



**HAL**  
open science

# Recherche de marqueurs associés à la production de méthane entérique chez la vache laitière par des approches métabolomiques multiplateformes

Bénédict Yanibada

## ► To cite this version:

Bénédict Yanibada. Recherche de marqueurs associés à la production de méthane entérique chez la vache laitière par des approches métabolomiques multiplateformes. Agronomie. Université Clermont Auvergne [2017-2020], 2018. Français. NNT : 2018CLFAC041 . tel-02426211

**HAL Id: tel-02426211**

**<https://theses.hal.science/tel-02426211>**

Submitted on 2 Jan 2020

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

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

ED SVSAE n° d'ordre :



ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE  
LA SANTE – AGRONOMIE - ENVIRONNEMENT

## THESE

Présentée pour obtenir le grade de

**DOCTEUR D'UNIVERSITE**

*Spécialité : Génétique, Physiologie, Pathologie, Nutrition, Microbiologie, Santé, Innovation*

Soutenue le 4 juillet 2018

Par **Bénédict YANIBADA**

### **RECHERCHE DE MARQUEURS ASSOCIES A LA PRODUCTION DE METHANE ENTERIQUE CHEZ LA VACHE LAITIERE PAR DES APPROCHES METABOLOMIQUES MULTIPLATEFORMES**

Directeurs de thèse :

Dr Hamid BOUDRA (Ingénieur de recherche, INRA Clermont-Ferrand)

Dr Diego MORGAVI (Directeur de recherche, INRA Clermont-Ferrand)

Membres du jury :

Dr Sandra ALVES (Maitre de conférence, Université Pierre et Marie Curie Paris) ; Rapporteur

Dr Frédérique COURANT (Maitre de conférence, Université Montpellier) ; Rapporteur

Dr Alain PARIS (Professeur, CNRS Paris) ; Rapporteur

Dr Anne-Marie DELORT (Directrice de recherche, CNRS Clermont-Ferrand) ; Examineur

Dr Corinne BURE (Ingénieur de recherche, CNRS Bordeaux) ; Invitée

Préparée dans l'Unité Mixte de Recherches sur les Herbivores

INRA Centre Auvergne Rhône-Alpes



## Remerciement,

Je souhaite exprimer mon entière reconnaissance à Mme Frédérique Courant (Maitre de conférence, Université Montpellier 1), Mme Sandra Alves (Maitre de conférence, Université Pierre et Marie Curie Paris) et Mr Alain Paris (Professeur, CNRS Paris) d'avoir accepté d'évaluer mon travail en qualité de rapporteurs. Je remercie également Mme Corinne Buré (Ingénieur de recherche, CNRS Bordeaux) et Mme Anne-Marie Delort (Directrice de recherche, CNRS Clermont-Ferrand) d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse.

Je tiens à remercier l'INRA, et les partenaires du projet Adisseo, Agrial, APIS-GENE, Deltavit, DSM, IDELE, Lallemand, MoyPark, Neovia, Techna, et Valorex pour le financement du projet.

Je souhaite également remercier Mme Estelle Pujos-Guillot (Ingénieur de recherche, INRA Clermont-Ferrand Theix), Mme Milka Popova (Chargée de recherche, INRA Clermont-Ferrand Theix), Mme Cécile Canlet (Ingénieur de recherche, INRA Toulouse), Mr Gonzalo Cantalapiedra (Ingénieur de recherche, INRA, Clermont-Ferrand Theix), Mr Julien Bocard (Chercheur, Université de Genève) et Mr Vincent Ballard (Ingénieur service ruminant CCPA Deltavit, Janzé) d'avoir accepté de participer à mes comités de thèse. Vos expertises, compétences et connaissances ont permis de faire évoluer le projet dans la bonne direction.

Je souhaite exprimer mes plus sincères remerciements à mes directeurs de thèse Hamid Boudra et Diego Morgavi sans qui le travail accompli n'aurait pu être possible. Je tiens à vous remercier pour la confiance que vous m'avez accordée, pour votre disponibilité tout au long de ces trois années de thèse et pour votre bienveillance. J'ai appris à vos côtés grâce à vos expertises scientifiques et à vos qualités humaines. J'ai vraiment apprécié de travailler avec vous deux.

Je tiens à remercier toutes les équipes de l'UMRH du Centre de l'INRA de Theix pour la disponibilité et l'aide. Mon projet de thèse m'a conduit à faire appel à beaucoup de personnes formidables qui ont toujours été prêtes à m'aider. Je remercie tous les membres de l'équipe Dinamic. Merci, Marine +(1/2), pour ton soutien, ton aide, ta gentillesse, ta disponibilité. Mention spéciale à Fred, tu m'as soutenu épaulé tout au long de ma thèse, je te suis infiniment reconnaissant.

Un grand Merci également à Ulli, d'avoir toujours été là pour m'aider avec les données LC-MS (tu es très pédagogue, tu devrais faire prof). Clo, merci pour ta présence, grâce à toi, ces années de thèse ont été merveilleuses, merci pour tout. Merci Maguy, de m'avoir tout appris sur les enceintes respiratoires et de m'avoir aidé à forger mon esprit critique. Merci également à Cécile, Gonzalo, Pierre pour vos conseils précieux. Un grand merci à Lorène, Angélique, Dominique, Sophie, Aline Donato et Fabienne pour l'aide et les nombreux services rendus. Je souhaite également remercier, Anne et Émilie pour leurs aides et leurs disponibilités pour les analyses réalisées. Grosse mention également à Matthieu (coach punchline), merci de m'avoir aidé et soutenu pendant toute la thèse. Merci également à tous les thésards (qui partage la même galère), les non-titulaires que j'ai eu la chance de rencontrer. Un grand Merci également aux deux Isabelle, à Anne-Marie, Annie et Nathalie pour leur gentillesse et leur disponibilité.

Un grand merci à toutes les personnes qui ont vécu dans le microcosme communément appelé les Fermentations. Merci à Milka, Diego, Hamid, Matthieu, Dominique, Marine, Ulli Aurélien et toutes les personnes qui ont été de passage. Les fermentations c'est comme le « Wakanda » de l'extérieur ça ne paie pas de mine, mais de l'intérieur on y est bien.

Je remercie également les membres de la plateforme analytique INRA/Axiom à Toulouse, chez qui j'ai effectué mes premiers mois de thèse. Je tiens particulièrement à remercier Cécile et Laurent qui m'ont soutenu toutes ces années. Je suis vraiment reconnaissant de la confiance que vous m'avez accordée. Je tiens également à remercier Marie Tremblay Franco, Roselyne Gauthier qui m'ont aidé tout au long de la thèse. Un grand merci également à Sylvie, Jean François, Émilien, Alyssa, Isabelle et Aurélien. Un grand merci également à l'équipe des Geeks et une mention spéciale à Fabien qui m'a toujours soutenu et aidé. Je garde un excellent souvenir de mon séjour au sein d'Axiom.

Je tiens à remercier les membres de la plateforme exploration du métabolisme qui m'ont accueilli pendant 5 mois. Merci, Estelle, Stéphanie et Mélanie pour votre aide, votre gentillesse, votre disponibilité, pour les conseils donnés. Je tiens également à remercier, Charlotte, Delphine, Sylvain, Franck, et Bernard.

Je remercie également le personnel de la ferme expérimentale des Cèdres. J'ai vraiment pris plaisir à travailler à vos côtés, merci, Sylvie, Dominique, Anthony François, Christophe, et Jean-Noël. Je tiens également à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à mon expérimentation animale.

Merci à toutes les personnes que j'ai pu côtoyer en Auvergne et en Occitanie. Merci Antoine, Laura, Cédric, Chouchou, Myrtho, Louise, Morgane, les casseurs et casseuses de cailloux, Raafat, Dani, Hakim, Ryan Maxime, Emily, Sandra, Hans, Georges, Sadou.

Merci Hélène d'être présente à mes cotés et pour ce que tu es tout simplement.

Une mention spéciale à mes collègues du basket, merci pour ces deux années intenses : on l'a fait on monte en pré-nationale.

La famille :

J'ai la chance d'avoir une grande famille qui m'a toujours soutenu.

Je remercie mes colocataires : merci, Marie-Anne d'être là, quatre belles et merveilleuses années de colocations, merci d'être là pour moi. Merci Brahim, pour tous les moments qu'on a passé ensemble, pour ta bienveillance. Merci Charlotte d'être arrivée à la coloc, pour ton amitié et ta gentillesse. Un grand merci à tous les colocs qui ont eu à me supporter, Camille, le boulanger, Thibault, Myriam.

Je remercie les collabos : depuis la fac on a toujours été ensemble, vous faites partie de ce que j'ai de plus précieux. Merci Aicha, Prez, Nam shina, Esther, Orphelia, JL, tata Roro, Luca, Christelle.

Merci à mes parents, pour tous ce que vous avez fait pour moi : pour l'amour que vous me portez, pour l'éducation que vous m'avez inculquée. Vous êtes mes modèles, je ne pourrais jamais être assez reconnaissant de vous avoir comme parent. Merci Koko und Ronny d'avoir été toujours là pour moi, je vous aime. Merci à toute ma famille.



## Résumé

Le méthane, puissant gaz à effet de serre (GES), est produit dans le rumen des bovins par la fermentation microbienne anaérobie des aliments. Cette production est également responsable d'une perte d'énergie pour l'animal représentant 6 % à 8 % de l'apport alimentaire. Pour ces raisons, plusieurs travaux de recherches sont entrepris pour réduire ces émissions, en jouant sur la composition des aliments ou sur l'utilisation d'additifs alimentaires. Actuellement, la mesure des émissions de méthane se fait par différentes techniques, qui présentent des inconvénients, notamment le coût ou encore la difficulté d'application à grande échelle sur le terrain. De ce fait, de nombreuses recherches sont menées pour trouver des méthodes alternatives ou « proxy » pour la mesure indirecte du méthane. Mon travail de thèse a pour objectif de rechercher des marqueurs associés à la production de méthane chez la vache laitière, par une approche métabolomique multiplateforme. Ces marqueurs, une fois validés, pourront être dosés par des méthodes simples de laboratoire et appliqués à grande échelle pour évaluer les émissions de méthane. Étant donné le caractère exploratoire de l'approche et pour maximiser nos chances de réussite, nous avons combiné l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de la méthanogénèse et l'analyse des profils métaboliques de quatre matrices (le lait, le plasma, le contenu ruminal et les urines) avec différentes plateformes analytiques complémentaires : la résonance magnétique nucléaire et la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse. Les échantillons biologiques proviennent d'une expérimentation animale utilisant 25 vaches Holstein primipares, et séparées en deux groupes suivant la présence ou non de l'additif anti-méthane dans la ration. Nous avons mesuré une diminution des émissions de méthane de 22,7% chez les animaux ayant reçu l'additif. Les analyses statistiques multivariées ont montré des profils métaboliques différents entre les 2 groupes d'animaux dans le plasma (27 métabolites discriminants) et le lait (16 métabolites discriminants). Les travaux sur les urines et le contenu ruminal sont en cours. L'analyse des réseaux métaboliques a mis en évidence plusieurs voies métaboliques impactées par la réduction des émissions de méthane impliquées dans le métabolisme énergétique ou encore dans celui des acides-aminés.

Mots clés : Emission de méthane, vache laitière, métabolomique, lait, plasma





## **Abstract**

Ruminants produce significant amount of enteric methane, which is a major contributor of greenhouse gas emissions from agricultural origin. This production also results in a loss of 6 to 8% of the energy present in the diet. The reduction of enteric methane emissions from ruminants is an active area of research that requires the use of expensive, constraining measurement methods such as respiratory chambers or the use of a tracer gas that are difficult to use outside experimental farms. Therefore, there is a need of alternative, non-invasive measurement methods that can be used on large number of animals. In this work, we used an open metabolomic approach for identifying potential metabolic biomarkers associated with the production of methane in dairy cows. These discriminant metabolites, once validated, may be used for monitoring methane emissions under field conditions. To maximize the chance of finding such biomarkers, we used a multiplatform metabolomics approach (nuclear magnetic resonance and mass spectrometry) to better cover the metabolome and analyzed four biological matrices, namely milk, plasma, ruminal fluid and urine. We carried out a study involving 25 primiparous Holstein dairy cows that were divided into two groups fed a diet with or without a specific anti-methanogenic compound. We measured 22.7% reduction of methane emissions in the Treated group compared to the Control group. We identified 27 discriminant metabolites in plasma and 16 discriminant metabolites in milk. Metabolic network analysis highlighted pathways involved in energy and amino acids metabolism suggesting a general effect on the host animal induced by a reduction in methanogenesis.

Keywords: methane, dairy cows, metabolomics, milk, plasma



## LISTE DES TRAVAUX

### Articles en préparation ou soumis dans des journaux à comité de lecture

**Yanibada B, Boudra H, Debrauwer L, Martin C, Morgavi DP, Canlet C.** 2018. Evaluation of sample preparation methods for NMR-based metabolomics of cow milk. *Heliyon*. DOI : 10.1016/j.heliyon.2018.e00856

**Yanibada, et al.,** Multiplatform metabolomics analysis highlights potential markers associated with methane emissions in dairy cows plasma; *en preparation pour Scientific Reports*.

**Yanibada et al.,** Milk multiplatform metabolomics analysis highlights metabolites and pathways related to methane emissions reduction in dairy cows; *en preparation pour Metabolomics*.

### Communications scientifiques

**Yanibada B, Boudra H, Martin C, Morgavi DP, Canlet C, Eugène M, Pétéra M;** Multiplatform milk metabolomics highlights potential biomarkers related to methane emissions in dairy cows. The International Symposium on the Nutrition of Herbivores. 2-6 Septembre 2018; Clermont-Ferrand, France. *Communication orale*

**Yanibada B, Boudra H, Martin C, Morgavi DP, Canlet C, Eugène M, Pétéra M;** Recherche de marqueurs de la production de méthane chez la vache laitière par des approches métabolomiques. Journée de l'école doctorale de l'Université Clermont Auvergne, Mai 2018, Clermont Ferrand, France. *Communication orale*

**Yanibada B, Boudra H, Martin C, Morgavi DP, Canlet C, Eugène M, Pétéra M;** L'approche métabolomique multiplateforme permet de mettre en évidence dans le lait de vaches, des marqueurs associés aux émissions de méthane. Journées scientifiques du Réseau Français de Métabolomique et Fluxomique. 23-25 mai 2018, Liège, Belgique. *Poster*

**Yanibada B, Boudra H, Martin C, Morgavi DP, Canlet C, Eugène M, Pétéra M;** Recherche de marqueurs de la production de méthane chez la vache laitière par des approches métabolomiques. Journée des doctorants et post-doctorants de l'unité mixte de recherche sur les herbivores (umrh), 29 mars 2018, Clermont Ferrand, France. *Communication orale*

**Yanibada B, Boudra H, Morgavi DP, Debrauwer L, Martin C, Gautier R, Canlet C;** Recherche des marqueurs de la production de méthane chez la vache laitière (Congrès de Spectrométrie de Masse, Métabolomique et Analyse Protéomique. 3-5 octobre 2017 ; Marne la Vallée Chessy, France. *Communication orale*

**Yanibada B, Boudra H, Martin C, Morgavi DP, Canlet C;** Montpellier, France. Développement d'une méthode préparation d'échantillons pour l'analyse métabolomique RMN du lait. 31 mai- 2 juin. Montpellier, France. *Poster*

**Yanibada B, Boudra H, Martin C, Morgavi DP, Canlet C;** Clermont-Ferrand, France. Développement d'une méthode préparation d'échantillons pour l'analyse métabolomique RMN du lait Journée des doctorants et post-doctorants de l'unité mixte de recherche sur les herbivores (umrh) 25 mars 2016, Clermont Ferrand, France. *Communication orale*

## Table des matières

<b>INTRODUCTION GÉNÉRALE .....</b>	<b>1</b>
<b>ÉTAT DE L'ART .....</b>	<b>7</b>
<b>Fermentation entérique et méthanogénèse .....</b>	<b>9</b>
<b>Stratégies de réduction des émissions de méthane et méthodes de mesure .....</b>	<b>16</b>
<b>Recherche de marqueurs par l'approche métabolomique .....</b>	<b>22</b>
<b>OBJECTIFS, STRATÉGIE ET MISE EN ŒUVRE DES TRAVAUX .....</b>	<b>47</b>
<b>MATÉRIELS ET MÉTHODES .....</b>	<b>51</b>
<b>Expérimentation animale .....</b>	<b>53</b>
<b>Publication 1: Sample preparation optimization of cow milk for NMR-based metabolomics .....</b>	<b>59</b>
<b>RÉSULTATS .....</b>	<b>63</b>
<b>Publication 2: Multiplatform metabolomics analysis highlights potential markers associated with methane emissions in dairy cows plasma.....</b>	<b>65</b>
<b>Publication 3: Milk multiplatform metabolomics analysis highlights metabolites and pathways related to dairy cows' methane emissions.....</b>	<b>99</b>
<b>DISCUSSION GÉNÉRALE &amp; PERSPECTIVES .....</b>	<b>127</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>143</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>161</b>



## Liste des Figures

Figure 1 : Évolution du nombre de vaches laitières en France et leur rendement (d'après le CNIEL) .....	4
Figure 2 : Émissions atmosphérique par secteur en France métropolitaine en kilo-tonne d'après le CITEPA .....	4
Figure 3 : Voies principales de biosynthèse des acides gras volatils à partir du glucose dans le rumen d'après Kohn (2015) .....	11
Figure 4 : Processus global de biosynthèse se déroulant dans le tractus digestif d'après Hanigan et al. (2006) .....	13
Figure 5: Principales voies d'utilisation du dihydrogène dans le rumen .....	13
Figure 6 : Le processus de méthanogénèse d'après Stams and Plugge (2010) .....	15
Figure 7 : Cibles des principales stratégies de réduction des émissions de méthane d'après (Patra, 2016) (modifiée).....	17
Figure 8 : Vue globale des approches « omiques » d'après (Klassen et al., 2017) .....	23
Figure 9 : Workflow d'une analyse métabolomique .....	25
Figure 10 : Principe de l'acquisition de signaux en RMN .....	27
Figure 11: Schéma d'un spectromètre de masse d'après Boudah et al. (2012) .....	29
Figure 12 : Répartition des variables d'un jeu de données suivant la méthode de mise à l'échelle .....	33
Figure 13 : Score plot d'une analyse en OPLSDA.....	36
Figure 14 : Test de permutation d'un modèle retenu .....	36
Figure 15: Identification de voies métaboliques impactées dans MetaboAnalyst .....	41
Figure 16: Sous réseau métabolique généré sous Metexplore reliant des marqueurs discriminants .....	41
Figure 17:Diagramme de Venn représentant les chevauchements entre plateformes analytiques d'après Saleem et al. (2013).....	44
Figure 18: Schéma de répartition des animaux dans les groupes au début de l'expérimentation animale .....	54
Figure 19 : Phases et implication des animaux dans l'expérimentation animale suivant le groupe .....	54
Figure 20: Évolution moyenne de la MSI et de la PL des groupes Témoin et Traité .....	132



Figure 21 : Cinétique des émissions moyennes de méthane des groupes Témoin et Traité sur 24 heures ..... 134

Figure 22: Métabolisme du méthane d'après Kegg ..... 136

## **Liste des Tableaux**

Tableau 1: Avantages et inconvénients des principales plateformes utilisées en métabolomique	46
Tableau 2: Formulation du prémix.....	55
Tableau 3: Formulation de la ration distribuée aux animaux.....	55

## **Annexe**

Annexe 1: caractéristiques des vaches impliquées dans l'expérimentation.....	163
Annexe 2: Prélèvements et analyses .....	164
Annexe 3: Collecte et processing des matrices prélevées pour analyses métabolomique et autres .....	165
Annexe 4: Mesure par groupe des paramètres sanguins des animaux en début et fin d'expérimentation.....	169
Annexe 5 : Mesures individuelles des émissions de méthanes des vaches conduites en enceintes respiratoires .....	171
Annexe 6 : Poster.....	173

## Abréviations

ACP <i>L'Analyse en Composantes Principales</i>	Jres ..... : J-Resolved Spectroscopy
AG ..... : <i>Acides Gras</i>	LC ..... : <i>Chromatographie Liquide</i>
AGV ..... : <i>Acide Gras Volatil</i>	Mcr ..... : <i>Co-enzyme M réductase</i>
ALAT ..... : <i>ALanine AminoTransferase</i>	methyl-CoM ..... : <i>Methyl-Coenzyme M</i>
ASAT ..... : <i>ASpartate AminoTransferase</i>	MFR ..... : <i>Méthanofurane</i>
ATP ..... : <i>Adénosine Tri Phosphate</i>	MSI ..... : <i>Matière Sèche Ingérée</i>
Beta OH ..... : <i>Beta Hydroxy butyrate</i>	NADH. <i>Nicotinamide Adénine Dinucleotide</i>
CH <sub>4</sub> ..... : <i>méthane</i>	NADPH <i>Nicotinamide Adénine Dinucléotide</i>
CHO-MFR ..... : <i>Formyl-MFR</i>	Phosphate
CITEPA: <i>Centre Interprofessionnel d'Etude de la Pollution</i>	NEFA ..... : <i>Acides Gras Non-Estérifiés</i>
CNIEL: <i>Centre Interprofessionnel de l'Economie Laitière</i>	NOESY Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
CO <sub>2</sub> ..... : <i>Dioxyde de Carbone</i>	OPLSDA <i>Orthogonal Partial Least Square-Discriminant Analysis</i>
CoM ..... : <i>Coenzyme M</i>	PAL ..... : <i>Phosphatase ALkaline</i>
COSY ..... : <i>COrrrelation Spectroscopy</i>	PL ..... : <i>Production Laitière</i>
CPMG ..... : <i>Carr-Purcell-Meiboom-Gill</i>	PLS: <i>Partial Least Square, : Partial Least Square</i>
DSS Acide 4,4-diméthyl-4-silapentane-1-sulfonique	Partial least square .....43
FADH ..... : <i>Flavine Adénine Dinucléotide</i>	Partial least square .....43
GC .....31, : <i>Chromatographie Gazeuse</i>	ppm ..... : <i>Partie Par Million</i>
GGT ..... : <i>Gamma Glutamyl Transpeptidase</i>	SF6 ..... : <i>Hexafluorure</i>
H <sub>2</sub> ..... : <i>Dihydrogène</i>	TSP ..... : <i>Trimethylsilylpropanoate</i>
H <sub>4</sub> MPT ..... : <i>Tétradromethanoptérine</i>	UV ..... : <i>Unit Variance</i>
HSQC Heteronuclear Single Quantum Coherence	VIP ..... : <i>Variable Important in the Projection</i>



# INTRODUCTION GÉNÉRALE

Introduction générale

L'agriculture et l'élevage ont depuis toujours occupé une part importante dans l'économie mondiale, avec une consommation des produits issus de ces secteurs qui n'a cessé de croître. L'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) estime que la demande mondiale de produits d'origine animale va encore augmenter de 70% d'ici 2050 (faits marquants ; <http://www.fao.org/livestock-environment/fr/>). Pour des raisons éthiques et surtout environnementales, la tendance durant les deux dernières décennies, est cependant à la réduction du nombre d'animaux. À l'échelle nationale, le Centre interprofessionnel de l'économie laitière (CNIEL) évalue le nombre de vaches laitières françaises à environ 3,6 millions en 2017, contre plus de 4 millions en 2004 (Figure 1).

En France, le secteur de l'élevage contribue de manière significative au rejet des gaz à effet de serre notamment le méthane, considéré comme étant un des principaux gaz à effet de serre (Steinfeld et al., 2006; Dollé et al., 2011). Par exemple, le Centre Interprofessionnel d'Etude de la Pollution (CITEPA) a évalué à plus de 1600 kilotonnes la part du secteur de l'agriculture et de la sylviculture dans les émissions de méthane en 2016 (Figure 2). La FAO a estimée à 424 kilotonnes les émissions de méthane (<http://www.fao.org/faostat/fr/#data/GE>) par les bovins laitiers, en France en 2016. Ce chiffre montre l'impact considérable du secteur de l'élevage dans les émissions de méthane.

La Conférence de l'Organisation des Nations unies sur le changement climatique (COP 23; novembre 2017) a reconnu l'importance des secteurs de l'agriculture et de l'élevage dans la mise en œuvre des Accords de Paris sur le changement climatique (Rhodes, 2016; Robbins, 2016). Selon les conclusions du rapport des accords de Paris sur le changement climatique, les émissions de gaz à effet de serre issues du secteur agricole vont augmenter, contribuant de manière plus importante au réchauffement climatique, à moins que de nouveaux objectifs ne soient fixés et que des pratiques d'élevage durables soient adoptées. Les pratiques d'élevage actuelles, ne vont pas dans le sens des engagements et des objectifs fixés dans le cadre de l'Accord de Paris impliquant la limitation de la hausse de la température mondiale à 2 degrés Celsius durant le siècle présent. Selon la FAO, l'agriculture a une opportunité par rapport aux autres secteurs de réduire significativement les émissions de gaz à effet de serre.



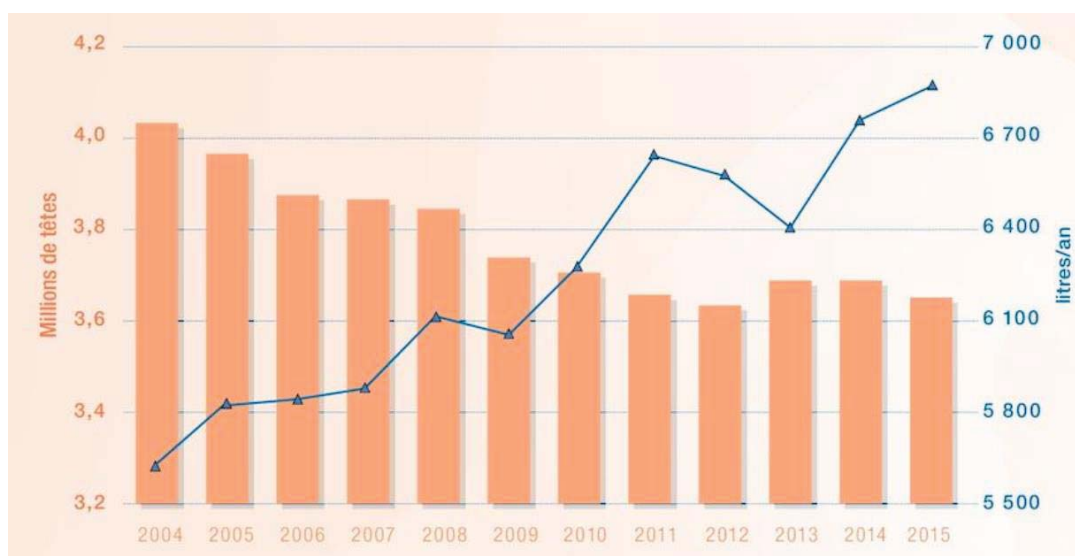


Figure 1 : Évolution du nombre de vaches laitières en France et leur rendement (d'après le CNIEL)

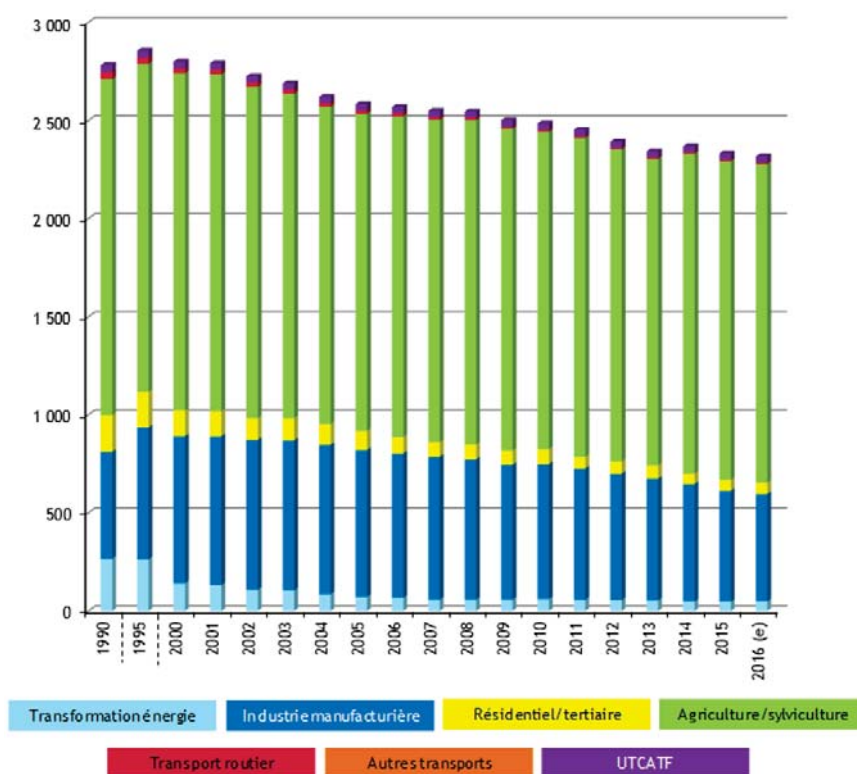


Figure 2 : Émissions atmosphériques par secteur en France métropolitaine en kilo-tonne d'après le CITEPA

Introduction générale

Par exemple, l'adoption des bonnes pratiques d'alimentation du bétail ainsi qu'une bonne gestion du fumier pourraient permettre au secteur de l'élevage de réduire sa production de gaz à effet de serre de 30 % (<http://www.fao.org/news/story/fr/item/1068398/icode/>).

Face à ce constat, des recherches sont conduites dans le but de réduire la contribution du secteur de l'élevage sur la production de gaz à effet de serre, notamment de méthane (CH<sub>4</sub>) (Chilliard et al., 2009). Les recherches portent sur l'adoption de pratiques plus respectueuses de l'environnement en modifiant la gestion des élevages (Martin et al., 2010; Kristensen et al., 2011), l'alimentation des animaux (Guyader et al., 2016) ou encore en réalisant une sélection génétique (De Haas et al., 2011). Actuellement, la mesure des émissions de méthane à l'échelle expérimentale est réalisée par des méthodes telles que les enceintes respiratoires (Guyader et al., 2015c) ou en utilisant un gaz traceur (Doreau et al., 2014). Ces méthodes sont difficilement applicables par exemple à l'échelle d'une ferme laitière qui, en France compte en moyenne 58 têtes (France Agri Mer, enquête annuelle 2014). Une mesure simple applicable à l'échelle du troupeau pourrait faciliter l'adoption de pratiques respectueuses de l'environnement. Ainsi, des techniques alternatives innovantes de mesure des émissions de gaz sont en cours de développement. Elles pourront, une fois validées, remplacer dans le futur les techniques classiques (Negussie et al., 2017a). A titre d'exemple, le dosage des acides gras du lait est testé pour prédire les émissions de méthane (Chilliard et al., 2009; Dijkstra et al., 2011).

C'est dans ce cadre que nous avons proposé la recherche de nouveaux marqueurs de la production de méthane par des approches métabolomiques qui peuvent être utilisées pour évaluer de nouvelles stratégies de mitigation sur le terrain.

La thèse a été organisée en cinq parties. La première partie présente l'État de l'art concernant les processus biologiques associés à la production de méthane chez les ruminants, les principaux leviers pour réduire les émissions de méthanes et enfin les principes de l'approche métabolomique. La 3<sup>ème</sup> partie « Matériels et Méthodes » détaille les dispositifs expérimentaux. Le chapitre 4 est consacré aux Résultats de l'analyse métabolomique du plasma et du lait, présentés sous formes de deux articles en préparation. Enfin, la partie Discussion générale & perspectives clôturent le manuscrit de thèse.

Introduction générale

# ÉTAT DE L'ART

État de l'art

## **Fermentation entérique et méthanogénèse**

La production de méthane chez les ruminants résulte de l'activité de certains microorganismes (archées) qualifiés de méthanogènes et présents principalement dans le rumen (Balch et al., 1979). Cette activité est liée à l'ingestion et la transformation d'aliments par le microbiote (Kim et al., 2017). La compréhension de la méthanogénèse et de ses conséquences sur l'organisme nécessite une connaissance des processus impliqués. Ces points seront décrits dans ce chapitre.

### **1. Le rumen : le siège de la fermentation**

Le rumen est un compartiment du système digestif des ruminants dans lequel se déroulent des dégradations et des transformations des aliments (Allen et al., 2005). Ces processus impliquent de nombreux microorganismes (Morgavi et al., 2013) qui, par leurs métabolismes, assurent leur survie ainsi que leur développement et fournissent de l'énergie à l'organisme hôte. Les fourrages dont la composition biochimique varie, constituent la principale source d'alimentation des ruminants. Ils présentent des caractéristiques et des propriétés qui ont un impact sur l'ingestion, la dégradation et la digestibilité (Agabriel, 2010; Sauvant and Noziere, 2016). La formulation de l'alimentation est calculée de manière à couvrir les besoins de l'animal (Jarrige, 1988) et assurer dans le cas des vaches laitières, une production et une qualité du lait optimales (Chilliard et al., 2007; Ruiz-Albarran et al., 2016). Cette alimentation, d'un point de vue biochimique, est principalement de nature polysaccharidique (des sucres solubles et des sucres structuraux des fibres) (Noziere et al., 2010). Des protéines et des lipides sont également retrouvés dans l'alimentation (Agabriel, 2010). La dégradation des aliments est réalisée sous l'action de microorganismes dont la diversité est décrite dans la littérature (Jami and Mizrahi, 2012). Parmi ces microorganismes, on retrouve des bactéries, des archées, des protozoaires et des champignons, qui ont une relation symbiotique entre eux et avec l'organisme hôte (Alexander and Plaizier, 2016). La composition et l'activité du microbiote ruminal varient et dépendent de différents paramètres tels que l'alimentation, ainsi que l'état physiologique et sanitaire de l'animal.

Les microorganismes, dotés d'enzymes capables de digérer les polysaccharides, les protéines et les lipides issus de l'alimentation, sont classés en groupes fonctionnels (Dehority, 2003). On distingue ainsi, les microorganismes cellulolytiques, hemicellulolytiques, amylolytiques responsables de la dégradation de polysaccharides structuraux ; les microorganismes dégradant les polysaccharides solubles ; les microorganismes protéolytiques et lipolytiques qui ont la capacité de respectivement dégrader les protéines et les lipides ; les microorganismes utilisant l'ammoniaque ; les microorganismes producteurs de méthane (Sirohi et al., 2010). L'activité globale de ces microorganismes produit et fournit de l'énergie à l'organisme hôte.

Par un processus de fermentation anaérobie réalisée par le microbiote impliquant de nombreuses réactions biochimiques, les polysaccharides (amidon, cellulose, hémicellulose) sont dégradés en monomères (glucose) puis fermentés en acides gras volatils (AGV), caractérisés par une chaîne carbonée courte (Figure 3). Parmi les AGV, on retrouve principalement l'acide acétique (45 à 70 % des AGV totaux), l'acide propionique (15 à 40 % des AGV totaux), l'acide butyrique (5 à 20 % des AGV totaux) (Dijkstra et al., 1993) et dans une moindre mesure, sont retrouvés les acides valérique, le caproïque, l'isobutyrique et l'isovalérique. La synthèse des AGV implique de nombreux processus biochimiques.

De manière plus synthétique, les réactions stœchiométriques associées à la synthèse des principaux AGV s'écrivent :



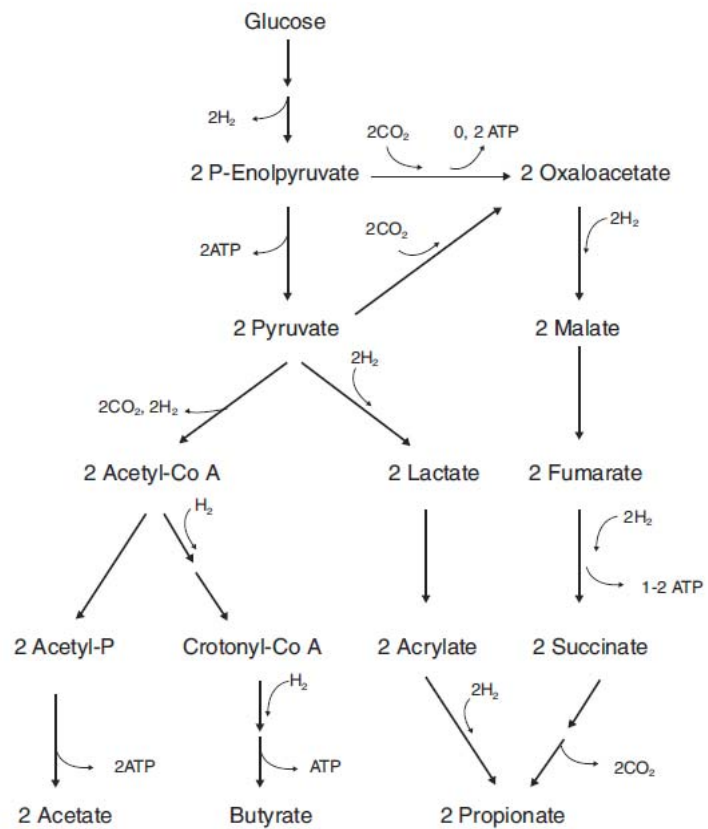


Figure 3 : Voies principales de biosynthèse des acides gras volatils à partir du glucose dans le rumen d'après Kohn (2015)

État de l'art



Les AGV constituent la principale source d'énergie (50 % de la quantité totale d'énergie digérée) pour les ruminants (Dijkstra et al., 1993). Cette énergie, générée sous forme d'adénosine triphosphate (ATP), est utilisée pour l'homéostasie des microorganismes et la synthèse de protéines et d'acide gras de l'organisme hôte. Les processus dans lesquels les AGV sont impliqués ont été décrits dans la littérature (Baldwin et al., 1987a; Baldwin et al., 1987b). L'acide acétique, majoritaire en terme de concentration et disposant d'une perméabilité membranaire faible, n'est pas métabolisé par les cellules de la paroi du rumen. Suite à son absorption, il est utilisé pour la synthèse de lipides (C4 à C16) (Bauman and Griinari, 2003) et d'acétyl coenzyme A, ainsi que comme substrat énergétique par les cellules et tissus extra hépatiques. L'acide butyrique est principalement catabolisé dans les cellules de l'épithélium ruminal (Pennington, 1952). Cela conduit à la synthèse de corps cétoniques (les acides acétoacétique et 3- hydroxybutyrique) et de l'acide lactique qui rejoignent, avec les AGV non catabolisés, la circulation sanguine via la veine porte. Les corps cétoniques (acides 3-hydroxybutyrique et lactique) sont des précurseurs importants pour les acides gras (AG) du lait (Figure 4). L'acide propionique est partiellement transformé en acide lactique dans la paroi du rumen. Il est métabolisé par le foie principalement en acide oxaloacétique et constitue le substrat primaire de la néoglucogenèse (Gäbel and Aschenbach, 2006).

