Non

13) Utilisation de produits de pré-trempeage ?

Oui Non

14) Faites-vous les premiers jets ?

Oui Non

15) Utilisez-vous un produit post-traite ?

Oui Non

Matériel de traite

16) Quel type de manchons trayeurs utilisez-vous ? (matériau)

Silicone Caoutchouc Autres :

17) Fréquence de renouvellement des manchons trayeurs ?
.....

18) Fréquence d'entretien des prises d'air sur les griffes ?
.....

19) Nombre de lactoducs ?
.....

Position :

Ligne haute Ligne basse

Longueur (en m) :

Diamètre (en cm) :

20) Volume du tank (en L) :
.....

21) Distance entre tank et la fin de la salle de traite (en m) ?
.....

22) Arrivée du lait dans le tank ?

Vers le haut Vers le bas

23) Température du tank (en °C) ?
.....

24) Avez-vous un pré-refroidisseur ?

Oui Non

6)

| | Lipolyse | TP | TB | Cellules | Production d'une vache moyenne (kg) | Mammites | Stade lactation (jours) |
|---------------------|----------|----|----|----------|-------------------------------------|----------|-------------------------|
| OCTOBRE 14 | | | | | | | |
| NOVEMBRE 14 | | | | | | | |
| DECEMBRE 14 | | | | | | | |
| JANVIER 15 | | | | | | | |
| FEVRIER 15 | | | | | | | |
| MARS 15 | | | | | | | |
| AVRIL 15 | | | | | | | |
| MAI 15 | | | | | | | |
| JUIN 15 | | | | | | | |
| JUILLET | | | | | | | |
| AOÛT 15 | | | | | | | |
| SEPTEMBRE 15 | | | | | | | |

6) Quelle ration est utilisée pour les vaches laitières ? (données à indiquer en % de la ration journalière)

Octobre 2014 :

Novembre 2014 :

Décembre 2014 :

Janvier 2015 :

Février 2015 :

Mars 2015 :

Avril 2015 :

Mai 2015 :

Juin 2015 :



Juillet 2015 :

Août 2015 :

Septembre 2015 :


Annexe 3

Rencontres Recherche Ruminant – Paris – 8-9/12/2016

Enquêtes sur les pratiques d'élevage en relation avec la lipolyse dans les exploitations de bovins laitiers

PAËS C. (1)*, RENOARD A. (1)*, TAUSSAT S. (1)*,
POULET J.-L. (2), HURTAUD C. (1), VANBERGUE E. (1,2)





La **lipolyse** correspond à une **dégradation des triglycérides du lait** pouvant **altérer la qualité du lait** et des **produits laitiers**. Deux types de lipolyse coexistent dans les premières 24 h suivant la traite : la **lipolyse spontanée**, liée à l'animal et aux systèmes d'élevage et la **lipolyse induite**, due aux chocs mécaniques et/ou thermiques subis lors de la traite et du stockage du lait. Actuellement, chez la vache laitière, **les techniciens laitiers manquent de références** pour expliquer les variations des niveaux de lipolyse dans les élevages. Cette enquête a eu pour objectif de mieux **identifier les différents facteurs associés aux lipolyse** spontanée et induite dans 3 territoires français.

Méthodologie d'enquête

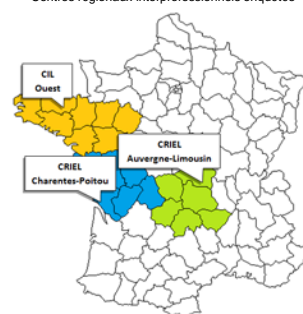
⇒ **Enquête téléphonique** auprès d'éleveurs adhérents à un organisme de contrôle de performance officiel via un questionnaire organisé en 4 parties :

Sur la campagne oct 2014 / sept 2015



- 1) **descriptif du troupeau** (races, production laitière, ...),
- 2) **relevé des données mensuelles de lipolyse, TP, TB et cellules**,
- 3) **conduite du troupeau** (rations, période des vêlages, fréquence et intervalle de traite, ...),
- 4) **descriptif de l'installation de traite** (position du lactoduc de traite, volume du tank à lait, ...) complété par les données des contrôles Opti'Traite® (= audits réguliers des machines à traire)

Centres régionaux interprofessionnels enquêtés



⇒ **Analyses statistiques** sous R des réponses de **67 élevages**

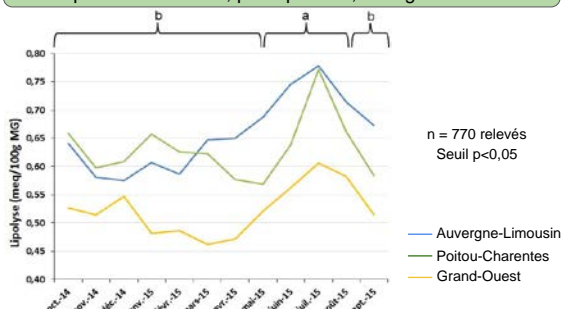
Etude des liens entre résultats de lipolyse, facteurs de lipolyse spontanée et de lipolyse induite par analyses de variance et régressions linéaires

Résultats & Discussion

Lipolyse spontanée

Hausse de lipolyse en été

Cause possible : chaleur, photopériode, changement de ration



Effet de la composition de la ration

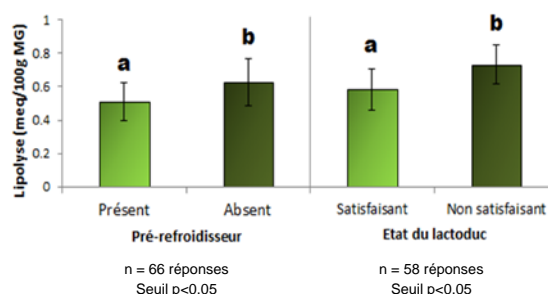
- Apport de tourteau de soja → lipolyse faible (p<0,05)
- L'équilibre énergétique et azoté de la ration influencerait la lipolyse du lait de vache

✗ Pas d'effet des caractéristiques du troupeau (parité, productivité) sur l'échantillon testé

Lipolyse induite

2 caractéristiques du matériel de traite ont un effet significatif sur les valeurs de lipolyse :

- L'état de satisfaction du lactoduc (combinaison de la pente, du diamètre et de l'état approprié du lactoduc évalué lors du contrôle Opti'Traite®)
- La présence ou non d'un pré-refroidisseur



✗ Pas d'effet des mesures d'hygiène avant et après la traite sur l'échantillon testé

Conclusion

La **saison** (été) et l'**alimentation** (déséquilibre protéique et énergétique de la ration) pourraient **augmenter les valeurs de lipolyse**. La **bonne conformité du lactoduc** de traite et l'**utilisation d'un pré-refroidisseur** seraient associées à des plus **faibles valeurs de lipolyse**. Une étude sur un plus grand nombre d'échantillons est désormais nécessaire pour **confirmer les facteurs identifiés** et, à terme, **proposer des recommandations aux acteurs** de la filière.

*Ces auteurs ont contribué de façon équivalente au projet

(1) : PEGASE, INRA, Agrocampus Ouest, 35590 Saint Gilles
(2) : Institut de l'Élevage, Monvoisin - BP 85225, 35652 Le Rheu



RENCONTRES
RECHERCHES
RUMINANTS



Sincères remerciements aux éleveurs volontaires pour le temps qu'ils ont consacré à cette enquête

Annexe 4

Rencontre Recherche Ruminant – Paris – 3-4/12/2015

Effet du polymorphisme au locus diacylglycerol-O-transférase 1 (DGAT1) sur la lipolyse spontanée, dans un contexte de variation de la fréquence de traite.