Du dihydrogène ( $H_2$ ) et du dioxyde de carbone ( $CO_2$ ) sont également formés (Morgavi et al., 2010) au cours du processus de fermentation. La production de  $CO_2$  correspond à 65 % des émissions totales de gaz dans le rumen (Ellis et al., 1991). La synthèse de dihydrogène est induite par la transformation de cofacteurs réduits, notamment la nicotinamide adénine dinucléotide, la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate et la flavine adénine dinucléotide (NADH, NADPH, FADH respectivement) en cofacteurs oxydés ( $NAD^+$ ,  $NADP^+$ ,  $FAD^+$ ), libérant ainsi du  $H_2$  (donneur d'électrons) (Nozière et al., 2010; Guyader, 2015). Ce dernier est produit principalement lors de la synthèse de l'acide acétique et de l'acide butyrique et ne s'accumule pas dans le rumen. Il est redirigé vers des voies métaboliques, incluant celles qui synthétisent l'acide propionique et le méthane (Figure 5).

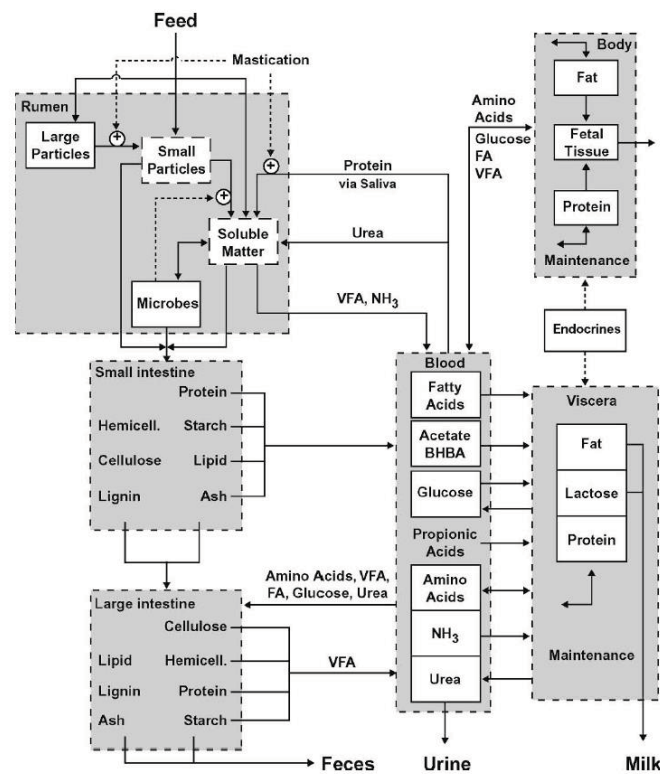


Figure 4 : Processus global de biosynthèse se déroulant dans le tractus digestif d'après Hanigan et al. (2006)

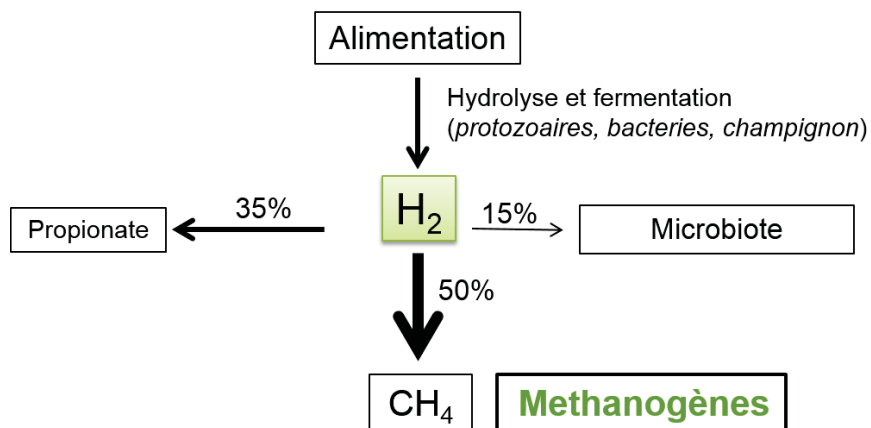


Figure 5: Principales voies d'utilisation du dihydrogène dans le rumen

État de l'art

## 2. Mais aussi le lieu de la méthanogénèse

La méthanogénèse constitue l'ensemble des voies métaboliques associées à la production de méthane chez les méthanogènes. Ces derniers appartiennent au règne des archées et sont principalement retrouvés au niveau du rumen et du réticulum (Murray et al., 1976). Les méthanogènes obtiennent leur énergie par la conversion d'un nombre limité de substrats ( $H_2$ ,  $CO_2$ , acides formique et acétique et dans une moindre mesure le méthanol, la triméthylamine et le diméthylsulfide) (Morgavi et al., 2010) et sont classés suivant leurs capacités à métaboliser des substrats. Ces substrats sont produits par différentes populations du microbiote ruminal tel que les protozoaires (Vogels et al., 1980), les bactéries (Klieve and Hegarty, 1999), les champignons (Brul and Stumm, 1994). On retrouve principalement dans le rumen des méthanogènes hydrogénotrophes (Wedlock et al., 2013; Costa and Leigh, 2014). Cette classe de méthanogène utilise le  $CO_2$  comme source de carbone et le dihydrogène comme agent réducteur (Martin et al., 2010) (Figure 6). La dégradation du  $CO_2$  chez ces microorganismes est réalisée par des coenzymes spécifiques, la méthanofurane (MFR), le tétrahydromethanoptérine ( $H_4MPT$ ) et le coenzyme M (CoM) (Figure 6). Dans une première étape, le  $CO_2$  se fixe à la MFR et est réduit en formyle (CHO-MFR). Ce dernier est transféré au coenzyme  $H_4MPT$  formant ainsi la molécule formyle -  $H_4MPT$ . Le groupe perd deux hydrogènes, et est réduit en méthylène -  $H_4MPT$  puis en méthyle -  $H_4MPT$ . Le groupe méthyle est transféré au coenzyme M formant le méthyl-Coenzyme M (methyl-CoM). Sous l'action de la Coenzyme M réductase (Mcr), le CoM est réduit en  $CH_4$ . Il est à noter que le CoM a été identifié chez tous les méthanogènes (Liu and Whitman, 2008) et qu'il représente ainsi une cible dans le cadre du développement de méthodes de réduction des émissions du méthane. La réaction biochimique de production de méthane chez ces organismes peut être résumée de la manière suivante :  $CO_2 + 4 H_2 \Rightarrow CH_4 + 2 H_2O$ . Le méthane formé est principalement **éliminé par éructation**.

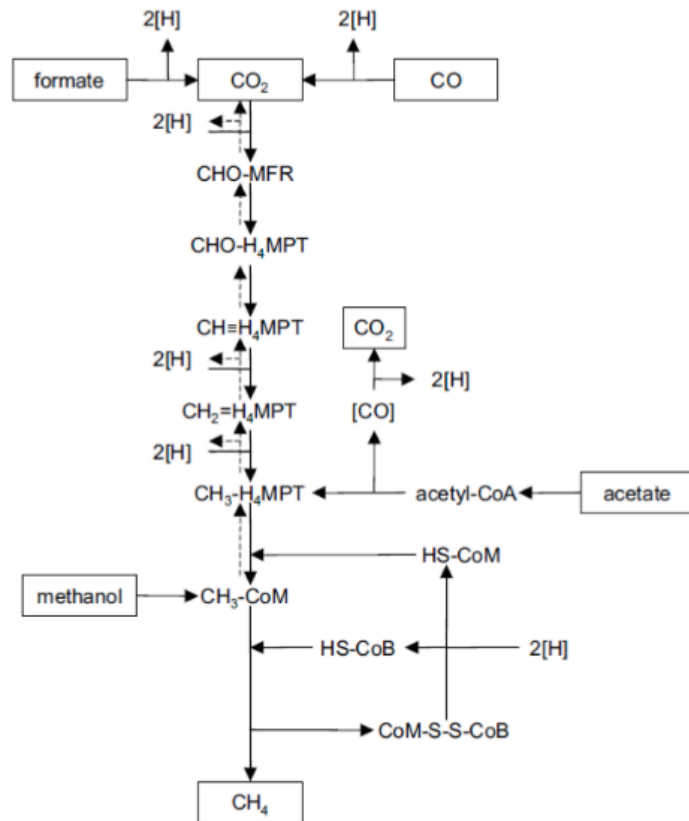


Figure 6 : Le processus de méthanogénèse d'après Stams and Plugge (2010)

État de l'art

# Stratégies de réduction des émissions de méthane et méthodes de mesure

## 1. Stratégies de réduction des émissions de méthane

La production de méthane chez les ruminants a un impact à la fois environnemental, mais également économique puisqu'elle induit une perte d'énergie non utilisable par l'animal (Baskaran et al., 2009; Gerber et al., 2013). Le développement de nouvelles stratégies visant à réduire les émissions de méthane est un enjeu majeur pour les éleveurs. Des leviers d'actions sont testés dans le but de réduire les émissions de méthane (Figure 7) (Martin et al., 2010). Ces stratégies interviennent à différents niveaux, c'est-à-dire de la gestion des systèmes d'élevages (Kristensen et al., 2011), à l'alimentation des animaux (Guyader et al., 2015b), à la modification de l'activité du microbiome (Mosoni et al., 2011), jusqu'à l'inhibition spécifique de la voie de la méthanogénèse. Ainsi, l'activité des méthanogènes est la principale cible des stratégies de réduction des émissions de méthane (Figure 7). Cette activité est dépendante du pool d'hydrogène disponible dans le rumen. Ainsi, la limitation de la production de dihydrogène (Doreau et al., 2011) ou le détournement de son utilisation par d'autres processus peut réduire l'activité des méthanogènes (Martin et al., 2010; Martinez-Fernandez et al., 2016). Parmi les stratégies alimentaires testées on retrouve notamment :

- **La supplémentation lipidique.** De nombreuses études ont montrées le potentiel de la supplémentation lipidique sur la réduction des émissions de méthane chez la vache laitière (Chilliard et al., 2009; Guyader et al., 2016). Eugène et al. (2008) ont montré dans une méta-analyse reprenant 25 études, que la supplémentation lipidique réduit de 9% les émissions de méthane chez la vache laitière. D'autres travaux ont montré que certains acides gras a chaîne moyenne affectait la population des méthanogènes (Machmüller et al., 2007).

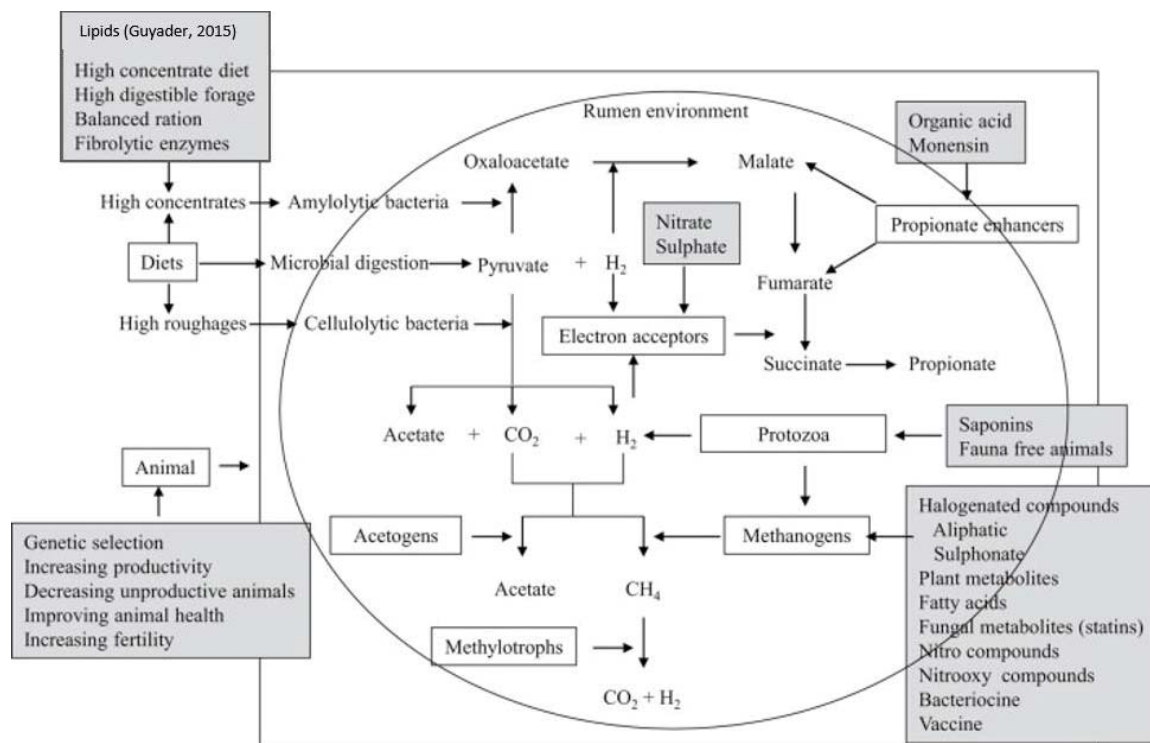


Figure 7 : Cibles des principales stratégies de réduction des émissions de méthane d'après (Patra, 2016) (modifiée)

- **Les additifs.** De nombreux additifs alimentaires ont montré leur efficacité à réduire les émissions de méthane tels que les extraits de plantes (tannins, saponine), des ionophores antibiotiques (monensin) (Odongo et al., 2007), des récepteurs d'électrons (fumarate, nitrate et sulfate) (Guyader et al., 2015a) et des inhibiteurs de l'activité des méthanogènes (bromochlorométhane, 3 nitroxypropanol) (Hristov et al., 2013). Ces additifs agissent suivant selon des mécanismes d'actions différents et ciblent différentes populations ou activités au sein du microbiote ruminal.

Valider ces stratégies de mitigation du méthane nécessite de disposer de méthodes de mesure fiables et robustes.

## 2. Méthodes de mesure directe des émissions de méthane

À l'échelle expérimentale, différentes méthodes de mesure du méthane sont appliquées. Chacune de ces méthodes présente ses spécificités, ses avantages et ses inconvénients (Storm et al., 2012; Patra, 2016). On distingue ainsi les méthodes de mesure continue comme les enceintes respiratoires et l'utilisation de gaz traceur ; les méthodes de mesure par spot telles que le GreenFeed, le sniffer et la mesure au laser ; et les méthodes alternatives.

- **Les enceintes respiratoires.** Elles fournissent les valeurs d'émission de méthane les plus fiables, en conditions contrôlées et constituent la méthode de référence. Cette méthode de mesure est basée sur le confinement des animaux en enceinte fermée (ou semi-ouverte). L'élimination et le renouvellement de l'air contenu dans l'enceinte se font via un système de pompe et de ventilation tandis que les gaz sont échantillonnés, mesurés et éliminés. Dans cet environnement, la température, l'humidité et la pression sont contrôlées pour avoir une mesure juste des volumes de gaz. La mesure est réalisée sur plusieurs jours et permet d'avoir une estimation des émissions de gaz journalières de l'animal. Cependant la méthode présente un certain nombre de limites : elle est coûteuse et l'animal n'est pas dans son habitat naturel. Ce dernier élément peut avoir des conséquences sur ses habitudes alimentaires et sur son comportement.

- **Les gaz traceurs.** L'utilisation du gaz traceur hexafluorure (SF<sub>6</sub>) qui présente les mêmes propriétés que le CH<sub>4</sub> est indiquée pour mesurer les émissions de méthane d'animaux au pâturage (Zimmerman, 1993; Martin et al., 2012). Cette méthode est basée sur la libération du SF<sub>6</sub> contenu dans un bolus localisé dans le rumen. Les gaz éructés par l'animal sont récupérés dans une bombonne et analysés par chromatographie. Une corrélation est établie entre la quantité de SF<sub>6</sub> et la quantité de méthane éructée (Grainger et al., 2007). Cette méthode contrairement aux enceintes respiratoires peut être appliquée sur un plus grand nombre d'animaux, car elle est moins coûteuse et peut avoir moins d'impact sur le comportement de ces derniers. Cependant, elle présente une certaine variabilité et une faible reproductibilité. Du fait de sa grande variabilité, et en prenant en compte le paramètre de la puissance statistique, la méthode nécessite plus d'animaux comparativement à l'utilisation des enceintes respiratoires pour mettre en évidence par exemple des différences de traitement (Storm et al., 2012; Doreau et al., 2018).
- **Le Green-Feed.** Ce dispositif (C-Lock Inc., Rapid City, South Dakota, USA) est basé sur la mesure en spot des émissions de méthane pendant les visites des animaux à l'auge, attirés par les aliments. Le principe repose sur la réalisation de mesures sur de courtes durées à l'aide d'un capteur, à différentes périodes d'une journée afin d'estimer les émissions sur 24 heures. Cette technique nécessite un nombre suffisamment élevé d'observations pour évaluer les émissions de méthane et est donc dépendante du comportement alimentaire des animaux (Huhtanen et al., 2015; Doreau et al., 2018). Cette méthode applicable sur le terrain présente une variabilité qui dépend du nombre de mesures et qui est plus importante que les enceintes respiratoires et l'utilisation de gaz traceurs (Doreau et al., 2018).



- **La technique du laser.** Cette méthode est basée sur la mesure du méthane au niveau des voies respiratoires supérieures des animaux à l'aide d'un détecteur laser. L'utilisation de la spectroscopie, qui permet de déterminer la concentration en méthane (Pickering et al., 2015a) à partir de longueurs d'onde caractéristiques (Chagunda, 2013), est aisément applicable sur le terrain et présente l'avantage d'être non invasive. Cependant, elle est dépendante de l'activité de l'animal (caractère individuel de la mesure) et présente ainsi une certaine variabilité liée à des facteurs de température, de pression et d'humidité qui limitent son utilisation sur le terrain (Chagunda et al., 2013).
- **Le « sniffer ».** Cette technique repose sur la collecte de l'air éructé par les animaux au cours de la traite par un capteur placé au niveau des auges (Garnsworthy et al., 2012a). L'air est échantillonné et mesuré à intervalles réguliers au niveau du museau des animaux. Les informations sur l'éructation et les émissions de méthane sont utilisées pour estimer le taux individuel d'émission de méthane pendant la traite.

### 3. Méthodes alternatives de mesure des émissions de méthane

Les méthodes de mesure directes énumérées précédemment présentent un certain nombre d'inconvénients qui limitent leur utilisation à grande échelle (Pickering et al., 2015b). Elles sont coûteuses, contraignantes et difficilement applicables sur un grand nombre d'animaux. Il apparaît nécessaire d'identifier des solutions pour palier à ces problèmes. Des alternatives à la mesure directe des émissions de méthane ou « proxies » sont testées ou en cours de développement. L'objectif est de remplacer les méthodes de mesures contraignantes par des méthodes alternatives simples, capables d'évaluer les émissions de méthane à l'échelle individuelle et à l'échelle du troupeau. Negussie et al. (2017a) ont passé en revue un certain nombre de potentiels proxies. Parmi ceux-ci, on retrouve : (1) l'ingestion et le comportement alimentaire ; (2) les fonctions ruminales, le microbiote et les métabolites ; (3) la production et la composition du lait, notamment en acides gras ; (4) l'analyse des fèces ; (5) la mesure de paramètres physiologiques de l'animal. Les auteurs ont décrit la complexité de la mise en place d'une mesure des émissions de méthane précise et simple, basée sur ces proxies liée au manque de robustesse et de précision. Parmi les proxies, une attention particulière a été portée sur le dosage des acides gras du lait pour prédire les émissions de méthane (Chilliard et al., 2009; Hart et al., 2015; Castro-Montoya et al., 2017). Les travaux ont portés sur la mise en place d'équation de prédiction des émissions de méthane via la composition en acide gras du lait. Les résultats obtenus d'une étude à l'autre présente une certaine variabilité (Castro-Montoya et al., 2017). Van Ganstelen dans ses travaux de thèse a tenté d'améliorer la prédiction des émissions de méthane en analysant la composition du lait (van Gastelen, 2017). Cette étude ne s'est pas limitée aux acides gras du lait : en effet, d'autres familles de composés ont été étudiées par des approches métabolomiques. L'analyse des métabolites dans ces travaux (Antunes-Fernandes et al., 2016) a permis de mettre en relation les variations de concentration de métabolites et l'intensité du méthane (g/KG fat-protein corrected milk (FPCM)). Cependant, il est difficile d'associer les changements observés au niveau du métabolome aux émissions de méthane, car la composante régime alimentaire constitue un effet confondant majeur dans ces travaux. La métabolomique non ciblée pourrait être une approche prometteuse pour la recherche de marqueurs spécifiquement associés aux émissions de méthane en se plaçant dans des conditions de réduction des émissions de méthane spécifiquement associées à la méthanogénèse.

# Recherche de marqueurs par l'approche métabolomique

## 1. Définitions et principes des approches métabolomiques

La métabolomique peut être définie comme la mesure quantitative de l'ensemble des métabolites dans un tissu ou fluide biologique à un instant t (Nicholson et al., 1999; Fiehn, 2001). Étant le dernier maillon de la chaîne des approches « omiques », la métabolomique reflète le mieux le phénotype et constitue l'approche la plus intégrative (Figure 8). Cette approche est appliquée dans de nombreux domaines tels que la médecine (Bril et al., 2018), la nutrition (Pereira et al., 2010), la toxicologie (Cabaton et al., 2013), le secteur de l'élevage (Hocquette et al., 2009) ou encore la botanique (Mhlongo et al., 2018).

Les approches métabolomiques se déclinent principalement en deux sous approches.

- **L'approche ciblée** : c'est une analyse quantitative absolue des composés d'intérêts (exemple la lipidomique).
- **L'analyse métabolomique non ciblée ou globale** : c'est une analyse de l'ensemble des métabolites présents dans un système biologique. Le principe de cette approche est de rechercher sans a priori des marqueurs en comparant les profils métaboliques de plusieurs groupes (par exemple contrôle vs traité) obtenus dans différentes situations (nutritionnelles, d'expositions à des contaminants environnementaux, pathologiques, ...).

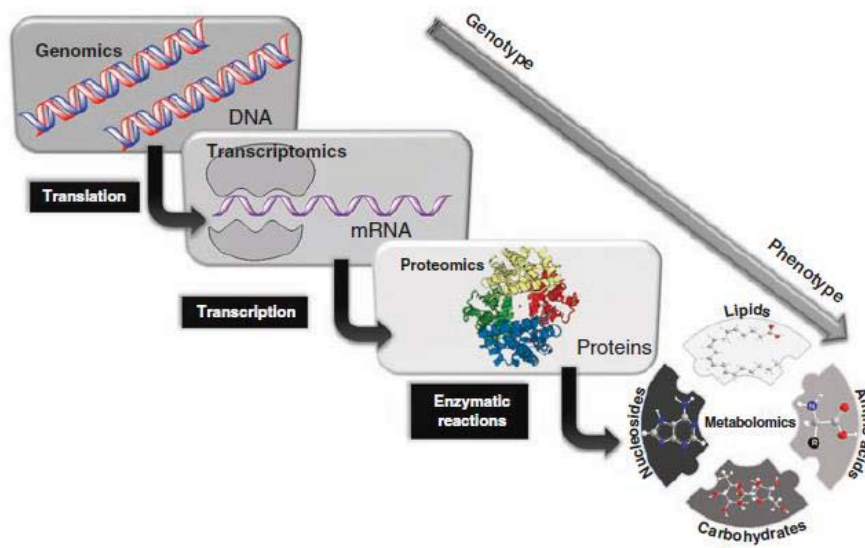


Figure 8 : Vue globale des approches « omiques » d'après (Klassen et al., 2017)

## 2. Enchaînement des différentes étapes de l'analyse métabolomique globale

L'analyse métabolomique s'articule autour de plusieurs étapes (Figure 9).

### *A. Plan expérimental, collecte et préparation d'échantillons*

Dans le cadre d'une étude, la préparation rigoureuse de l'expérimentation qui s'organise autour de la question biologique et du facteur d'intérêt est importante car, elle a un impact majeur sur les résultats de l'analyse métabolomique et l'interprétation biologique. Ainsi le nombre d'individus impliqués (qui atteste de la puissance statistique des résultats), la connaissance de facteur pouvant biaiser les résultats (différences au niveau du métabolisme de vaches primipares et multipares) est importante. Par ailleurs, une collecte et une conservation peu rigoureuses favorisent la poursuite de l'activité biologique de la matrice étudiée, altérant ainsi le métabolisme et l'interprétation biologique des résultats. Par exemple, Rist et al. (2013) ont étudié la stabilité des échantillons d'urine à différentes températures (-20 °C et -80 °C) avant une analyse en RMN. Ils recommandent la conservation pour une durée maximale de sept jours des échantillons à -20 °C, et à -80 °C pour des périodes plus longues (Pinto et al., 2014).

Suivant la matrice et la technique analytique employée, différentes méthodes de préparation d'échantillons peuvent être appliquées. Cette étape de préparation d'échantillon peut nécessiter une optimisation afin d'assurer un bon recouvrement des métabolites d'intérêt comme cela a été fait pour le plasma (Pereira et al., 2010), les fèces (Deda et al., 2016) ou encore les tissus biologiques (Wu et al., 2008). En théorie, la méthode idéale de préparation d'échantillon doit être non-sélective, simple, rapide et reproductible (Vuckovic, 2012). Pour les matrices riches en protéines comme le plasma et le lait, une étape préliminaire de précipitation avec des solvants organiques peut être réalisée.

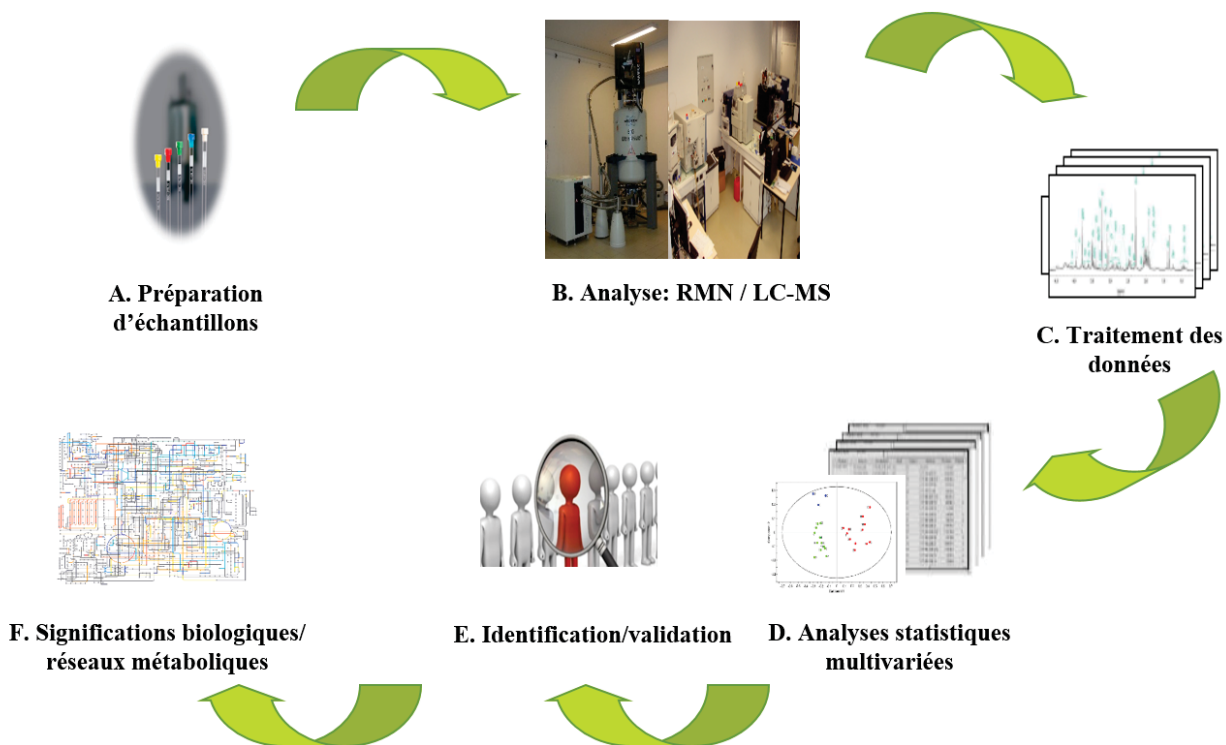


Figure 9 : Workflow d'une analyse métabolomique

## *B. Analyse des échantillons*

Les analyses en métabolomique sont principalement réalisées en utilisant deux plateformes analytiques, la Résonance Magnétique Nucléaire et la spectrométrie de masse.

**La RMN**, technique, reproductible et quantitative est utilisée en routine en métabolomique, pour analyser l'ensemble des métabolites majoritaires (limite de détection de l'ordre du  $\mu\text{M}$  pour un spectromètre RMN 600 MHz équipé d'une sonde cryogénique). Le principe de la RMN repose sur les propriétés magnétiques des atomes des métabolites à analyser. Ces derniers sont constitués de protons et de neutrons qui se comportent comme de petits aimants, caractérisés par un paramètre physique : le spin qui doit être non nul pour être observable. Les noyaux protons ( $^1\text{H}$ ), carbone ( $^{13}\text{C}$ ) et phosphore ( $^{31}\text{P}$ ) sont les plus étudiés (spin  $\neq 0$ ). En présence d'un champ magnétique ( $B_0$ ) et d'un pulse de radiofréquence, les spins subissent des transitions énergétiques (Figure 10). La perturbation de l'état d'équilibre entraîne les spins dans un état d'excitation en absorbant l'énergie provenant du champ, c'est le phénomène de résonance. Le signal est mesuré quand les noyaux retournent à leur état d'équilibre (relaxation) en induisant le signal de précession libre (FID) qui donnera le spectre RMN après une transformation de Fourier.

Un certain nombre de paramètres qui varient en fonction de l'environnement chimique du noyau sont utilisés pour l'interprétation des spectres RMN et l'identification des composés. On retrouve comme paramètres :

- **Le déplacement chimique exprimé en partie par million (ppm) :** Il correspond à la fréquence du noyau (Hz) divisée par la fréquence du spectromètre (MHz). Le déplacement chimique d'un composé est indépendant du champ magnétique. La valeur du déplacement chimique dépend de l'environnement chimique du noyau.
- **Le couplage scalaire :** c'est une interaction entre plusieurs spins à travers les liaisons chimiques. Il est caractérisé par la multiplicité du signal qui dépend du nombre de voisins (singulet, doublet, triplet, etc), et la constante de couplage (distance séparant deux signaux).
- **L'aire du signal :** est proportionnelle au nombre de protons et à la concentration du composé.

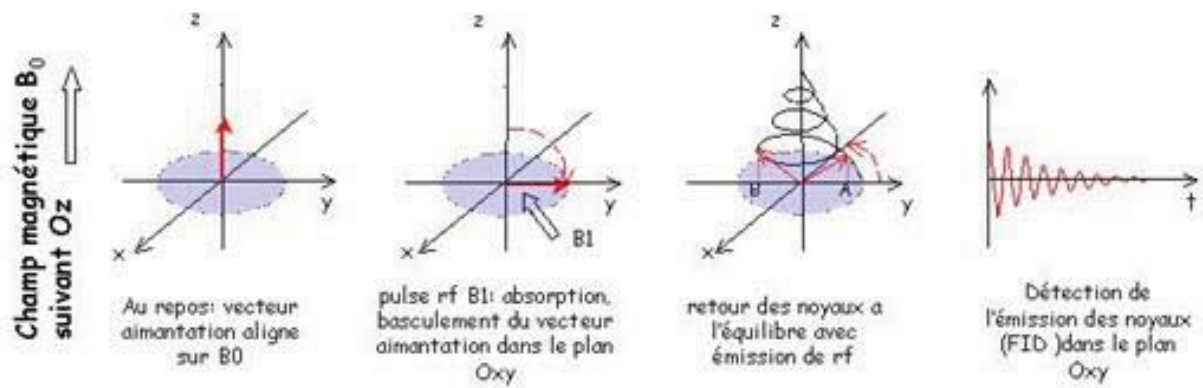


Figure 10 : Principe de l'acquisition de signaux en RMN



Afin d'obtenir des spectres de bonne qualité, il est nécessaire d'ajouter dans l'échantillon de l'eau deutérée afin de stabiliser le champ magnétique sur le signal du deutérium (lock), d'ajouter un tampon pour éviter les fluctuations de pH (le déplacement chimique peut varier avec le pH), et un étalon interne tel que le trimethylsilylpropanoate de sodium (TSP) ou encore l'acide 4,4-diméthyl-4-silapentane-1-sulfonique (DSS) pour calibrer les spectres. L'analyse métabolomique en RMN se base le plus souvent sur l'utilisation de spectre proton en une dimension (1D), car l'analyse est rapide et compatible avec le haut-débit. La plupart des échantillons analysés en RMN sont solubilisés dans l'eau (concentration des protons de l'eau=100 M).

**La spectrométrie de masse** est une technique analytique basée sur la mesure de molécules suite à une étape d'ionisation. Un spectromètre de masses est constitué de plusieurs modules, le système d'introduction de l'échantillon, la source d'ionisation des analytes, un ou plusieurs analyseurs qui permettent de séparer les ions en fonction du rapport masse sur charge ( $m/z$ ), un détecteur qui permet de compter le nombre d'ions et une console de commande qui permet le réglage des paramètres et le traitement des données (Figure 11). Il existe de nombreuses sources, d'analyseurs qui répondent à divers usages. La spectrométrie de masse peut être couplée en amont à un système de séparation de molécules. On distingue comme système, l'électrophorèse capillaire la chromatographie en phase gazeuse (GC), la chromatographie liquide (LC). Celle-ci est basée sur l'utilisation de deux phases, une phase stationnaire sur laquelle vont être adsorbées les molécules, et une phase mobile qui permet d'éluer les molécules suivant leur affinité. Les composés sont détectés et caractérisés par un temps de rétention (en minute) et par l'intensité de la réponse.

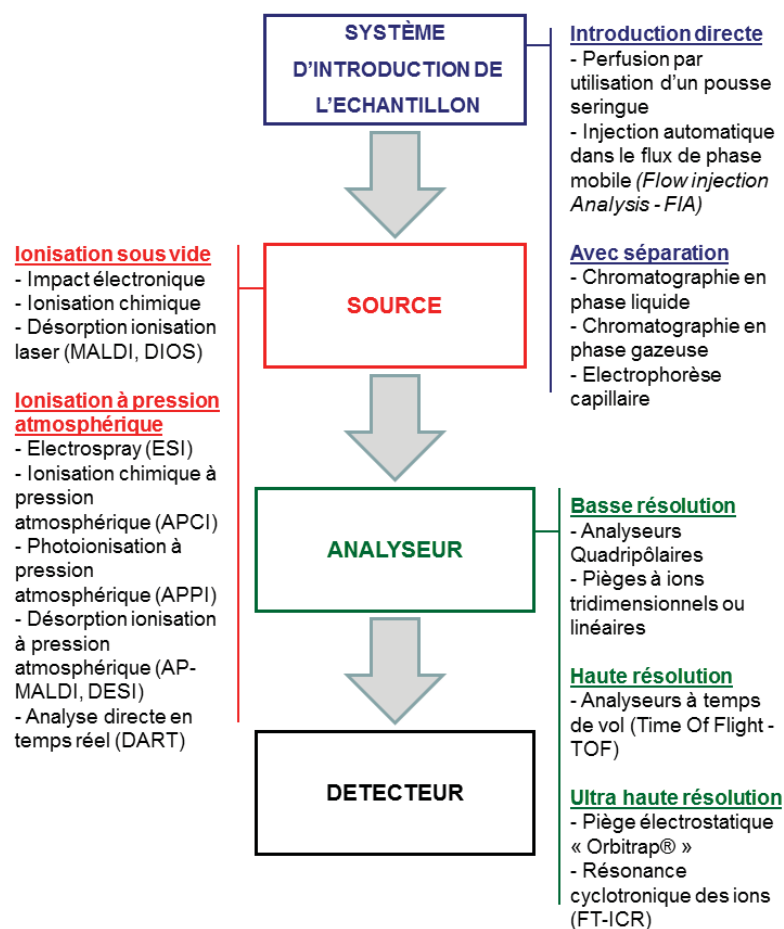


Figure 11: Schéma d'un spectromètre de masse d'après Boudah et al. (2012)

### *C. Traitement et analyse des données*

**En RMN 1 dimension** pour des applications métabolomiques, deux séquences d'impulsions sont principalement utilisées. Il s'agit de la **Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG)** et de la **Nuclear Overhauser effect spectroscopy (NOESY)**. La première permet la suppression du signal des macromolécules sur le spectre qui pourrait masquer les signaux de plus faible concentration ou de plus faible poids moléculaire. La seconde est une séquence d'acquisition rapide, quantitative. Son application est limitée dans le cas d'analyse de mélanges de composés qui peuvent avoir des déplacements chimiques proches, ce qui entraîne des superpositions de signaux, une identification structurale et une quantification difficiles.

Une fois l'acquisition des spectres RMN 1D réalisée, le signal de précession libre (ou Free Induction Decay) est obtenu. Une étape de prétraitement est nécessaire pour obtenir les spectres RMN. Ce prétraitement s'articule autour de :

- **La fonction de pondération** (Apodization function and zero filling), qui permet d'augmenter le rapport signal sur bruit.
- **La transformation de Fourier**. Cette opération mathématique permet la conversion de signaux caractérisés par une échelle de temps en signaux caractérisés par une fréquence en Hz.
- **Le phasage des spectres**. Les données fournies par le spectromètre sont déphasées. Une correction de la phase en RMN 1D et 2D est nécessaire afin que tous les pics du spectre aient la bonne forme d'absorption.
- **La correction de la ligne de base**. Cette étape est réalisée pour corriger des distorsions qui peuvent apparaître d'une partie à l'autre d'un spectre. Ces distorsions sont dépendantes de la stabilité du spectromètre et de la nature des échantillons.
- **La calibration des spectres**. La présence d'un étalon interne, par exemple le TSP dont le déplacement chimique est fixé à 0, permet d'effectuer cette opération.

- **L'alignement des spectres.** Des décalages d'un même signal peuvent apparaître d'un échantillon à l'autre. Ceci peut être lié à la nature de la matrice analysée, à la température, au pH ou encore à la force ionique.

L'information graphique présente sur les spectres est convertie en information numérique. Afin de réduire le nombre de variables, les spectres sont découpés en segments appelés « buckets » de taille fixe (pas fixe) ou variable (pas variable) et sont intégrés. Le bucketing permet de réduire le nombre de variables (bucket) et simplifier l'analyse des données. Chaque bucket est caractérisé par un déplacement chimique et une intensité correspondant à l'aire sous la courbe. L'application d'un pas fixe génère un nombre important de variables et présente l'inconvénient de découper un signal donné en plusieurs buckets avec des différences qui peuvent apparaître d'un échantillon à l'autre. L'application d'un pas variable permet la sélection de signaux correspondant à des métabolites et ainsi d'écartier le bruit. Une normalisation des données est faite, car des variations peuvent exister entre échantillons, liés à la matrice ou aux erreurs de l'opérateur (pipetage). Tous ces facteurs induisent au final une variation sur les intensités des signaux entre échantillons d'une même expérience indépendante du facteur étudié. On normalise ainsi sur l'intensité totale du spectre ou sur le signal du standard interne. Suite à cette étape, la matrice des données RMN est obtenue, avec les individus en ligne, les variables RMN en colonne, et une intensité relative pour chaque variable et chaque individu.

Les données acquises en LC-MS sont traitées de telle manière à convertir l'information graphique (signaux) en information numérique. Dans le cadre de la thèse, la web-instance Galaxy workflow for metabolomics (W4M) (Giacomoni et al., 2015) a été utilisée pour traiter les données. Ce traitement se décompose en quatre étapes successives incluant la détection de signaux et le filtrage du bruit, l'alignement des signaux entre échantillons, la correction des temps de rétention, et enfin la complétion de données manquantes. Cette opération est réalisée à l'aide du logiciel XCMS (Smith et al., 2006). L'annotation des spectres est réalisée à l'aide du logiciel Camera (Kuhl et al., 2012). L'extraction des données est suivie d'une étape de filtration et de normalisation. Une première filtration des données sur des blancs analytiques (échantillons contenant le solvant d'injection en LC-MS) est faite pour éliminer les masses liées au bruit de fond. Une deuxième filtration est effectuée sur les temps de rétention pour éliminer les composés présents dans le volume mort et en fin d'analyse.

Il existe en LC-MS des fluctuations de réponses des systèmes analytiques, liées à différents effets notamment la suppression d'ionisation qu'il est important de corriger. Cette opération se fait par la normalisation des données par des échantillons contrôle qualité (QC) préparés en mélangeant à volume égal l'ensemble des échantillons analysés. Les QC sont analysés régulièrement au cours de la séquence d'acquisition afin de corriger les dérives analytiques dont notamment la baisse de l'intensité des signaux due à l'encrassement de la source.

#### *D. Traitement statistique des données*

Une fois filtrées et normalisées, les données sont transformées pour les analyses statistiques. Il existe plusieurs méthodes de transformation des données, le choix dépendant essentiellement de l'homogénéité de la distribution des variables sur le diagramme. La gamme dynamique des variables d'un jeu de données peut être importante. Ainsi, dans le cas d'analyses utilisant des calculs de variances, les signaux d'importantes intensités auront plus d'influence que les signaux de plus faible intensité. Il est nécessaire de procéder à une harmonisation de l'échelle des données.

Trois transformations sont généralement utilisées :

- **Centrage** : Les données sont centrées sur la moyenne.
- **Pareto**: Les données sont centrées et réduites par la racine carrée de l'écart type.
- **Variance unitaire (UV)** : Les données sont centrées et réduites par l'écart-type.

Dans la Figure 12 par exemple, la variabilité est supportée par seulement quelques variables suites au centrage ou à la transformation Pareto (Figure 12A et B) ; alors que dans l'UV (Figure 12C) elle est répartie de façon homogène.

L'application de méthodes statistiques en métabolomique permet la structuration des données et la mise en évidence de facteurs et variables impliqués dans le processus biologique d'intérêt. Les analyses métabolomiques, génèrent un volume important de données, qui ne pourront être analysées par les méthodes statistiques classiques. Elles sont analysées avec les méthodes statistiques multivariées, qui ont pour objectif de réduire les données pour en faciliter la structuration et l'interprétation. Les principales méthodes multivariées sont :

- **Les analyses non supervisées**, pour lesquelles aucune hypothèse n'est formulée sur les individus (ex : Analyse en Composantes Principales).
- **Les analyses supervisées** pour lesquelles des classes d'individus sont prises en compte (par exemple traité vs malade) (ex : méthode de régression des moindres carrés partiels).

État de l'art

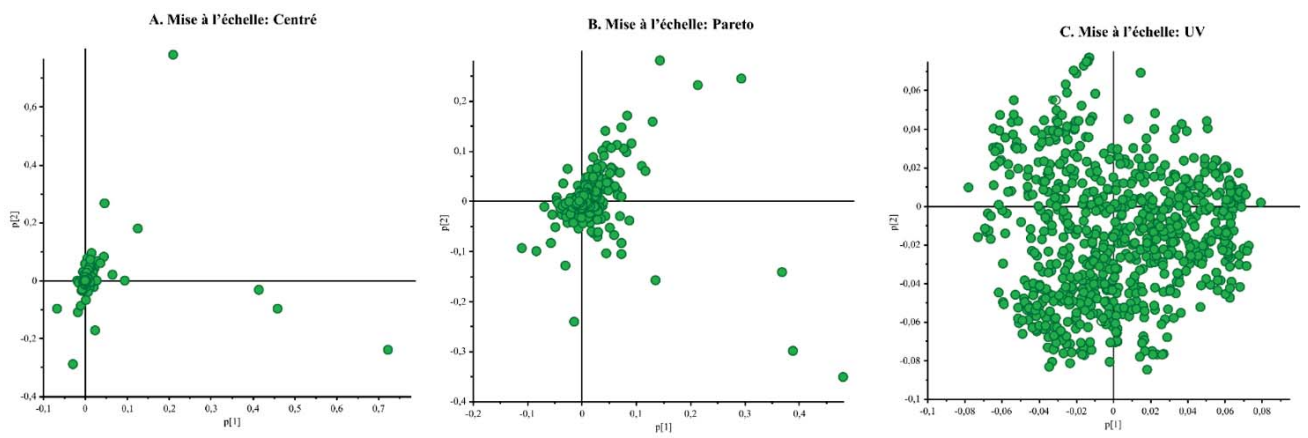


Figure 12 : Répartition des variables d'un jeu de données suivant la méthode de mise à l'échelle

## Analyse multivariée non supervisée

L'Analyse en Composantes Principales (ACP) (Wold et al., 1987) permet, une visualisation sans a priori du jeu de données global basée sur la maximisation de la variance sur des combinaisons linéaires des variables. L'ACP est souvent utilisée comme étape préalable à toute analyse de régression par les moindres carrés partiels PLS. Elle permet la mise en évidence d'éventuelles tendances entre échantillons et de détecter des individus extrêmes (outliers). L'évaluation de l'ACP est basée sur :

- **Le nombre de composantes n** : Chaque composante représente une fraction de la variance.
- **Le pourcentage total de variance** : représenté sur les axes retenus  $R^2X$ .
- **Les pourcentages de variabilité** : déterminés pour chaque composante  $R^2X [1 : n]$ .
- **Le score plot** : est une projection des individus sur un plan factoriel (par ex. 1<sup>ère</sup> et seconde composantes principales). Il fournit une indication sur les similarités entre individus, relative à la variabilité capturée par les composantes.
- **Le loading plot** : représente la liaison entre variables et axes. Ce dernier permet dans un premier temps d'évaluer un éventuel besoin de normalisation.
- **La présence d'outlier** (Rocke and Woodruff, 1996) : mise en évidence dans un premier temps en analysant le score plot de l'ACP (individu se détachant fortement du nuage d'individus, notamment pouvant se situer en dehors d'une ellipse de Hotelling à 5 %) et dans un second temps par l'utilisation du « Distance to the model in the X-block » (Dmod X - des valeurs larges indiquent la présence d'observations aberrantes ou « outliers »). L'élimination de ces individus aberrants est une décision qui doit être justifiée (par exemple, erreur lors de la préparation d'échantillon ou individu malade), en effet cela a un impact sur les modèles en analyse supervisée.

## Analyses multivariées supervisées

Les méthodes de régression partielle des moindres carrés ou « Partial Least Square regression » (PLS) sont des méthodes supervisées de régression linéaire pour lesquelles deux matrices sont mises en relation : la matrice de variables X (par ex. RMN ou MS) et la matrice de réponse Y (groupe par exemple sain vs malade) en maximisant la covariance. Ces méthodes permettent d'identifier des variables X liées aux variables Y. L'évaluation des modèles PLS générés est réalisée à l'aide des paramètres suivants :

État de l'art

- **Le nombre de composantes n.**
- **Les pourcentages de variance  $R^2X$**  (% de variance de X expliqué par chaque composante) et  **$R^2Y$**  (le % de variance de Y expliqué par chaque composante).
- **La capacité prédictive des modèles  $Q^2$ .**

La projection orthogonale en structure latente ou « L'orthogonal projection to latent structure » (OPLS) (Trygg and Wold, 2002) est une variante des méthodes PLS. Cette méthode présente la même capacité prédictive ( $Q^2$ ) que la méthode PLS, mais propose une interprétation plus simple des variables X par rapport à la PLS. L'OPLS est caractérisée par la décomposition des données en composantes prédictives, c'est-à-dire qui explique la réponse Y (par exemple sain vs malade) et en composantes orthogonales qui ne sont pas liées à la réponse Y (autres sources de variabilité) (Pinto et al., 2012). Il ne peut y avoir qu'une seule composante prédictive pour une réponse Y binaire, mais il peut y avoir plusieurs orthogonales. L'analyse discriminante OPLS (OPLS-DA) (Bylesjo et al., 2006) est le plus souvent utilisée en analyse métabolomique (Figure 13).

### **Validation du modèle**

Le test de permutations permet d'évaluer la fiabilité du pouvoir de prédiction du modèle généré (Figure 14). Le  $R^2Y$  et le  $Q^2$  du modèle sont comparés à ceux de modèles dont les éléments du vecteur Y ont été aléatoirement permutés et pour lequel une capacité prédictive faible est attendue.

Une fois le modèle choisi, les variables responsables de la séparation sont déterminées *via* les valeurs de « Variable Important in the Projection » (VIP) (Galindo et al., 2013) et une identification structurale de ces variables est réalisée.



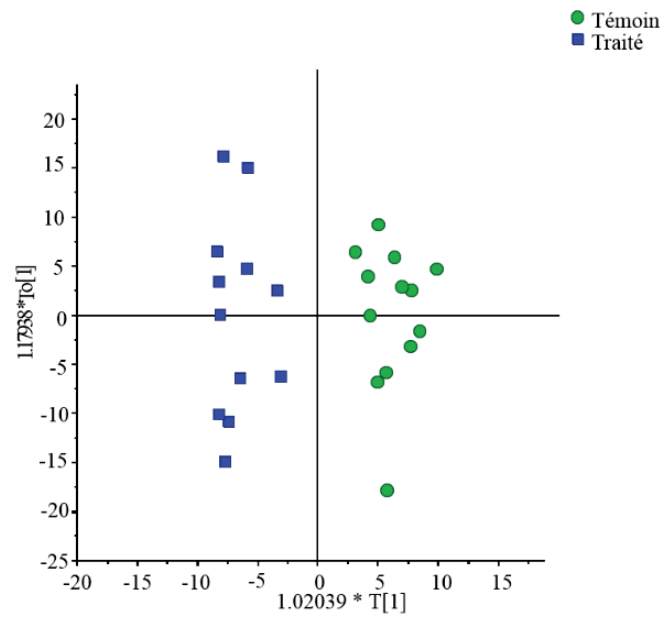


Figure 13 : Score plot d'une analyse en OPLSDA

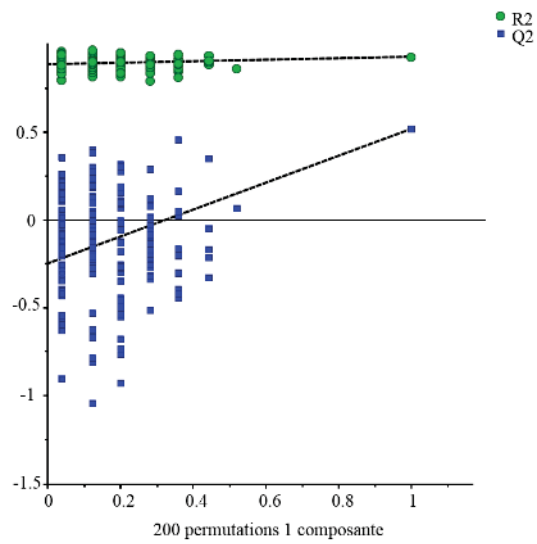


Figure 14 : Test de permutation d'un modèle retenu

État de l'art

## Méthodes d'amélioration de modèle en analyse supervisée

Les modèles générés en analyse supervisée peuvent avoir une capacité prédictive limitée ( $Q^2$  de faible valeur). De ce fait existe des méthodes d'amélioration de la capacité prédictive des modèles.

- **La sélection des variables** : basée sur la suppression des variables à faible VIP sur la composante prédictive sur le premier modèle contenant toutes les variables (Wojtowicz et al., 2017). Le choix d'effectuer une telle sélection de variables se justifie par le fait que sur l'ensemble du jeu de données, on s'attend à ce que de nombreuses variables n'aient aucun lien avec la question de recherche. Les conserver dans le modèle est pénalisant, car leur poids individuellement faible devient non-négligeable avec le nombre de variables concernées. Il est cependant important de noter que cette méthode peut entraîner des biais, et doit être utilisée avec certaines précautions. Cette méthode ne pénalise pas la recherche de biomarqueurs, mais une validation de ces derniers est impérative en dosant ces potentiels biomarqueurs dans d'autres échantillons. La validation peut également s'accompagner d'une étude mécanistique qui pourrait générer des hypothèses sur ces biomarqueurs. La sélection de variables peut ne pas être suffisante pour améliorer la capacité prédictive d'un modèle donné.
- La correction orthogonale de signaux ou Orthogonal Signal Correction (OSC) est une méthode basée sur la suppression de variabilités systématiques dans les données, mais non liées à une variable donnée (composante orthogonale). Cette méthode augmente la part du bruit dans le jeu de données filtré et est susceptible d'entraîner un sur ajustement du modèle PLS construit par la suite, et de la sorte fournir des résultats très optimistes. Aussi, une vigilance particulière doit être apportée à la validation du modèle obtenu. Cette méthode est peu appropriée pour une optique biomarqueurs, mais ne pénalise pas la recherche de mécanisme biochimique. Suite à l'application de la filtration OSC, il est important de revenir sur les données d'origine des potentiels biomarqueurs afin de pouvoir vérifier leurs capacités de séparation suivant le facteur d'intérêt.

### *E. Identification de métabolites*

Quel que soit l'outil analytique utilisé, l'identification est délicate et chronophage.

#### **RMN**

L'identification est basée sur les caractéristiques en termes de fréquences de groupement fonctionnel, disponibles notamment dans des tables (Silverstein and Bassler, 1962; Pretsch et al., 2000). Des déplacements chimiques, des couplages scalaires, des multiplicités caractéristiques sont associés aux composés RMN 1D et 2D (Dona et al., 2016). Par ailleurs, des bases de données telles que la Human Metabolome Database (HMDB) (Wishart et al., 2007) et la Biological Magnetic Resonance Data Bank (BMRB) (Ulrich et al., 2008) permettent de faciliter l'identification de métabolites en analysant les déplacements chimiques de standards. L'idéal étant de disposer d'une banque de données interne, car les spectres sont acquis dans des conditions identiques. Par la suite, la RMN 2D est utilisée pour confirmer les assignations de spectres. On distingue deux types d'analyse RMN-2D, les homonucléaires ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) et les hétéronucléaires ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  par exemple). Parmi les analyses homonucléaires, on retrouve la J-Resolved Spectroscopy (Jres). Dans cette expérience, les déplacements chimiques et les couplages sont dans deux dimensions distinctes. Cette spectroscopie a l'avantage de fournir l'information de couplage, ce qui facilite l'identification de composés. Cependant, les couplages forts sont perturbés par des artefacts et les signaux peuvent être modulés, ce qui conduit à une perte de sensibilité et d'intensité. On retrouve également comme séquence d'impulsion, la COrrrelation SpectroscopY (COSY). Cette expérience basée sur le transfert de magnétisme par couplage scalaire hors diagonale entre protons voisins permet la mise en évidence de couplage entre spins (entre protons) au sein d'une même molécule. Parmi les analyses hétéronucléaires, on retrouve la séquence Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC). Le plus souvent le noyau hétéronucléaire est le carbone. Dans cette expérimentation, l'énergie d'un proton donné est transférée au carbone puis de nouveau au proton pour acquisition. Cela permet de détecter les atomes de carbone liés à un proton. Cette méthode est intéressante, car les déplacements chimiques des protons et des carbones ne sont pas dans les mêmes dimensions. Le temps d'acquisition des spectres est long.

## LC-MS

En LC-MS, l'identification est la principale étape limitante. Il est difficile de s'appuyer sur des bases de données disponibles en ligne (Wishart et al., 2007), car les conditions d'acquisition ne sont pas identiques d'une plateforme analytique à une autre et donc non transférables. Un workflow et des niveaux d'identification et d'annotation de métabolites en LC-MS ont été définis. Ainsi, la première étape consiste à interroger les banques de données internes, pour lesquelles l'acquisition des spectres a généralement été réalisée dans les mêmes conditions chromatographiques. L'annotation se fait à l'aide du m/z et du temps de rétention. La confirmation de la structure à l'aide des spectres de fragmentation et la comparaison avec ceux de standards permet d'avoir le niveau le plus élevé d'identification. Dans le cas où aucune information n'est disponible sur les bases de données internes, on n'interroge les bases de données publiques (par exemple HMDB ou encore Kegg) pour réaliser une annotation en comparant les masses précises expérimentales et théoriques.

### Seuil d'annotation

Des seuils d'annotation généraux ont été définis par la Metabolomic Standard Initiative (Sumner et al., 2007; Dunn et al., 2013; Dona et al., 2016) :

**Composés identifiés :** Ce niveau d'identification nécessite au minimum deux critères d'identification orthogonaux : En LC-MS le temps de rétention et le spectre de masse ou Masse exacte et spectre MS/MS ; En RMN le spectre 1 dimension et un spectre 2 dimensions. La confirmation de l'identification est obtenue en analysant le standard de référence dans les mêmes conditions.

**Composés putativement annotés :** l'identification repose sur la similitude spectrale d'un composé avec les informations disponibles dans des banques de données spectrales.

**Composés putativement caractérisés :** Composés pour lesquels il n'y a pas de proposition de structure dans les banques de données spectrales, mais qui présentent des similitudes spectrales avec des composés connus d'une classe chimique donnée.

**Composés inconnus :** aucune hypothèse structurale n'a été émise.

### *G. Analyse des réseaux et voies des métabolites*

L'application d'outils bio-informatiques en métabolomique offre la possibilité de remettre les potentiels biomarqueurs d'un facteur d'intérêt dans un contexte biologique. Ces outils emploient, les réseaux métaboliques qui correspondent à l'ensemble des processus et réactions qui déterminent les propriétés physiologiques et biochimiques d'un organisme, d'une matrice biologique, d'une cellule. Les réseaux prennent en compte les réactions chimiques du métabolisme et les voies impliquées. Par exemple dans un contexte pathologique, l'identification de métabolites marqueurs, permet la mise en évidence de potentielles voies métaboliques affectées et permet la génération des hypothèses mécanistiques.

Il a été recensé un peu moins de 500 outils bio-informatiques associés à l'analyse métabolomique (<https://omictools.com/>). Parmi les outils proposés, une cinquantaine d'outils peuvent être utilisés pour l'analyse des voies et réseaux métabolomiques. Ceux-ci permettent l'enrichissement de réseaux métaboliques, l'identification, la mise en relation et la visualisation des réseaux métaboliques. Certains outils offrent la possibilité de relier des changements métaboliques à l'expression de gènes et de protéines ou encore l'analyse des flux métaboliques. Dans le travail de thèse, deux outils ont été utilisés pour remettre les potentiels biomarqueurs dans un contexte biologique.

- *Metaboanalyst* : c'est une web instance (Xia et al., 2015) qui permet l'analyse global des données métabolomiques, du traitement des données à l'analyse des voies métaboliques en passant par les analyses statistiques. Elle a été utilisée dans les travaux de thèse pour identifier les voies métaboliques dans lesquelles les potentiels marqueurs discriminants sont impliqués. L'outil MetPA (Figure 15) permet l'identification de voies métaboliques impactées. Cette identification est basée sur deux paramètres, l'enrichissement de la voie métabolique, c'est-à-dire la détermination du nombre de métabolites discriminants dans une voie métabolique donnée, représenté sur l'axe des ordonnées par la valeur de  $-\log p$ . Le second paramètre est la position des métabolites discriminants dans une voie donnée, c'est-à-dire, la définition de l'importance de ces derniers en terme d'implications dans les réactions de la voie, représenté sur l'axe des abscisses par le paramètre « pathway impact ». Un score est ainsi attribué aux voies métaboliques qui sont classées suivant l'importance.

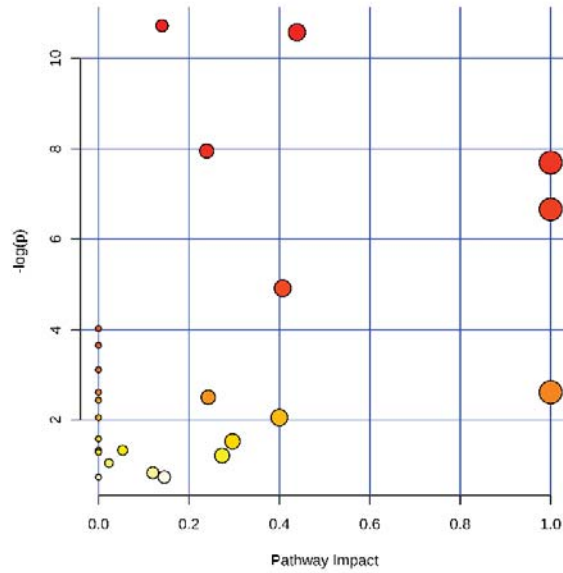


Figure 15: Identification de voies métaboliques impactées dans MetaboAnalyst

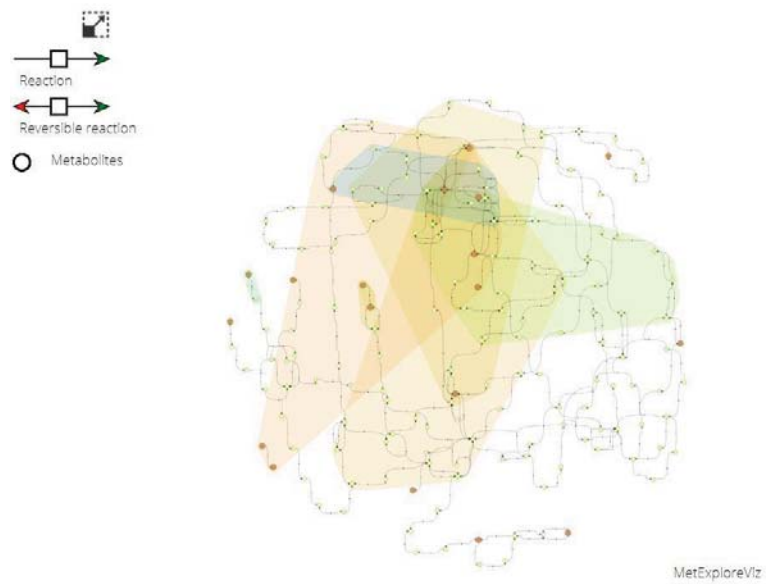


Figure 16: Sous réseau métabolique généré sous Metexplore reliant des marqueurs discriminants

État de l'art

- *Metetexplore* : est une web-instance (Cottret et al., 2010) qui permet de réaliser de l'enrichissement fonctionnel, mais aussi de connecter les métabolites d'intérêts dans un réseau. L'analyse sous Metexplore est basée sur l'implémentation des métabolites d'intérêts dans un réseau métabolique et l'application de la méthode des graphes pour mettre en évidence les relations entre métabolites. Cet outil permet de mettre sous forme de réseau les voies métaboliques impactées (Figure 16). Une série d'étape est réalisée pour construire un sous réseau. Dans un 1<sup>er</sup> temps, on choisit la biosource, c'est-à-dire le réseau métabolique sur lequel on souhaite travailler (homme, vache. Par la suite les métabolites discriminants sont implémentés dans le réseau, le plus souvent via l'utilisation d'identifiant (Kegg par exemple) ce qui permet de s'affranchir des différents dénominations que peut avoir un métabolite donné selon les bases de données. Le sous réseau est ensuite généré en se basant sur un algorithme qui soit limite le nombre d'intermédiaires (shortest path) ou privilégie les interactions les moins coûteuses d'un point de vue thermodynamique (lightest path).

L'analyse des voies et réseaux métaboliques repose sur l'utilisation de bases de données fournissant des informations sur les réactions biochimiques impliquant les métabolites. Parmi ces bases de données, on retrouve Kegg (Kanehisa et al., 2017) ou encore Biocycic (Caspi et al., 2012) qui fournissent des informations par espèce, plus ou moins détaillées et vérifiées . Dans le cadre de notre étude nous nous sommes appuyés sur le réseau métabolique de la vache, proposé par Kegg (Elsik et al., 2009).

## **Le choix de l'approche multiplateforme et les challenges analytiques de**

### **l'approche métabolomique**

En raison de la diversité chimique notamment présente au sein d'une matrice biologique, aucune technique ne peut recouvrir à elle seule la totalité du métabolome comme l'illustre, la Figure 17. C'est pourquoi la tendance actuelle est à l'utilisation des approches multiplateformes. Dans ce travail, nous avons employé deux techniques analytiques complémentaires: la RMN et la spectrométrie de masse. La RMN est une technique non destructive, qui a montré son efficacité dans l'analyse et la quantification de métabolites dans des mélanges complexes (fluides tissus biologiques). La RMN est une technique qui présente cependant peu de sensibilité. La LC-MS quant à elle, est une technique plus sensible qui permet d'obtenir des informations spécifiques sur les masses moléculaires (haute résolution), et la structure des métabolites (fragmentation MS/MS). Par ailleurs cette technique analytique permet l'analyse de molécules dans une gamme dynamique importante (en deçà du  $\mu\text{M}$ ). La spectrométrie de masse quant à elle est beaucoup moins répétable mais présente une sensibilité plus importante ce qui pourrait favoriser la détection de composés minoritaires pouvant fournir des informations pertinentes.

En prenant en considération l'ensemble des étapes nécessaire pour mener à bien une analyse métabolomique, il apparait que cette approche fait face à de nombreux challenge :

- Le premier est lié à la grande diversité de composés présentant différentes propriétés physico-chimiques et dans des gammes de concentration différentes, rendant difficile l'analyse complète du métabolome à partir d'une seule technique analytique. L'application d'une approche multiplateforme est un moyen d'améliorer la couverture du métabolome. Cependant des limites peuvent également être mentionnées tels que la quantité d'échantillon disponible, le coût des analyses multiplateformes.



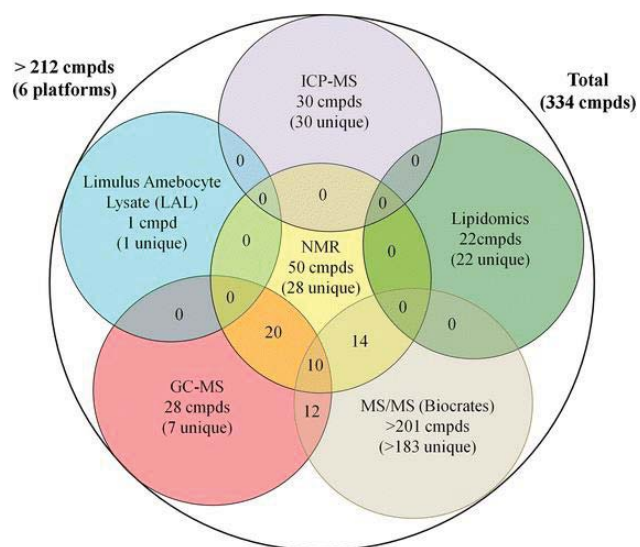


Figure 17: Diagramme de Venn représentant les chevauchements entre plateformes analytiques d'après Saleem et al. (2013)

- Un volume important de données redondantes sont générées. Le choix des méthodes de traitements des données en RMN et en spectrométrie de masse et le choix des méthodes statistiques afin d'extraire l'information utile et pertinente sont primordiales et représentent un challenge.
- L'annotation constitue le goulot d'étranglement de l'information car il est difficile d'identifier de manière précise la totalité des métabolites d'intérêts, la limite étant la disponibilité des standards. En RMN, plusieurs métabolites, peuvent résonner à un même déplacement chimique. L'application de la RMN 2D permet en partie de palier à ce problème, en disposant des standards pour valider ou non les annotations. En spectrométrie de masse un métabolite peut fournir plusieurs signaux sous formes d'adduits ou de fragments. Le regroupement 'clustering ' de l'information est nécessaire afin de limiter par la suite des erreurs d'annotation.
- La compréhension des processus biologiques impacté représente également un challenge. L'analyse des réseaux et voies métaboliques apportent des informations utiles. Ces outils d'analyses s'appuient sur des réseaux métaboliques d'organismes qui sont pour la plus part générés de manière informatique mais qui ne sont pas vérifiés et annotés. Par ailleurs il est difficile de comprendre des processus dans des compartiments complexes tels que le rumen où existent des interactions entre les microorganismes et l'animal hôte par exemple. Des outils ont très récemment été développés pour intégrer ces interactions complexes (kbase, vmh) chez l'homme.

Nonobstant de tous ces challenges mentionnées, la métabolomique est une approche en plein essor qui bénéficie d'un engouement, de collaborations (Metabohub) qui permettront, je pense de répondre au fur et à mesure à ces contraintes.

Tableau 1: Avantages et inconvénients des principales plateformes utilisées en métabolomique

	avantages	inconvénients
RMN	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Non destructive</li> <li>• reproductible et répétable</li> <li>• Quantification</li> <li>• analyse de biofluides, tissus</li> <li>• méthode de préparation d'échantillon simple</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• sensibilité faible (détection de métabolites dans des concentrations élevées)</li> <li>• superposition de spectres</li> <li>• quantité importante d'échantillons nécessaire</li> <li>• coût</li> </ul>
LC-MS	<ul style="list-style-type: none"> <li>• soft ionisation</li> <li>• indiquée pour les composés non volatils</li> <li>• sensibilité (picomole)</li> <li>• robuste</li> <li>• préparation d'échantillon</li> <li>• sélectivité</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• analyse destructive</li> <li>• reproductibilité (inter-laboratoire ; LC)</li> <li>• variabilité des instruments analytiques (MS)</li> <li>• nécessite des volumes importants de solvants</li> <li>• suppression d'ionisation</li> <li>• quantification difficile</li> </ul>
GC-MS	<ul style="list-style-type: none"> <li>• temps de rétention reproductible</li> <li>• sensibilité</li> <li>• bases de données</li> <li>• analyse de composés volatils</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• préparation d'échantillon (dérivatisation des composés)</li> <li>• dégradation des analytes</li> <li>• quantification difficile</li> </ul>

**OBJECTIFS, STRATÉGIE ET MISE EN  
ŒUVRE DES TRAVAUX**

Objectifs, stratégie et mise en œuvre des travaux

En raison de la contribution importante du méthane à l'échelle mondiale (~ 52%) aux émissions totales de gaz à effet de serre dans le secteur agricole, de nombreuses stratégies de mitigation des émissions de méthane ont été proposées. Pour tester ces stratégies sur le terrain en conditions réelles, il est nécessaire de trouver une alternative de la mesure des émissions de méthane qui soit peu coûteuse et facile à mettre en œuvre.

**L'objectif de mon travail de thèse est double, (i) rechercher de nouveaux marqueurs associés aux émissions de méthane chez la vache laitière, par une approche métabolomique multiplateforme dans 4 matrices biologique lait et le plasma ; et (ii) apporter des connaissances sur des mécanismes biologiques associés et les voies métaboliques impactées.**

La thèse est réalisée dans le cadre d'un projet Consortium-méthane qui réunit L'INRA et 11 partenaires industriels : Adisseo, Agrial, APIS-GENE, Deltavit, DSM, IDELE, Lallemand, MoyPark, Neovia, Techna, et Valorex. Le projet a pour objectif d'identifier et valider des marqueurs de la méthanogénèse entérique dans le but d'appliquer des stratégies de mitigation du méthane chez les ruminants. Ce projet s'articule autour de 5 Work Package (WP), et mon travail de thèse fait partie du WP3 dédié à l'approche métabolomique.

L'originalité de notre approche par rapport aux données publiées est la recherche de marqueurs « spécifique des émissions de méthane » en évitant tout biais expérimental **en utilisant : la même ration alimentaire, des vaches au même stade physiologique (primipare) et au même stade de lactation, un additif anti-méthane qui inhibe spécifiquement la dernière étape de la méthanogénèse chez les microorganismes producteurs de méthane.**

Pour maximiser nos chances de trouver des marqueurs « universels » de la méthanogénèse et ce quel que soit l'additif utilisé, l'autre stratégie a été de **réaliser l'analyse des profils métaboliques de 4 matrices biologiques (lait, plasma, contenu ruminal et urine) par 3 plateformes analytiques en combinant les deux outils analytiques les plus utilisés en métabolomique (RMN et spectrométrie de masse). Dans le cadre de la thèse deux matrices biologiques ont été étudiées : le lait et le plasma.**

Objectifs, stratégie et mise en œuvre des travaux

## **MATÉRIELS ET MÉTHODES**



## Matériels et Méthodes

## **Expérimentation animale**

### **1. Mise en œuvre de l'expérimentation animale**

L'expérimentation animale a été approuvée par le comité d'éthique régional (N° d'approbation 1472). L'expérimentation a été mise en place, conformément aux procédures et aux directives du Ministère français de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur et de l'Union Européenne concernant les expérimentations animales.

D'un commun accord avec les partenaires industriels du projet, il a été décidé de ne pas divulguer le nom de l'additif anti-méthane utilisé dans le cadre de l'expérimentation animale. Toutefois, il est à préciser que celui-ci a été déjà testé et a prouvé son efficacité pour réduire les émissions de méthane.

L'essai a été réalisé sur 25 vaches primipares Holsteins, participant pour la première fois à une expérimentation animale. Les données physiologiques relatives à chaque animal sont disponibles en annexe (1). Les animaux ont été appariés selon leurs dates de vêlage, la matière sèche ingérée (MSI) et la production laitière (PL). Ils ont ensuite été répartis en 4 groupes suivant la proximité de date de vêlage. Au sein d'un groupe, les paires d'animaux ont été séparés en deux lots, (Contrôles (n=13) vs Traités (n=12)) homogènes et équilibrés (Figure 18) suivant la présence ou non de l'additif anti-méthane.

L'expérimentation s'est déroulée sur 8 semaines comprenant 2 semaines d'adaptation au régime alimentaire (SA1 & SA2), 5 semaines d'expérimentation (S1 à S5 ; les prélèvements pour analyses métabolomiques ont été réalisés en S5) et 1 semaine dédiée aux mesures des émissions de méthane en enceinte (S6). Les groupes d'animaux sont entrés en expérimentation avec un décalage d'une semaine, (la 6<sup>ième</sup> semaine de lactation), ce qui permet d'avoir des animaux au même stade de lactation lors des prélèvements d'échantillon pour analyse (Figure 19).