VANBERGUE E. (1) (2) (3), GUINARD-FLAMENT J. (2) (1), BARBEY S. (4), CHARTON C. (2) (6), LEFEBVRE R. (5), GALLARD Y. (4) et HURTAUD C. (1) (2)

(1) INRA UMR1348 Physiologie, Environnement, Génétique pour l'Animal et les Systèmes d'Elevage (PEGASE), F-35590 Saint-Gilles, France

(2) Agrocampus Ouest UMR1348 Physiologie, Environnement, Génétique pour l'Animal et les Systèmes d'Elevage (PEGASE), F-35000 Rennes, France

(3) Institut de l'élevage, Monvoisin, F-35910 Le Rheu, France

(4) INRA, Domaine du Pin-au-Haras, F-61310 Exmes, France

(5) INRA, UMR1313 Génétique Animale et Biologie Intégrative, F- 78352 Jouy en Josas, France

(6) INRA / INPT ENSAT / INPT ENVT, UMR 1388 GenPhySE, F-31326 Castanet-Tolosan cedex, France

RESUME

La lipolyse spontanée (LS) du lait dépend de nombreux facteurs d'élevage, dont la fréquence de traite, et la génétique de l'animal. Nous avons donc testé l'effet du gène DGAT1, polymorphique au locus K232A, sur la LS dans un contexte de variation de la fréquence de traite. Huit vaches « KK », 8 vaches « KA » et 5 vaches « AA » ont été utilisées. L'essai s'est déroulé sur 3 périodes successives : une semaine de référence en bitraite, 3 semaines de monotraite et une semaine de bitraite. Les prélèvements ont été effectués à J-4, J0 (date de passage en monotraite), J1, J2, J7 et J24, pour évaluer le taux butyreux (TB), le taux protéique (TP), la composition en acides gras (AG) et en protéines, et la LS. Les vaches « KK » ont présenté un TB et un TP plus élevés, une production laitière plus faible, une quantité de caséines α_1 et κ plus élevée que les vaches « AA ». Les profils en AG n'ont pas présenté de différence. En bitraite, la LS a été deux fois plus élevée chez les vaches « KK » que chez les vaches « KA » et « AA » (1,28 vs 0,59 et 0,63 mEq/100g de MG respectivement, pendant la période de référence). En monotraite, la LS a été identique dans les 3 groupes et inférieure à 0,2 mEq/100g de MG.

Effects of diacylglycerol-O-transferase 1 (DGAT1) gene polymorphism and milking frequency on cow milk spontaneous lipolysis.

VANBERGUE E. (1) (2) (3), GUINARD-FLAMENT J. (2) (1), BARBEY S. (4), CHARTON C. (2) (6), LEFEBVRE R. (5), GALLARD Y. (4) et HURTAUD C. (1) (2)

(1) INRA UMR1348 Physiologie, Environnement, Génétique pour l'Animal et les Systèmes d'Elevage (PEGASE), F-35590 Saint-Gilles, France

(2) Agrocampus Ouest UMR1348 Physiologie, Environnement, Génétique pour l'Animal et les Systèmes d'Elevage (PEGASE), F-35000 Rennes, France

(3) Institut de l'élevage, Monvoisin, F-35910 Le Rheu, France

SUMMARY

Milk spontaneous lipolysis (SL) depends on breeding factors such as milking frequency genetics. The gene encoding DGAT1, an enzyme implicated in triglycerides synthesis, have an important polymorphic site at the K232A locus. This gene is well known to modulate milk composition. Thus, a trial was carried out to evaluate the effects of DGAT1 polymorphism on milk spontaneous lipolysis according milking frequency (once and twice daily milking (ODM, TDM)). 21 cows were divided into 3 groups according their DGAT1 genotype: 8 "KK" cows, 8 "KA" cows, 5 "AA" cows. The trial consisted in 3 successive periods: 1 week of TDM, 3 weeks of ODM and 1 week of TDM. Samples were collected on D-4 (TDM), D0 (beginning of ODM), D1, D2, D7 and D24 (TDM) for fat yield, protein yield, fatty acid and protein composition and SL determination. "KK" cows presented higher fat and protein contents, lower milk production, higher α_1 and κ caseins contents. There was no significant difference in fatty acid composition between groups. SL was twice higher for "KK" cows in TDM situations (1.28 vs 0.59 and 0.63 mEq/100g of fat during the 1st period of TDM). During ODM, no difference in SL was found between groups and SL remained below 0.2 mEq/100g of fat.

INTRODUCTION

La lipolyse est définie comme la dégradation de la matière grasse du lait par une enzyme native du lait, la lipoprotéine lipase (LPL). Il existe trois types de lipolyse : la lipolyse spontanée (LS), intrinsèque à l'animal, la lipolyse induite, consécutive aux chocs mécaniques et thermiques et la lipolyse microbienne. Les résultats de lipolyse sont fluctuants et instables entre années et selon les périodes de l'année, ce qui en fait une question interprofessionnelle récurrente. De nombreuses études sur la LS ont été réalisées dans les années 1980 pour comprendre ce phénomène (Chilliard et Cartier, 1990). Elles ont permis d'identifier les facteurs

zootecniques d'influence et il est actuellement admis que l'alimentation, le stade de gestation/lactation, la fréquence de traite et l'individu lui-même sont des facteurs de variation de la LS. Heuchel et Chilliard (1988) relevaient un effet individuel fort ; 30 à 40 % de la variabilité de la LS était expliqué par l'effet individuel. Cela sous-entendait l'existence d'un déterminisme génétique de la LS.

Dans la glande mammaire, l'enzyme DGAT1 catalyse la dernière étape de la synthèse des triglycérides du lait. Le gène associé à cette enzyme est un gène polymorphique situé sur le chromosome 14. Une substitution de 2 nucléotides successifs GC (guanine, cytosine) par AA (adénine) induit une substitution de la lysine (K) par l'alanine

(A) à la position 232 (K232A) de l'enzyme DGAT1, modifiant ses propriétés fonctionnelles et influençant la composition du lait. L'allèle K est associé à un taux butyreux (TB) et un taux protéique (TP) plus élevés, une production laitière (PL) plus faible, à des variations de la composition des acides gras et des protéines du lait (Grisart et al 2002, Spelman et al, 2002 ; Schennink et al, 2007 ; Boichard et al, 2014). DGAT1 pourrait donc être un gène candidat à la modulation de la LS.

Les objectifs de cette étude ont donc été d'évaluer les effets du polymorphisme au locus DGAT1 sur les composants du lait et plus particulièrement sur la LS dans un contexte de variation de la fréquence de traite, facteur environnemental de variation de la LS.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. SCHEMA EXPERIMENTAL

Dans cet essai, 21 vaches multipares Holstein croisées Normande en milieu de lactation ont été utilisées (date moyenne de vêlage : 24/12/2013). Les vaches ont été réparties en 3 groupes selon leur génotype au locus K232A de DGAT1 : homozygote GCGC (AA), hétérozygote GCAA ou AAGC (KA) et homozygote AAAA (KK). Huit vaches avaient le variant KK (vaches KK), 8 le variant KA (vaches KA) et 5 le variant AA (vaches AA). Les vaches étaient logées en bâtiment avec une surface moyenne par animal de 10 m².

L'essai s'est déroulé en 3 périodes successives : une semaine de référence où les vaches étaient conduites en bitraite (BT1), de J-7 à J0, suivie de 3 semaines où les vaches étaient conduites en monotraite (MT), de J0 à J21 et une semaine où les vaches étaient conduites en bitraite (BT2), de J21 à J27, pour pouvoir examiner les effets résiduels. Les vaches étaient traitées à 6h45 et 16h30 en période de bitraite et à 7h45 en période de monotraite.

Le régime a été formulé de manière à couvrir les besoins d'animaux traits deux fois par jour. Les vaches étaient alimentées avec une ration composée d'ensilage de maïs *ad libitum*, d'ensilage d'herbe (4 kg de MS), de pulpe de betterave (2 kg de MS), et de tourteau de soja (2 kg brut). La quantité de concentrés énergétiques était distribuée en fonction de la production laitière. Au-delà de 22 kg de lait produit par jour, les animaux recevaient 1kg brut de concentré pour 2,5kg de lait produit en plus.

1.2. PRODUCTION LAITIERE

La PL a été enregistrée tous les jours. Pour BT1, les données de PL ont été moyennées pour obtenir une référence de production en bitraite. Pour MT, les données des jours J0, J1, J2 et J7 sont présentées car elles correspondaient aux périodes de prélèvements expérimentaux. Pour BT2, les données ont été moyennées sur une semaine.

1.3. ECHANTILLONNAGE ET MESURES EXPERIMENTALES

Des échantillons de lait et de sang ont été collectés à J-4, J0, J1, J2, J7, J15 et J24. Dans le cas des traites biquotidiennes, les laits ont été collectés matin et soir, puis poolés dans les proportions 60 : 40.

Le TB, la matière grasse (MG), le TP, la matière protéique (MP), le lactose, les cellules somatiques (CCS), la proportion en acide gras saturés (AGS), insaturés (AGI), monoinsaturés (AGMI), polyinsaturés (AGPI), C16:0, C18:0, C18:1, la proportion en caséines β (β C), caséines α 1 (α 1C), caséines α 2 (α 2C), caséines κ (κ C) ont été évalués par spectrométrie en moyen infrarouge (MIR).

La LS a été évaluée par différence entre la quantité d'acides gras libres (AGL) initialement présents dans le lait après la traite et la quantité d'AGL présents après 24 h de stockage à 4°C. Le dosage des AGL a été réalisé par la méthode des savons de cuivre.

La lactosémie, les acides gras non estérifiés (AGNE), le glucose et l'urée ont été mesurés par enzymologie, à l'aide d'un spectrophotomètre multiparamètre KONE.

1.4. ANALYSES STATISTIQUES

Les effets du génotype DGAT1 pendant la période de référence BT1 ont été analysés via la procédure GLM de SAS[®]. Les effets du changement de fréquence de traite, selon le génotype au locus DGAT1 ont été analysés via la procédure MIXED de SAS[®].

2. RESULTATS

2.1. EFFET DU POLYMORPHISME DU GENE DGAT1 PENDANT BT1

2.1.1. Effet sur la production et la composition du lait

Tableau 1 Production laitière et composition du lait selon le génotype au locus DGAT1.

| | KK | KA | AA | Effet |
|---|-------------------|-------------------|-------------------|-------|
| PL (L) | 24,2 | 25,3 | 32,8 | * |
| CCS ($\times 10^3$ /ml) | 59 | 44 | 107 | ns |
| LS ⁽¹⁾ | 1,28 ^a | 0,59 ^b | 0,63 ^b | * |
| <i>Macronutriments du lait</i> | | | | |
| TB (g/L) | 42,1 | 37,2 | 36,3 | ns |
| TP (g/L) | 31,7 ^a | 31,1 ^a | 28,8 ^b | * |
| MG (g) | 1182 | 885 | 1023 | ns |
| MP (g) | 773 | 785 | 943 | ns |
| Lactose (g/L) | 50,4 | 50,3 | 52,4 | ns |
| <i>Proportion relative des AG (%)</i> | | | | |
| AGS | 74,6 | 72,0 | 75,6 | ns |
| AGI | 25,4 | 28,6 | 24,4 | ns |
| AGMI | 23,8 | 26,3 | 23,8 | ns |
| AGPI | 4,4 | 4,5 | 4,7 | ns |
| C16:0 | 35,9 | 32,9 | 35,9 | ns |
| C18:0 | 9,8 | 10,0 | 9,4 | ns |
| C18:1 | 17,1 | 19,3 | 17,6 | t |
| <i>Concentration des protéines majeures (g/L)</i> | | | | |
| C | 26,3 ^a | 25,8 ^a | 23,8 ^b | * |
| β C | 10,6 | 10,6 | 9,8 | ns |
| α 1C | 8,4 ^a | 8,2 ^a | 7,5 ^b | * |
| α 2C | 3,5 | 3,4 | 3,2 | ns |
| κ C | 3,4 ^a | 3,3 ^a | 2,9 ^b | ** |

⁽¹⁾ La LS est exprimée en mEq/100g de matière grasse ; t = 0,05 < p < 0,1 ; * = p < 0,05 ; ** = p < 0,01

La PL a été plus faible et le TB numériquement plus élevé chez les vaches KK comparées aux vaches KA et AA. Le TP a été plus faible chez les vaches AA.

Peu de différences ont été observées entre les groupes sur la composition en acides gras (AG) du lait. Le lait des vaches hétérozygotes KA a cependant eu tendance à être plus riche en C18:1.

La teneur en caséines κ et α 1C a été plus faible dans le lait des vaches AA. (Tableau1).

2.1.2. Effet sur la lipolyse spontanée du lait

La LS du lait a été deux fois plus élevée chez les vaches KK comparativement aux vaches KA et AA (Tableau1).

2.1.3. Effet du polymorphisme du gène DGAT1 sur l'état métabolique des animaux pendant BT1

Le polymorphisme du gène DGAT1 n'a eu aucun effet sur les AGNE, le glucose, le lactose et l'urée du plasma.

2.3. EFFET D'UN FACTEUR ENVIRONNEMENTAL, LA FREQUENCE DE TRAITE, SUR LA QUALITE DU LAIT

2.3.1. Effet de la fréquence de traite sur la composition du lait.

En MT, nous avons observé une réduction de la PL plus marquée chez les vaches AA que chez les autres vaches. En BT2, les vaches KK et KA ont retrouvé leur niveau de PL

initial, ce qui n'a pas été le cas pour les vaches AA. Nous avons observé une augmentation du TB lors de la monotraite, quel que soit le génotype DGAT1. Cependant, pour l'ensemble de la période expérimentale, le TB des vaches KK a été supérieur au TB des vaches KA et AA. L'évolution du TP a été la même pour l'ensemble des animaux pendant toute la période de monotraite. Le TP a diminué pendant les premiers jours de MT, puis a augmenté en J7 et BT2 (en moyenne, TP = 30,5 g/L à J0, 28,9 g/L à J1, 31,2 g/L à J7 et 32,6 g/L en PE, $p < 0,001$). Les CCS ont augmenté pendant MT (Tableau 2).

Les AGM et les AGPI ont diminué pendant MT et BT2 par rapport à BT1 quel que soit le génotype des vaches

(respectivement de 24,6 % à 21,1 % et de 4,6 % à 3,0 %, $p < 0,001$) avec notamment une diminution des C18:1 de 18,1% à 15,4%, ($p < 0,001$). Le C18:0 a également diminué de 9,7% à 8,2%, ($p < 0,001$) et le C16:0 a augmenté de 34,6 % à 36,0 % ($p < 0,001$) (Tableau 2).

La teneur en caséines a diminué en J1 et J2 en lien avec la diminution de la concentration en α_2 C et κ C. La concentration en β C et α_1 C est restée constante en MT. En BT2, les teneurs en α_2 C et κ C ont été similaires à BT1 alors que les teneurs en α_1 C et β C ont été supérieures aux niveaux de BT1 (Tableau 2).

Tableau 2 Effet de la monotraite sur la production laitière et les composants du lait selon le génotype au locus DGAT1

| | KK | | | | | KA | | | | | AA | | | | | Effet | | |
|--|--------|-------------------|-------------------|-------------------|--------|--------|-------------------|-------------------|--------|--------|-------------------|--------|--------|--------|-------------------|-------|----|----|
| | BT1 | J1 | J2 | J7 | BT2 | BT1 | J1 | J2 | J7 | BT2 | BT1 | J1 | J2 | J7 | BT2 | Mt | D | It |
| PL ⁽¹⁾ | 24,2** | 19,4 ^c | 17,7 ^c | 18,9 ^c | 24,0** | 25,3** | 19,9 ^c | 18,4 ^c | 22,0** | 25,3** | 32,8 ^a | 22,1** | 20,3** | 22,5** | 28,8 ^c | *** | t | * |
| CCS ⁽⁴⁾ | 58 | 129 | 154 | 61 | 151 | 44 | 368 | 323 | 138 | 210 | 107 | 152 | 128 | 52 | 60 | *** | ns | ns |
| Macronutriments du lait (g/L) | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| TB | 42,1 | 51,0 | 65,2 | 51,7 | 54,0 | 37,2 | 46,2 | 50,8 | 47,6 | 45,9 | 36,3 | 44,1 | 65,2 | 44,5 | 43,7 | *** | ** | ns |
| TP | 31,7 | 30,4 | 30,1 | 32,2 | 33,5 | 31,1 | 29,2 | 29,6 | 31,4 | 33,6 | 28,8 | 27,2 | 28,4 | 30,1 | 30,9 | *** | ns | ns |
| Teneurs en protéines majeures du lait (g/L) | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| C | 26,3 | 25,5 | 24,7 | 26,6 | 28,0 | 25,9 | 24,8 | 24,6 | 26,0 | 28,2 | 23,8 | 23,2 | 23,7 | 25,1 | 25,9 | *** | ns | ns |
| β C | 10,6 | 10,7 | 10,4 | 10,9 | 11,8 | 10,6 | 10,2 | 10,3 | 10,6 | 11,8 | 9,8 | 9,9 | 10,2 | 10,5 | 11,2 | *** | ns | ns |
| α_1 C | 8,4 | 8,2 | 8,2 | 8,9 | 9,1 | 8,2 | 8,0 | 8,1 | 8,8 | 9,0 | 7,5 | 7,4 | 7,6 | 8,3 | 8,3 | *** | t | ns |
| α_2 C | 3,5 | 3,0 | 2,9 | 3,2 | 3,3 | 3,4 | 2,9 | 2,9 | 3,1 | 3,3 | 3,2 | 2,6 | 2,7 | 2,9 | 3,1 | *** | ns | ns |
| κ C | 3,4 | 2,9 | 3,0 | 3,3 | 3,3 | 3,3 | 2,9 | 3,0 | 3,2 | 3,3 | 2,9 | 2,5 | 2,7 | 3,0 | 2,8 | *** | * | t |
| Proportion relative des AG du lait (%) | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| AGS | 69,4 | 70,3 | 69,9 | 70,7 | 72,2 | 68,7 | 68,8 | 69,0 | 69,6 | 71,8 | 70,4 | 69,8 | 69,7 | 69,3 | 72,1 | *** | ns | ns |
| AGMI | 22,2 | 20,3 | 20,7 | 21,4 | 19,7 | 25,1 | 22,0 | 22,2 | 22,2 | 20,4 | 22,8 | 20,2 | 21,1 | 22,3 | 20,0 | *** | ns | ns |
| AGPI | 4,1 | 2,9 | 3,0 | 3,4 | 2,6 | 3,9 | 3,3 | 3,3 | 3,1 | 2,9 | 4,5 | 2,8 | 3,0 | 3,6 | 2,9 | *** | ns | ** |
| C18:0 | 9,0 | 8,4 | 8,3 | 8,3 | 7,6 | 9,3 | 9,3 | 8,8 | 8,8 | 8,0 | 8,8 | 8,5 | 8,3 | 8,3 | 7,8 | *** | ns | ns |
| C18:1 | 16,2 | 14,8 | 15,8 | 15,4 | 14,7 | 18,4 | 16,0 | 16,3 | 15,9 | 14,5 | 16,8 | 14,8 | 16,2 | 16,3 | 14,7 | *** | ns | ns |
| C16:0 | 33,5 | 33,1 | 33,6 | 33,2 | 34,8 | 31,3 | 31,0 | 32,4 | 32,0 | 33,0 | 33,3 | 33,2 | 34,0 | 32,0 | 34,4 | *** | ns | ns |