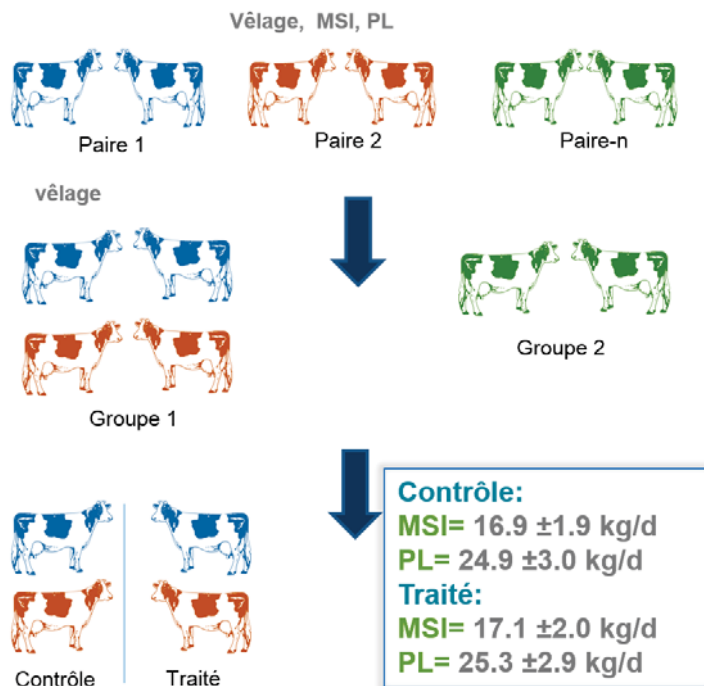


Figure 18: Schéma de répartition des animaux dans les groupes au début de l'expérimentation animale

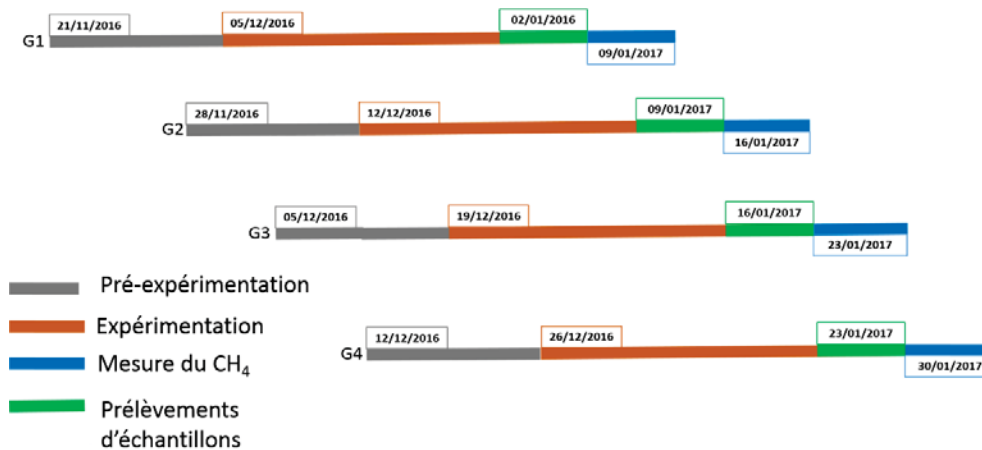


Figure 19 : Phases et implication des animaux dans l'expérimentation animale suivant le groupe

Tableau 2: Formulation du prémix

Premix	Contrôle (%)	Traité (%)
Mélasse de betterave	6	6
Huile de tournesol	16	16
Farine de maïs	75	75
additif (placebo/additif anti CH4)	3	3
UFL	1,4	1,4
MG	207	207
PDIN g/kg MS	63	63
PDIE g/kg MS	76	76
MAT g/kg MS	86	86
NDF g/kg MS	220	220
Amidon g/kg MS	392	392
(PDIN-PDIE)/UFL	-9,29	-9,29

Tableau 3: Formulation de la ration distribuée aux animaux

Ration finale	Contrôle (%)	Traité (%)
Ensilage de maïs	35	35
Concentré (INRA)	21	21
Foin	30	30
Farine de soja	12	12
Premix	2	2
UFL	0,91	0,91
MG	28	28
PDIN g/kg MS	105	105
PDIE g/kg MS	104	104
MAT g/kg MS	150	150
NDF g/kg MS	435	435
Amidon g/kg MS	178,4	178,4
(PDIN-PDIE)/UFL	1 099	1 099

Les animaux ont été logés en stabulation libre équipée de portillon électronique pour mesurer les quantités ingérées tout au long de l'expérimentation, à l'exception de la semaine de mesure du méthane où ils ont été conduits en enceinte respiratoire.

Le plan de rationnement, la composition du régime ont été identiques pour tous les animaux, tout au long de l'expérimentation et les quantités distribuées ont été adaptées individuellement aux besoins de chaque animale. Les régimes alimentaires des groupes Contrôles et Traités n'ont différé que par la présence ou non dans l'alimentation d'un composé anti-méthane qui cible spécifiquement la dernière étape de la méthanogénèse. Les pourcentages de fourrage et concentré de production ont été respectivement de 65 et 35 %. Le composé actif administré à faible dose (0,06% de l'alimentation distribuée) a été préparé dans un prémix et incorporé dans la ration totale. Les compositions du prémix et de la ration totale sont présentées dans les Tableaux 2 et 3.

Des semaines d'adaptation au régime alimentaire à la semaine de collecte des échantillons pour analyse métabolomique (SA1 à S5), la ration a été distribuée ad libitum et restreinte à 95 % ad libitum en semaine 6. Etant donné la faible quantité d'additif anti-méthane ajoutée dans la ration (0,06% de la ration), il est important de s'assurer qu'il n'y ait pas de refus pendant la semaine de mesure des émissions de méthane. La ration a été distribuée 2 fois par jour (9 h et 16 h) dans les proportions 2/3 et 1/3. Les quantités distribuées ont été réajustées toutes les semaines en pesant les refus (quantité d'aliment restante).

## 2. Mesure en cours et en fin d'expérimentation

### *A. Mesure de paramètres zootechniques*

Des mesures quotidiennes et hebdomadaires ont été réalisées tout au long de l'expérimentation afin de vérifier l'état général des animaux de l'expérimentation animale. Ces mesures ont concerné la pesée des animaux, la mesure de la teneur en matière sèche des aliments, les quantités ingérées et les refus. Des analyses biochimiques de la matière sèche, de la production et de la composition du lait ont été réalisées (données disponibles en annexe 2).

### *B. Bilan énergétique et état sanitaire*

L'état sanitaire global des animaux a été vérifié à l'aide d'examen biochimiques plasmatiques en début et en fin d'expérimentation (semaine 5). Le sang a été collecté dans des vacutainers EDTA ou héparine suivant le dosage à réaliser par la suite. Le plasma a été obtenu par centrifugation à 2000 g pendant 15 min à 4°C, et a été utilisé pour les analyses suivantes: les taux de glucose de beta hydroxy butyrate (Beta OH) des acides gras non estérifiés (NEFA), de l'urée, des enzymes du foie (Alanine aminotransferase, aspartate amino-transferase, Gamma glutamyl transpeptidase, Phosphatase Alkaline (ALAT, ASAT, GGT et PAL). Ces analyses ont été effectuées sur un analyseur photométrique ARENA 20 XT (Thermo Fisher Scientific; Vanta Finland) avec les kits recommandés par le constructeur (Thermo Fisher Scientific; Vanta Finland).

### *C. Prélèvement d'échantillon pour analyse métabolomique*

En semaine 5, des prélèvements d'urines, de fèces, de lait, de sang et de contenu ruminal ont été réalisés avant la prise de la ration alimentaire du matin. Les méthodes de prélèvements et le processing des matrices biologiques sont présentés en annexe 3. Brièvement :

- **Les urines** : Les prélèvements d'urines ont été réalisés sur 3 journées consécutives (10 ml), et directement congelées à -20 °C. Une fois tous les prélèvements réalisés, les échantillons ont été poolés par vache afin d'avoir un échantillon représentatif du métabolisme. Les échantillons d'urine ont été conservés à -80 °C.
- **Le lait** : Les échantillons ont été prélevés au cours de la traite (15 ml) sur deux journées successives matin et soir et conservés à -20 °C. À la fin de l'expérimentation et pour chaque vache, la traite d'une journée a été poolée en fonction des productions du matin et du soir (2/3 et 1/3) et mélangés sur deux jours consécutifs pour chaque vache pour avoir une représentation plus juste du métabolisme du lait. Les échantillons de lait ont été transférés dans des Eppendorfs et conservés à -80 °C.

- **Le sang** : Les prélèvements de sang tubes héparinés (10 ml) ont été réalisés au niveau de la veine jugulaire. Les échantillons ont été centrifugés (10 minutes, 3000 g, 4 °C), et le plasma a été transféré dans des tubes Eppendorfs (1,5 ml) conservés à -80 °C.
- **Le contenu ruminal** a été prélevé par intubation œsophagienne (500 ml). Les échantillons sont filtrés, transférés dans des Eppendorfs et plongés dans l'azote liquide avant conservation à -80 °C.

Le plasma et le lait ont été analysés dans le cadre de la thèse.

#### *D. Mesure du méthane*

En semaine 6, les mesures des cinétiques des émissions de méthane ont été réalisées en enceinte respiratoire sur quatre jours consécutifs. Pour des raisons de logistiques (quatre enceintes respiratoires disponibles), les mesures n'ont concerné que 16 animaux (quatre animaux par semaine, c'est-à-dire deux Témoins et deux Traités). Les caractéristiques et le paramétrage des enceintes respiratoires ont été précédemment décrits par Guyader et al. (2015b).

## **Publication 1: Sample preparation optimization of cow milk for NMR-based metabolomics**

Les travaux présentés dans ce chapitre ont consisté à optimiser une méthode de préparation des échantillons de lait destiné à l'analyse des profils métaboliques par RMN. Pour cela, 8 méthodes de préparation d'échantillon ont été testées et évaluées en termes de qualité visuelle des spectres, de répétabilité, d'efficacité et de rendement d'extraction. Au terme de l'évaluation, l'extraction au méthanol a été retenue pour l'analyse des profils métaboliques. La méthodologie a été validée sur des échantillons de lait provenant d'une expérimentation utilisant 16 vaches laitières réparties en deux groupes dont l'un a reçu, un additif alimentaire qui réduit les émissions de méthane de 30 % (Guyader, 2016). L'analyse statistique multivariée a montré une séparation des deux groupes d'animaux. Cinq métabolites discriminants ont été mis en évidence. Un travail similaire d'optimisation de méthode de préparation d'échantillon a été réalisé en vue d'une analyse en LC-MS. La publication est en cours de rédaction.



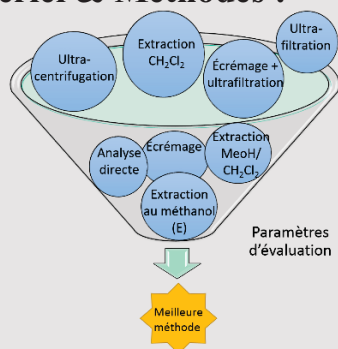
## Matériels et Méthodes

## Résumé : Comparaison et évaluation de méthode de préparation d'échantillon pour une analyse du lait en métabolomique RMN

### Objectifs :

- Réaliser une étude bibliographique sur les méthodes de préparation d'échantillon de lait pour une analyse métabolomique RMN.
- Evaluer les méthodes sélectionnées selon des paramètres d'évaluation.

### Matériel & Méthodes :



Paramètres d'évaluation	Caractéristiques
Qualité des spectres	Acquisition de signaux fins et résolus en RMN et absence de signaux de macromolécules
Rapport signal/ bruit	rapport entre l'intensité maximal d'un signal et le bruit de fond
Répétabilité	évaluation de la variabilité sur des mesures successives
Capacité d'extraction	Capacité d'un protocole à extraire un métabolite en terme d'intensité
Rendement d'extraction	Taux de récupération des métabolites après extraction

- Huit méthodes de préparation d'échantillon du lait ont été testées : l'analyse directe du lait, l'ultracentrifugation, l'écémage, l'ultrafiltration, la combinaison des deux, les précipitations au méthanol, au dichlorométhane, la combinaison des deux.
- Les extraits de lait ont été analysés par RMN du proton sur un instrument résonnant à une fréquence de 600 MHz (spectromètre Bruker Avance III équipé d'une cryosonde).
- L'évaluation des protocoles a été réalisée sur des paramètres (voir tableau).
- Une validation des capacités de la méthode retenue a été réalisée sur un jeu de données expérimentales impliquant 16 vaches laitières, séparées en deux groupes suivant la présence ou non d'un additif alimentaire anti-méthane.

### Résultats :

- L'évaluation de la qualité des spectres a permis de retenir l'écémage, l'ultrafiltration, la combinaison de l'écémage et de l'ultrafiltration, la précipitation au méthanol, au dichlorométhane et la combinaison des deux solvants organiques.
- La précipitation au méthanol a présenté la meilleure répétabilité.
- Les préparations d'échantillons impliquant des solvants organiques ont permis une meilleure extraction des métabolites en termes d'intensité.
- La précipitation au méthanol a été retenue et l'analyse des spectres obtenus a permis d'annoter plus de 30 métabolites.
- Une validation des capacités de la méthode retenue a été réalisée sur un jeu de données expérimentales impliquant 16 vaches laitières, séparées en deux groupes suivant la présence ou non d'un additif alimentaire anti-méthane. Une discrimination des groupes a été mise en évidence et quatre métabolites discriminants ont été identifiés.

### Conclusion :

- ✓ La préparation d'échantillon par précipitation au méthanol répond le mieux aux critères d'évaluation et a été retenue pour l'analyse du lait en RMN pour la suite des travaux.

## Matériels et Méthodes

Received:  
16 April 2018

Revised:  
24 July 2018

Accepted:  
10 October 2018

Cite as: Bénédicte Yanibada, Hamid Boudra, Laurent Debrauwer, Cécile Martin, Diego P. Morgavi, Cécile Canlet. Evaluation of sample preparation methods for NMR-based metabolomics of cow milk. *Heliyon* 4 (2018) e00856. doi: 10.1016/j.heliyon.2018.e00856



# Evaluation of sample preparation methods for NMR-based metabolomics of cow milk

Bénédicte Yanibada<sup>a</sup>, Hamid Boudra<sup>a,\*</sup>, Laurent Debrauwer<sup>b,c</sup>, Cécile Martin<sup>a</sup>, Diego P. Morgavi<sup>a</sup>, Cécile Canlet<sup>b,c</sup>

<sup>a</sup> Université Clermont Auvergne, INRA, VetAgro Sup, UMR Herbivores, F-63122, Saint-Genès-Champagnelle, France

<sup>b</sup> Toxalim, Research Centre in Food Toxicology, Université de Toulouse, INRA, ENVT, INP-Purpan, UPS, F-31027, Toulouse, France

<sup>c</sup> Axiom Platform, MetaToul-MetaboHUB, National Infrastructure for Metabolomics and Fluxomics, F-31027, Toulouse, France

\* Corresponding author.

E-mail address: [abdelhamid.boudra@inra.fr](mailto:abdelhamid.boudra@inra.fr) (H. Boudra).

## Abstract

The quality of milk metabolome analyzed by nuclear magnetic resonance (NMR) is greatly influenced by the way samples are prepared. Although this analytical method is increasingly used to study milk metabolites, a thorough examination of available sample preparation protocols for milk has not been reported yet. We evaluated the performance of eight milk preparation methods namely (1) raw milk without any processing; (2) skimmed milk; (3) ultrafiltered milk; (4) skimming followed by ultrafiltration; (5) ultracentrifuged milk; (6) methanol; (7) dichloromethane; and (8) methanol/dichloromethane, in terms of spectra quality, repeatability, signal-to-noise ratio, extraction efficiency and yield criteria. A pooled sample of milk was used for all protocols. Skimming, ultracentrifugation and unprocessed milk protocols showed poor NMR spectra quality. Protocols involving multiple steps, namely methanol/dichloromethane extraction, and skimming followed by ultrafiltration produced inadequate results for signal-to-noise ratio parameter. Methanol and skimming associated to ultrafiltration provided good repeatability results compared to the other protocols. Chemical-based sample preparation

protocols, particularly methanol, showed more efficient metabolite extraction compared to physical preparation methods. When considering all evaluation parameters, the methanol extraction protocol proved to be the best method. As a proof of utility, methanol protocol was then applied to milk samples from dairy cows fed a diet with or without a feed additive, showing a clear separation between the two groups of cows.

Keywords: Nutrition, Food analysis, Analytical chemistry

## 1. Introduction

Information on milk composition is used in the dairy industry to assess milk quality and to optimize technological processes. Milk is an attractive matrix for diagnostic purposes and to improve the farming system because of the presence of different classes of molecules. The non-invasive character of sample collection is also an advantage of this matrix (Jenkins et al., 2015). Analytical techniques like Mid-Infrared (MIR) spectroscopy (Ye et al., 2016) are routinely used to measure milk's major compounds like lipids, proteins, lactose (Di Marzo and Barbano, 2016) and minerals (Visentin et al., 2016). MIR spectroscopy shows benefits like rapidness and reproducibility but accurate identification of compounds is limited. Analytical techniques such as Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and Mass spectrometry (MS) used in metabolomics are attractive because they provide both qualitative and quantitative information on hundreds of compounds present in biological matrices (de Graaf et al., 2015; Pinto et al., 2015). The information provided by such milk metabolomics studies has been applied to certify both geographical and species origins (Andreotti et al. 2000, 2002; Li et al., 2017) and to assess its technological and nutritional value (Sundekilde et al., 2011). Other studies investigated the physiology of lactation (Klein et al., 2010; Ilves et al., 2012) or methane mitigation strategies (Antunes-Fernandes et al., 2016) in dairy cows.

In a metabolomic study, each step is crucial to produce good quality data, starting from a standardized sample collection up to the analysis (Álvarez-Sánchez et al., 2010). Several papers showed that sample preparation strongly affects metabolite profile (Le Gall, 2015), highlighting the importance to optimize the process. A sample preparation method for global metabolomics analysis has to be non-selective, with a minimal number of steps (Vuckovic, 2012). Since each biological fluid has a particular composition, optimization is required for each analytical platform in order to produce optimal results. For NMR analysis, a good sample preparation method should generate reproducible spectra with low intersample chemical shift variability, provide high signal-to-noise ratio (SNR), and allow the detection of the highest number of metabolites. In addition, the method should preferably be rapid, robust, non-selective and compatible with high-throughput analyses. Several milk preparation methods have been reported in the literature. These methods are diverse and range from the use of unprocessed

milk with simply the addition of deuterated water before analysis (Hu et al., 2007) to various physical and chemical processing methods such as centrifugation (skimmed milk) (Sundekilde et al., 2011; Tian et al., 2016), ultrafiltration (Klein et al. 2010, 2012), centrifugation and ultrafiltration (Sundekilde et al., 2013a), ultracentrifugation (Lu et al., 2013), methanol (protein precipitation) (Wu et al., 2016), and chloroform (Lamanna et al., 2011). Each method has advantages and disadvantages. Physical separation protocols do not affect the concentration of volatile compounds as there is no evaporation step involved. However, the recovery of some metabolites can be affected by the type and amount of macromolecules characteristic of milk from different mammals. In contrast, chemical precipitation protocols are useful to discard macromolecules such as proteins and lipoproteins. This is important for NMR metabolomics analysis since macromolecules can hinder metabolite signals and hamper quantification (Beckonert et al., 2007) but an evaporation step is necessary. Comparison of sample preparation protocols was reported for blood (Nagana Gowda et al., 2015), feces (Lamichhane et al., 2015) and tissues (Wu et al., 2008). For dairy milk, to the best of our knowledge, the comparison of the existing protocols for NMR analysis has not been reported. In the present study, we developed a systematic and standardized procedure to compare different milk sample preparation protocols for NMR metabolomics analysis. Various parameters were used, namely 1D NMR spectrum quality, signal-to-noise ratio (SNR), repeatability, efficiency and yield of extraction. Subsequently, the best protocol was then used to compare metabolite profile of milk samples obtained from dairy cows fed a diet with or without a feed additive.

## 2. Materials and methods

Milk samples used were obtained from previous animal studies conducted according to procedures approved by the regional ethical committee and in accordance with applicable French and European guidelines. The approval numbers are CE50-12 and 821-2015060811534198.

### 2.1. Chemicals

Methanol and dichloromethane were purchased from Scharlau SL (Sentmenat, Spain), deuterium oxide (D<sub>2</sub>O) and sodium 3-trimethylsilyl-2,2,3,3-tetradeuteriopropionate (TSP) from Eurisotop (Saint-Aubin, France). Hippuric acid, 3-hydroxybutyric acid, citric acid, formic acid, and L-Alanine were purchased from Sigma Chemical Company (Saint Louis, MO).

### 2.2. Sample preparation

Protocols were evaluated by analyzing replicate sets (n = 6) of quality control samples (QC) prepared from a pooled milk sample that were collected (10 ml from each

cow) from four lactating Holstein cows ( $54 \pm 14$  days in milk) receiving a diet consisting of 56% corn silage, 4% hay and 40% of concentrate. Milk samples were collected at each milking, twice in a single day aliquoted by fraction of 500  $\mu$ l and immediately stored at  $-80$  °C. Samples were thawed on ice and mixed for each individual cow at a 3:2 ratio for the morning and evening milking, respectively. In this study, 8 different sample preparation protocols described in the literature were evaluated: (1) raw milk without any processing (Hu et al., 2007); (2) skimmed milk (Sundekilde et al., 2011), (3) ultrafiltered milk (Klein et al. 2010, 2012), (4) skimming followed by ultrafiltration (Sundekilde et al., 2013a), (5) ultracentrifuged milk (Lu et al., 2013); (6) methanol (Wu et al., 2016), (7) dichloromethane (Lu et al., 2015) and (8) methanol/dichloromethane (Pratico et al., 2014; Andreas et al., 2015). Protocols 2 to 5 are physical separation protocols using centrifugation and/or filtration whereas protocols 6 to 8 are based on chemical sample preparation. Samples were thawed on ice, homogenized by vortex mixing and processed following each specific procedure. To minimize changes in the metabolome during sample preparation, samples were kept on ice or at  $4$  °C whenever possible and each protocol was performed as quickly as possible, i.e. no waiting time between steps.

For physical separation protocols, skimmed milk samples were prepared by centrifugation of 500  $\mu$ l of milk at 1,000 g for 15 min. The aqueous layer was aspirated and transferred into 1.5 ml Eppendorf tubes for a second centrifugation step using the same parameters. Ultrafiltration was undertaken with Amicon centrifugal filter units (cut-off 10 kDa) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) as described by (Sundekilde et al., 2013a). Filters were prewashed as described by (Zacharias et al., 2013). A double wash was necessary to remove contaminants and protective agents released by the filter. A preliminary test was performed on protocols using ultrafiltration to determine the minimum milk dilution that gave the largest volume of filtered milk. Different volumes of water (50-100-150-250 and 300  $\mu$ l) were added into 500  $\mu$ l milk, vortex mixed and centrifuged at 14,000 g for 20 min at  $4$  °C. Adding a volume of 50  $\mu$ l of water was optimal for ultrafiltration protocol but none of the tested volumes changed the volume recovered from the protocol combining skimming and ultrafiltration, as the skimming steps discarded a great amount of high molecular weight compounds. Ultracentrifugation was performed at 140,000g for 75 min at  $4$  °C (Beckman L8-55M, Brea, USA). The lower layer was collected in glass tubes, centrifuged at 16,000 g for 20 min at ambient temperature ( $20$  °C) to remove remaining fat and the supernatant was used for analysis. For each physical separation protocol, the final volume collected was measured and adjusted to 500  $\mu$ l with Milli-Q water.

For chemical based preparation protocols, 500  $\mu$ l of milk samples were transferred into Pyrex glass tubes to avoid any interaction between the solvent and the container. For the methanol protocol as described by Wu et al. (2016), 1 ml of cold methanol was added to the milk sample. The mixture was vortexed, stored at  $-20$  °C for 30 min

and centrifuged at 18,000 g for 10 min at 4 °C. The methanol-water solution was then transferred to a glass tube using a Pasteur pipette and evaporated to dryness using a Speedvac evaporator (Thermo Scientific, Waltham, USA) without heating for 3 hours. The residue was dissolved in 500 µl of Milli-Q water for the analysis of polar compounds. The dichloromethane protocol was described by [Lu et al. \(2015\)](#). Briefly 1 ml dichloromethane was mixed with 500 µl of milk, vortexed for 20 seconds, and centrifuged at 8,000 g for 20 min at room temperature (20 °C). The milk aqueous layer was collected, the volume was adjusted to 500 µl and analyzed without any other processing. The methanol/dichloromethane protocol ([Pratico et al., 2014](#); [Andreas et al., 2015](#)) involved the use of 6 ml of methanol/dichloromethane mixture (1:2, v: v). Samples were homogenized with a vortex mixer for 10 seconds and centrifuged at 1,500 g for 5 min at 4 °C. The supernatant was collected (2.3 ml), mixed with 1.2 ml of NaCl (0.9%), and centrifuged as described in the first step. The top aqueous layer was collected, evaporated to dryness as described above for the methanol protocol and the residue was dissolved in 500 µl of Milli-Q water for the analysis of polar compounds.

Metabolite quantification and recovery were tested on protocols that passed the first NMR spectra quality step. Samples were spiked at 0.12 M with a standard mixture containing hippurate, 3- hydroxybutyrate, alanine, citrate, and formate. These five metabolites were chosen as they are naturally present in milk and they display chemical shifts covering a broad spectrum range (from 1.47 to 8.46 ppm). For each protocol, three replicates were spiked with the standard mixture and three without as follows: to 250 µl of QC sample, 50 µl of standard mixture or 50 µl of Milli-Q water were added. After the different sample preparations, Milli-Q water was added if necessary to obtain a final volume of 500 µl. Control samples were also prepared, using 50 µl of the standard mixture and 450 µl of Milli-Q water.

The chosen protocol was finally tested using samples from an independent study to validate the methodology. For that, we used milk samples obtained from individual cows from a study described by ([Guyader et al., 2016](#)). In this study, lactating cows were allocated into two groups that were fed a similar diet consisting of 54% maize silage, 6% of hay, and 40% of concentrate supplemented (Treated, n = 8) or not (Control, n = 8) with 3.5% fat from linseed and 1.8% nitrate. Linseed and nitrate are known to reduce methane emission without affecting digestibility and animal health ([Doreau et al., 2014](#)). Both groups were balanced for calving date, milk production and had similar proportion of crude protein, starch, and fiber content in the diet. All these factors are known to influence milk composition and milk metabolome ([Antunes-Fernandes et al., 2016](#)). We choose this study because we hypothesized that differences in milk metabolome between the two groups would not be large and to be able to detect these differences using a relatively reduced number of individuals the analytical variance accounted for the sample preparation protocol



needs to be low. Milk samples were collected in week 16 of the study, stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  and processed as described above.

### 2.3. NMR analysis

Before NMR analysis, 200  $\mu\text{l}$  of deuterium oxide ( $\text{D}_2\text{O}$ ) phosphate buffer (pH 7) solution containing sodium trimethylsilyl propionate (TSP) was added to milk samples to avoid possible chemical shift drifts due to pH effects (De Marco, 1977). Samples were then vortexed and centrifuged at 5,500 g for 10 min at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  and the supernatants were analyzed by  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy. The supernatants (600  $\mu\text{l}$ ) of each sample were transferred into 5 mm NMR tubes.  $^1\text{H}$  NMR spectra were acquired on a Bruker Avance III HD spectrometer (Bruker, GMBH, Karlsruhe, Germany) operating at 600.13 MHz, equipped with an inverse detection 5 mm  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$ - $^{31}\text{P}$  cryoprobe connected to a cryoplatfom and a cooled SampleJet sample changer, using TopSpin 3.2 software (Bruker, GMBH, Karlsruhe, Germany). The temperature was allowed to stabilize for 5 min after insertion into the magnet. Tuning, matching, and shimming was performed for each sample, and the  $^1\text{H}$  pulse length was calibrated on each sample and was typically around 10  $\mu\text{s}$ . Spectra were acquired using a Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) spin echo sequence used to reduce macromolecular signals (Gowda et al., 2008) with a 5 seconds-relaxation delay to attenuate proteins and lipoproteins broad signals. A water suppression signal was achieved, by presaturation during the relaxation delay. The spectral width was set to 20 ppm for each spectrum and 128 scans (16 dummy scans) were collected with 32K points. Free induction decays were multiplied by an exponential window function ( $\text{LB} = 0.3$  Hertz used to avoid broad signals) before Fourier Transform. The spectra were manually phased and the baseline was corrected. All spectra were referenced to TSP signal at 0 ppm. A 1D NO-ESY pulse sequence was used to evaluate amounts of residual macromolecule signals. A relaxation delay of 5 seconds was used, the receiver gain was set to 45.2 and 128 scans with 32 K points were collected. Also, zgpr 1D pulse sequence was used for quantitative NMR. A relaxation delay of 8 seconds was used, the receiver gain (rg) was set to 36, and 512 scans were collected with 32K points. The line broadening was set at 0.3.

### 2.4. Data quality assessment

Before analysis of milk samples, sensitivity, lineshape, and water suppression were checked using NMR sample reference tubes 0.1% Ethylbenzene in  $\text{CDCl}_3$  (Bruker, Z10121), 1%  $\text{CHCl}_3$  in acetone- $d_6$  (Bruker, Z10250), and 2mM sucrose 10%  $\text{D}_2\text{O}$  (Bruker, Z10268), respectively. After shimming optimization, values obtained corresponded to manufacturer's specifications. Temperature stability was checked with the 4% Methanol in methanol- $d_4$  NMR standard tube (Bruker, Z10128). The shim quality

was appraised using the line width of TSP at 50% of its full height (0.86 Hz), as it is recommended by (Sumner et al., 2007). The line width at half height of residual water was 2.72 Hz indicating that the water suppression was within specification. The baseline was manually corrected, removing distortions and setting the corrected baseline near to the zero intensity level. Aware that TSP might interact with proteins in milk, we verified that TSP did not have any negative effect on calibration and normalization by following the recommendations made by (Beckonert et al., 2007). In order to detect eventual protein binding on TSP, the measurement of the width at half height for each spectra was done. TSP signal was considered good if the value was lower than 2.5 (with a line broadening of 1 Hz). The line width half height is inversely proportional to the relaxation time. Since macromolecules such as proteins have small relaxation times, TSP binding to proteins would lead to line width half heights larger than 10 Hz when using a CPMG sequence. We evaluated the amount of residual macromolecules in different sample preparations. The superposition of zgpr and CPMG spectra helped to identify attenuated signals belonging to macromolecules. The calculation of integral signals and the comparison to the spectra integral (without water signals) gave an estimation of the extent of residual macromolecule signals. Resolution was quantified by calculating, width at half height for each signal.

## 2.5. Data processing and statistical analysis

The NMR spectra were imported in the Amix software (version 3.9, Bruker, Rheinstetten, Germany) for data processing. A variable size bucketing was used based on graphical pattern (166 buckets), each integrated region was normalized to the TSP signal. Data were analyzed by chemometrics tools as unsupervised principle component analysis (PCA) and supervised orthogonal projections to latent structures-discriminant analysis (OPLS-DA) (Trygg and Wold, 2002) using SIMCA P+ (V14, Umetrics AB, Umea, Sweden). PCA was first performed to look for trends, clusters between protocols or identify potential outliers. For the samples used for validation, based on both Hotelling and the distance to the model (DModx) plots, two samples from the treated group were outliers and then removed. These two samples had altered spectra with an important methanol signal, probably caused by incomplete evaporation of methanol. Supervised OPLS-DA was performed on validation samples to reveal potential markers of response to additive supplementation. The performances of the models were assessed by their predictive ability ( $Q^2$ ) and the proportion of explained variable ( $R^2$ ). A cross-validation procedure was used to assess the robustness of the model using the permutation test proposed by SIMCA P+ (V14, Umetrics AB, Umea, Sweden). Most predicted values ( $Q^2$ ) obtained by the permutation test were equal or lower than those of the original model indicating its validity (Fig. 5B).

## 2.6. Performance evaluation

For each protocol, spectrum quality, SNR of each signal, intra-run variability and sample preparation efficiency were checked. For spectrum quality, signals shapes were visually evaluated. For protocols that successfully pass this first evaluation, they were evaluated in terms of signal to noise ratio (SNR), repeatability, extraction efficiency. The SNR was evaluated by designing spectral region integral for each sample preparation methods, to define signal and noise (10–10.5 ppm) regions for the SNR calculation. Topspin “Sino” function based on an automatic calculation of the most intense SNR for each defined region was applied. The threshold of SNR to consider a peak as a real signal was set to 20. The repeatability was evaluated on the selected buckets ( $n = 166$ ). The repeatability between the different protocols was first visualized using PCA (see Supplementary Material S1) (Trygg et al., 2007; Lindon et al., 2001), and then evaluated by calculating the coefficient of variation (CV) defined as the ratio of the standard deviation to the mean of the signal intensities, which was considered as acceptable if lower than 10%. The extraction efficiency was assessed based on a geometric method proposed by (Martineau et al., 2011), it was assessed by evaluating the contribution of each bucket in the discrimination process among the protocols. Also, the concentration of 10 identified metabolites namely butyrate, valine, isoleucine, acetone, glutamate, citrate, creatine, galactose, orotate and hippurate was determined in different protocols. The calculation was performed using TSP integration value set to an arbitrary value of 100. The calculation used signal multiplicity, integration value and TSP concentration. Additionally, metabolite recovery was tested with QC samples spiked with a standard mixture containing five metabolites (see Supplementary Material S2). NMR spectra obtained on unspiked and spiked QC and the pure solution of standards were compared.

## 2.7. Metabolite annotation

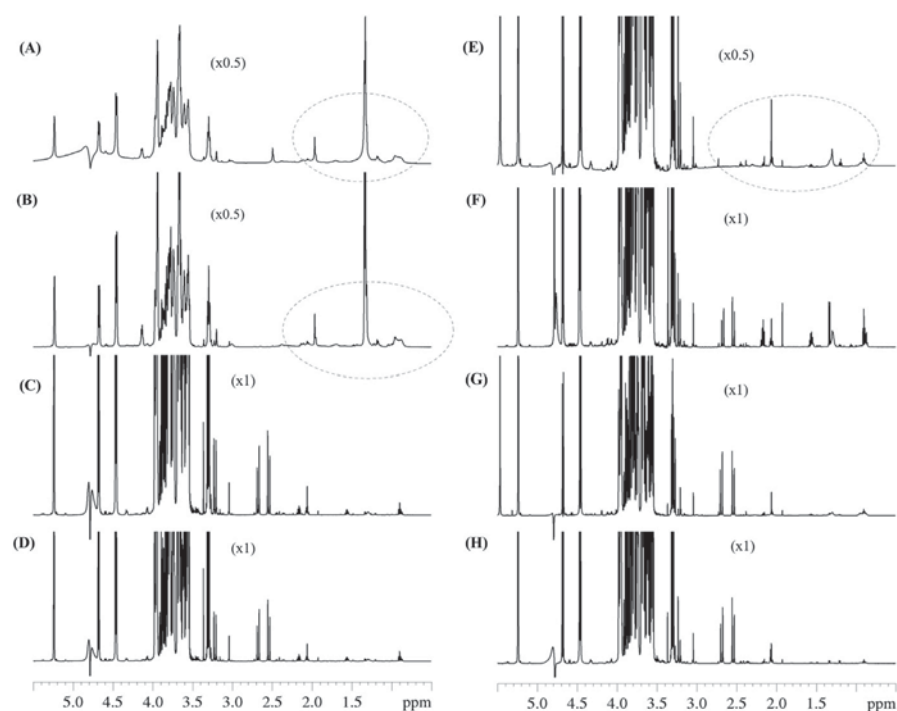
The annotation of metabolites was performed, in the first instance by comparing chemical shifts and coupling constants, with  $^1\text{H}$  NMR spectra of reference compounds acquired under the same conditions. We further followed the annotation by comparing our data with published studies (Sundekilde et al., 2013a,b; Yang et al., 2016; Li et al., 2017; Klein et al., 2010) and on standards implemented in databases like the Human Metabolome Database (Wishart et al., 2007) (<http://www.hmdb.ca/metabolites>) and the Biological Magnetic Resonance Data Bank (Ulrich et al., 2008) (<http://www.bmrb.wisc.edu/metabolomics/metabolomicsstandards.shtml>). Identified chemical structures were confirmed using two-dimensional NMR experiments (2D J-Resolved  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy, 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  Correlation Spectroscopy, 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  Heteronuclear Single Quantum Spectroscopy). According to Sumner et al. (2007), metabolites are identified at the Metabolomics Standards

Initiative (MSI) level 1 if two independent and orthogonal data are identical to those of a reference compound analyzed under the same conditions (for example  $^1\text{H}$  NMR spectrum and 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC NMR spectra). If this information is not available the metabolite is putatively annotated from publications or databases (MSI level 2). The identification MSI level is given for each metabolite.

### 3. Results

#### 3.1. 1D NMR spectra quality

The 1D NMR spectra quality was compared for the different protocols. Analysis of raw milk without any processing, milk skimming and milk ultracentrifugation led to spectra displaying broad signals (Fig. 1A, B and E). For instance, spectra obtained without any processing or following skimming showed large signals from 0.84 to 2.5 ppm, as shown in Fig. 1. These signals likely correspond to macromolecules which were not efficiently removed and which may hinder resonance signals from relevant metabolites. In contrast, ultrafiltration or methanol protocols (Fig. 1C and F) provided accurate and well resolved signals. On the basis of this first observation, the protocol without any processing as well as skimming and ultracentrifugation



**Fig. 1.** 600 MHz 1D  $^1\text{H}$  NMR CPMG spectra obtained from cow milk prepared by different protocols. Raw milk without any processing (A), skimmed milk (B), ultrafiltered milk (C), skimming followed by ultrafiltration (D), ultracentrifuged milk (E), methanol (F), dichloromethane (G) and methanol/dichloromethane (H). Circles in the spectra indicates regions containing signals from macromolecules.

protocols were excluded for the next steps of the evaluation. For the five other protocols, the amount of residual macromolecules were quantified. Physical extraction protocols had the lowest amount of residual macromolecular signals compared to protocols with a precipitation step, particularly dichloromethane. The 1D NOESY sequence shows that residual macromolecules signals was 2.10% for dichloromethane, 0.40% for methanol, 0.85% for methanol/dichloromethane, 0.03% for ultrafiltration and 0.04% for skimming associated with ultrafiltration. The comparison of 1D NOESY, zgpr and CPMG sequences for each protocol confirms that CPMG attenuate macromolecule signals (Data are available on the Metabolights database).

### 3.2. Signal-to-noise ratio

The remaining five protocols were then assessed on the basis of SNR. A total of 368 signals could be observed along the spectral region. Table 1 indicates that the dichloromethane protocol yielded the highest percentage of buckets displaying a SNR greater than 20, followed by methanol and ultrafiltration protocols that gave similar percentages. Protocols involving multiple steps, namely methanol/dichloromethane and skimming and ultrafiltration led to lower SNR values. The dichloromethane protocol had a high width at half height value for the reference compound (TSP), revealing the presence of contaminating proteins (Table 1). In contrast, the other protocols had values lower than 2.5 Hz. Width at half height was also determined for signals with a SNR ratio higher than 20. The results show that physical based protocols had better results in terms of number of signal with low width at half height value, meaning a better resolution (Table 1).