⁽¹⁾ CCS en 10³/mL ; ⁽⁴⁾ PL en L ; Mt = monotraite ; D = DGAT1 ; It = interaction Mt*D ; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$

2.3.2. Effet de la fréquence de traite sur la lipolyse spontanée du lait

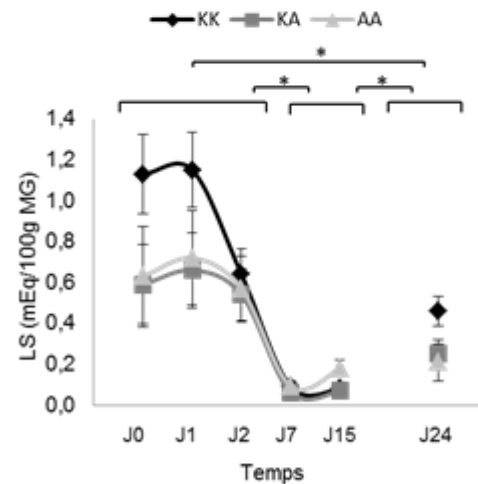
La LS a diminué quel que soit le génotype au locus DGAT1 pendant la période de monotraite ($p < 0,001$). A J7, la lipolyse était la même dans les 3 groupes (inférieure à 0,2 mEq/100g de MG), malgré les différences observées entre les groupes pendant la période BT1. En MT, la lipolyse a été divisée par un facteur 10 pour les vaches KK et par un facteur 5 pour les vaches KA et AA.

Pendant la période BT2, la lipolyse a augmenté significativement ($p < 0,001$). L'augmentation a été plus importante dans le cas des vaches KK (0,46 mEq/100g MG vs 0,25 mEq/100g MG et 0,21 mEq/100g MG pour les vaches KA et AA respectivement) (Figure 1).

3. DISCUSSION

Les effets estimés du polymorphisme DGAT1 sur les paramètres laitiers sont cohérents avec l'ensemble de la littérature (Grisart et al 2002, Spelman et al, 2002 ; Schennink et al, 2007). Cependant, nous n'avons pas montré d'effet du génotype DGAT1 sur la composition en acide gras, contrairement à Schennink et al (2007). L'absence de différence significative dans notre essai pourrait être due au faible effectif d'animaux et au mode de dosage par MIR de ces AG.

Le lait de vaches AA a été moins riche en κ C et en α_1 C. Selon Boichard et al (2014), le gène DGAT1 régirait l'ensemble des caséines mais n'expliquerait toutefois que 3 à 11 % de la variance génétique, selon la race et la protéine concernée. La teneur en différentes protéines du lait étant régulée par de multiples loci, le lien entre le locus DGAT1 et la teneur en protéines est présent mais il est ténu et variable.



* = $p < 0,05$

Figure 1 Evolution de la lipolyse du lait selon la fréquence de traite

Nous avons montré que la LS était deux fois plus importante chez les vaches KK que chez les vaches AA. Or, les facteurs biochimiques les mieux corrélés à la LS sont la proportion de LPL liée aux GG, l'intégrité de la MGG et l'équilibre entre les activateurs et les inhibiteurs de la LPL (Cartier et Chilliard, 1990). L'influence du génotype DGAT1 sur le taux de LS pourrait avoir lieu via ces trois niveaux. D'après Faucon et al (2008), le lait des vaches AA serait plus riche en LPL. De plus, la LPL étant initialement liée aux κ C et aux α_1 C, une quantité moins importante de ces protéines, comme nous

avons pu l'observer chez les vaches AA, pourrait avoir déplacé l'équilibre « caséine-lipase-globule gras », engendrant ainsi une lipolyse accrue chez les vaches AA. Cependant, les vaches AA ont des taux de LS inférieurs. Les variations de quantité de LPL, κC et αsC, selon le génotype DGAT1, ne semblent donc pas affecter la LS. Ceci est en accord avec les observations de Chilliard et Cartier (1990) qui soulignaient que la quantité totale de LPL n'était pas un facteur limitant et n'influçait pas le niveau de LS en bitraite. Selon Lu et al (2015), dans leur analyse du protéome, il n'y a pas de variation de la lactophorine (protéose peptone 3), identifiée comme un inhibiteur de la LS, ou de la protéose peptone 5, identifiée comme un activateur de la LS (Chilliard et al, 1986). Les activateurs et inhibiteurs de LPL ne semblent pas varier selon le génotype DGAT1. La MGG, serait quant à elle plus riche en sphingomyéline et en stomatine chez les vaches KK (Argov-Argaman et al 2013 ; Lu et al, 2015). Ces deux composants sont des constituants des rafts lipidiques, présents sur les MGG (Lopez et al, 2010). Les MGG des vaches KK contiendraient alors plus de rafts lipidiques que celles des vaches AA. Ces rafts pourraient faciliter le lien de la LPL aux GG via des interactions électrostatiques, favorisant ainsi la LS. Ils pourraient aussi être plus sensibles au refroidissement et endommager la MGG en migrant vers la phase aqueuse, rendant les triglycérides plus accessibles. La modification des composants des MGG semble être la voie la plus explicative des variations de LS observées.

Les effets de la monotraite sur la production et les paramètres laitiers sont cohérents avec la littérature (Pomiès et al, 2007 ; Stelwagen et al, 2013). Peu d'études ont évalué l'effet de la monotraite sur la composition en AG du lait. Guinard-Flament et al (2007) n'ont pas montré de modification de la proportion en AGS en monotraite. Dans notre essai, l'augmentation de la proportion en AGS pourrait être une conséquence d'apports énergétiques importants par rapport aux besoins des animaux (même régime en monotraite et en bitraite). La diminution de la teneur en caséines en monotraite est conforme aux études de Guinard-Flament et al (2007), Rémond et al (2005) et Pomiès et al (2007) qui reportent une diminution de la quantité de caséines et une augmentation de la quantité de protéines solubles. Dans notre essai, la diminution des caséines totales aurait pour origine la diminution des αs₂C et plus transitoirement des κC. Ce résultat est en accord avec la diminution des niveaux de transcrits de κC recensée par Boutinaud et al (2008) : la quantité de transcrits de la κC diminuait de 86% une semaine après le passage en monotraite.

La diminution de la LS observée en monotraite est en accord avec les résultats de Pomiès et al (2007) et de Rémond et al (2005) qui reportaient une diminution de la quantité d'AGL dans le lait de 67% et une diminution de l'activité lipasique de 27%, qui expliquerait, du moins en partie, la diminution de la quantité d'AGL. Une diminution des transcrits codant pour la LPL a également été observée dans des cas de monotraite par Littlejohn et al (2010) et Boutinaud et al (2013). Il n'y a pas d'information disponible sur l'impact de la monotraite sur la taille et la composition des membranes des globules gras. Les modifications de la sécrétion des composants de lait pendant la période de monotraite pourraient également influencer l'équilibre entre les activateurs et les inhibiteurs de la LPL. La LS a diminué quel que soit le génotype DGAT1. En monotraite, la quantité de LPL pourrait devenir limitante, diminuant ainsi la LS quel que soit le génotype.