### 3.3. Repeatability tests

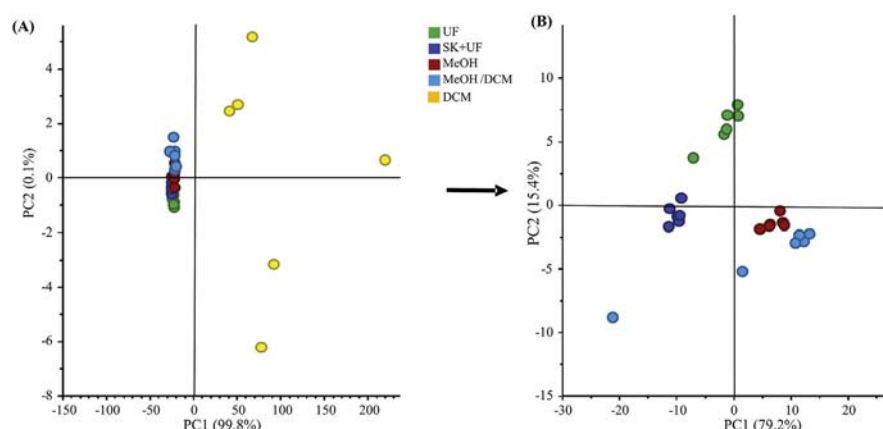
The PCA score plot clearly shows that samples processed by the dichloromethane protocol were loosely clustered and differed from the other protocols (Fig. 2A).

**Table 1.** Sample preparation methods percentage of signal to noise ratio over 20 (368 signals) and signals wide at half height.

Protocols	Signals <sup>1</sup> with SNR (%) > 20	TSP average wide at half height (Hz) <sup>2</sup>	% of signals with a wide at half height higher than 2.5 Hz
Ultrafiltration	66	1.6 ± 0.2	12
Skimming/ultrafiltration	60.5	2.0 ± 0.6	19
Methanol	67.1	1.8 ± 0.1	46
Dichloromethane	72.5	5.9 ± 0.3	30
Methanol/dichloromethane	62.2	1.9 ± 0.5	40

<sup>1</sup> The signal to noise calculation was performed using Top-spin "sino" function. A threshold of 20 was fixed.

<sup>2</sup> TSP signal is considered good if the value was lower than 2.5 (with a line broadening of 1 Hz).

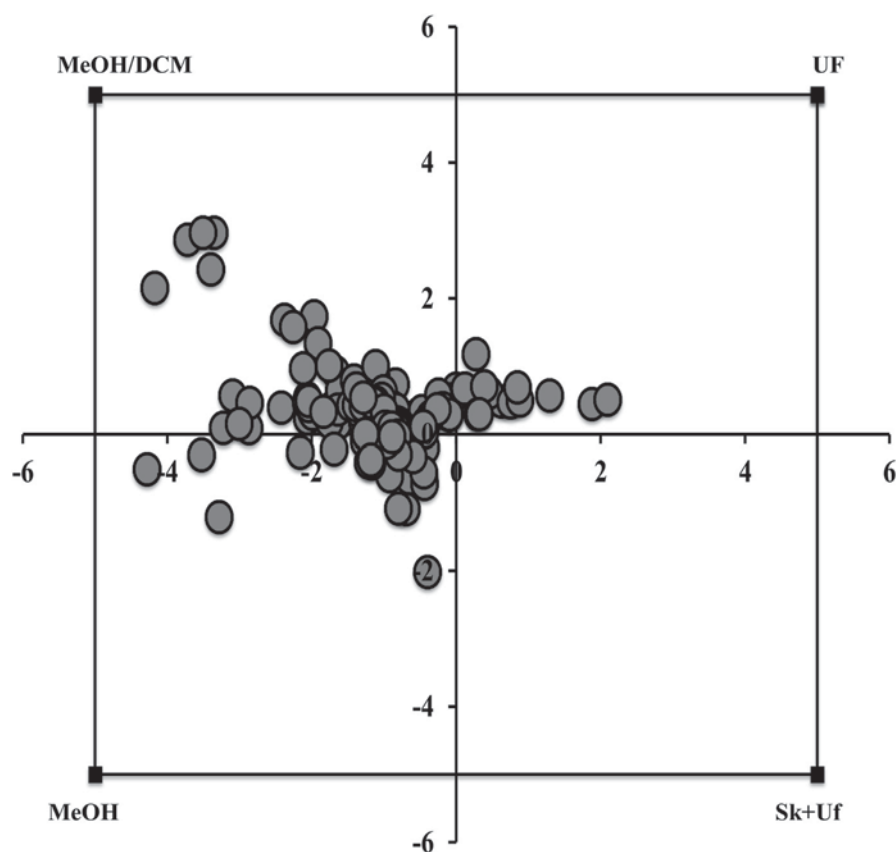


**Fig. 2.** Principal Components Analysis score plot of the 1D  $^1\text{H}$  NMR CPMG spectra from cow milk prepared by (A): Ultrafiltration (UF) (green circle); Skimming associated with ultrafiltration (SK + UF) (blue circle); Methanol (MeOH) (red circle); Dichloromethane (DCM) (yellow circle); Methanol/dichloromethane (MeOH/DCM) (cyan circle), and (B) after removing dichloromethane sample preparation. Dichloromethane (plot A) and MeOH/DCM (plot B) protocols show high variability; whereas remaining protocols were tightly clustered. The first two components explained more than 95% of the variance. Each dot in the score plot represents a NMR spectrum corresponding to a sample.

When removing dichloromethane samples, the PCA score plot shows three tight clusters for ultrafiltration, skimming/ultrafiltration and methanol treated samples, and another cluster corresponding to methanol/dichloromethane samples that display variability (Fig. 2B). The CV calculated from buckets intensities was used to compare the protocols. For each method, buckets with a CV lower than 10% were considered as acceptable. Results indicate that methanol sample preparation provided the highest number of buckets (137/166) with a CV lower than 10%, followed by skimming associated with ultrafiltration (121/166) and ultrafiltration (108/166) protocols. In contrast, no single acceptable bucket was provided by dichloromethane and methanol/dichloromethane protocols. In agreement with the high width at half height reported above for TSP, this result confirms the presence of contaminating macromolecules in samples prepared with the dichloromethane protocol. High TSP wide at half height value and low repeatability are incompatible with quantitative analysis and, therefore, the dichloromethane protocol was discarded in subsequent steps.

### 3.4. Extraction efficiency

For the four remaining protocols, extraction efficiency was assessed based on a geometric method proposed by (Martineau et al., 2011), which allows to highlight differences in profiles induced by the various sample preparation. Fig. 3 shows that the two chemical protocols (methanol and methanol/dichloromethane) were the most efficient for extracting milk metabolites in terms of integration value. In addition, recovery rate calculation was determined on five spiked metabolites (Table 2). These



**Fig. 3.** Graphical representation of the efficiency of sample preparation methods for cow milk. Buckets integration data were plotted on a square where each corner represents one of the four preselected sample preparation methods namely ultrafiltration (UF), skimming associated with ultrafiltration (SK + UF), methanol (MEOH) and methanol/dichloromethane (MEOH/DCM) sample preparation, and each bucket is represented by a dot. For protocols giving greater integration values, buckets are positioned close to the corresponding corner of the square, illustrating the efficiency of the corresponding technique to extract the metabolite. A bucket positioned in the center of the square has the same weight for the four sample preparations.

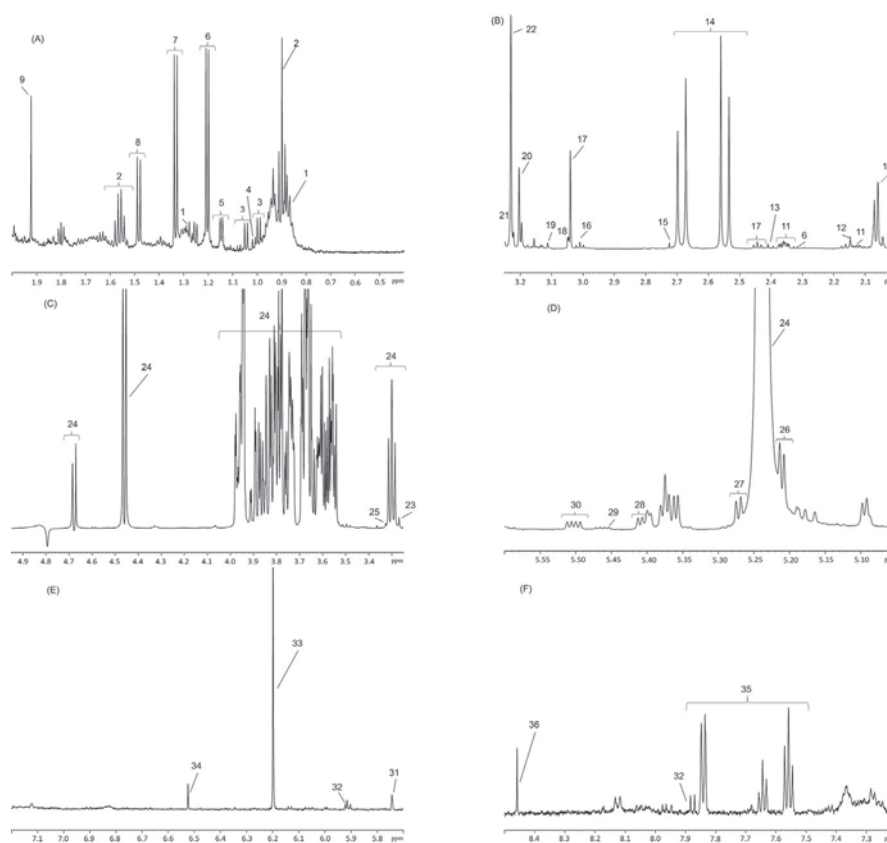
**Table 2.** Recovery rate (%) of five metabolites spiked in milk obtained for the tested sample preparation methods.

Protocols	Recovery (mean $\pm$ SD, n = 3)			
	Ultrafiltration	Skimming/ ultrafiltration	Methanol	Methanol/ dichloromethane
Formate	51 $\pm$ 5	35 $\pm$ 7	83 $\pm$ 6	67 $\pm$ 6
Hippurate	39 $\pm$ 4	29 $\pm$ 6	76 $\pm$ 1	77 $\pm$ 7
Citrate	34 $\pm$ 3	28 $\pm$ 9	70 $\pm$ 7	65 $\pm$ 8
3-Hydroxybutyrate	48 $\pm$ 5	37 $\pm$ 7	87 $\pm$ 3	69 $\pm$ 6
Alanine	47 $\pm$ 5	35 $\pm$ 7	87 $\pm$ 6	72 $\pm$ 7

Metabolites chemical shifts: formate (8.46 ppm); hippurate (7.55 ppm - 7.64 ppm - 7.82 ppm); 3 hydroxybutyrate (4.15 ppm-2.40 ppm - 2.31 ppm-1.20 ppm); alanine (1.47 ppm-3.78 ppm); citrate (2.66 ppm-2.53 ppm).

metabolites which are commonly reported in milk analysis, are evenly spread over the spectral window and are accurately quantified without signal superposition. Methanol protocol gave the best results with yields ranging from 70% to 87%, followed by methanol/dichloromethane protocol with yields comprised between 65% and 77%. The two physical based separation protocols showed low recoveries for all metabolites with yields lower than 50%. Comparison of recoveries obtained using ultrafiltration with and without prior skimming indicates that the skimming step was responsible for a signal loss ranging from 6 to 16% depending on the considered metabolite.

Based on all results, the methanol protocol was chosen for validation. Additionally, metabolite annotation was undertaken on the NMR spectra. Thirty-six metabolites,



**Fig. 4.** Typical NMR spectrum obtained from cow milk using the methanol protocol for sample preparation. The spectrum was divided into 6 parts: (A) 1. Caproate, 2. Butyrate, 3. Valine, 4. Isoleucine, 5. Propylene Glycol, 6. 3-Hydroxybutyrate, 7. Lactate; 8. Alanine, and 9. Acetate; (B) 10. N-Acetyl Glucosamine, 11. Glutamate, 12. Methionine, 13. Succinate, 14. Citrate, 15. Dimethylamine; 16. 2-Oxoglutarate, 17. Creatine/Phosphocreatine, 18. Creatinine, 19. Dimethylsulfone, 20. Choline/Phosphocholine, 21. Glycerophosphocholine, and 22. Carnitine; (C) 23. Betaine, 24. Lactose, and 25. Methanol; (D) 24. Lactose, 26. Mannose, 27. Galactose, 28. Maltose, 29. Glucose-1-phosphate, 30. UDP-N-acetyl glucosamine; (E) 31. Cis-aconitate, 32. Uridine, 33. Orotate, and 34. Fumarate; (F) 32. Uridine, 35. Hippurate, and 36. Formate.



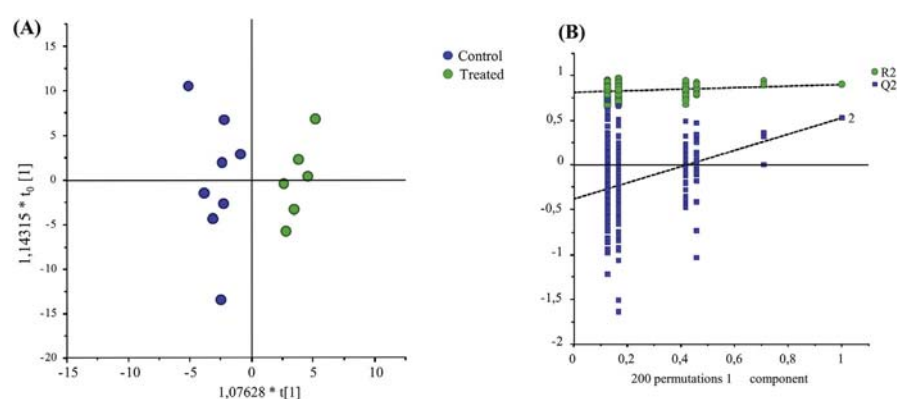
mainly amino acids, carbohydrates, and organic acids, were annotated (MSI level 1,  $n = 25$ ) or putatively annotated (MSI level 2,  $n = 11$ ) as shown in Fig. 4A–F (see Supplementary Material S3).

### 3.5. Application of the selected protocol on experimental data

As part of the validation process and to confirm that the analytical variance was lower than the biological variance, the methanol sample preparation method was tested on experimental samples (data can be found in Supplementary Material S4). Orthogonal Partial Least Square Discriminant analysis shows a clear separation of milk samples according to groups (Fig. 5A). The model, validated by a permutation test, had a good explained variance ( $R^2X = 0.418$ ) and predictivity ( $Q^2 = 0.527$ ). The permutation test confirmed the robustness of the model (Fig. 5B). More than 90 variables important in the projection (VIP) with a value higher than 1.3 were responsible for the differences between groups, among them hippuric acid, citric acid, betaine, orotic acid and glucose-1-phosphate were identified (Table 3).

## 4. Discussion

Sample preparation is a crucial step for metabolomic analysis (Dunn and Ellis, 2005; Duportet et al., 2012). For NMR, sample preparation aims to extract the maximum number of metabolites without interfering macromolecules. Therefore, protocols involving a precipitation or ultrafiltration step are often used to discard macromolecules. Our results agree as raw milk analysis, skimming, ultracentrifugation and dichloromethane protocols, which do not remove macromolecules, were unsuitable. For other protocols, residual macromolecule signals were evaluated on spectra but their proportion was weak, less than 1% of the total intensity of the spectrum



**Fig. 5.** (A) Orthogonal projections to latent structures-discriminant analysis (OPLS-DA) score plot of the 1D 1H NMR CPMG spectra of methanol-processed milk samples from two groups of cows fed a similar diet supplemented or not with linseed oil-nitrate additive. Control (blue circles) and treated group (green circles) ( $R^2X = 0.418$ ,  $R^2Y = 0.902$ ,  $Q^2 = 0.527$ ), (2 samples were discarded as there were outliers in the PCA score plot). (B) Permutation test of the OPLS-DA model.

**Table 3.** Milk metabolites identified in cows fed a similar diet supplemented (Treated) or not (Control) with linseed oil-nitrate additive.

Metabolites	VIP value <sup>1</sup>	Chemical shift (ppm) <sup>2</sup>	Identification MSI <sup>3</sup>	Fold change <sup>4</sup>
Hippurate	1.89	7.835 (t)	1	1.42
Citrate	1.93	2.705 (dd)	1	2.01
Betaine	1.86	3.265 (s)	1	1.20
Orotate	1.32	6.175 (s)	2	2.70
Glucose-1-phosphate	2.05	5.435 (dd)	2	1.88

<sup>1</sup> The bucket with the highest VIP value is given.

<sup>2</sup> Multiplicity: (dd) = doublet of doublet; (s) = singlet; (t) = triplet.

<sup>3</sup> Level 1 (annotated): confirmed by two independent and orthogonal data relative to an authentic compound analyzed under identical experimental conditions, for example <sup>1</sup>H NMR and 2D <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC NMR spectroscopy. Level 2 (putatively annotated): Comparison with a standard using a single acquisition sequence, for example <sup>1</sup>H NMR spectroscopy as recommended by the Metabolomics Standard Initiative (MSI) (Sumner et al., 2007).

<sup>4</sup> Ratio of the mean intensity between Treated and Control replicates.

(Gowda and Raftery, 2014). Also, good TSP signals were obtained (between 1.6 Hz for ultrafiltration and 2.0 Hz for skimming associated with ultrafiltration with a LB of 1 Hz) and therefore we considered that the effect of macromolecules was minimal.

We observed important differences among the various protocols tested in this work. The results were not always convergent and, to aid in the decision process, we gave more weight to the most relevant assessment parameters. In metabolomic studies, repeatability is one of the most important parameters indicating the reliability of the analytical method to identify potential markers (Wu et al., 2008; Markley et al., 2017). Regarding the two physical separation methods, skimming associated with ultrafiltration protocol provided better repeatability results with 72% of the buckets displaying a CV lower than 10%, compared to ultrafiltration protocol for which 65% of the buckets met the defined criteria. This could be due to a better elimination of lipid components with the skimming step, thus leading to a better selectivity, which improve repeatability. Regarding the two chemical-based protocols, methanol protocol provides better results than dichloromethane/methanol protocols. The latter is widely used for lipid isolation as the aqueous phase contains polar metabolites whereas non-polar metabolites stay in the organic phase. However, when applied to the milk matrix, no bucket had a CV inferior to 10% for the methanol/dichloromethane protocols. In addition, the repeatability for these two methods was poor compared to methanol alone or to skimming and ultrafiltration. Methanol/dichloromethane protocol is also time-consuming since it involves several steps. Moreover, the tested protocol, derived from (Folch et al., 1957), uses sodium chloride which can induce drifts in the chemical shifts and affect the NMR probe performance, impairing quantification (Bharti and Roy, 2012). Methanol protocol retains efficiently and selectively polar to mid-polar metabolites and precipitate proteins in

one step (Want et al., 2006). Methanol protocol provided good repeatability results but also good recovery results as described in Table 2. The percentage of recovery ranged from 70 to 87%, compared to other protocols which barely reached 70%. This makes the methanol protocol simple and straightforward, which is important for high-throughput metabolomics studies. This protocol, together with skimming associated with ultrafiltration, showed the best repeatability that, as stated above, is likely the most important parameter. Skimming associated with ultrafiltration is a double-step process that eliminates lipids first, and then macromolecules (molecular weight greater than 10 kDa with the filter cut-off used in this work). Skimming associated with ultrafiltration is a physical separation protocol that appears to have a good resolution and with no interactions between a solvent and milk metabolites. This feature can represent an advantage, since no alteration of the metabolome may occur by potential artefactual reactions and alterations induced by the solvent. Moreover, physical separation does not involve evaporating steps, thus also avoiding losing volatile compounds. This method is often used for NMR milk metabolomics analysis. Nevertheless, skimming associated with ultrafiltration protocol showed a low yield compared to methanol and the presence of large amounts of proteins can lead to filter clogging. In addition, if we consider the advantage of applying a single protocol for performing multiplatform analyses, ultrafiltration is generally not used for LC-MS analysis because the higher sensitivity of LC-MS can lead to detection of filter contaminants (Tulipani et al., 2013).

Methanol protocol represented the best compromise in terms of spectral quality, repeatability, efficiency and extraction yield in our cow milk samples (Vuckovic, 2012). (Yang et al., 2016) successfully used methanol protocol and NMR analysis for differentiating milk metabolites from yak, camel, goat and cow. In contrast, (Wu et al., 2016) compared methanol and ultrafiltration for preparing human milk samples and concluded that ultrafiltration allowed a better identification and quantification of metabolites. This contrasting result might be due to differences in milk composition between species. Human breast milk contains 3 times less protein than cow's milk (Hernell, 2011). Removing excess proteins is essential to get a clear access to the metabolome, which explains why methanol precipitation seems more appropriate than ultrafiltration for cow milk analysis. An additional advantage of using methanol sample preparation for cow's milk metabolites NMR analysis is that it can also be easily transposed to MS analysis, which is interesting for a broad coverage untargeted metabolomics approach. The findings of this study may have applications for the analysis of milk from other animal species.

## 5. Conclusion

This study shows that methanol preparation is the best performing preparation method for NMR metabolomic analysis of cow milk samples. Milk is a biological

matrix that can provide information on the nutrition, physiology and health status of the producing animal and metabolomics is a promising tool to study these aspects in dairy cows (Klein et al., 2012). The methanol preparation was chosen following a systematic comparison of all available milk preparation methods described in the literature. This sample preparation protocol was then successfully applied to discriminate the metabolite profile of milk from cows fed diets with minor differences in composition, highlighting the power and quality of the methanol sample preparation method selected in this work and its potential for experimental applications. A comparison of different milk preparation methods for NMR analysis was missing in the literature. The results of this study are useful for analytical laboratories working on cow milk metabolomics.

## Declarations

### Author contribution statement

Bénédict Yanibada, Cécile Canlet: Conceived and designed the experiments; Performed the experiments; Analyzed and interpreted the data; Contributed reagents, materials, analysis tools or data; Wrote the paper.

Hamid Boudra, Diego P. Morgavi: Conceived and designed the experiments; Analyzed and interpreted the data; Contributed reagents, materials, analysis tools or data; Wrote the paper.

Laurent Debrauwer: Conceived and designed the experiments; Wrote the paper.

Cécile Martin: Analyzed and interpreted the data; Contributed reagents, materials, analysis tools or data.

### Funding statement

Bénédict Yanibada was supported by a CIFRE (Industrial Agreements of Training by Research) PhD studentship funded by the ANRT (National Association of Research and Technology). This study is part of a collaborative project led by INRA and funded by 11 institutes and private companies: Adisseo France SAS (Antony, France), Agrial (Caen, France), APIS-GENE (Paris, France), Deltavit (Janzé, France), DSM Nutritional Products AG (Kaiseraugst, Switzerland), Institut de l'Élevage (Paris, France), Lallemand (Blagnac, France), Moy Park Beef Orléans (Fleury-les-Aubrais, France), Neovia (Saint Nolf, France), Techna France Nutrition (Couëron, France), and Valorex (Combourtillé, France). This work was carried out within the French Infrastructure for Metabolomics and Fluxomics (MetaboHUB ANR-11-INBS-0010). Milk samples used to test the selected protocol came from the PhD work of J. Guyader which was co-funded by Inra and Neovia.

## Competing interest statement

The authors declare no conflict of interest.

## Additional information

Data associated with this study has been deposited at the EMBL-EBI database MetaboLights under accession number MTBLS623 (<https://www.ebi.ac.uk/metabolights/MTBLS623>).

Supplementary content related to this article has been published online at <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00856>.

## Acknowledgements

The author thanks the personnel of the experimental facilities of INRA experimental Unit Herbipôle for the care of animals.

## References

- Álvarez-Sánchez, B., Priego-Capote, F., Luque de Castro, M.D., 2010. Metabolomics analysis I. Selection of biological samples and practical aspects preceding sample preparation. *Trends Anal. Chem.* 29 (2), 111–119.
- Andreas, N.J., Hyde, M.J., Gomez-Romero, M., Lopez-Gonzalvez, M.A., Villasenor, A., Wijeyesekera, A., et al., 2015. Multiplatform characterization of dynamic changes in breast milk during lactation [Journal article]. *Electrophoresis* 36 (18), 2269–2285.
- Andreotti, G., Lamanna, R., Trivellone, E., Motta, A., 2002. <sup>13</sup>C NMR spectra of TAG: an easy way to distinguish milks from different animal species. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 79 (2), 123–127.
- Andreotti, G., Trivellone, E., Lamanna, R., Di Luccia, A., Motta, A., 2000. Milk identification of different species: <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy of triacylglycerols from cows and buffaloes' milks. *J. Dairy Sci.* 83 (11), 2432–2437.
- Antunes-Fernandes, E.C., van Gastelen, S., Dijkstra, J., Hettinga, K.A., Vervoort, J., 2016. Milk metabolome relates enteric methane emission to milk synthesis and energy metabolism pathways. *J. Dairy Sci.* 99 (8), 6251–6262.
- Beckonert, O., Keun, H.C., Ebbels, T.M., Bundy, J., Holmes, E., Lindon, J.C., et al., 2007. Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nat. Protoc.* 2 (11), 2692–2703.

- Bharti, S.K., Roy, R., 2012. Quantitative  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy. *Trac. Trends Anal. Chem.* 35, 5–26.
- de Graaf, R.A., Prinsen, H., Giannini, C., Caprio, S., Herzog, R.I., 2015. Quantification of  $(^1\text{H})$  NMR spectra from human plasma. *Metabolomics* 11 (6), 1702–1707.
- De Marco, A., 1977. pH dependence of internal references. *J. Magn. Reson.* 26 (3), 527–528.
- Di Marzo, L., Barbano, D.M., 2016. Effect of homogenizer performance on accuracy and repeatability of mid-infrared predicted values for major milk components. *J. Dairy Sci.* 99 (12), 9471–9482.
- Doreau, M., Bamiere, L., Pellerin, S., Lherm, M., Benoit, M., 2014. Mitigation of enteric methane for French cattle: potential extent and cost of selected actions. *Anim. Prod. Sci.* 54 (9), 1417–1422.
- Dunn, W.B., Ellis, D.I., 2005. Metabolomics: current analytical platforms and methodologies. *Trends Anal. Chem.* 24 (4), 285–294.
- Duportet, X., Aggio, R.B.M., Carneiro, S., Villas-Boas, S.G., 2012. The biological interpretation of metabolomic data can be misled by the extraction method used. *Metabolomics* 8 (3), 410–421.
- Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226 (1), 497–509.
- Gowda, G.A., Zhang, S., Gu, H., Asiago, V., Shanaiah, N., Raftery, D., 2008. Metabolomics-based methods for early disease diagnostics. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 8 (5), 617–633.
- Gowda, G.A.N., Raftery, D., 2014. Quantitating metabolites in protein precipitated serum using NMR spectroscopy. *Anal. Chem.* 86 (11), 5433–5440.
- Guyader, J., Doreau, M., Morgavi, D.P., Gerard, C., Loncke, C., Martin, C., 2016. Long-term effect of linseed plus nitrate fed to dairy cows on enteric methane emission and nitrate and nitrite residuals in milk. *Animal* 10 (7), 1173–1181.
- Hernell, O., 2011. Human milk vs. cow's milk and the evolution of infant formulas [Comparative Study Review]. In: *Nestle Nutrition Workshop Series. Paediatric Programme*, Vol. 67, pp. 17–28.
- Hu, F., Furihata, K., Kato, Y., Tanokura, M., 2007. Nondestructive quantification of organic compounds in whole milk without pretreatment by two-dimensional NMR spectroscopy [Research Support, Non-U S Gov't]. *J. Agric. Food Chem.* 55 (11), 4307–4311.

- Ilves, A., Harzia, H., Ling, K., Ots, M., Soomets, U., Kilk, K., 2012. Alterations in milk and blood metabolomes during the first months of lactation in dairy cows [Research Support, Non-U.S. Gov't] *J. Dairy Sci.* 95 (10), 5788–5797.
- Jenkins, N.T., Pena, G., Risco, C., Barbosa, C.C., Vieira-Neto, A., Galvao, K.N., 2015. Utility of inline milk fat and protein ratio to diagnose subclinical ketosis and to assign propylene glycol treatment in lactating dairy cows. *Can. Vet. J.* 56 (8), 850–854.
- Klein, M.S., Almstetter, M.F., Schlamberger, G., Nürnberger, N., Dettmer, K., Oefner, P.J., et al., 2010. Nuclear magnetic resonance and mass spectrometry-based milk metabolomics in dairy cows during early and late lactation. *J. Dairy Sci.* 93 (4), 1539–1550.
- Klein, M.S., Buttchereit, N., Miemczyk, S.P., Immervoll, A.K., Louis, C., Wiedemann, S., et al., 2012. NMR metabolomic analysis of dairy cows reveals milk glycerophosphocholine to phosphocholine ratio as prognostic biomarker for risk of ketosis. *J. Proteome Res.* 11 (2), 1373–1381.
- Lamanna, R., Braca, A., Di Paolo, E., Imparato, G., 2011. Identification of milk mixtures by <sup>1</sup>H NMR profiling. *Magn. Reson. Chem.* 49 (Suppl 1), S22–S26.
- Lamichhane, S., Yde, C.C., Schmedes, M.S., Jensen, H.M., Meier, S., Bertram, H.C., 2015. Strategy for nuclear-magnetic-resonance-based metabolomics of human feces [Research Support, Non-U S Gov't] *Anal. Chem.* 87 (12), 5930–5937.
- Le Gall, G., 2015. Sample collection and preparation of biofluids and extracts for NMR spectroscopy. *Methods Mol. Biol.* 1277, 15–28.
- Li, Q., Yu, Z., Zhu, D., Meng, X., Pang, X., Liu, Y., et al., 2017. The application of NMR-based milk metabolite analysis in milk authenticity identification. *J. Sci. Food Agric.* 97 (9), 2875–2882.
- Lindon, J.C., Holmes, E., Nicholson, J.K., 2001. Pattern recognition methods and applications in biomedical magnetic resonance. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 39 (1), 1–40.
- Lu, J., Antunes Fernandes, E., Paez Cano, A.E., Vinitwatanakhun, J., Boeren, S., van Hooijdonk, T., et al., 2013. Changes in milk proteome and metabolome associated with dry period length, energy balance, and lactation stage in postparturient dairy cows. *J. Proteome Res.* 12 (7), 3288–3296.
- Lu, J., Boeren, S., van Hooijdonk, T., Vervoort, J., Hetinga, K., 2015. Effect of the DGAT1 K232A genotype of dairy cows on the milk metabolome and proteome. *J. Dairy Sci.* 98 (5), 3460–3469.

- Markley, J.L., Bruschweiler, R., Edison, A.S., Eghbalnia, H.R., Powers, R., Raftery, D., et al., 2017. The future of NMR-based metabolomics. *Curr. Opin. Biotechnol.* 43, 34–40.
- Martineau, E., Tea, I., Loaec, G., Giraudeau, P., Akoka, S., 2011. Strategy for choosing extraction procedures for NMR-based metabolomic analysis of mammalian cells. *Anal. Bioanal. Chem.* 401 (7), 2133–2142.
- Nagana Gowda, G.A., Gowda, Y.N., Raftery, D., 2015. Expanding the limits of human blood metabolite quantitation using NMR spectroscopy. *Anal. Chem.* 87 (1), 706–715.
- Pinto, J., Barros, A.S., Domingues, M.R., Goodfellow, B.J., Galhano, E., Pita, C., et al., 2015. Following healthy pregnancy by NMR metabolomics of plasma and correlation to urine. *J. Proteome Res.* 14 (2), 1263–1274.
- Pratico, G., Capuani, G., Tomassini, A., Baldassarre, M.E., Delfini, M., Miccheli, A., 2014. Exploring human breast milk composition by NMR-based metabolomics. *Nat. Prod. Res.* 28 (2), 95–101.
- Sumner, L.W., Amberg, A., Barrett, D., Beale, M.H., Beger, R., Daykin, C.A., et al., 2007. Proposed minimum reporting standards for chemical analysis chemical analysis working group (CAWG) metabolomics standards initiative (MSI). *Metabolomics* 3 (3), 211–221.
- Sundekilde, U.K., Frederiksen, P.D., Clausen, M.R., Larsen, L.B., Bertram, H.C., 2011. Relationship between the metabolite profile and technological properties of bovine milk from two dairy breeds elucidated by NMR-based metabolomics. *J. Agric. Food Chem.* 59 (13), 7360–7367.
- Sundekilde, U.K., Poulsen, N.A., Larsen, L.B., Bertram, H.C., 2013a. Nuclear magnetic resonance metabolomics reveals strong association between milk metabolites and somatic cell count in bovine milk. *J. Dairy Sci.* 96 (1), 290–299.
- Sundekilde, U.K., Larsen, L.B., Bertram, H.C., 2013b. NMR-based milk metabolomics. *Metabolites* 3 (2), 204–222.
- Tian, H., Zheng, N., Wang, W., Cheng, J., Li, S., Zhang, Y., et al., 2016. Integrated metabolomics study of the milk of heat-stressed lactating dairy cows. *Sci. Rep.* 6, 24208.
- Trygg, J., Holmes, E., Lundstedt, T., 2007. Chemometrics in metabolomics. *J. Proteome Res.* 6 (2), 469–479.
- Trygg, J., Wold, S., 2002. Orthogonal projections to latent structures (O-PLS). *J. Chemometr.* 16 (3), 119–128.



- Tulipani, S., Llorach, R., Urpi-Sarda, M., Andres-Lacueva, C., 2013. Comparative analysis of sample preparation methods to handle the complexity of the blood fluid metabolome: when less is more. *Anal. Chem.* 85 (1), 341–348.
- Ulrich, E.L., Akutsu, H., Doreleijers, J.F., Harano, Y., Ioannidis, Y.E., Lin, J., et al., 2008. BioMagResBank. *Nucleic Acids Res.* 36, D402–D408.
- Visentin, G., Penasa, M., Gottardo, P., Cassandro, M., De Marchi, M., 2016. Predictive ability of mid-infrared spectroscopy for major mineral composition and coagulation traits of bovine milk by using the uninformative variable selection algorithm. *J. Dairy Sci.* 99 (10), 8137–8145.
- Vuckovic, D., 2012. Current trends and challenges in sample preparation for global metabolomics using liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 403 (6), 1523–1548.
- Want, E.J., O'Maille, G., Smith, C.A., Brandon, T.R., Uritboonthai, W., Qin, C., et al., 2006. Solvent-dependent metabolite distribution, clustering, and protein extraction for serum profiling with mass spectrometry. *Anal. Chem.* 78 (3), 743–752.
- Wishart, D.S., Tzur, D., Knox, C., Eisner, R., Guo, A.C., Young, N., et al., 2007. HMDB: the human metabolome database. *Nucleic Acids Res.* 35 (Database issue), D521–D526.
- Wu, H., Southam, A.D., Hines, A., Viant, M.R., 2008. High-throughput tissue extraction protocol for NMR- and MS-based metabolomics. *Anal. Biochem.* 372 (2), 204–212.
- Wu, J., Domellof, M., Zivkovic, A.M., Larsson, G., Ohman, A., Nording, M.L., 2016. NMR-based metabolite profiling of human milk: a pilot study of methods for investigating compositional changes during lactation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 469 (3), 626–632.
- Yang, Y., Zheng, N., Zhao, X., Zhang, Y., Han, R., Yang, J., et al., 2016. Metabolomic biomarkers identify differences in milk produced by Holstein cows and other minor dairy animals. *J. Proteomics* 136 (16), 174–182.
- Ye, M.P., Zhou, R., Shi, Y.R., Chen, H.C., Du, Y., 2016. Effects of heating on the secondary structure of proteins in milk powders using mid-infrared spectroscopy. *J. Dairy Sci.* 16 (16), 30798–30796.
- Zacharias, H.U., Hochrein, J., Klein, M., Samol, C., Oefner, J.P., Gronwald, W., 2013. Current experimental, bioinformatic and statistical methods used in NMR based metabolomics. *Curr. Metabol* 1 (3), 253–268.

## RÉSULTATS

Résultats

## **Publication 2: Multiplatform metabolomics analysis highlights potential markers associated with methane emissions in dairy cows plasma**

Les travaux présentés dans ce chapitre ont consisté à réaliser une analyse métabolomique du plasma. Cette analyse a été réalisée en appliquant une méthode décrite par Fardet et al. (2007) pour la RMN et une méthode développée par Pereira et al. (2010) en LC-MS. L'objectif est d'identifier des marqueurs plasmatiques associés aux émissions de méthane et de tenter de comprendre les mécanismes biochimiques. Ainsi, 27 métabolites discriminants ont été identifiés entre les groupes Témoin et Traité. L'analyse des réseaux métabolique a montré que la voie métabolique de la leucine, isoleucine et valine et plus généralement le métabolisme énergétique étaient impactés.

Résultats



**Conclusion :**

- ✓ Dans cette étude exploratoire, la métabolomique a permis de mettre en évidence des marqueurs potentiellement associés aux émissions de méthane.
- ✓ Le métabolisme énergétique et celui des acides aminés semblent être impactés par la réduction des émissions de méthane.

**Multiplatform metabolomics analysis highlights potential markers associated with methane emissions in dairy cows plasma**

**Yanibada et al**

<sup>1</sup>Université Clermont Auvergne, INRA, VetAgro Sup, UMR Herbivores, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France.