CONCLUSION

En bitraite, le génotype KK au locus DGAT1 a été associé à des taux de LS deux fois plus élevés comparativement aux génotypes KA et AA. En monotraite, les niveaux de LS étaient semblables quel que soit le génotype et inférieurs à 0,2 mEq/100gMG. Ces résultats demandent à être confirmés par une étude sur un plus grand nombre d'animaux. Une évaluation de la LS après plusieurs mois de monotraite serait intéressante. L'existence d'un polymorphisme au locus LPL, en déséquilibre de liaison avec DGAT1 serait également à approfondir (Badaoui et al, 2007).

Les auteurs remercient le personnel du Pin au Haras pour la gestion du troupeau, le LILANO pour les dosages en laboratoire, le CNIEL pour son soutien financier. Les vaches utilisées font partie du projet Ruminflame (Métaprogramme GISA).

- Argov-Argaman N., Mida K., Cohen B.-C., Visker M., Hettinga K., 2013,** PLoS ONE 8, e68707.
- Badaoui B., Serradilla J.M., Tomas, A., Urrutia B., Ares J.L., Carrizosa J., Sanchez A., Jordana J., Amills M., 2007,** J Dairy Sci 90, 3012-3017.
- Boichard D., Govignon-Gion A., Larroque H., Maroteau C., Palhiere I., Tosser-Klopp G., Rupp R., Sanchez M.P., Brochard M., 2014,** INRA Prod. Anim. 27, 283-298.
- Boutinaud M., Ben Chedly M.H., Delamaire E., Guinard-Flament J., 2008,** J Dairy Sci 91, 988-998.
- Boutinaud M., Galio L., Lollivier V., Finot L., Wiart S., Esquerré D., Devinoy E., 2013,** Physiol Genomics, 45 (20) 973-985
- Cartier P., Chilliard Y., 1990,** J Dairy Sci 73, 1178-1186.
- Chilliard Y., Chazal MP., Cartier P., 1986,** Revue des ENIL 112, Poligny, France .12-19
- Faucon F., Rebours E., Bernard L., Hurtaud C., Miranda G., Menard O., Dhorne-Pollet S., Bevilacqua C., Larroque H., Gallard Y., Leroux C., Martin P., 2008,** Renc. Rech. Ruminants 15, 435-438
- Grisart B., Coppieters W., Farnir F., Karim L., Ford C., Berzi P., Cambisano N., Mni M., Reid S., Simon P., Spelman R., Georges M., Snell R., 2002,** Genome Res 12, 222-231.
- Guinard-Flament J., Delamaire E., Lambertson P., Peyraud J.L., 2007,** J Dairy Sci 90, 5062-5072.
- Heuchel V., Chilliard Y., 1988,** Le point sur la lipolyse du lait de vache. ITEB, Paris, France, 13.
- Littlejohn, M.D., Walker, C.G., Ward, H.E., Lehnert, K.B., Snell, R.G., Verkerk, G.A., Spelman, R.J., Clark, D.A., Davis, S.R., 2010,** Physiol Genomics 1, 21-32
- Lopez C., Madec M.-N., Jimenez-Flores R., 2010,** Food Chem 120, 22-33.
- Lu J., Boeren S., van Hooijdonk T., Vervoort J., Hettinga K., 2015,** J Dairy Sci 98, 3460-3469.
- Pomiès D., Martin B., Chilliard Y., Pradel P., Rémond B., 2007,** Animal 1, 1497-1505.
- Rémond B., Pomiès D., 2005,** Anim. Res. 54, 427-442.
- Schennink A., Stoop W.M., Visker M.H.P.W., Heck J.M.L., Bovenhuis H., Van Der Poel J.J., Van Valenberg H.J.F., Van Arendonk J.A.M., 2007,** Animal Genet 38, 467-473.
- Spelman R.J., Ford C.A., McElhinney P., Gregory G.C., Snell R.G., 2002,** J Dairy Sci 85, 3514-3517.
- Stelwagen K., Phyn C.V.C., Davis S.R., Guinard-Flament J., Pomiès D., Roche J.R., Kay J.K., 2013,** J Dairy Sci 96, 3401-3413.

Annexe 5

Journées Francophones de la Nutrition – Marseille – 9-11/12/2015

Effet de l'apport de concentrés riches en oméga 3 dans les rations des vaches laitières sur la lipolyse spontanée du lait.

E. Vanbergue^{1,2}, J.Mourot¹, P. Debournoux¹, M. Guillevic³, N. Huchet¹, C.Perrier¹, C. Hurtaud¹

¹INRA-Agrocampus Ouest, UMR1348 PEGASE, 35590 SAINT-GILLES, France

² Institut de l'Élevage, 35650 LE RHEU, France

³ Valorex, 35210 COMBOURTILLE, France

La lipolyse spontanée (LS) correspond à la dégradation de la matière grasse (MG) du lait, après refroidissement, sous l'action de la lipoprotéine lipase, en l'absence de chocs mécaniques et thermiques. Elle a pour conséquence une augmentation de la quantité d'acides gras libres (AGL) dans le lait. Les AGL courts, tels que l'acide caprylique et l'acide caprique sont responsables de l'apparition d'un goût de rance dans les produits laitiers frais qui n'est pas apprécié des consommateurs. La LS dépend de nombreux facteurs d'élevage dont notamment l'alimentation. L'amélioration de la qualité nutritionnelle du lait par l'apport dans l'alimentation des bovins, d'aliments riches en acides gras oméga 3 (AG n-3) pourrait modifier la susceptibilité des laits à la LS. Nous avons donc étudié l'effet de 5 concentrés riches en AG n-3 associés à une ration à base d'ensilage maïs : du lin extrudé (Lin), du lin riche en fibres (LF⁺), du lin pauvre en fibres (LF⁻), des micro-algues (Alg) et un mélange de Alg et de LF⁺ (LF⁺/Alg). Ces rations ont été comparées à une ration témoin (Tem) à base d'ensilage de maïs, de concentrés de céréales et de tourteau de soja. Les régimes étaient iso-lipidiques et iso-oméga3. Cette expérimentation a été réalisée selon un schéma en continu sur 48 vaches laitières en milieu de lactation (6 lots de 8 vaches) durant 6 semaines. En fin d'essai, des échantillons de lait ont été collectés le matin pour mesurer le taux butyreux (TB), le taux protéique (TP), le profil en acides gras (AG), la taille des globules gras (GG) et la LS. La LS a été évaluée par différence entre les AGL initiaux et les AGL présents dans le lait après 24 h de stockage à 4 °C. Le lait des lots Alg et LF⁺/Alg a été plus riche en DHA que le lait du lot Tem (0,45 et 0,17 vs 0 % des AG identifiés). La production laitière (PL) de ces 2 lots a été inférieure à celle du lot Tem (27,5 et 24,7 vs 30,3 kg/j respectivement), le TB a été divisé par 2 (19,0 et 18,1 vs 36,6 g/kg respectivement) et la taille médiane des GG a été significativement réduite (2,20 et 2,35 vs 3,66 µm respectivement). La quantité d'AGL initiaux et la LS étaient supérieures dans ces 2 lots (0,95 et 0,87 vs 0,40 mEq/100g de MG pour les AGL initiaux et 1,12 et 0,54 vs 0,24 mEq/100g de MG pour la LS). Le lait du lot LF⁺/Alg a été plus riche en protéines solubles. Les laits des lots Lin, LF⁺ et LF⁻ ont été plus riches en C18:3 n-3 par rapport au groupe Tem (0,47 ; 0,52 ; 0,47 vs 0,20 %). Il n'y a pas eu de modification de la PL, du TB, du TP, de la taille des GG, et de la LS du lait de ces lots. Les micro-algues ont perturbé les fermentations ruminales entraînant une régulation négative de la production laitière et de la matière grasse secrétée sous forme de petits globules gras. La synthèse des phospholipides et des triglycérides pourrait avoir été perturbée. Ceci expliquerait les niveaux d'AGL initiaux et la lipolyse spontanée plus élevés, dépassant le seuil de d'acceptabilité pour les consommateurs. Les différentes formes d'apport de lin ont enrichi le lait en AG n-3 sans modifier les autres composants du lait et la lipolyse spontanée.

Annexe 6

Journées Francophones de la Nutrition – Marseille – 9-11/12/2015

Effet de différentes formes d'apport d'oméga 3 sur le profil en acides gras des laits de vaches et les propriétés sensorielles des fromages et des beurres

C. Hurtaud¹, E. Vanbergue^{1,2}, S. Buchin³, G. Duboz³, E. Beuvier³, M. Guillevic⁴ et J. Mouro¹

¹INRA-Agrocampus Ouest UMR1348 PEGASE, 35590 Saint-Gilles

²Institut de l'Élevage, 35652 Le Rheu

³INRA, URTAL 342, 39801 Poligny

⁴Valorex, 35210 COMBOURTILLE, France

L'alimentation de la vache laitière a un impact fort sur la qualité nutritionnelle des produits car il existe une relation entre les acides gras (AG) ingérés et ceux du lait. On peut améliorer la qualité nutritionnelle en introduisant dans l'alimentation des vaches laitières des AG intéressants pour la santé humaine. Il est donc important d'améliorer l'efficacité du transfert des AG de l'aliment des animaux à l'aliment des hommes. Deux voies d'amélioration de l'efficacité de transfert des AG n-3 ont été étudiées : nouvelle technique de traitement des graines de lin et utilisation de micro-algues riches en DHA. Ces aliments (lin riche LF+ ou pauvre en fibres LF-, micro-algues ALG, mélange micro-algues-lin riche en fibres LF+-ALG) ont été comparés à un régime témoin (ensilage de maïs, concentré céréales et tourteau de soja TEM) ou à ce même régime complété par du lin extrudé LIN. Cette expérimentation a été réalisée selon un schéma en continu sur 48 vaches laitières en milieu de lactation (6 lots de 8 vaches). Une analyse de covariance a été réalisée selon la procédure GLM de SAS. Seul l'effet « traitement » a été testé. Les traitements ALG et LF+-ALG ont provoqué une diminution de la production laitière (respectivement -2,8 et -6,0 kg/j) et de la teneur en matières grasses du lait (respectivement -17,3 et -17,9 g/kg). En parallèle, le profil en AG des laits a été modifié : augmentation du C18:3 n-3 avec les traitements LIN, LF-, LF+ et LF+-ALG (respectivement 0,3, 0,28, 0,32 et 0,26 unités %), augmentation du C22:5 n-3 avec ALG et LF+-ALG (respectivement 0,43 et 0,15 unités %). Des fabrications beurrières et fromagères de type pâte pressée cuite ont été réalisées avec les traitements TEM, LF+, ALG et LF+-ALG. Les crèmes issues des traitements ALG et LF+-ALG n'ont pas permis la fabrication de beurre. Les paramètres de fabrication n'ont pas été différents entre les traitements TEM et LF+. Le beurre LF+ a eu tendance à être moins dur et il était moins jaune. Concernant les propriétés sensorielles, le beurre LF+ avait une odeur et une saveur rances moins prononcées (respectivement -1 et -1,2 points) et une saveur crème plus intense (0,5 point) que le beurre TEM. Le rendement fromager en frais a été plus élevé avec le traitement LF+-ALG (0,52 kg/100 kg par rapport à TEM). Par contre, le rapport gras/sec, l'extrait sec du caillé ont été moins élevés avec les traitements ALG et LF+-ALG tandis que le lactosérum était plus riche en matières grasses. Les fromages ALG et LF+-ALG ont été jugés moins colorés, plus ouverts, moins fermes, plus élastiques, plus granuleux et plus piquants. En conclusion, le lin LF+ est très bien valorisé par les ruminants laitiers et produit des laits enrichis en C18:3 similaires au lin « normal ». Ces laits ont de bonnes aptitudes à la transformation beurrière et fromagère et les produits obtenus ont de bonnes propriétés sensorielles. Les micro-algues ont eu un effet exacerbé : les vaches ont produit un lait demi-écrémé enrichi en DHA. Des essais seraient nécessaires pour trouver la dose idéale de micro-algues.



INTRODUCTION

Spontaneous lipolysis (SL) is the hydrolysis of milk triglycerides by the lipoprotein lipase, a milk native enzyme, without any thermal or mechanical shocks. This leads to an accumulation of free fatty acids (FFA) in milk and some of them (C10:0, C8:0) are responsible for rancid flavor.

SL depends on breeding factors such as genetics, breed, milking frequency, lactation stage and feeding systems. Concentrates rich in omega3 fatty acids (n-3 FA) had been introduced in dairy cows' diet to improve the nutritional value of dairy products.

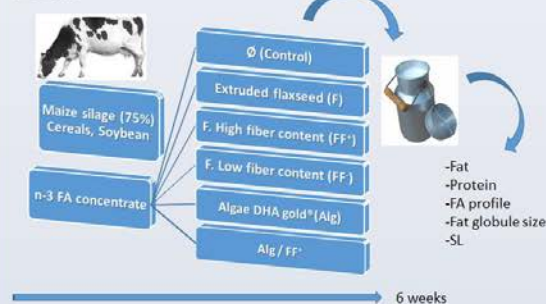
OBJECTIVE

Evaluate the effects of n-3 FA concentrates on milk spontaneous lipolysis and milk composition

MATERIAL & METHODS

Experimental design:

6 x 8 cows



Statistical analysis:

PROC GLM SAS[®] 9.2

$Y_i = \mu + r_i + \text{cov } Y_i + e_i$

Y_i: variable; μ : mean; r_i: treatment effect; cov Y_i: Y_i covariable; e_i: residual error.

Composition of experimental diets:

| | Control | F | FF ¹ | FF ² | Alg | Alg / FF ² |
|---|---------|-------|-----------------|-----------------|-------|-----------------------|
| Ingredients (% unless noted) | | | | | | |
| Corn silage | 75 | 75 | 75 | 75 | 75 | 75 |
| Energy concentrate | 11.2 | 6.3 | 6.4 | 6.4 | 9.8 | 6.4 |
| Soya meal | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Wheat bran | 0 | 2.5 | 2.4 | 2.4 | 0 | 2.4 |
| n-3 FA concentrate | 0 | 2.5 | 2.4 | 2.4 | 1.5 | 2.4 |
| Urea (g) | 1.3 | 1.2 | 1.3 | 1.2 | 1.2 | 1.2 |
| Minerals (g) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Fatty acid composition (g/kg of DM unless noted) | | | | | | |
| Fat | 158.9 | 169.9 | 169.1 | 169.8 | 167.4 | 156.9 |
| MUFA | 12.8 | 14.2 | 14.1 | 14.2 | 12.7 | 16.0 |
| PUFA | 30.3 | 38.5 | 37.0 | 37.6 | 35.4 | 31.1 |
| C18:3 n-3 | 4.6 | 11.3 | 10.2 | 10.7 | 4.6 | 7.0 |
| C22:6 n-3 | 0.07 | 0.14 | 0.08 | 0.07 | 3.72 | 0.73 |
| Nutritional value (g/kg of DM unless noted) | | | | | | |
| NEL (kJ/kg DM) | 6419 | 6484 | 6471 | 6483 | 6462 | 6185 |
| PDIE | 84 | 85 | 85 | 85 | 84 | 81 |
| PDIN | 91 | 75 | 75 | 75 | 73 | 59 |

MUFA: monounsaturated fatty acid; PUFA: polyunsaturated fatty acid

PDIE: protein digested in the small intestine supplied by rumen-undegraded dietary protein and by microbial protein from rumen-fermented DM (Institut National de la Recherche Agronomique, 1989).

PDIN: protein digested in the small intestine supplied by rumen-undegraded dietary protein and by microbial protein from rumen-degraded DM (Institut National de la Recherche Agronomique, 1989).