Key words: Methane, plasma, metabolomics, NMR, LC-MS/QTOF, dairy cow

**En préparation pour Scientific Reports**

Résultats



Résultats

## **Abstract**

Ruminants contribute significantly to methane (CH<sub>4</sub>) emissions, a main greenhouse gas associated to global warming. Reducing the production of enteric methane from ruminants is an active area of research. The aim of this study was to identify plasma biomarkers that could be used as an alternative of methane measurements. Twenty-five primiparous Holstein cows were separated in two groups that received (Treated, n=12) or not (Control, n=13) an anti-methanogenic feed additive in the diet. The study lasted six weeks and at the end of the fifth week, plasma samples were collected for metabolomic analysis. Plasma metabolome analysis was performed using three analytical platforms: Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry (LC-MS/QTOF) for untargeted analysis and LC-MS/MS targeted analysis. Methane emissions were reduced by 22.7% in the Treated group (in g CH<sub>4</sub>/day). Metabolomic analyses indicate 27 discriminant metabolites that were identified (17 with NMR; 8 with LC-QToF-MS and 4 with targeted analysis) including amino-acids, carbohydrates, carboxylic acids and lipids. Pathways analysis revealed that changes in these metabolites were associated with general energy metabolic pathways and amino acids metabolism. The results suggest that plasma has the potential to be considered as an interesting proxy of methane emissions in the future.

Key words: Methane, plasma, metabolomics, NMR, LC-MS/QTOF, dairy cow

Résultats

## **Introduction**

Methane emitted by domestic ruminants is a major contributor to the global amount of greenhouse gases released annually from anthropogenic sources (Gerber et al., 2013). The production of methane in the gastrointestinal tract of ruminants is extensively studied and different strategies are being tested to mitigate methane emissions. The main strategies under development are based on changes in diet composition (e.g. Gidlund et al., 2015), the addition of additives (e.g. Lopes et al., 2016; Wang et al., 2016) or the modulation of the rumen microbiota (e.g. Jeyanathan et al., 2014). In all cases, methane emissions have to be measured to evaluate the effectiveness of different treatments. Under controlled conditions available in experimental research stations the use of respiratory chambers, gas tracer techniques and repeated spot measurement techniques are commonly implemented (Guyader et al., 2015b; Arbre et al., 2016). These methods are accurate and repeatable but although some of them can be applied in farms, their use is not adapted to a high number of animals. Other limitations are the cost, the invasive character for some of them and the required technicity that makes their utilization difficult to implement at the herd level. To address these issues, alternative methods to estimate methane emission using indirect markers or proxies are tested (Negussie et al., 2017b). Among them, the analysis of milk fatty acids profiles seems to be a promising alternative (Chilliard et al., 2009; Dijkstra et al., 2011; Brade and Nurnberg, 2016). However, this is limited to lactating dairy cows whereas a large proportion of enteric methane emissions from ruminants is originated from beef production and growing (non-lactating) replacement dairy heifers. Blood is also an attractive biofluid that can be routinely obtained and reflects both the microbial gut activity and the host animal metabolism. As an example, a recent study showed that average daily gain, a measure of performance efficiency, was associated to ruminal and plasmatic metabolome changes in steers (Artegoitia et al., 2017). The authors' conclude that differences observed between low and high average daily gain groups were associated to both animal physiology and microbial metabolism. Metabolomics is an approach that has shown utility for the discovery of metabolic functions and metabolites associated to various conditions such as disease, stress and nutrition. Blood, particularly plasma, is a biofluid that has been widely studied in metabolomics (de Graaf et al., 2015). In cattle, a plasma metabolomic approach was successfully used to assess heat stress in lactating dairy cows; a Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry (LC-MS) metabolomics analysis identified 41 plasma metabolites that were affected by heat stress (Tian et al., 2015b).

Résultats

Plasma metabolomics was also used for the understanding of metabolic disorders such as clinical and subclinical ketosis. Nuclear Magnetic Resonance (NMR) identified 25 metabolites associated to this common production disorder in high producing dairy cows (Sun et al., 2014). These two techniques, NMR and LC-MS, can be complementary and are increasingly used together to enhance the coverage of the metabolome (Dieme et al., 2015; Kaluarachchi et al., 2016). The characterization of potential plasmatic changes induced by reduced enteric methane emissions can bring new insights on the integrated microbial-host metabolism. It might be also a powerful approach to identify metabolites as proxies of methane emissions in ruminants.

The objective of this study was to explore changes in plasma profiles associated with the reduction of methane emissions. We used a methane inhibitor that specifically block the last enzymatic step of the methanogenesis pathway, unique to methanogenic archaea. This inhibitor does not have a direct effect on other microbial groups or on host cells. We hypothesized that a reduction of methane emissions in the rumen will reveal changes in plasma metabolites that are originated from rumen microbes, from the host or both (co-metabolites).

## **Methods**

The study was conducted at the animal facilities of the French National Institute of Agronomic Research (INRA) UE1414 Herbipôle Unit (Saint-Genès Champanelle, France). Procedures were evaluated and approved by the French Ministry of Education and Research (APAFIS #2015073116475330) and carried out in accordance with French and European guidelines and regulations for animal experimentation.

### **Animals and experimental procedures**

Twenty-five Holstein primiparous dairy cows were used in this study. Animals were divided into 2 groups of equivalent days in lactation, dry matter intake (DMI), and milk yield (MY). Cows were fed with a total mixed ration of corn silage (30%), grass hay (30%), and concentrate (40%) containing (Treated; n=12) or not (Control; n=13) an anti-methanogenic additive (0.1% of the dry matter). The experimentation lasted six weeks with the 2 last weeks for sampling and measurements.

In week 5, blood samples were collected through the jugular vein using heparinized vacutainers (Greiner bio-one, Kremsmünster, Austria) (10 ml), in the morning after milking and before feeding. Blood samples were centrifuged (2,000g; 15 minutes; 4°C), and plasma was transferred into 1.5 ml polypropylene tubes and stored at -80°C until analysis. In week 6, 16 randomly cows were transferred from the free stall into respiratory chambers to measure methane emissions for four days as previously described (Guyader et al., 2015c).

### **Plasma metabolites profiling using untargeted methods**

Nuclear Magnetic Resonance analysis was performed using the method of Rohart et al. (2012). Briefly, plasma samples (500 µl) were thawed on ice, 200 µl were transferred into a 1.5 ml polypropylene tube to which 500 µl of deuterium oxyde (D<sub>2</sub>O) phosphate buffer (pH 7) solution containing sodium trimethylsilyl propionate (TSP, 1 mM) was added. Samples were vortexed, centrifuged (5,500g; 10 minutes; 4°C) and 600 µl of supernatant were transferred into NMR tubes for NMR spectroscopy analysis. The NMR analysis was performed on a Bruker Avance III HD spectrometer (Bruker, GMBH, Karlsruhe, Germany) operating at 600.13 MHz, and equipped with an inverse detection 5 mm <sup>1</sup>H- <sup>13</sup>C- <sup>15</sup>N-<sup>31</sup>P cryoprobe connected to a cryoplatform.

One dimensional ( $^1\text{H}$ ) spectra were acquired using a Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) spin echo pulse sequence with a 5 second-relaxation delay. A water signal suppression was achieved by presaturation during the relaxation delay. The spectral width was set to 20 ppm for each spectrum and 256 scans (16 dummy scans) were collected with 32k points. Free induction decays were multiplied by an exponential window function (LB=0.3 Hz) before Fourier Transformation.

For LC-MS analysis, plasma samples were analyzed following a procedure previously described by Pereira et al. (2010) with slight modifications. Briefly, plasma samples (500  $\mu\text{l}$ ) were thawed on ice and 100  $\mu\text{l}$  were transferred into microtubes (1.5 ml) containing 200  $\mu\text{l}$  of cold methanol. After centrifugation (14,000g; 10 minutes; 4°C) and evaporation using a Genevac EZ-2 evaporator (Genevac SP Scientific, Ipswich, UK) with its aqueous program, dried residues were solubilized in 50/50 (v/v) water/acetonitrile plus 0.1% formic acid mixture, and then analyzed in a ultra-performance liquid chromatography coupled to a quadrupole–time-of-flight mass spectrometer (Bruker impact HD2) equipped with an ESI source.

In order to ensure performance of analytical instrumentation, quality control samples (QC) were prepared by pooling all plasma samples and analyzed throughout the run for each analytical platform (NMR n=3; LC-MS n=11).

#### **Targeted metabolomics analysis.**

The targeted method was based on electrospray ionization mass spectrometry measurements using the Absolute*IDQ* p180 kit assay (Biocrates Life Sciences AG, Innsbruck, Austria). The assay measures 180 metabolites belonging to seven different biochemical families (amino acids, biogenic amines, acylacarnitines, lyso-phosphatidylcholines, phosphatidylcholines, sphingolipids and monosaccharides).

#### **Data processing and Statistical analysis.**

For NMR spectra were manually phased and the baseline was corrected using TopSpin 3.2 software (Bruker, GMBH, Karlsruhe, Germany). All spectra were referenced to TSP signals at 0 ppm. The spectral data were imported in the Amix Software (version 3.9, Bruker, Rheinstetten, Germany) to perform data reduction in the region between 10.0 and 0.5 ppm with a bucket width of 0.01 ppm (n=981 buckets).

The region between 5.1 and 4.5 ppm corresponding to water signal was excluded and data were normalized to the total intensity of the spectra. A matrix containing chemical shifts and intensities was generated.

For LC-MS, raw data were converted into NETCDF files and processed using a Galaxy web instance (Guitton et al., 2017). Ions were extracted using the centWave algorithm (resolution=10 ppm; peak width=5 to 20; s/n=5) included in the XCMS platform (Tautenhahn et al., 2008). Retention time correction was performed by applying peak-group algorithms and the minimum fraction of samples was set to 0.3. Data were filtered on retention time (<0.4 minute and >22 minutes), fold (<2) and tstat (<0) to remove spurious signals followed by correcting signal drift and batch effect using the linear method algorithm (van der Kloet et al., 2009). And as for NMR, a matrix containing retention times, masses and intensities was generated.

Before analysis, NMR data were log-Pareto scaled and LC-MS and targeted data were Unit Variance (UV) scaled. All data were processed using multivariate statistical analyses as implemented in SIMCA (V13, Umetrics AB, Umea, Sweden). The data were first examined by unsupervised Principal Component Analysis (PCA) to visualize trends and potential outliers. Supervised Orthogonal Partial Least Square Discriminant (OPLS-DA) analysis was then performed to reveal differences between Control and Treated groups.

The performance of this model was assessed by the predictive ability ( $Q^2$ ) and the proportion of explained variable ( $R^2$ ). A permutation test based on 200 iterations were applied in order to validate the model.

Data from targeted method were also compared by one-way ANOVA test with Dunnet's test for multiple comparison. Significance was established by  $P < 0.1$ .

**Metabolite identification.** For NMR, identification was based on similarity of chemical shifts and coupling constants between plasma samples and standards. The comparison was performed between one dimensional analytical data and standards acquired under the same analytical conditions in our internal database; and public databases like the Livestock Metabolome Database (Goldansaz et al., 2017) (LMDB, //www. <http://lmdb.ca/>) and the Biological Magnetic Resonance Data Bank (Ulrich et al., 2008) (<http://www.bmrbl.wisc.edu/metabolomics/metabolomicsstandards.shtml>).



Identified chemical structures were confirmed using two-dimensional NMR experiments (Jres, COSY, HSQC) on pooled samples (Level 1) (Sumner et al., 2007). For LC-MS data, discriminant metabolites were first identified using an in-house database containing more than 1,000 metabolites acquired under the same chromatographic and mass spectrometry conditions (Level 2). Annotated metabolites were validated by comparing their MS<sup>2</sup> spectra with those from standards acquired under the same fragmentation conditions (Level 1). For the remaining unidentified metabolites, putative annotation was achieved by comparing their exact masses and/or their fragmentation spectra with those provided in public database (putative annotation). Fragmentation spectra were obtained on an Orbitrap Velos (Thermo, Les Ulis, France) at normalized collision energies (NCE) 25 in the ion trap (collision-induced dissociation (CID), resonant activation) as well as NCE 35 in a quadrupole collision cell (Higher-energy collisional dissociation (HCD), non-resonant activation). If needed, the collision energy was adapted for ion species with insufficient or too harsh fragmentation (signal intensity of the precursor ion in the fragment spectra outside a 10-40% range). Chromatography were executed on UltraMate 3000 (Dionex, Les Ulis, France), coupled to the Orbitrap Velos, using the same LC conditions as for the LC-MS acquisitions described before. Full scans were acquired at mass resolution 100,000 (FWHM, m/z 400) to obtain the exact mass whereas mass resolution 30,000 (FWHM, m/z 400) was used for fragmentation experiments, both with AGC 1E6.

### **Pathway analysis.**

Discriminant metabolites identified by the 3 analytical platforms were imported into Metaboanalyst 3.0 (Xia et al., 2015) (<http://www.metaboanalyst.ca>) for subsequent metabolic pathways analysis. Additionally, MetExplore web-server (<https://metexplore.toulouse.inra.fr/metexplore2/>) (Cottret et al., 2010) was used to identify potential linkage between discriminant metabolites and pathways. For pathway analysis, *Bos taurus* model developed on Kegg database (Kanehisa et al., 2017) containing more than 1,200 metabolites was used.

## Results

### Enteric methane and production parameters

The treatment reduced enteric methane emissions (in g CH<sub>4</sub>/day) by 22.7% without affecting dry matter intake and milk production (Table 1). Treated cows, however, tended to have higher concentration of milk protein (P= 0.078) and lower concentration of lactose (P= 0.053). Intake increased from week 1 up to week 5 but this increase was similar in both groups. Classical biochemical analysis performed on plasma samples for monitoring general health aspects showed values within normal ranges for dairy cows (Bellier, 2010).

**Table 1.** Nutrient intake, milk yield and composition of lacting cows of Control (n=13) and Treated group (n=12)

Item	Con		Tre		SEM	Treatment	P-value	
	S1	S5	S1	S5			Week	Treatment*week
<b>Nutrient intakes</b>								
DMI (kg/day)	18.0	19.5	18.5	18.8	0.44	0.76	0.03	0.13
<b>Plasma biochemical parameters</b>								
Urea (mmol/L)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.01	0.76	<0.0001	0.23
Glucose (mmol/L)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.02	0.60	0.27	0.25
BetaOH (µmol/L)	0.4	0.3	0.4	0.3	0.03	0.67	0.002	0.71
NEFA (mmol/L)	0.3	0.2	0.2	0.2	0.03	0.09	0.09	0.99
GGT (IU)	22.3	22.3	21.7	23.6	1.18	0.95	0.05	0.05
PAL (IU)	107.5	120.6	110.2	121.6	10.07	0.88	0.03	0.88
ALAT (IU)	22.6	25.7	23.4	23.7	1.47	0.84	0.12	0.20
ASAT (IU)	70.2	71.6	69.5	71.4	5.68	0.95	0.63	0.94
<b>Milk yield and composition</b>								
MY (kg/day)	24.6	23.9	24.8	24.4	0.93	0.77	0.06	0.62
Fat (g/kg)	35.2	33.8	35.4	35.4	1.24	0.58	0.34	0.33
Protein (g/kg)	28.1	29.9	29.4	31.2	0.55	0.08	<0.0001	0.96
Lactose (g/kg)	51.8	51.7	50.6	51.2	0.38	0.05	0.45	0.25
Cells	147.6	145.4	152.9	89.5	37.74	0.58	0.25	0.28

Normal range of values of the biochemical parameters (Bellier, 2010 and Synlab, 2010): Urea 3-8 mmol/L ; Glucose 2.5-4.2 mmol/L; BetaOH <1400 µmol/L; NEFA 0-0.45 mmol/L; GGT 6-18 IU; PAL < 500 IU ; ALAT 11-40 IU; ASAT 78-132 IU.

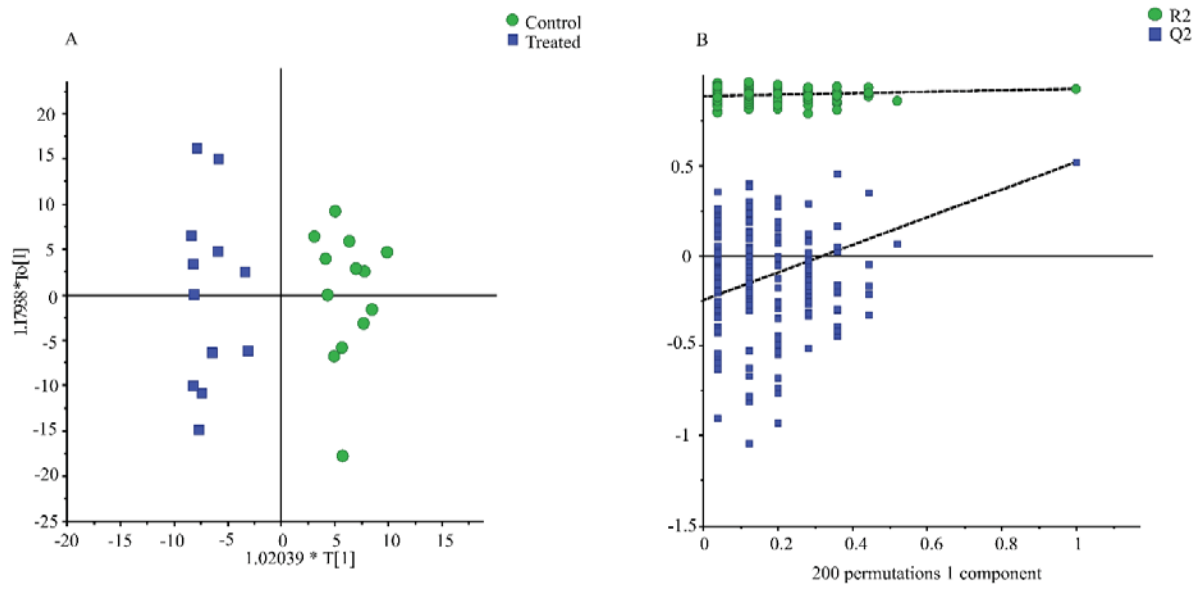
At the beginning of the experiment Control group cows were 55 ± 11 days in milk and Treated group cows were 55 ± 10 days in milk.

This indicates no overt health problems that could have influenced the metabolome and confirms the absence of negative effect of the treatment. Non-esterified fatty acids (NEFA) tended to decrease in treated cows ( $P= 0.099$ ). Reduction of NEFA concentration is, however, a desirable outcome. Some metabolites and enzymatic activities differed between the beginning and end of the experimental period independently of the treatment (Table 1).

### **Untargeted plasma metabolome analysis**

The two groups of cows used in this study received the same diet and were comparable in terms of age, body weight, days in milk and milk production. All these aspects are major metabolomic determinants that were removed in the study. In contrast, for the low methane-emission phenotype induced by the treatment, we expected subtle changes in the metabolome. Consequently, for the discovery of relevant metabolites of interest we used variable selection approaches to reduce the size of datasets (Grissa et al., 2016).

For the NMR dataset ( $n=891$  variables), the Orthogonal Signal Correction (OSC) (Wold et al., 1998) filtering was applied prior to chemometric analysis for removing features that were not related to group discrimination. The OSC PLS-DA model with one component removed explained 55.3% of the variability ( $n=2$ ;  $R^2X=0.407$ ;  $R^2Y=0.854$ ;  $Q^2=0.55$ ) (Figure 1A). This model, validated by a permutation test (Figure 1B) was robust. Up to 120 variables important in the projection (VIP) were above 1.2 of which 17 metabolites could be annotated (Table 2). A great majority of these metabolites were amino acids and carboxylic acids. Among the identified metabolites, 14 were annotated at level 1 by comparing 1 dimensional and 2 dimensional spectra with standard compounds spectra.



**Figure 1A.** Score plot of the OSC-PLS-DA model of NMR data analysis (n=2;  $R^2X=0.407$ ;  $R^2Y=0.854$ ;  $Q^2=0.55$ . Control group (green, n=13) vs Treated group (blue, n=12) **B.** Permutation test of the OSC-PLS-DA model

Résultats

**Table 2.** List of plasma metabolites identified using NMR analysis differing between cows fed a similar diet supplemented (n=12) or not (n=13) with an anti-methanogenic chemical

Metabolites	Chemical shift (ppm)	multiplicity	relative changes	VIP value*	annotation level	Fold Change
<b>Amino acids and derivatives</b>						
Asparagine	2.925	m	↑	1.1	1	1.05
Betaine	3.275	s	↓	2.3	1	0.95
Creatine	3.035	s	↑	4	1	1.13
Creatinine	4.055	s	↑	1.5	2	1.12
Glutamine	2.445	m	↑	2.2	1	1.15
Glycine	3.565	s	↑	5.7	1	1.22
Isoleucine	1.005	d	↓	2.7	1	0.83
Leucine	1.685	m	↑	1.3	1	0.91
Methionine	2.135	m	↑	2.5	2	1.11
Threonine	4.235	m	↑	1.4	1	1.05
Valine	1.055	d	↓	2.7	2	0.60
<b>Carbohydrates</b>						
Glucose	3.265	t	↑	3.5	1	1.14
<b>Carboxylic acids</b>						
Acetic acid	1.925	s	↓	3.9	1	1.06
Citric acid	2.515	dd	↑	2	1	1.19
Formic acid	8.455	s	↑	1.7	1	2.18
Lactic acid	1.345	d	↓	2.5	1	0.79
<b>Miscellaneous</b>						
Dimethyl sulfone	3.155	s	↑	6.1	1	1.92

Relative changes: ↑ = increased in Treated group; ↓ = decreased in Treated group

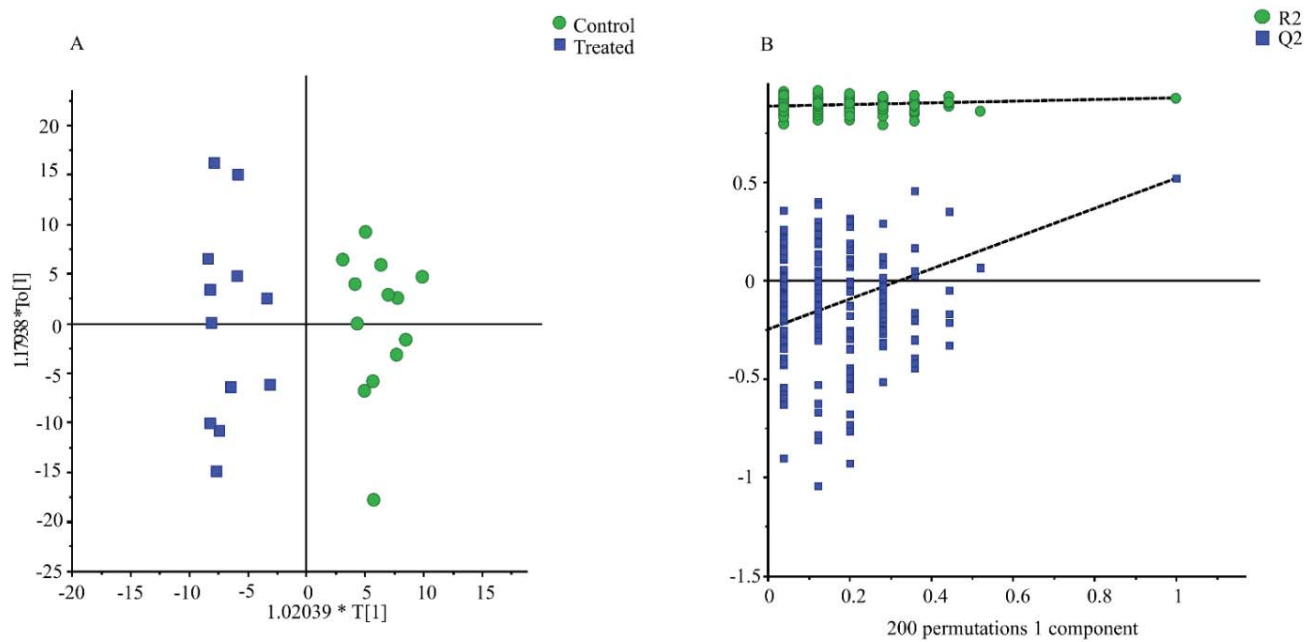
\*For multiple chemical shifts, the highest VIP value is given.

Multiplicity: s = singlet; d = doublet; dd = doublet of doublet; m = multiplet; t = triplet

Level 1 (annotated): confirmed by two independent and orthogonal data relative to an authentic compound analyzed under identical experimental conditions, for example <sup>1</sup>H NMR and 2D <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC NMR spectroscopy. Level 2 (putatively annotated):

For the LC-MS dataset (n=771), an OPLS-DA model was used after variable selection. The chosen model (n=1+1+0;  $R^2X=0.213$ ;  $R^2Y=0.927$ ;  $Q^2=0.519$ ) was obtained after discarding 212 variables (Figure 2A). The permutation test validated the robustness of the model ((Figure 2B). Table 3 shows the eight metabolites identified out of the 108 VIP with values above 1.2. Features with ion abundance insufficient for fragmentation experiments were only annotated by their exact mass and retention time (level 2). Among the discriminant metabolites, four were amino acids and their derivate/degradation products (methylhistidine, methionine, pyrrolidine, stachydrine).

In addition, L-alpha-Amino-1H-pyrrole-1-hexanoic acid and phosphatidylcholine (PC 14:0/0:0) were identified by their fragmentation patterns. One metabolite was identified due to its insource fragmentation and adduct pattern as belonging to the group of trihydroxy-cholanoic acids (21 known isomers in HMDB) (Table 4). The protonated form  $[M+H]^+$  of this compound was not detected; ammonium  $[M+NH_4]^+$  and sodium  $[M+Na]^+$  adducts, that are more stable than  $[M+H]^+$ , are present in the spectra. Furthermore three fragments resulting from the loss of up to three molecules of water  $[M-xH_2O+H]^+$  strongly indicate that the targeted compound is a trihydroxy-carboxylic acid. The intensity ratios of the fragment and adduct signals are alike for each sample, which strongly indicate that the signals belong to one metabolite. In addition, the VIP values are also similar. We validated this fragmentation/adduct pattern by analyzing cholic acid, one isomer of the group of trihydroxy-cholanoic acids. The retention time and fragmentation/adduct pattern of cholic acid is similar to the observed metabolite, which is another indicator for the present of an isomer of trihydroxy-cholanoic acid. Nevertheless, we cannot confirm the exact metabolite. The slightly variation of the polarity due to different positions of the hydroxyl group does not allow a specific annotation without comparing all possible isomers.



**Figure 2A.** Score plot of the OPLS-DA model of LC-MS data analysis after a variable selection. ( $n=1+1+0$ ;  $R2X=0.213$   $R2Y=0.927$ ;  $Q2=0.519$ ). Control group (green,  $n=13$ ) vs Treated group (blue,  $n=12$ ) **B.** Permutation test of the OSC-PLS-DA model

**Table 3.** List of plasma metabolites identified using LC-MS analysis differing between cows fed a similar diet supplemented (Treated, n=12) or not (Control; n=13) with an anti-methanogenic chemical

Metabolites	Formula	m/z	$\Delta m/z$ (ppm)	Rt	relative change	VIP value	Annotation level	Fold Change
Methylhistidine	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub> N <sub>3</sub>	170.0925	-0.14	0.84	↑	1.22	2	1.05
Stachydrine	C <sub>7</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	144.1019	-	1.03	↑	1.38	2	1.42
Pyrrolidine	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> N	72.0806	-	1.18	↓	1.42	2	0.87
Methionine	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub> NS	150.0583	-0.24		↑	1.62	1	1.20
L-alpha-Amino-1H-pyrrole-1-hexanoic acid	C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	197.1285	-	-	↑	1.52	putative MS <sup>2</sup>	1.29
Trihydroxy-cholanoic acids and derivates	-	-	-	-	↑	1.75	2	1.23
LysoPC(18:2(9Z, 12Z))	C <sub>26</sub> H <sub>51</sub> O <sub>7</sub> NP	523.3486	-	14.66	↓	1.3	2	0.92
PC(14:0/0:0)	C <sub>22</sub> H <sub>47</sub> NO <sub>7</sub> P	468.3086	2.80	13.82	↓	1.32	putative MS <sup>2</sup>	0.91

PC(14:0/0:0):1-tetradecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

m/z = ratio of mass (m) to charge (z)

t<sub>R</sub> = retention time

VIP = Variable important in the projection

Level 1 of identification: exact mass, retention time and fragmentation spectra comparison with a standard

Level 2 of identification: mass and retention time comparison with a standard

Putative MS<sup>2</sup>: the chemical structure has been identified by fragmentation spectra

Résultats



**Table 4.** Trihydroxy-cholanoic acids derivatives and adducts characteristics determined on LC-QToFMS and on Orbitrap

name	m/z	STD	VIP	ion type	formula	m/z Orbitrap	$\Delta m/z$ in ppm
M355.26322752T13	355.26323	0.97	2.13	$[M-3H_2O+H]^+$	$C_{24}H_{35}O_2$	355.26328	0.35
M373.27365079T13	373.27365	0.95	2.1	$[M-2H_2O+H]^+$	$C_{24}H_{37}O_3$	373.27358	-0.38
M374.27726444T13	374.27726	0.94	2.07	$[M-2H_2O+H]^+, ^{13}C$			
M391.28440421T13	391.28440	0.96	2.1	$[M-H_2O+H]^+$	$C_{24}H_{39}O_4$	391.28412	-0.42
M392.28781555T13	392.28782	0.98	2.13	$[M-H_2O+H]^+, ^{13}C$			
Trihydroxy-cholanoic acids	409.29492			$[M+H]^+$			
M426.32146922T13	426.32147	1.10	1.97	$[M+NH_4]^+$	$C_{24}H_{44}O_5N$	426.32153	0.30
M427.32489672T13	427.32490	0.77	2.23	$[M+NH_4]^+, ^{13}C$			
M428.32761942T13	428.32762	1.40	2.27	$[M+NH_4]^+, ^{13}C_2$			
M431.27688814T13	431.276888	1.33	1.33	$[M+Na]^+$	$C_{24}H_{40}O_4Na$	431.27749	1.61

m/z = ratio of mass (m) to charge (z)

$t_R$  = retention time: The value was 12.8 min for each feature on QToF and 12.68 min on Orbitrap

VIP = Variable important in the projection

$\Delta m/z$ : difference of m/z between samples and standards

### Targeted plasma metabolomics analysis.

Metabolites which had values below the limit of identification were excluded leaving a total of 136 metabolites for statistical analysis. The OPLS-DA model showed a clear separation between the 2 groups of animals with an acceptable predictive ability ( $Q^2=0.54$ ). A permutation test (200 permutations) was used to evaluate the validity of the model (Figure 3a & 3b). Four metabolites had VIP values higher than 1.2. Concentration of amino acids serine, glycine and serotonin, as well as sphingomyelin (C20:2) were increased in the Treated group (Table 5).

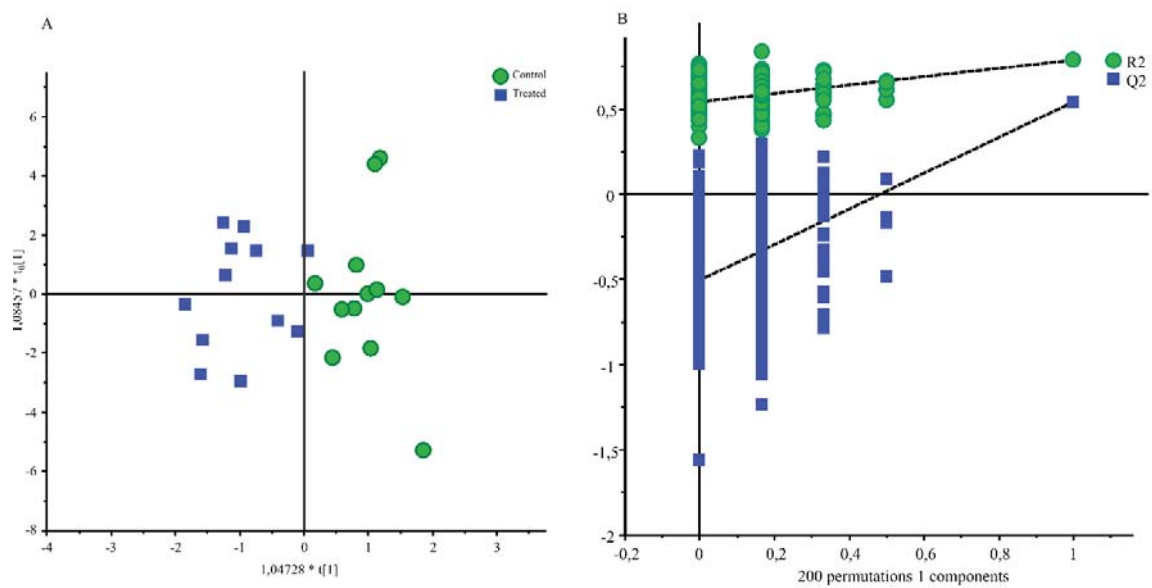
**Table 5.** List of plasma metabolites identified using targeted metabolomics analysis differing between cows fed a similar diet supplemented (Treated, n=12) or not (Control, n=13) with an anti-methanogenic chemical

	Formula	mass	Relative change	VIP value	Fold change
Glycine	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	75.0320284	↑	1.5	1.32
Serine	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub>	105.042593	↑	1.4	1.36
Serotonin	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O	176.094963	↑	1.7	2.24
Sphingomyelin	C <sub>43</sub> H <sub>84</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> P	755.6067	↑	2.4	2.42

VIP = Variable important in the projection

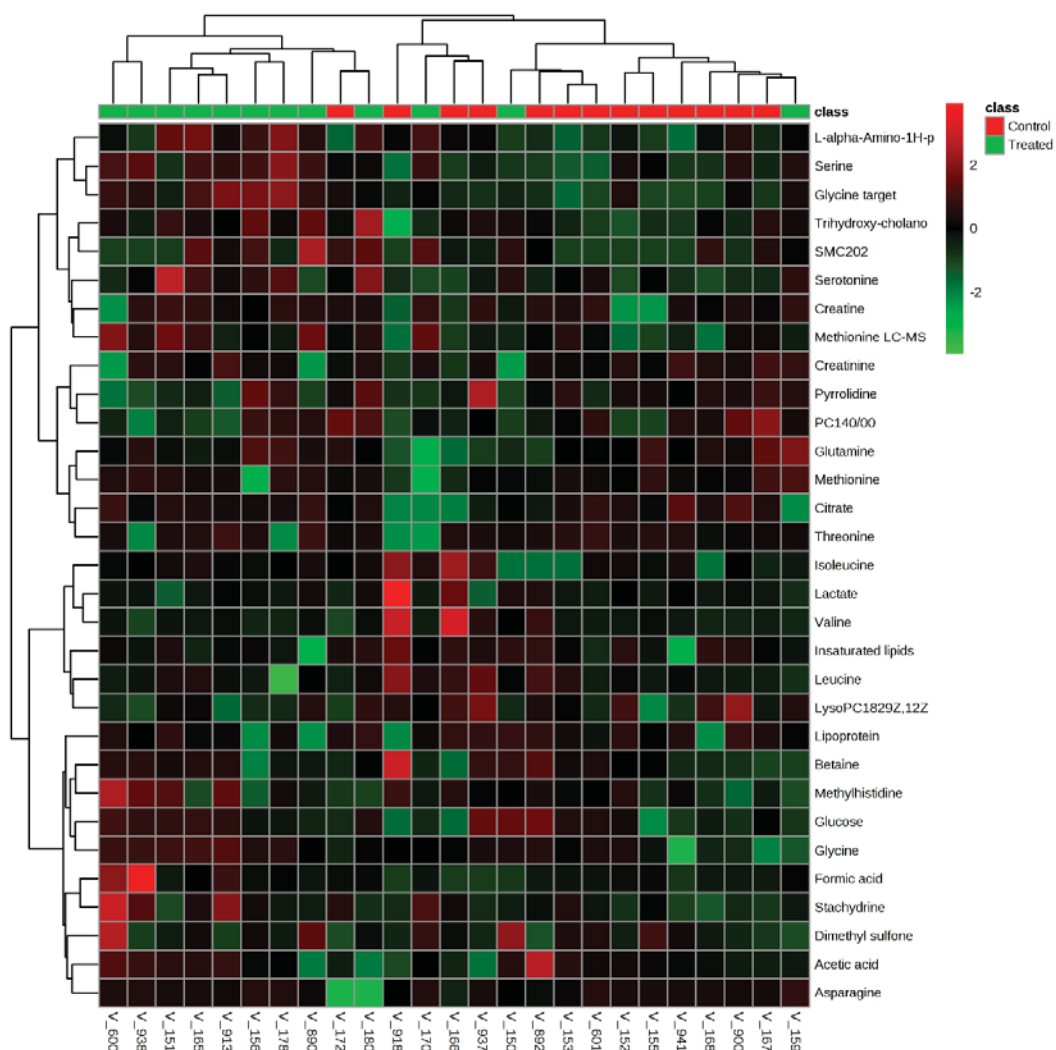
### Pathway analysis

A heatmap based on Euclidian distance measures and Ward clustering algorithm (minimizing the sum of the squares of any two clusters) was built (Figure 4). Cows were clustered according to groups. In group control, one cow was misclassified, whereas three cows were not correctly clustered in the Treated group. To identify metabolic pathways, discriminant metabolites identified by the 3 analytical platforms (n=27) were imported into Metaboanalyst 3.0. Twenty-two out of the 27 metabolites initially identified could be mapped on the *Bos taurus* network. Pathways analysis revealed that changes in these metabolites were associated with 25 pathways (Figure 5) and four of them were considered significant by fixing the p-value to 0.05 and the pathway impact threshold to 0.1. These pathways were: 1/glycine, serine and threonine metabolism, 2/methane metabolism, 3/tryptophan metabolism, and 4/aminoacyl-tRNA biosynthesis.