RESULTS & DISCUSSION

Milk production and composition under different n-3 FA sources:

| | Control | FF | FF ¹ | FF ² | Alg | FF ² Alg | Effect |
|----------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|---------------------|--------|
| Fat (g/kg) | 36.6 ^a | 35.9 ^a | 35.7 ^a | 34.5 ^a | 19.0 ^b | 18.1 ^b | *** |
| Protein (g/kg) | 30.0 ^b | 29.1 ^b | 28.7 ^b | 28.7 ^b | 29.2 ^b | 32.6 ^a | *** |
| Milk yield (kg) | 30.3 ^a | 31.4 ^a | 31.3 ^a | 31.5 ^a | 27.5 ^b | 24.7 ^c | *** |
| Initial FFA ⁽¹⁾ | 0.40 ^b | 0.42 ^b | 0.38 ^b | 0.45 ^b | 0.95 ^a | 0.87 ^a | *** |
| SL ⁽¹⁾ | 0.24 ^c | 0.25 ^c | 0.22 ^c | 0.25 ^c | 1.12 ^a | 0.54 ^b | *** |
| D50 (µm) | 3.66 ^a | 3.75 ^a | 3.68 ^a | 3.25 ^a | 2.20 ^b | 2.35 ^b | *** |

⁽¹⁾ mEq/100g fat; *** p-value < 0.001

Milk fatty acids composition (%) under different n-3 FA sources:

| | Control | FF | FF ¹ | FF ² | Alg | FF ² Alg | Effect |
|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|---------------------|--------|
| AGMI | 24.9 ^c | 28.7 ^c | 26.7 ^c | 30.0 ^b | 32.7 ^a | 37.2 ^a | *** |
| AGPI | 2.8 ^c | 3.3 ^{cb} | 3.3 ^{cb} | 3.7 ^b | 5.3 ^a | 4.8 ^a | *** |
| Short FA | 9.5 ^a | 7.38 ^b | 7.66 ^b | 7.87 ^b | 6.80 ^b | 5.49 ^c | *** |
| trans10 C18:1 | 0.53 ^c | 0.85 ^c | 0.74 ^c | 1.12 ^c | 11.27 ^b | 13.85 ^a | *** |
| C18:2/ (ALA+DHA) | 8.68 ^a | 3.84 ^b | 3.46 ^b | 3.57 ^b | 3.31 ^b | 3.63 ^b | *** |
| C18:3 n-3 | 0.20 ^b | 0.47 ^a | 0.47 ^a | 0.52 ^a | 0.25 ^b | 0.46 ^a | *** |
| C22:6 n-3 | 0.02 ^c | 0.00 ^c | 0.00 ^c | 0.00 ^c | 0.45 ^a | 0.17 ^b | *** |

*** p-value < 0.001

F, FF¹, FF² did not modify milk production and milk parameters.

Compared to Control, F, FF¹ and FF² did not change milk yield, fat and protein contents, FFA, SL, fat globule size. Milk parameters results are consistent with Neveu *et al.* (2015), although some studies reported a decrease in milk fat content (Moallem *et al.*, 2009), a reduction of fat globules size and an increase in SL (Hurtaud *et al.*, 2010). Diet composition (*i.e.* forage composition) could explain those differences.

Alg induced ruminal fermentation changes that seriously impaired milk quality.

Alg induced a decrease in milk production. Fat content was halved, and consequently, milk fat globules were smaller. Those results are consistent with Boeckaert *et al.* (2008). Trans10 C18:1 also increased in both groups. Alg must have induced changes in fermentative activity in the rumen, resulting in changes in the hydrogenation activity. Trans10 C18:1 is known to inhibit *de novo* synthesis of FA (Bauman and Grinari, 2001) that would explain the decrease in fat content. The decrease in milk production may be explained by the decrease in dry matter intake (data not shown). Initial FFA and SL were enhanced in both groups. Triglycerides and phospholipids synthesis must have been impaired, that may have caused structural fragility of milk fat globules membrane, increasing milk susceptibility to SL.

F, FF¹, FF² and Alg, Alg/FF² improved milk FA composition.

F, FF¹ and FF² increased n-3 FA percentage, particularly the C18:3 n-3. Those results are consistent with the literature (Hurtaud *et al.*, 2010; Neveu *et al.*, 2015). Alg increased the n-3 FA percentage, particularly the C22:6 n-3. Those results are consistent with Boeckaert *et al.*, 2008. In consequence, FA composition and milk nutritional value were improved.

CONCLUSION

Flaxseed based concentrates improved milk FA composition without any alteration of milk composition. Microalgae supplementation impaired FA secretion and milk production: fat content was halved, fat globules were smaller and milk was more susceptible to SL. More investigation on the doses of algae supplementation should be done.

REFERENCES

- Bauman, D.E., Grinari, J.M., 2001. *Livest. Prod. Sci.* 70, 15-29.
- Boeckaert, C., Vlaeminck, B., Dijkstra, J., Issa-Zacharia, A., Van Nespen, T., Van Straalen, W., Fievez, V., 2008. *J. Dairy Sci.* 91, 4714-4727.
- Hurtaud, C., Faucon, F., Couvreur, S., Peyraud, J.L., 2010. *J. Dairy Sci.* 93, 1429-1443. Institut National de la Recherche Agronomique, 1989. Ruminant Nutrition: Recommended Allowances and Feed Tables. R. Jarrige, ed. John Libbey, London, UK.
- Moallem, U., 2009. *Anim. Feed Sci. Technol.* 152, 232-242.
- Neveu, C., Baurhoo, B., Mustafa, A., 2013. *J. Dairy Sci.* 96, 3886-3894.

ACKNOWLEDGEMENTS and CONTACT

The authors thank the program ANR ALID 12-0003-01 AGRALID for financial support and the staff of the experimental farm (INRA-Agrocampus Ouest, UMR PEGASE, domaine de Méjusseume, Le Rheu) for animal care and experimentation.

Contact: Elise Vanbergue: elise.vanbergue@rennes.inra.fr
Catherine Hurtaud: catherine.hurtaud@rennes.inra.fr

Annexe 8

Rencontres Recherche Ruminant – Paris – 7-8/12/2016



INRA
SCIENCE & IMPACT

EFFETS DU STADE DE GESTATION / LACTATION SUR LES VARIATIONS DE LA LIPOLYSE SPONTANÉE DU LAIT DE VACHE






VANBERGUE E.^{1,2}, CIROT C.^{1,2}, FISCHER A.^{1,2}, FAVERDIN P.¹, HURTAUD C.¹
¹INRA-Agrocampus Ouest UMR 1348 PEGASE, 35590 Saint-Gilles, France
²Institut de l'Élevage, Monvoisin, BP 85225, 35652 Le Rheu, France

INTRODUCTION

Il est largement connu dans la littérature et sur le terrain que la lipolyse spontanée augmente en fin de lactation/gestation (Chazal et al., 1986).

Cette augmentation de la lipolyse spontanée serait due au stade de gestation et serait plus marquée à partir du 6^{ème} mois. Cependant, si les effets du stade de lactation ont pu être dissociés du stade de gestation, il n'a jamais été possible de déterminer le poids relatif du stade physiologique et de la diminution de la production laitière (PL) (effet « concentration »). De plus, les effets du stade physiologique sont souvent confondus avec ceux d'autres variables, telles que l'alimentation. **L'objectif de cette étude est donc d'analyser les variations de la lipolyse spontanée au cours d'une lactation, dans le cadre d'une alimentation à base d'une ration de composition constante afin de maintenir une persistance de production élevée**

MATERIELS et METHODES



- 29 VL Holstein : 15 multipares / 14 primipares
- Date de vêlage : du 16/09 au 29/09/2014
- Date d'IA fécondante : du 23/11/2014 au 01/03/2015



- Ensilage de maïs (64,7% MSI)
- Concentrés (35,3% MSI)

$$\left. \begin{array}{l} \text{PDI / UFL} \\ = 101 \end{array} \right\}$$



- Suivi pendant une lactation (9 mois)
- Prélèvement mensuel de lait matin / soir pendant 2 jrs. consécutifs



- PL, TB, TP
- Lipolyse = $AGL_{t=24h} - AGL_{t=0h}$; savons de cuivre



- PROC MIXED à mesures répétées de SAS VL en effet aléatoire ; période en effet fixe
- PROC CORR de SAS

RESULTATS et DISCUSSION

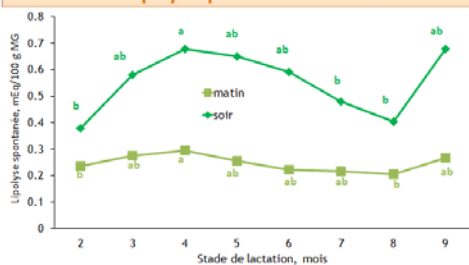
Evolution de la PL et du TB au cours de la lactation :

| Mois de prélèvement | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|---------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------|
| PL (kg) | 31,6 ^a | 31,5 ^a | 31,1 ^a | 30,4 ^{ab} | 30,6 ^{ab} | 30,2 ^{ab} | 29,6 ^{bc} | 28,1 ^c |
| TB (g/kg) | 39.3 | 39.6 | 38.2 | 38.9 | 38.9 | 38.3 | 39.6 | 38.0 |

PL pratiquement stable pendant la lactation

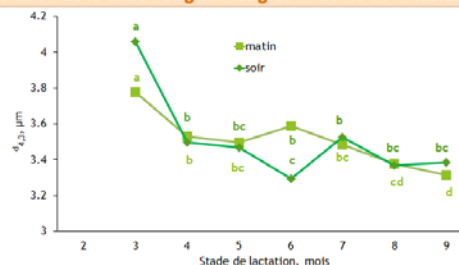
→ Étude de l'effet du stade physiologique sur la lipolyse spontanée indépendamment de la PL

Evolution de la lipolyse spontanée au cours de la lactation :



- Pas de variation de lipolyse spontanée le matin
- Variations en « cloche » le soir ← variations ponctuelles
- Augmentation à partir du 9^{ème} mois ?