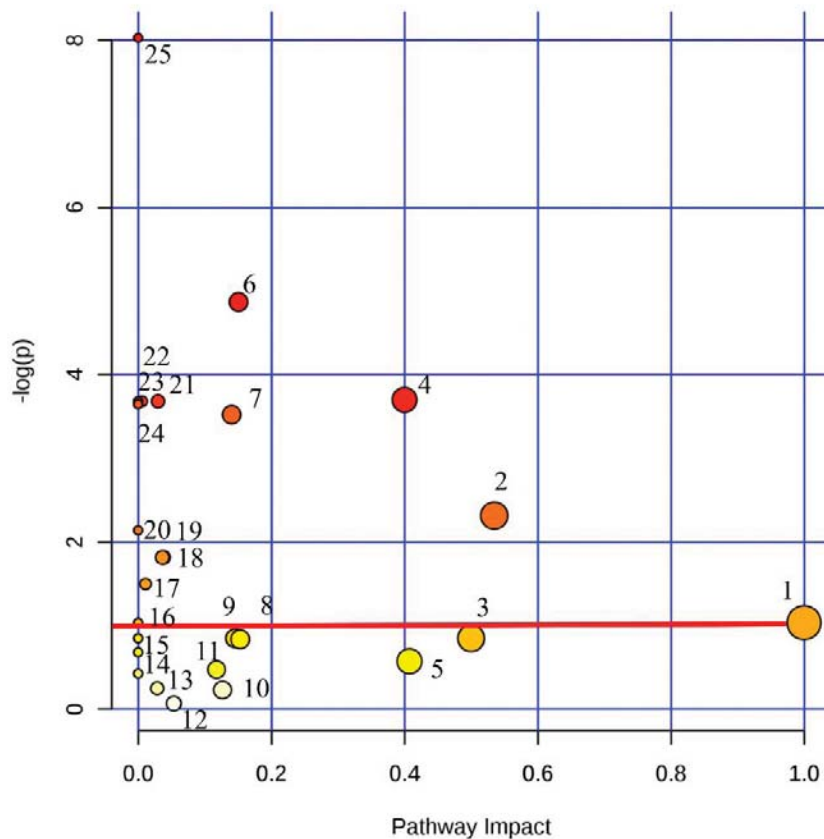


**Figure 3.** Score plot of the PLS-DA model of the targeted metabolomics analysis. (n=2; R2X=0.389 R2Y=0.823; Q2=0.663). Control group (green, n=13) vs Treated group (blue, n=12)  
 b. Permutation test of the OSC-PLS-DA model

Additionally, linkage between discriminant metabolites was performed using The MetExplore web-server that identified 19 metabolites mapping on *Bos Taurus* and a subnetwork linking 14 metabolites was built. The json file that can be implemented on Metexplore is available on supplementary material. Based on pathways analysis, a simplified network was designed in order to highlight linkages between discriminant metabolites and pathways (Figure 6). Some intermediate metabolites of this sub-networks that are not discriminants were retrospectively found (n=10) by going back to raw data, and identified at level 2 based on exact masses and retention (dark blue, n=7) and level 3 based on exact masses (light blue, n=3).



**Figure 4.** Hierarchical clustering analysis of discriminant metabolites between Control and Treated group in the form of a Heatmap. Discriminant metabolites were identified by NMR, LC-QToF-MS and targeted analysis. Rows: metabolites; columns: samples. Red and green hues indicate concentration increase and concentration decrease, respectively.



**Figure 5.** Determination of pathways involving discriminant metabolites based on Metaboanalyst analysis. The Node color is based on p value and the node size is determined based on the pathway impact value. The red line correspond to a threshold of 1.3 (-logp). Node1: Valine, leucine, isoleucine biosynthesis; node2: Glycine, serine and threonine metabolism; node3: Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis; node4/ Methane metabolism; node5: Glyoxylate and dicarboxylate metabolism; node6: Tryptophan metabolism; node7: Aminoacyl-tRNA biosynthesis; 8/ Pyruvate metabolism; 9/ Tyrosine metabolism; node10: Alanine, aspartate and glutamic acid metabolism; node11: Cysteine and methionine metabolism; node12: Citric acid cycle (TCA cycle); node13: Glycolysis or gluconeogenesis; node14: D-Glutamine and D-glutamic acid metabolism; node15: Histidine metabolism; node16: Phenylalanine metabolism; node17: Arginine and proline metabolism; node18: Galactose metabolism; node19: Starch and sucrose metabolism; node20: Primary bile acid biosynthesis; node22: Porphyrin and chlorophyll metabolism; node23: Glutathione metabolism; node24: Nitrogen metabolism; node25: Sphingolipid metabolism

Résultats



## Discussion

The reduction of enteric methane emissions from ruminants is of concern for the sustainability of ruminant production systems. For monitoring the effectiveness of different reduction strategies and for testing and validating new experimental treatments it is essential to assess methane emissions. However, methane measurement on live animals is difficult to perform in the field and alternative approaches, involving indirect measurements are being tested. The aim of this study was to identify plasma biomarkers that could be used as an alternative of methane measurements. To maximize the chance to identify potential biomarkers of methane emissions in plasma, we used a specific anti-methanogenic compound that inhibits the last step of methanogenesis and analyzed plasma using three analytical platforms. The combination of untargeted (NMR and MS) and targeted MS methods allows an increased coverage of the metabolome. Also, identification of metabolites on more than one platform is useful for validating purposes.

The majority of the annotated discriminant metabolites were amino acids. Methionine, an essential amino acid supplied by the diet or synthesized in the rumen (Block et al., 1951) increased in the Treated group. This amino acid and other related metabolites identified in this study are hypothetically related to methanogenesis. Methionine is a known precursor of methyl-containing modified amino acids present in the structure of methylcoenzyme M reductase of methanogens (Selmer et al., 2000). It can be speculated that higher concentrations of methionine in the plasma of treated cows is partly due to a lower uptake from rumen methanogens. In the rumen, methionine is slowly degraded compared to other amino acids and the main initial product of degradation is methanethiol (Onodera, 1993). Methanethiol is at the origin of dimethylsulfone and formic acid, two metabolites with higher abundance in treated cows, that can be either produced by microbial metabolism or microbial-mammalian co-metabolism (He and Slupsky, 2014). Conversion of methanethiol to formic acid produces hydrogen sulfide and consumes hydrogen. In the rumen, this conversion is done by anaerobic sulfate-reducing microbes that efficiently compete with methanogens for hydrogen utilization (Morgavi et al., 2010). Concurring with our results, inhibition of methanogenesis by chloroform resulted in accumulation of methanethiol in lake ecosystems (Zinder and Brock, 1978).



Serine, creatinine, creatine, glycine and threonine increased in Treated cows. These amino acids belong to the glycine, serine and threonine metabolism pathway and are closely related (Figure 5) (Zhang et al., 2013). Serine, a non-essential amino acid is an intermediate of the glycolysis pathway. Glycine, an amino acid derived from serine is involved in the production of DNA and phospholipids and in cell energy metabolism. Creatine is mainly synthesized in the liver from different amino-acids like glycine and methionine. Creatine and its breakdown natural product, creatinine, are involved in cell energy metabolism (Sun et al., 2014). Threonine an essential amino-acid supplied by rumen microbes or the diet can be catabolized to glycine via the action of threonine dehydrogenase. The levels of branched essential amino acids like isoleucine and valine decreased in the treated group as opposed to leucine that increased. These amino acids, supplied by rumen microbes or by the diet, have an important role in the regulation of amino acids and protein metabolism in mammals (Jefferson and Kimball, 2003; Dodd and Tee, 2012). Subnetwork analysis shows that isoleucine, leucine and valine are closely related and belong to the same pathway. At this stage, we cannot explain the differences between groups for these branched amino acids or whether these differences are due to increased biosynthesis or degradation. It has been reported that increased propionic acid and glucose, as observed in this work (discussed below), is associated to lower concentration of branched chain amino acids in cows plasma (Nichols et al., 2016; Curtis et al., 2018)

It is known that plasmatic concentration of amino acids is highly correlated to microbial protein synthesis in the rumen (Wallace et al., 1997). Based on overall trends discussed above, we can hypothesize that changes in amino acids concentration between Control and Treated groups is partly due to changes in rumen microbial activity. Sustaining this suggestion are the changes observed in acetic acid and glucose. Acetic acid, one of the main volatile fatty acid synthesized by ruminal microbes during the fermentation of carbohydrates (Dijkstra et al., 1993), was lower in the Treated group compared to controls. Ruminal production of acetic acid releases dihydrogen that is associated to increased methanogenesis. In contrast, propionic acid production consumes dihydrogen and is associated to decreased methanogenesis (Van Nevel and Demeyer, 1988; Martin et al., 2010). Propionic acid absorbed from the rumen is the major substrate for hepatic neoglucogenesis in ruminants (Young, 1977). The greater concentration of glucose in the Treated group can be associated to higher availability of propionic acid (Aschenbach et al., 2010).

## Résultats

This was confirmed by rumen measures of volatile fatty acids; the Treated group had greater proportion of propionic acid and lesser proportion of acetic acid than the Control group (unpublished data).

Four metabolic pathways were affected by the reduction of enteric methane production. One is methane metabolism and the others are related to amino-acid biosynthesis and metabolism. MetExplore analysis linked 14 metabolites and intermediate metabolites identified based on untargeted LC-MS data were useful to validate relationships between discriminant metabolites based on the generated subnetwork. Pathway analysis allows to propose hypotheses linking functional relationships between discriminant metabolites. Therefore, metabolic changes associated with methane emissions can be interpreted in an integrated way (Booth et al., 2013). For example, the increase of glutamic acid, oxoglutaric acid, as intermediate, and citric acid may suggest a role for the tricarboxylic cycle in the Treated group. Moreover, MetExplore analysis highlights close relations between threonine, serine, glycine, creatine and creatinine, which were increased in the Treated group and were linked with less than two intermediates based on the subnetwork. These metabolites, involved in energy metabolism as described above, suggest a higher availability of energy in the Treated group.

We performed the pathway analysis based on *Bos taurus* genome since this biosource was manually annotated and verified (Elsik et al., 2009). We could not map all metabolites in *Bos taurus* network as information on amino acid derivatives tachydrine, pyrrolidine, and L-alpha-amino-1H-pyrrole-1-hexanoic acid was missing. Also, the lipids lyso phosphatidyl choline and 1-tetradecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine were missing. These metabolites may have a rumen microbial or a dietary origin. However, given the large diversity of the rumen microbiota (Li et al., 2018; Seshadri et al., 2018) we have not attempted to map these metabolites on networks from rumen microbes. Moreover, to our knowledge, microbial networks from rumen microbes have not been manually curated (Go, 2010).

This study was performed under controlled conditions, involving healthy dairy cows in the same lactation stage and fed the same diet. These optimal conditions are required to identify changes in the metabolome of low-methane emitting animals. Between 20 to 40% reduction in emissions can be observed in animals receiving dietary treatments or selected for low emission (Martin et al., 2010; Pinares-Patino et al., 2013). This amount of methane reduction is not expected to produce massive and clear changes in the metabolome as those reported for diseases (i.e., Klein et al., 2012). This study demonstrates the proof of principle of the usefulness of plasma metabolomics to detect changes in enteric methane emissions in ruminants. A validation of the approach and discriminant metabolites is, however, required under other conditions. Validation studies should be carried out on large populations to test the ability to detect natural variation within individual animals; also in studies using anti-methanogenic additives with different modes of action. The potential development of methane emission proxy based on plasma analysis of selected metabolites will need to take into consideration these validation steps.

## **Conclusion**

This study shows that variation in enteric methane emissions induced detectable changes in plasma metabolome in cattle. Some of these discriminant metabolites from microbial origin are known to be involved in methanogenesis and the utilization of hydrogen in the rumen. Other discriminant metabolites found in plasma are produced by the host or have a mixed, microbial-host origin. These metabolites are involved in general energy metabolic pathways and amino acids metabolism suggesting a general effect on the host animal induced by a reduction in methanogenesis that was never shown before. Plasma metabolites are useful to improve our understanding of the physiological effects on the host ruminant induced by a reduction of methanogenesis. This biofluid could also be of interest for developing indirect alternative indicators of methane emissions from ruminants. Future metabolomics studies with more animals and different physiological states are required to validate the findings of this study.

## **Acknowledgments**

This study is part of the PhD work of Benedict Yanibada and was granted through the Cifre (ANRT) framework by a consortium of R&D institutes and of private companies: Adisseo, Agrial, APIS-GENE, Deltavit, DSM, Institut de l'Élevage, Inra, Lallemand, Moy Park Orléans, Neovia, Techna and Valorex through the framework of a contract CIFRE (Industrial Agreements of Training by Research) supported by the (National Association of Technical Research. The author thanks the personnel of the experimental facilities of INRA experimental Unit Herbipôle for the care of animals

## **Additional Information**

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

This study was funded by the Agence National de la Recherche et de la Technologie (ANRT), Cifre n°2015/0182.

Résultats

### **Publication 3: Milk multiplatform metabolomics analysis highlights metabolites and pathways related to dairy cows' methane emissions**

Les travaux présentés dans ce chapitre ont pour objectif d'identifier dans le lait des marqueurs associés aux émissions de méthane. L'analyse en RMN a été faite en appliquant la méthodologie retenue suite à l'optimisation méthodologique (Publication 1) et en LC-MS par une précipitation au méthanol. Les émissions de méthane chez les animaux alimentés avec le composé anti-méthane ont été réduites de 23 %. L'analyse des profils métaboliques du lait en RMN et en LC-MS combinées avec l'analyse statistique multivariée a permis de séparer les deux groupes d'animaux. Parmi les variables responsables de la séparation, seize métabolites ont été identifiés. L'analyse des réseaux métaboliques impliquant ces métabolites-marqueurs a montré que les voies associées aux métabolismes des acides aminés notamment la valine, leucine, isoleucine et le métabolisme du glutamate semblent être affectées.

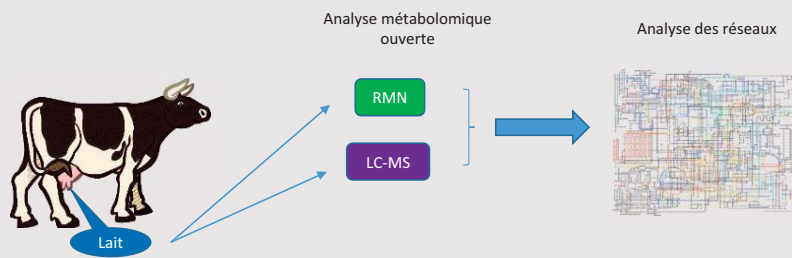
Résultats

## Résumé: Recherche de marqueurs dans le lait associés aux émissions de méthane chez la vache laitière par une approche métabolomique

### Objectifs :

- Réaliser une analyse des profils métaboliques de lait de vaches supplémentées ou non avec un produit anti-méthane.
- Identifier de potentiels métabolites discriminants les groupes et les voies métaboliques impactées.

### Matériel & Méthodes :

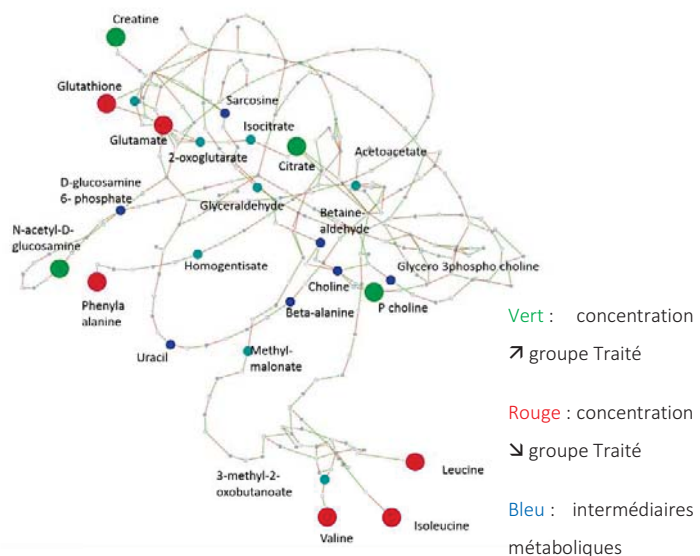


- 25 vaches Holstein primipares séparées en deux groupes suivant la présence ou non d'un produit anti-méthane dans l'alimentation.
- L'expérimentation a duré huit semaines comprenant deux semaines d'adaptation au régime alimentaire, cinq semaines d'expérimentation et une semaine de mesure des émissions de méthane en enceinte respiratoire.
- Des échantillons de lait ont été prélevés matin et soir et poolés (2/3 et 1/3) pendant deux jours consécutifs.
- Une analyse métabolomique multiplateforme a été réalisée employant la RMN et la LC-MS
- Des outils bio-informatiques ont été appliqués pour remettre les potentiels biomarqueurs dans un contexte biologique.

### Résultats :

Metabolites	RMN	LC-MS
3-hydroxybutanoic acid	↓	-
Acetyl L Carnitine	-	↓
Citramalic acid	↑	-
Citrate	↑	-
Creatine /Phosphate	↑	-
Dimethylsulfone	↑	-
Dimethylsulfoxyde	-	↑
Glutamic acid	↓	-
Glutathione	↓	-
Leucine	↓	↓
Isoleucine	↓	↓
N acetyl glucosamine	↑	-
Phenylalanine	-	↓
Phosphocholine	↑	-
Pyrrolidine	-	↓
Valine	↓	-

**Métabolites discriminants identifiés  
(variation pour le groupe traité)**



**Sous-réseau métabolique associant les  
métabolites discriminants du lait**

Résultats



- Les émissions de méthane du groupe traites ont été réduites de 23%.
- En combinant les résultats de la LC-MS et de la RMN, 15 métabolites discriminants ont été identifiés.
- Les réseaux et voies métaboliques ont permis de mettre en relation des métabolites et ont mis en évidence des voies impactées (la voie de la leucine, isoleucine et valine).

### **Conclusion :**

- ✓ Dans cette étude exploratoire, la métabolomique a permis de mettre en évidence des marqueurs potentiellement associés aux émissions de méthane dans le lait.
- ✓ Le métabolisme des acides aminés, des acides gras et le cycle des acides tricarboxyliques semblent être impactés par la réduction des émissions de méthane.

**Milk multiplatform metabolomics analysis highlights metabolites and pathways related to dairy cows' methane emissions**

**Yanibada et al**

<sup>1</sup>Université Clermont Auvergne, INRA, VetAgro Sup, UMR Herbivores, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France.

**En préparation pour Metabolomics**

Résultats

Résultats

## **Abstract**

Dairy cows contribute significantly to methane emissions. In order to reduce the contribution of ruminants to the carbon footprint. Therefore, research are undertaken to reduce ruminant's methane emissions and alternative way to measure methane are tested. The objective of this study is to investigate changes in the metabolic profiles of the milk of dairy cows associated with a reduction of methane emissions which may be used to measure out the emissions. Twenty-five primiparous Holstein cows that received a specific anti-methanogenic treatment (Treated n=12) or not (Control n=13) were used. The study lasted six weeks and at the end of the fifth week, milk samples were collected for metabolomic analysis. Milk metabolome analysis was performed using Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry (LC-MS/QTOF). The measurement of methane emissions using respiratory chambers revealed a reduction of emissions evaluated to 22.7% in the Treated group. Overall, 16 discriminant metabolites (12 with NMR; 5 with LC-QToF-MS) were annotated or identified. Metabolic network analysis allows to suggest seven pathways mostly involving amino acids for example valine, leucine and isoleucine biosynthesis; glutamine and glutamic acid metabolism; phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis; affected by the reduction of methane emissions. The discriminants metabolites and the associated pathways led us to hypothesize that energy and fatty acids metabolism may be impacted by the reduction of methane emissions

Résultats

## Introduction

Ruminant methanogenesis is one the main sources of anthropogenic methane (CH<sub>4</sub>) (Gerber et al., 2013). This compound, a by-product of the ruminal fermentation process (Morgavi et al., 2010; Wallace et al., 2017) produced by archaea, contributes significantly to greenhouse gas emissions (Baskaran et al., 2009) and constitute a loss of energy for the host animal (Johnson and Johnson, 1995). Therefore, different strategies are tested at experimental level to mitigate methane emissions (Beauchemin et al., 2009; Martin et al., 2010; Wall et al., 2010). The assessment of these treatments is performed at the experimental scale using tools that are unfortunately not easily applicable on the field and in large scale studies. Therefore, alternative measurement methods are needed.

Metabolomic approaches have proved to be effective in identifying potential biomarkers in many fields. Two complementary platforms, NMR and LC-MS, have been widely used alone or in combination (Lindon and Nicholson, 2008; Büscher et al., 2009). This approach might be helpful to identify markers related to methane emissions in biological fluid. Identifying such metabolites, would be beneficial to assess anti-methanogenic treatments on the field and so favor the adoption of more sustainable environmental and more efficient husbandry practices. The last decades, milk fatty acids have been studied to highlight correlation with methane emissions with more or less success (Chilliard et al., 2009; van Lingen et al., 2014). Milk metabolites may also provide information. By testing four different diets Antunes-Fernandes et al. (2016) identified milk acetoacetic acid, creatinine, ethanol, formic acid, methylmalonic acid and N-acetyl sugar as being positively related to CH<sub>4</sub> intensity (in g CH<sub>4</sub>/kg of milk) and citric acid as being negatively related to CH<sub>4</sub> intensity.

The aim of the study is to highlight changes in milk metabolome specifically associated with a reduction of methane emission and by examining discriminant metabolites to identify and better understand the metabolic pathways affected by this change. The experimental conditions were optimized for the identification of potential biomarker of methane emissions. In fact, The originality of this study lies in the use of primiparous dairy cows in the same physiological state; the use of a similar diet which only differs by the presence or not of a specific anti-methanogenic additive that selectively inhibits the last step of the methanogenesis pathway by competing against methyl-coenzyme M (Scheller et al., 2013; Aguinaga Casanas et al., 2015); the use of a multiplatform metabolomics approach to improve the coverage of milk metabolome. We performed pathway analysis in order to understand changes occurring in milk metabolome.

## **Methods**

### **Milk sample collection.**

The experiment previously described (publication 2) involved the collection of milk samples. Cows were milked twice a day (7:30 am and 3:30 pm) and the production was controlled by weighing and recorded all along the experiment. The metabolomics analysis was performed with samples collected, during two consecutive days (week 5) from the two milkings (10 ml) and mixed at a 2:1 ratio that reflected the daily production. The milk samples for each cow collected over two days were mixed in equal proportion in order to have a more accurate overview of the metabolism. Samples were aliquoted by fractions of 500  $\mu$ l and stored at -80°C until analysis.

### **Milk metabolomics analysis.**

NMR analysis. Milk samples analysis was performed with the methodology previously described (NMR methodology). NMR analysis was performed on Bruker Avance III HD spectrometer (Bruker, GMBH, Karlsruhe, Germany) operating at 600.13 MHz, and equipped with an inverse detection 5 mm  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$ - $^{31}\text{P}$  cryoprobe connected to a cryoplatfrom. One dimensional (1D- $^1\text{H}$ ) proton spectra were acquired using a Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) spin echo pulse sequence with a 5 second-relaxation delay to attenuate proteins and lipoproteins broad signals. A water suppression signal was achieved, by presaturation during the relaxation delay. The spectral width was set to 20 ppm for each spectrum and 128 scans (16 dummy scans) were collected with

32k points. Free induction decays was multiplied by an exponential window function (LB=0.3 Hertz) before Fourier Transformation.

LC-MS analysis. Milk samples in a volume of 500  $\mu$ l were thawed in ice, sonicated for 10 minutes and centrifuge at 3,000 g for 15 minutes at 4 °C. The aqueous phase was collected and 100  $\mu$ l was transferred into a 1.5 Eppendorf. Cold methanol in a volume of 200  $\mu$ l was added, samples were vortexed and kept at -20 °C for 30 min. Samples were centrifuged at 14,000 g for 10 minutes at 4 °C. Supernatants were collected, transferred into a glass vial and evaporated to dryness using a Genevac EZ-2 evaporator (Genevac SP Scientific, Ipswich, UK) with a HPLC program for 25 minutes. Samples were resolubilized in 500  $\mu$ l of MilliQ water/acetonitrile (50/50) in 0.1% of formic acid mixture, and 10  $\mu$ l were injected into the system. The chromatographic separation was performed on an Acquity UPLC HSSS T3 column (ThermoFischer Scientific, Montigny-le-Bretonneux, France) with a particle size of 1.8  $\mu$ m at a flow rate of 0.4 ml/min at 30 °C. Samples were eluted from the LC column using a linear gradient (curve number: 6): 0-2min:100% A; 2–15 min: 0–100% B; 15–22 min: 100% B; 22–26 min 100% A for re-equilibration. Mass spectrometry analysis was performed on a Bruker Q-ToF impact II (Bruker Daltonik, Bremen, Germany) module in a positive mode with a scan range from 50 to 1,000 m/z. Fragmentation spectra were obtained on an Orbitrap Velos (Thermo, Les Ulis, France) as previously described (publication 2).

A pooled quality control (QC) sample was prepared for each analytical platform by mixing equal parts of each biological milk sample. These QC samples were processed as described above and analyzed at regular intervals throughout the run (NMR n=3; LC-MS n=11).

#### **Data processing and statistical analysis.**

**NMR spectra** were manually phased and the baseline was corrected using TopSpin 3.2 software (Bruker, GMBH, Karlsruhe, Germany). All spectra were referenced to TSP signals at 0 ppm. The spectral data were imported in the Amix Software (version 3.9, Bruker, Rheinstetten, Germany) for data reduction. The bucketing was performed in the region [10.0-0.5] ppm with a bucket width of 0.01 ppm and data were normalized to the total intensity of the spectra. The following regions [5.1-4.5] corresponding to water signal, whereas [5.27-5.21], [5.095-4.41], [4.015-3.53], [3.33-3.27] corresponding to lactose signals and [3.39-3.36] corresponding to methanol signals were excluded.



**LC-MS** Data extraction was handled using Bruker software Data Analysis (Bruker Daltonik, Bremen, Germany) which carry out the analysis of spiked compounds and converted data into NetCDF format for global analysis using Galaxy open web-based platform. Ions were extracted using XCMS tool (Smith et al., 2006) using the centWave algorithm for peak picking (resolution= 10 ppm; peak width= 5 to 20; s/n=5). The peak-group algorithm was applied to correct retention time and Minfrac was set to 0.3, meaning that peaks, which appears in more than 30% of the samples, were kept. Data were filtered on retention time (<0.4 minutes and >22 minutes) to remove noisy signals contained in solvents, fold (<2), tstat (<0) and corrected for signal drift and batch effect based on the linear algorithm (van der Kloet et al., 2009).

Statistical analysis was performed using by SIMCA-P+ software (V13, Umetrics AB, Umea, Sweden). NMR data were log-Pareto scaled and LC-MS data were Unit Variance (UV) scaled. The assessment was realized in a first instance using unsupervised Principal Component Analysis (PCA) to identify trends and outliers. Then, Supervised Orthogonal Partial least Square Discriminant Analysis (OPLS-DA) was performed to identify variables discriminating Control and Treated. The predictive ability of the model ( $Q^2$ ) and the percentage of variable explains ( $R^2$ ) were used to evaluate OPLS-DA models. Values close to 1.0 for parameters indicate a robust predictive model. A permutation test (200 iterations) was applied in order to evaluate the validity of the model.

### **Metabolite identification**

NMR metabolites identification was performed, by comparing chemical shifts and coupling constants of signals with standard spectra provided standards acquired in the same conditions, by the literature (Klein et al., 2010; Sundekilde et al., 2013a; Yang et al., 2016; Li et al., 2017a), and by databases like the Livestock Metabolome Database (Goldansaz et al., 2017) (<http://lmdb.ca/>) or the Biological Magnetic Resonance Data Bank (Ulrich et al., 2008) (<http://www.bmrb.wisc.edu/metabolomics/metabolomicsstandards.shtml>). Identified chemical structures were confirmed using two orthogonal acquisition sequences (i.e. 1 dimensional and 2 dimensional NMR) and compared with a standard.

LC-MS discriminant metabolites were annotated in a first instance by comparing masses and retention times with data provided by an in-house database containing more than 1,000 metabolites acquired under the same chromatographic conditions. Confirmation was performed by comparing MS<sup>2</sup> spectra with those from standards acquired under the same fragmentation conditions as previously described (publication 2).

### **Data and pathway analysis**

The discriminant metabolites identified in both analytical platforms were implemented in Metaboanalyst 3.0 (Xia et al., 2015) (<http://www.metaboanalyst.ca>). This web instance allows performing heat maps, enrichment and pathways analysis in order to identify the main pathways potential biomarkers were involved in. It was followed by pathways analysis using Metexplore (<https://metexplore.toulouse.inra.fr/metexplore2/>) (Cottret et al., 2010) in order to highlight links between discriminant metabolites. For both web instances, *Bos Taurus* metabolic pathway, which contains 88 pathways and 1526 metabolites with Kegg identifiers, was used.

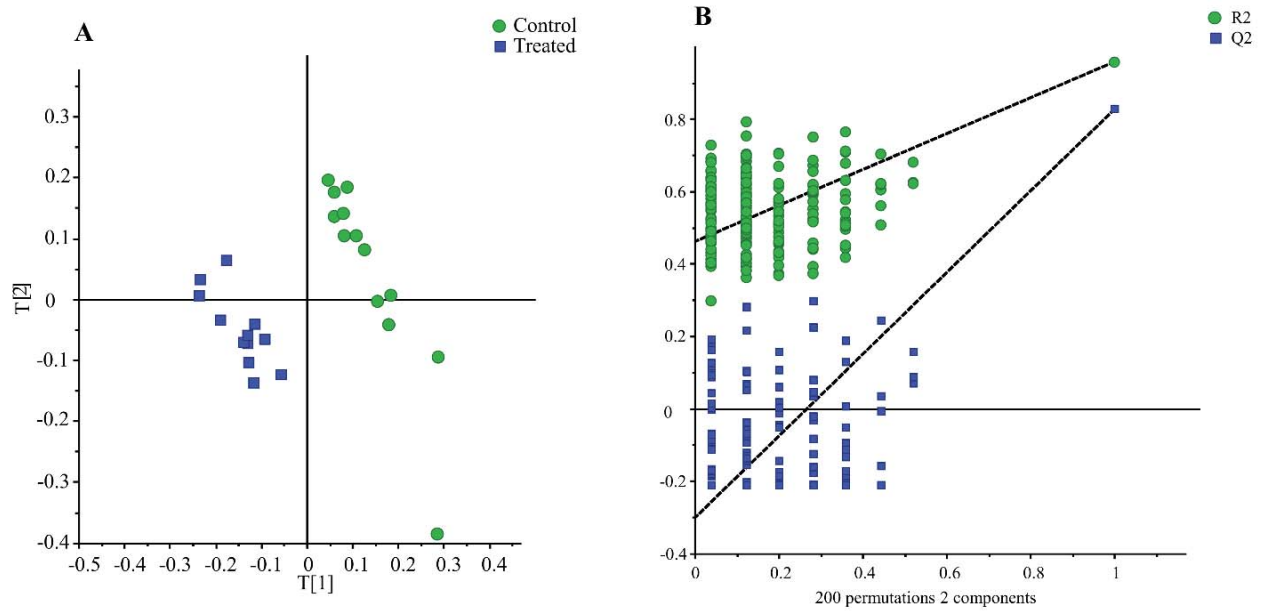
## Results

### Enteric methane and milk parameters

Methane emissions measurement performed in respiratory chambers showed 22.7% (g CH<sub>4</sub>/day) reduction in the Treated group. No impact were observed regarding dry matter intake and milk production as previously described (publication 2). Higher concentration of protein (P= 0.078) and lower concentration of lactose (P=0.053) were observed in the Treated group.

### Metabolomics and identification of discriminant variables

Orthogonal Signal Correction (OSC) was applied on NMR data (n=814) by removing one component and 77.54% of variability remains. This filtering led to a clear separation of the two groups as shown Figure 1A ( $R^2X=0.267$ ;  $R^2Y=0.959$ ;  $Q^2=0.828$ ). The permutation test Fig. 1B validated the robustness of the model. Over the 199 variables important in the projection (VIP score >1.2) and based on 1D and 2D NMR spectra, 12 metabolites, were identified (Table 1). These 12 discriminant metabolites resonated in the aliphatic region signals (0.8-0.45 ppm) and among them, five were amino acids and derivatives (valine, leucine, isoleucine and glutamic acid; creatine/phosphate, glutathione), three were organic acids (3-hydroxy-butyric acid, citramalic acid, citric acid), one was a sulfured compounds (dimethylsulfone). A majority of amino acids were reduced in the Treated group. Lipids' chemical shifts (0.84-0.97 ppm; 1.26-1.31 ppm) were part of the discriminant compounds but NMR is not suitable to accurately identify and characterize fatty acids and therefore, we were not able to identify those molecules. The predominance of lactose signals, makes difficult the validation of annotated metabolites on NMR 2D spectra. Indeed, homonuclear (Cosy) and heteronuclear (HSQC) lactose correlation signal hampers the visualization of metabolites found at low concentration. Therefore, confirming some 1D NMR annotation was hard to achieve (six metabolites were identified in level 1 and six were annotated in level 2).



**Figure 1A.** Score plot of the OSC-PLS-DA model of NMR data analysis ( $n=2$ ;  $R2X=0.267$ ;  $R2Y=0.959$ ;  $Q2=0.828$ ). Control group (green circles,  $n=13$ ) vs Treated group (blue rectangles,  $n=12$ ) **B.** Permutation test of the OSC-PLS-DA model.

**Table 1.** List of milk metabolites identified using NMR analysis differing between cows fed a similar diet supplemented (n=12) or not (n=13) with an anti-methanogenic chemical

Metabolites	Chemical shift (ppm)	multiplicity	relative change	VIP value	annotation level	Fold change
<b>Amino acids and derivatives</b>						
Leucine	0.965	t	↓	1.83	1	0.74
Isoleucine +lipids	0.945	t	↓	2.71	1	0.70
Valine	2.285	m	↓	1.45	2	0.77
Glutamic acid	2.115	m	↓	2.17	1	0.77
Creatine /Phosphate	3.045	s	↑	5.26	2	1.15
Glutathione	2.985	dd	↓	1.49	2	0.78
<b>Carboxylic acids</b>						
Beta-hydroxybutyric acid	1.195	d	↓	2.45	1	0.83
Citramalic acid	2.735	d	↑	2.71	2	1.99
Citric acid	2.565	dd	↑	9.08	1	1.41
<b>Carbohydrates and derivatives</b>						
N-acetyl glucosamine	2.055	m	↓	5.24	2	0.90
<b>Miscellaneous</b>						
Dimethylsulfone	3.155	s	↑	5.92	1	1.70
Phosphocholine	3.225	s	↑	4.74	2	1.13

Relative changes: ↑ = increased in Treated group; ↓ = decreased in Treated group

\*For multiple chemical shifts, the highest VIP value is given.

Multiplicity: s = singlet; d = doublet; dd = doublet of doublet; m = multiplet; t = triplet

VIP= Variable important in the projection; A threshold of 1.2 was fixed for statistical significance

Level 1 (annotated): confirmed by two independent and orthogonal data relative to an authentic compound analyzed under identical experimental conditions, for example 1H NMR and 2D 1H-13C HSQC NMR spectroscopy. Level 2: Comparison with a standard using a single acquisition sequence

LC-MS data (1039 ions) provided by Galaxy web instance were subjected to a variable selection. The OPLS-DA model (n=673 variables) obtained discriminates samples according to groups as shown in Figure 2A and had acceptable model parameters ( $R^2X=0.362$ ;  $R^2Y=0.853$ ;  $Q^2=0.506$ ). The permutation test validated the model (Figure 2.B). Table 2 described the five discriminant metabolites identified following in-house database inquiries and MS-MS confirmation. The validation of the identification using MS-MS was limited due to the low relative intensities of discriminant compounds. In fact, a great number of compounds had intensity values in an order of magnitude ranking between  $10^3$  and  $10^4$ . MS-MS analysis on Orbitrap is achievable for ions with intensity value over  $10^5$  (four metabolites were identified level 1; one in level 2).