Evolution de la taille des globules gras au cours de la lactation :



- Diminution de la taille des GG du début au milieu de lactation. idem Altenhofer et al. (2015)

Caractérisation des 29 VL relativement à leur sensibilité à la lipolyse spontanée :

13 VL = Lipolyse spontanée > 0,6 mEq/ 100g MG
« susceptibles » pour 15 % des prélèvements

16 VL = Lipolyse spontanée < 0,4 mEq/ 100g MG
« non susceptibles »

CONCLUSION

Il n'y a pas eu d'effet du stade de gestation, en cohérence avec Chazal et al. (1986) mais il y avait avec peu d'animaux au-delà de 6 mois de gestation.

Peu d'effets du stade de lactation ont été observés avec une PL maintenue constante. La lipolyse spontanée n'a pas augmenté en fin de lactation. Cependant, une évaluation sur une lactation plus longue aurait été pertinente pour valider l'augmentation de la lipolyse après 9 mois. Les variations de lipolyse spontanée observées surtout dans les laits du soir sont essentiellement dues à des variations individuelles non expliquées. Deux groupes de VL ont pu être identifiés selon leur sensibilité à la lipolyse spontanée, sans pour autant avoir pu être caractérisés à l'aide d'autres variables.



INRA
SCIENCE & IMPACT



AGRO CAMPUS OUEST



INSTITUT DE L'ÉLEVAGE



Association Gala



RENCONTRES RECHERCHES RUMINANTS



CONGRÈS INTERNATIONAL FRANCOPHONE
7 & 8 Décembre 2016

Annexe 9

Congrès de l'European Federation of Animal Science – Belfast, Irlande – 29/08/2016- 02/09/2016

Impacts of energy level of the diet and nature of forage on milk spontaneous lipolysis in dairy cows.

Vanbergue E^{1,2,3}, Peyraud J.L.^{2,3}, Ferlay A⁴, Miranda G⁵, Martin P⁵, Hurtaud C^{2,3}

¹Institut de l'élevage, F-35650 Le Rheu

²INRA UMR 1348 PEGASE, F-35590 Saint-Gilles

³Agrocampus Ouest UMR 1348 PEGASE, F-35000 Rennes

⁴UMR1213 Herbivores, INRA, Vetagro Sup, 63122, Saint-Genès-Champanelle, France

⁵GABI, AgroParisTech, INRA, Université Paris-Saclay, 78350, Jouy-en-Josas, France

Spontaneous lipolysis (**SL**) is one of the criteria of milk technological and organoleptic quality. Few studies have been done to investigate the impact of feeds on SL although milk quality is hardly related to feeding systems. This trial was aimed to evaluate the effects of the energy level of the diet and the nature of forage on SL.

Thirty two cows were divided into 4 groups according their diet. Diets were based on maize silage or haylage and dried grass. Two levels of feed restriction were applied: "non-restricted" which cows were fed at 100% of *ad libitum* dry matter intake (**DMI**) and "restricted" which cows were fed at 75% of *ad libitum* DMI. The trial was conducted in a reverse design on the energy level of the diet. Cows were followed during 11 weeks: 3 control weeks and 6 experimental weeks divided in 2 periods. Milk samples were collected from morning and evening milkings at the end of each period for fat, protein, fat globule size and SL determination. Data were analyzed with SAS GLM procedure.

Milk fat was lower when cows were fed with maize silage (3.53 vs 3.91%) and was not affected by feed restriction. Milk fat globule size was lower when cows were fed with maize silage (average diameter: 3.25 vs 3.55 μm) and was not affected by feed restriction. SL was sharply higher in milk from evening milkings compared to morning milkings (0.72 vs 0.29 mEq/ 100 g of fat). In morning milks, SL was higher when cows were fed with maize silage (0.40 vs 0.20 mEq/100 g of fat) and restricted (0.35 vs 0.26 mEq/100 g of fat). In evening milks, SL was higher when cows were restricted (0.88 vs 0.60 mEq/100 g of fat) and there was no significant effect of the nature of forage. We supposed that the mechanisms of SL are different in morning and evening milks. Higher impact of feed restriction on evening milks would be explained by higher energy requirements during the day. Further investigation will be done to clarify the mechanisms behind.

RÉSUMÉ

Les facteurs de variations de la lipolyse spontanée du lait de vache et mécanismes biochimiques associés.

La lipolyse est une réaction enzymatique qui influence négativement les qualités organoleptiques et technologiques du lait. La lipolyse spontanée (LS) correspond à la part de la lipolyse qui dépend de l'animal et du système d'élevage. La LS résulte de l'action de la lipoprotéine lipase (LPL) et de ses cofacteurs sur les globules gras (GG). L'objectif de la thèse a été de comprendre les variations de LS à l'échelle zootechnique et à l'échelle du lait. Les vaches (VL) ont pu être classées en 2 groupes selon leur phénotype : « susceptible » et « non susceptible » à la LS, confirmant l'importance de l'effet individu. Chez les VL susceptibles, nous avons confirmé un effet de la race/génétique, de la parité, du stade physiologique, du moment de la traite, de la fréquence de traite et de l'alimentation. La LS était plus élevée dans les laits issus de la traite du soir, chez les VL Holstein, génotypées KK au locus de DGAT-1. Elle l'était également en fin de lactation et en début de lactation uniquement chez les multipares hautes productrices. Un bilan énergétique négatif pourrait expliquer ces variations. L'augmentation de la fréquence de traite, la restriction alimentaire, l'alimentation à base d'ensilage de maïs comparé à l'herbe conservée/fraîche et la supplémentation lipidique ont également augmenté la LS. Le mécanisme d'action implique probablement une inhibition de la LS par la protéose peptone 5. La membrane des GG semblerait avoir un rôle crucial dans le maintien de l'intégrité du GG, l'interaction avec la LPL et l'équilibre des cofacteurs. L'impact des facteurs zootechniques et biochimiques reste cependant difficile à hiérarchiser.

Mots-clefs : Acide gras libre, génétique, DGAT-1, alimentation, fréquence de traite, lipoprotéine lipase, globule gras, qualité du lait

ABSTRACT

Milk spontaneous lipolysis modulating factors at zootechnical and biochemical levels in dairy cows.

Lipolysis is an enzymatic reaction which leads to off-flavor in milk and impairs technological properties of milk. Spontaneous lipolysis (SL) is the fraction of lipolysis which depends on cows and breeding systems. SP corresponds to the hydrolysis of milk fat in milk fat globules (MFG) by the lipoprotein lipase (LPL) and its cofactors. The aim of the PhD was to understand SL variations at both zootechnical and biochemical levels. Cows were sorted in two groups according their phenotype: "susceptible" and "non-susceptible" to SL, confirming the strong impact of the individual effect. Among cows "susceptible" to SL, we confirmed the effects of breed/genetics, parity, physiological stage, milking moment, milking frequency and feeding systems. SL was higher in evening milks of Holstein cows and of cows having the KK genotype at the DGAT-1 locus. SL was higher in late lactation and, in early lactation only for high merit multiparous cows, probably in relation to negative energy balance. An increase in milking frequency, feeding restriction, maize silage based diets compared to fresh grass and conserved grass based diets and lipid supplementation enhanced SL. At a biochemical level, LS might be inhibited by proteose peptone 5. The MFG membrane might play an important role on MFG integrity, LPL and MFG interactions, and cofactors balance. The impact of zootechnical and biochemical factors on SL is still difficult to hierarchize.

Keywords: Free fatty acids, genetics, DGAT-1, feeding systems, milking frequency, lipoprotein lipase, fat globule, milk quality



AGROCAMPUS OUEST • Institut supérieur des sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage
65 rue de Saint-Brieuc – CS84215 – F-35042 Rennes Cedex
Tél. : 02 23 48 50 00
www.agrocampus-ouest.fr