**Table 2.** Milk metabolites annotated and identified by LC-MS metabolomics analysis differing between cows fed a similar diet supplemented (n=12) or not (n=13) with the anti-methanogenic chemical

Metabolites	Formula	m/z	$\Delta m/z$ in ppm	$t_R$ in min	relative change	VIP value	Annotation level	Fold change
Pyrrolidine	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> N	72.08057	-3.27	1.18	↓	1.50	1	0.70
DMSO	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> S	79.02096	-3.44	1.19	↑	1.77	1	6.27
Leucine/Isoleucine	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	132.10198	-4.71	1.19	↓	1.41	1	0.76
Acetyl L Carnitine	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> NO <sub>4</sub>	204.12302	-3.58	1.19	↓	1.21	1	0.88
Phenylalanine	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> NO <sub>2</sub>	166.08627	-5.31	6.24	↓	1.31	2	0.81

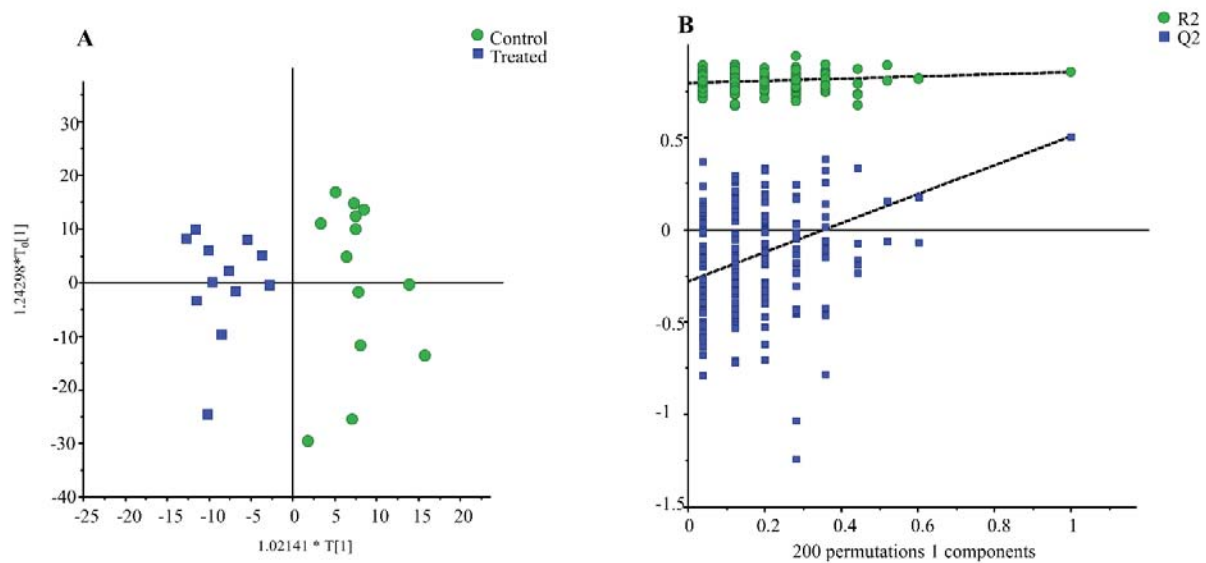
$\Delta m/z$  (in ppm) = difference of mass between the identified metabolites and the standard

↑=increased in Treated group; ↓=decreased in Treated group

A threshold of 1.2 was fixed

Level 1 of identification: exact mass, retention time and fragmentation spectra comparison with a standard

Level 2 of identification: mass and retention time comparison with a standard



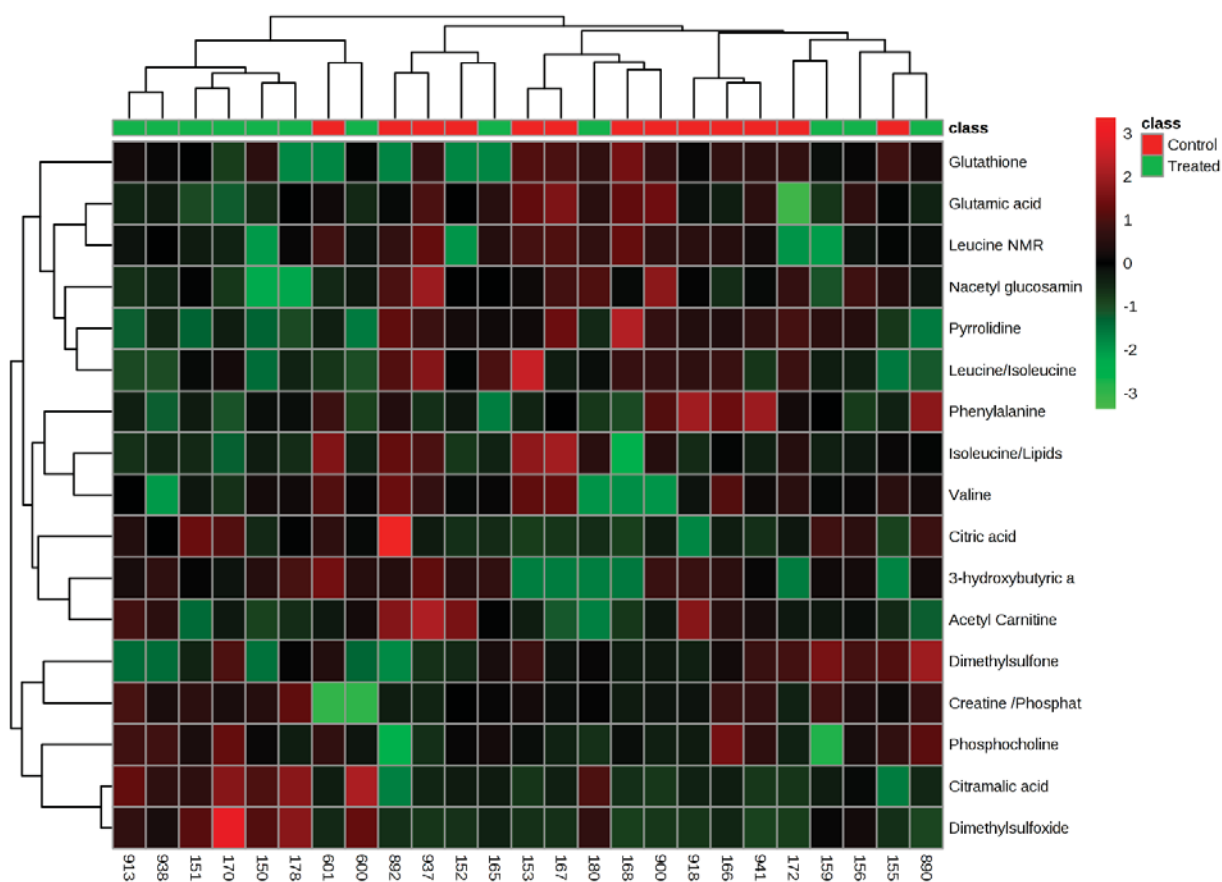
**Figure 2A.** Score plot of the OPLS-DA model of LC-MS data analysis after a variable selection. (n=1+1+0; R2X=0.362; R2Y=0.853; Q2=0.506). Control group (green, n=13) vs Treated group (blue, n=12) **B.** Permutation test of the OSC-PLS-DA model.

### **Metabolic patterns and pathways analysis**

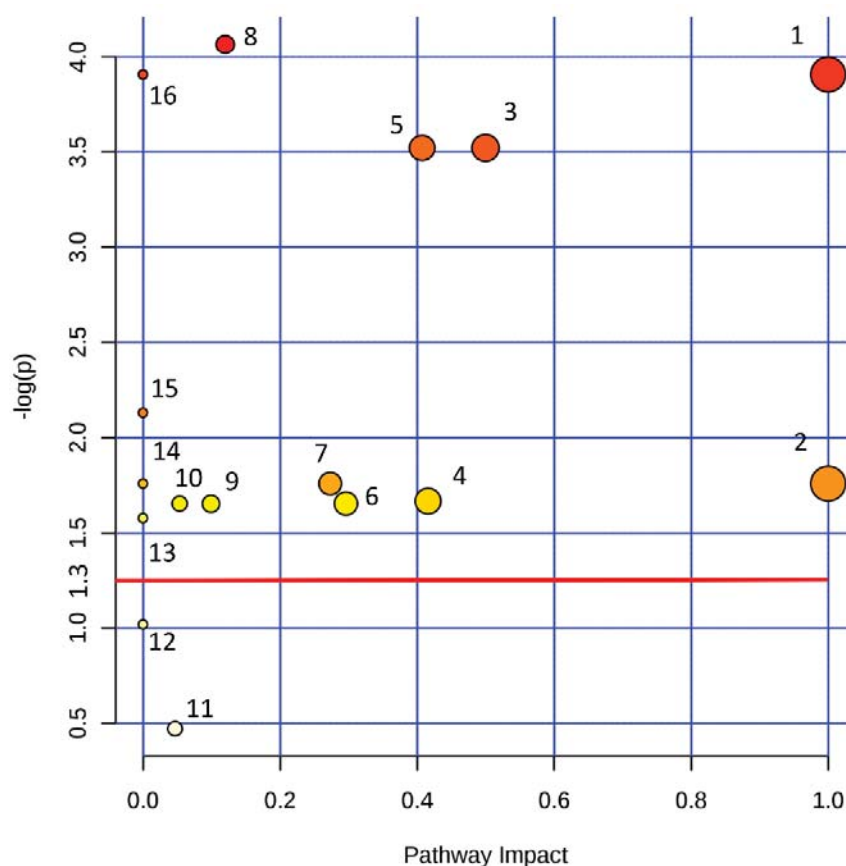
To better illustrate statistical significant changes, a heatmap shown on Figure 3 built with non-signals corrected, scaled data originating from LC-MS and NMR analysis is given. The higher the intensities of metabolites are, the redder in the heat map they appear and the lower the intensities of metabolites are, the greener in the heat map they appear. Results showed a separation into two major clusters with one misclassification for the Control group and five for the Treated group.

Enrichment and pathway analysis were performed in order to evaluate the possible role of the metabolites in biological pathways. Fifteen out of the discriminant metabolites identified were mapped on *Bos Taurus* network. Only pyrrolidine was missing. Among the 16 identified pathways, seven were considered relevant, by fixing p-value of the ttest at 0.05 and the pathways impact value threshold to 0.2 (Fig. 4) (Zhu et al., 2015). These were 1/valine, leucine and isoleucine biosynthesis; 2/Glutamine and glutamate metabolism; 3/Phenylalanine, tyrosine and tryptophane biosynthesis; 4/Glutathione metabolism; 5/Phenylalanine metabolism; 6/Glyoxylate and dicarboxylate metabolism 7/Alanine, aspartate and glutamate metabolism were filtered out.





**Figure 3.** Hierarchical clustering analyses for potential biomarkers expression profile. Heat map shows metabolites identified by NMR and LC-QToF-MS. Rows: metabolites; columns: samples. Color key indicates metabolite expression value. The higher concentration of metabolites, the redder in the heat map, and the lower concentration of metabolites, the greener in the heat map.

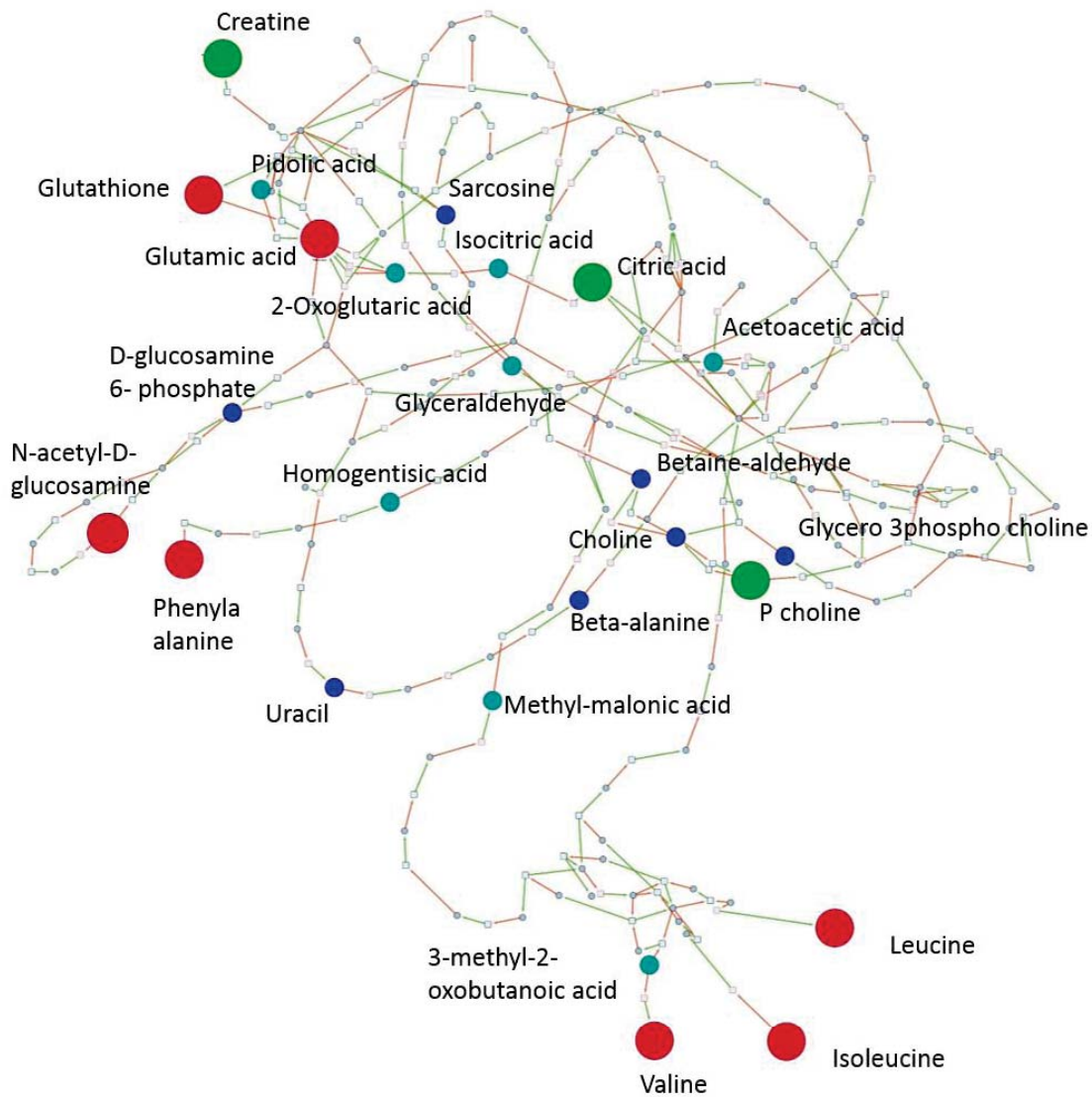


**Figure 4.** The  $-\log(p\text{-value})$  represents the enrichment score. The impact score (0–1) indicates the pathway topological importance of the metabolites. The color and size of each circle is based on p values and pathway impact values, respectively. Node1/Valine, leucine and isoleucine biosynthesis; node2/Glutamine and glutamic acid metabolism; node3/Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis; node 4/Glutathione metabolism; node5/Phenylalanine metabolism; node 6/Glyoxylate and dicarboxylate metabolism; node7/Alanine, aspartic acid and glutamic metabolism; node8/Amino sugar and nucleotide sugar metabolism; node9/Arginine and proline metabolism; node10/Citric cycle (TCA cycle); node11/Glycerophospholipid metabolism; node12/Synthesis and degradation of ketone bodies; node13/Butanoic acid metabolism; node14/Nitrogen metabolism; node15/Pantothenic acid and CoA biosynthesis; node16/Valine, leucine and isoleucine degradation. Seven pathways were considered relevant, by fixing p-value at 0.05 ( $-\log(p)=1.3$ ) and the pathways impact value to threshold to 0.2.

Discriminant metabolites were implemented into *Bos Taurus* network using Metexplore 2.12. Over 16 metabolites identified, 12 were mapped (Pyrrolidine, dimethylsulfoxide, dimethylsulfone and acetyl carnitine were missing). A subnetwork (Chazalviel et al., 2017) describing potential relationships between discriminant metabolites was generated. A simplified model based on pathways, subnetwork and literature was designed in order to highlights potential linkage between discriminant metabolites (Fig. 5). Pathway were validated by searching for signals in the LC-MS data set that could correspond to intermediates. Exact masses (provided by public databases) and retention time (in-house database) were used for the annotation of these intermediate (n=15).

## Discussion

In order to develop alternative methods of methane measurement and from a metabolic point a view, milk is an interesting biofluid, since it is non-invasive and readily available for dairy cows. Identifying potential markers of methane emissions in milk and understanding the mechanism were the core issues of the study (Xia et al., 2013). Therefore, a similar diet that only differed by the presence or not of an anti-methanogenic additive targeting specifically the last step of methanogenesis was used. This additive had no effect on dry matter intake and milk production. It was important to perform the experiment with cows in a similar physiological state lactation stage has an impact on milk metabolome stage since it changes milk metabolome (Klein et al., 2010; Li et al., 2017b). We investigated changes in the milk metabolic profile between the Control and Treated groups and, 16 discriminant metabolites were identified by the application of a multiplatform metabolomics approach involving NMR and LC-MS. We performed network analysis and linked discriminant metabolites to reveal affected pathways. Seven metabolic pathways have been highlighted to be influenced by metabolites expressions changes. These pathways involved mostly amino-acids metabolism that take part into energy metabolism. Through *Bos Taurus* network, metexplore was able to link 12 of the discriminant metabolites with more or less important number of intermediates. Three of the non-mapped compounds namely dimethylsulfone, dimethylsulfoxyde and pyrrolidine originate from the ruminal microbiota activity (He and Slupsky, 2014) which may explain why they are not present in *Bos Taurus* network.



**Figure 5.** Potential linkage between discriminant metabolites obtained after Metaboanalyst and Metaxplore analysis; Metabolites in green means an increase of relative concentration in Treated group compared to Control; Metabolites in red mean a decrease of relative concentration in Treated group compared to Control. Metabolites in dark blue are intermediates identified using LC-MS data (Level 2; comparison with standards masses and retention times). Metabolites in lights blue are intermediates identified using LC-MS data in level 3 (based on masses).

Among the discriminant metabolites, most of amino-acids and derivatives concentration were reduced in the Treated group. Four of them were essential amino acids, namely leucine, isoleucine, phenylalanine and valine. These amino acids are provided through diet or by microorganism. Leucine, isoleucine and valine are branched chain amino acids that have been described to be involved in the ruminal synthesis of branched-chain fatty acids (Massart-Leëen and Massart, 1981). A reduction of the relative concentration of this essential amino acid may be potentially correlated with lower amount of odd-branched-chain-fatty acids in the milk of the Treated group.

In the animal study, metabolic profiling of plasma was also undertaken (publication 2). Higher plasmatic level of methionine were observed in the Treated group. This amino acid may be metabolized by the liver to produce creatine, phosphocreatine and phosphocholine (Mato and Lu, 2007) leading to higher concentrations in the Treated group milk. Also, milk's relative concentration of methionine was checked using the experimental LC-MS dataset analysis and appeared to be similar between the Control and Treated groups, meaning that probably no proteic synthesis problem occurred, taking into account that methionine is the main limiting factor during this process (Rogers et al., 1987; Pinotti et al., 2002). It was confirmed by the determination of protein rates which was similar between groups (no significant differences,  $p$ -value = 0.078). Dimethylsulfone and dimethylsulfoxyde, two discriminant metabolites increased in the Treated group are synthesized from methanethiol, a degradation product of methionine. (He and Slupsky, 2014). Higher availability of methionine in the rumen may have favored the synthesis of the two sulfured metabolite and through passive diffusion, they can be found in the milk of Treated cows in higher concentrations (Villeneuve et al., 2013).

Similar to our results, van Gastelen et al. (2018) have described a negative relationships between citric acid concentration and methane emissions. Citric acid secreted by the mammary epithelial cells by exocytosis (Shennan and Peaker, 2000) has been reported to reflect this organ activity (Linzell et al., 1976). This metabolite, as Coenzyme A conjugate, can be separated into acetyl Coenzyme A, which participates in fatty acids metabolism (Garnsworthy et al., 2006). In addition, acetic acid and beta-hydroxybutyric acid, which are two major compounds involved in the synthesis of de novo fatty acids including C4:0 to C12:0, most of the C14:0 and half of the C16:0. (Lock and Shingfield, 2004) were found at lower concentration in the Treated group.

## Résultats

The decreased of the proportion of acetic acid in the rumen (data not shown) resulted in a lower plasma concentration may have reduced the conversion of acetic acid to acetyl coenzyme A in the mammary gland leading to a reduction of fatty acid synthesis. Also, it has been suggested that elevated levels of propionic acid in the rumen might diminish the availability of beta-hydroxybutyric acid for fatty acid synthesis (Van Soest and Allen, 1959). Acetyl carnitine was reduced in the Treated group, which is contrary to the results obtained by van Gastelen et al. (2017). It have been reported that carnitine and acetyl carnitine have a crucial role in energy metabolism by taking over the transport of long-chain fatty acids from the cytosol to the mitochondria, by regulating the acyl-CoA/Co A ratio and by being involved in neoglucogenesis (Ringseis et al., 2018). Carnitine can be synthesized by the host animal, by the microbiota or provided by the diet. It is difficult to correlate acetyl carnitine concentration in milk with methanogenesis due to it numerous origins. All these indices are indications of changes associated with energy metabolism and fatty acids biosynthesis and availability in milk. In order to validate this hypothesis, it would be interesting to measure out milk fatty acid composition and concentration (Lock and Shingfield, 2004; Vlaeminck et al., 2005). Combining metabolomics results and fatty acids information may improve the prediction of methane emissions. However, these discriminant metabolites should be validated for robustness by testing them under different situations.

Also, we observed seven common discriminant metabolites in plasma and milk. They were leucine, isoleucine, valine, dimethylsulfone, creatine and citric acid identified by NMR, whereas pyrrolidine was identified by LC-MS. The calculation of the ratio of intensity plasma/milk for each group shows (data not shown) higher level of leucine, isoleucine, valine and pyrrolydine in plasma and higher levels of dimethylsulfone, creatine and citric acid in milk. Milk creatine has been described by Lamarre et al. (2010) in rat to be extracted from circulating plasma by the mammary gland. The authors also showed that there was no evidence that mammary gland was able to synthetized creatine. Mammary epithelium has been described being impermeable to citrate therefore milk citrate levels reflects mammary rather than general metabolism. Higher concentrations of leucine, isoleucine and valine have also been described by Klein et al. (2013) and were linked to their extensive utilization by the mammary gland for milk protein synthesis and the generation of gluconeogenic and ketogenic precursors (Mephram, 1982).

## Résultats

The ratios were similar when comparing Control and Treated group, meaning that cows were certainly in a stable metabolic state. Combining plasma and milk potential biomarkers of methane emissions might be useful to reveal a metabolic signature that could differentiate low and high methane producers. In our opinion, the key issue regarding the use of biomarkers of methane emission to describe process occurring in the rumen in biofluid like milk is the relation between what take place in the rumen what leaves the rumen and what is found in milk. Therefore, dimethylsulfone that is synthesized in the rumen and the essential branched amino acids, should be take into consideration in future studies as they might be closely related to the microbiota activity.

## **Conclusion**

By combining the use of dairy cows in the same physiological state, a similar diet with the presence or not of a specific anti-methanogenic compound and a multiplatform metabolomic analysis we were able to reveal discriminant metabolites in milk potentially related to changes in enteric methane emissions. The discriminant metabolites originating from the microbiota and the host animal metabolism suggested that the energy metabolism and the fatty acids synthesis might be impacted. The analysis of milk fatty acids composition might give more explanations and information.

## **Acknowledgments**

This study is part of the PhD work of Benedict Yanibada and was granted through the Cifre (ANRT) framework by a consortium of R&D institutes and of private companies: Adisseo, Agrial, APIS-GENE, Deltavit, DSM, Institut de l'Élevage, Inra, Lallemand, Moy Park Orléans, Neovia, Techna and Valorex through the framework of a contract CIFRE (Industrial Agreements of Training by Research) supported by the (National Association of Technical Research. The author thanks the personnel of the experimental facilities of INRA experimental Unit Herbipôle for the care of animals

## **Additional Information**

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

This study was funded by the Agence National de la Recherche et de la Technologie (ANRT), Cifre n°2015/0182.

The authors declare that this manuscript and the work described is unpublished and has not been submitted for publication elsewhere.



Résultats

**DISCUSSION GÉNÉRALE &  
PERSPECTIVES**

Discussion générale & perspectives

## 1. Contexte de l'étude

Les ruminants contribuent de manière significative aux émissions de méthane suite au processus de fermentation entérique (Gerber et al., 2013). L'adoption de nouvelles pratiques d'élevage est indispensable pour réduire la part du secteur de l'élevage dans les émissions de gaz à effet de serre. De ce fait, des recherches ont été menées ces dernières décennies afin d'améliorer les pratiques d'élevage, l'alimentation étant le levier le plus simple sur lequel il est possible d'agir (Beauchemin et al., 2009; Martin et al., 2010). L'efficacité de ces moyens pour réduire la part du secteur de l'élevage dans les émissions de gaz à effet de serre dépend de leurs applications sur un long terme, et de l'incapacité des méthanogènes à s'adapter à ces stratégies. Par ailleurs, le suivi de l'efficacité des moyens utilisés pour réduire les émissions de méthane est possible à l'échelle expérimentale grâce à des méthodes de mesure directe (Hammond et al., 2016), mais celui-ci devient limité, difficile à implémenter sur le terrain à l'échelle d'un troupeau et sur le long terme (Pickering et al., 2015b). Rechercher des méthodes alternatives indirectes de mesure des émissions de méthane semble nécessaire pour supplanter les méthodes lourdes et coûteuses (Negussie et al., 2017a) et faciliter les tests de nouvelles stratégies de mitigation sur le terrain. L'analyse de la composition de matrices biologiques est une alternative prometteuse pour évaluer les émissions de méthane chez les ruminants (Chilliard et al., 2009; van Gastelen et al., 2017).

## 2. Objectif et originalité du travail de thèse

Le projet Consortium Méthane dans lequel s'inscrit cette thèse a pour objectif d'identifier et valider des marqueurs de la méthanogénèse entérique dans le but d'appliquer des stratégies de mitigation du méthane chez les ruminants. Ces travaux de thèse, dédiés à la métabolomique ont été effectués au travers de collaborations avec la plateforme Axiom de Toulouse pour les analyses RMN et la plateforme d'exploration du métabolisme à Clermont-Ferrand pour les analyses LC-MS. L'ambition dans ce projet de thèse, qui est exploratoire, était de rechercher des marqueurs associés aux émissions de méthane, chez la vache laitière, dans plusieurs matrices. Ces biomarqueurs potentiels pourraient in fine après validation être utilisés sur le terrain comme proxy pour évaluer les émissions de méthane et permettre aux partenaires de tester de nouvelles stratégies de mitigation du méthane sur le terrain.

Dans cette étude exploratoire, les conditions, expérimentales, analytiques ont été optimisées afin de favoriser l'identification de marqueurs associés à la méthanogénèse dans les matrices étudiées et comprendre les mécanismes sous-jacents. Ainsi :

**La stratégie expérimentale**, a consisté à utiliser des vaches laitières n'ayant jamais participé à une expérimentation et présentant des caractéristiques physiologiques proches (vaches primipares, au même stade de lactation). Les animaux ont suivi un régime alimentaire similaire qui ne différait que par la présence ou non de l'additif anti-méthane. Cet additif, cible spécifiquement la dernière étape de la méthanogénèse en entrant en compétition avec le méthyle coenzyme M. L'utilisation d'un composé anti-méthane moins spécifique aurait potentiellement pu donner des résultats similaires en terme d'émission de méthane, mais il aurait été plus difficile de mettre en évidence un lien direct avec les émissions de méthane.

**Des outils modernes de métabolomique** ont été mis à disposition pour l'analyse des profils métabolique du lait et du plasma. Une approche métabolomique multiplateforme basée sur l'utilisation d'au moins trois plateformes analytiques (RMN, LC-MS, approche ciblée ; analyse des acides gras du lait en GC-MS (en cours)) a été appliquée afin de maximiser les chances d'identifier des marqueurs de la méthanogénèse.

**L'analyse des réseaux métaboliques** a été utile pour générer des hypothèses sur les voies métaboliques vraisemblablement associées à la réduction des émissions de méthane. L'identification de sous-réseaux reliant les métabolites discriminants a permis de mettre en avant des voies métaboliques impactées. La caractérisation des intermédiaires des voies à l'aide de données de masses et de temps de rétention obtenues par l'analyse en LC-MS, a permis de donner du crédit aux hypothèses générées sur les voies impactées et les relations entre métabolites discriminants.

### 3. Principaux résultats

#### *A. Résultats de l'expérimentation animale*

La stratégie expérimentale adoptée a permis de mettre en évidence des modifications de profils métaboliques dans le lait et le plasma associés aux émissions de méthane, avec un effectif raisonnable d'animaux (vingt-cinq vaches). Le plan expérimental choisi, qui montre un équilibre entre les groupes Témoin et Traité en termes de MSI et de PL, a aussi permis de réduire le poids de paramètres importants tels que le stade physiologique relativement proches d'un animal à l'autre lors des prélèvements pour analyse métabolomique. Dans la littérature, on considère qu'une production laitière élevée est associée à un niveau de matière sèche ingérée plus élevé qui est lui-même associé à des émissions de méthane plus importantes (Garnsworthy et al., 2012b; Hristov et al., 2013). Ces paramètres, qui ont une influence sur les émissions de méthane, peuvent être confondants avec l'effet de l'additif anti-méthane. Il a semblé alors nécessaire de réduire leur poids par rapport au facteur d'intérêt en équilibrant les groupes (Ilves et al., 2012; Bell et al., 2016; Li et al., 2017b). La Figure 20, qui présente l'évolution moyenne de la matière sèche ingérée et de la production laitière pendant cinq semaines d'expérimentation (S1 à S5), montre qu'aucune différence significative n'a été observée concernant la MSI et la PL tout au long de l'expérimentation.

Les analyses réalisées pour le bilan énergétique et quelques paramètres de santé (semaines 1 et 5) n'ont montré aucune carence chez les animaux (les résultats moyens par groupe sont disponibles en annexe 4). Il a été jugé important de réaliser ces mesures dans l'éventualité d'expliquer à posteriori de potentielles anomalies au cours des analyses métabolomiques (par exemple la présence d'outliers en ACP).

La mesure des émissions de méthane réalisée sur 16 animaux (huit témoins et huit traités) a permis de mettre en évidence une différence de 23 % (g/kg de MSI) entre les groupes Témoin et Traité (données individuelles disponibles en Annexe 5). Cette méthode a été sélectionnée, car elle correspond au « gold standard » et elle est adaptée aux conditions de l'expérimentation (Grainger et al., 2007). En effet, un faible nombre d'animaux est impliqué et les paramètres zootechniques tels que l'ingestion peuvent être rigoureusement mesurés et contrôlés.

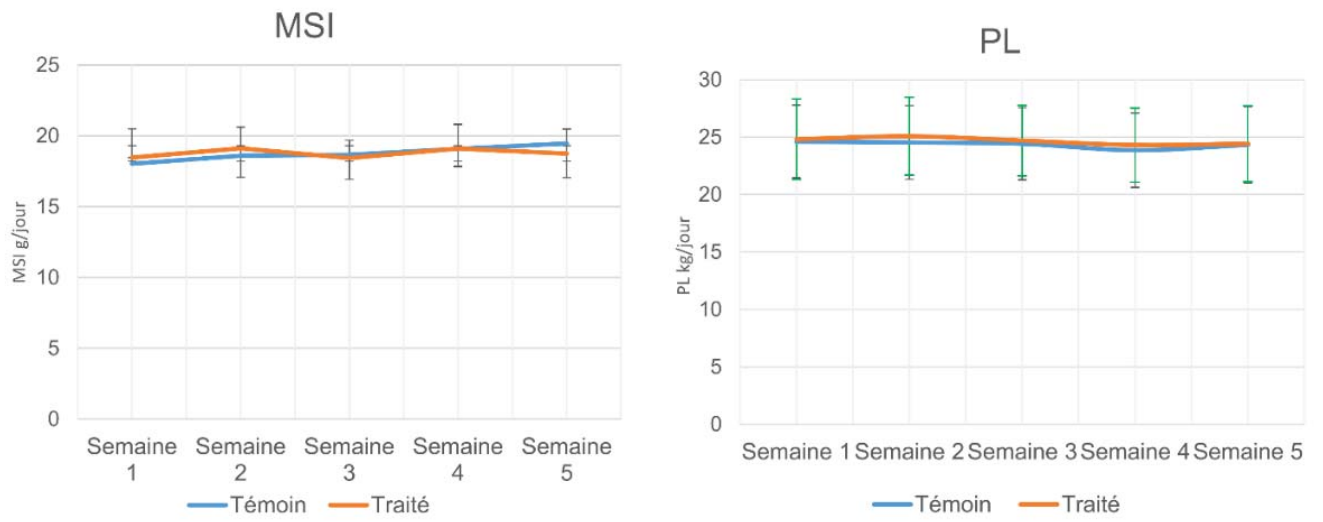


Figure 20: Évolution moyenne de la MSI et de la PL des groupes Témoin et Traité

La cinétique des émissions de méthane moyenne par groupe en 24 heures (Figure 21) montre une augmentation des émissions de méthane pour le groupe Témoin et une diminution pour le groupe Traité suite à la distribution de l'alimentation des animaux (9 h 00 et 15 h 30). Les émissions de méthane reviennent à un état de stabilité équivalent entre les groupes, quelques heures après le deuxième repas. Ces résultats témoignent de l'efficacité de l'additif anti-méthane. Les mesures du méthane ont été effectuées après la collecte des échantillons afin d'éviter un stress aux animaux, susceptible d'avoir un impact sur les ingestions, sur le métabolisme et par conséquent apporter plus de variabilité entre les animaux au niveau du métabolome.

**Des limites relatives à l'expérimentation animale liées à son impact et à sa portée peuvent être relevées.** De nombreux paramètres ont été mesurés et maîtrisés au cours de l'expérimentation animale comme par exemple, la matière sèche ingérée, les paramètres sanguins, l'utilisation de vaches primipares au même stade physiologique. Cela représente un atout indéniable pour la recherche de marqueurs associés aux émissions de méthane. Cependant, dans l'optique d'utiliser ces marqueurs pour évaluer les émissions de méthane à l'échelle d'une exploitation, on s'interroge sur la manière dont on peut prendre en considération ces paramètres ainsi que la variabilité physiologique des animaux, car ceux-ci ont une importance sur le métabolisme. Par ailleurs, l'analyse du plasma est intéressante et nécessaire pour ne pas limiter les études qu'aux vaches laitières. Cependant, la question du caractère invasif du prélèvement se pose. Dans le cas où l'analyse du plasma se révèle pertinente dans l'évaluation des émissions de méthane, peut-on réaliser cette opération invasive en routine ?

### *B. Résultats métabolomique*

**L'approche multiplateforme** a montré la complémentarité des plateformes analytiques car d'une part des métabolites discriminants communs ont été identifiés pour une plateforme analytique donnée (par exemple l'isoleucine dans le lait suite aux analyses métabolomiques RMN et LC-MS) et d'autre part la couverture du métabolome a été améliorée (dans le plasma, la RMN a permis d'identifier des acides carboxyliques, la LC-MS, quant à elle, certaines classes de lipides). L'approche adoptée permet ainsi de maximiser les chances d'identifier des marqueurs associés à la méthanogénèse.



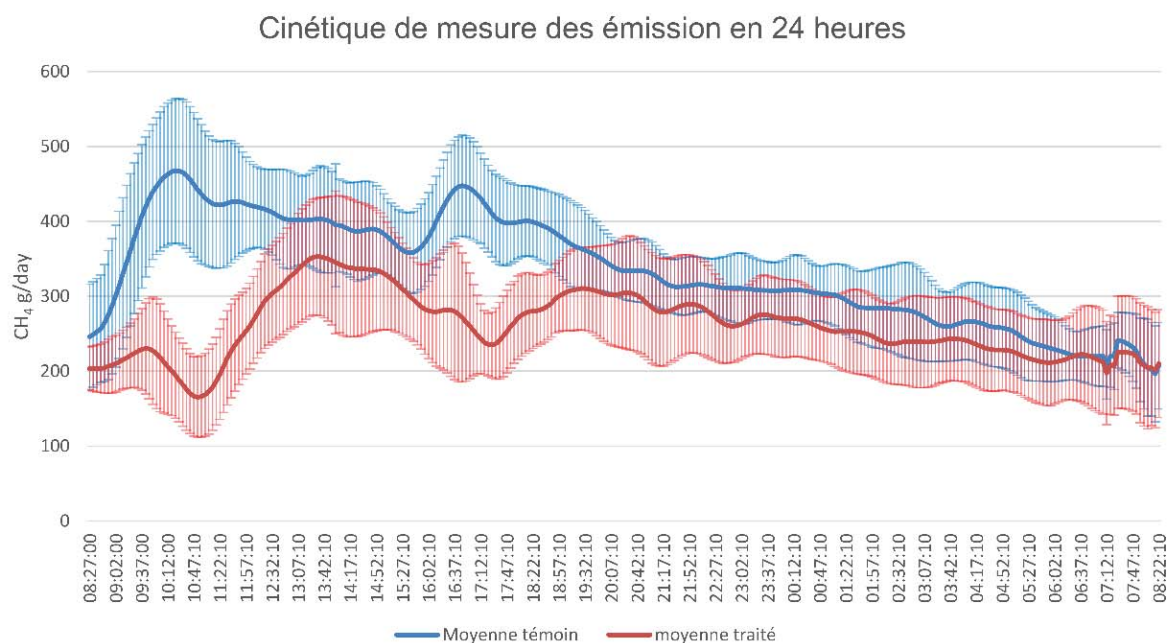


Figure 21 : Cinétique des émissions moyennes de méthane des groupes Témoin et Traité sur 24 heures

Discussion générale & perspectives

Les analyses statistiques multivariées des données brutes n'ont pas fourni de modèles robustes et fiables. Il a été nécessaire d'optimiser les modèles via la sélection de variables et via l'OSC. Dans le travail de thèse, la latitude que l'on s'accorde à réaliser la sélection de variables ou le filtrage OSC est justifiée par le fait que l'étude est exploratoire. L'application de la sélection de variables et du filtrage OSC ne porte pas préjudice à l'identification de métabolites discriminants et à la compréhension des mécanismes biochimiques (Xia et al., 2013). Par ailleurs, l'approche métabolomique dans le cadre de la recherche de marqueurs associés aux émissions de méthane est difficile à mettre en place, car la méthanogénèse ne représente qu'une faible proportion des processus se déroulant dans le rumen (Morgavi et al., 2010). De plus, les analyses métabolomiques ont été réalisées sur des matrices physiquement et biologiquement éloignées du compartiment ruminal dans lequel se déroule principalement la méthanogénèse. Des processus tels que le métabolisme du foie (Bu et al., 2017) ou encore l'activité de la glande mammaire ont aussi un impact (McLean, 1960; Ferreira et al., 2013; Maher et al., 2013) sur le métabolome et complexifie l'identification de marqueurs associés au facteur d'intérêt.

**L'analyse du plasma** a montré une relation entre la diminution des émissions de méthane dans le groupe Traité et des modifications d'expression de 27 métabolites. Ces observations ont permis d'émettre quelques premières hypothèses sur les voies impactées par le facteur d'intérêt. Le métabolisme énergétique et celui des acides aminés semblent être particulièrement affectés par la réduction des émissions de méthane dans le plasma des animaux du groupe Traité. En effet, des métabolites discriminants identifiés, tels que la créatine ou la glycine, ont été décrits dans la littérature comme intervenant dans le métabolisme énergétique au niveau du plasma, chez la vache laitière (Sun et al., 2014; Tian et al., 2015a). On peut également penser que les variations d'expression de la sérine, de la glycine et de l'acide formique dans le plasma sont liées à des modifications dans la voie de la méthanogénèse où ces métabolites interviennent (d'après le réseau métabolique du méthane de la base de données Kegg Figure 22). L'acide formique, dont la concentration est augmentée dans le groupe Traité, est un substrat de la méthanogénèse utilisé pour réduire le CO<sub>2</sub> en CH<sub>4</sub> (Morgavi et al., 2010). On émet l'hypothèse que l'augmentation des concentrations en acide formique dans le plasma est liée à son utilisation moins importante en tant que substrat de la méthanogénèse dans le rumen. Ainsi, des concentrations plus importantes d'acide formique se retrouvent dans le plasma.

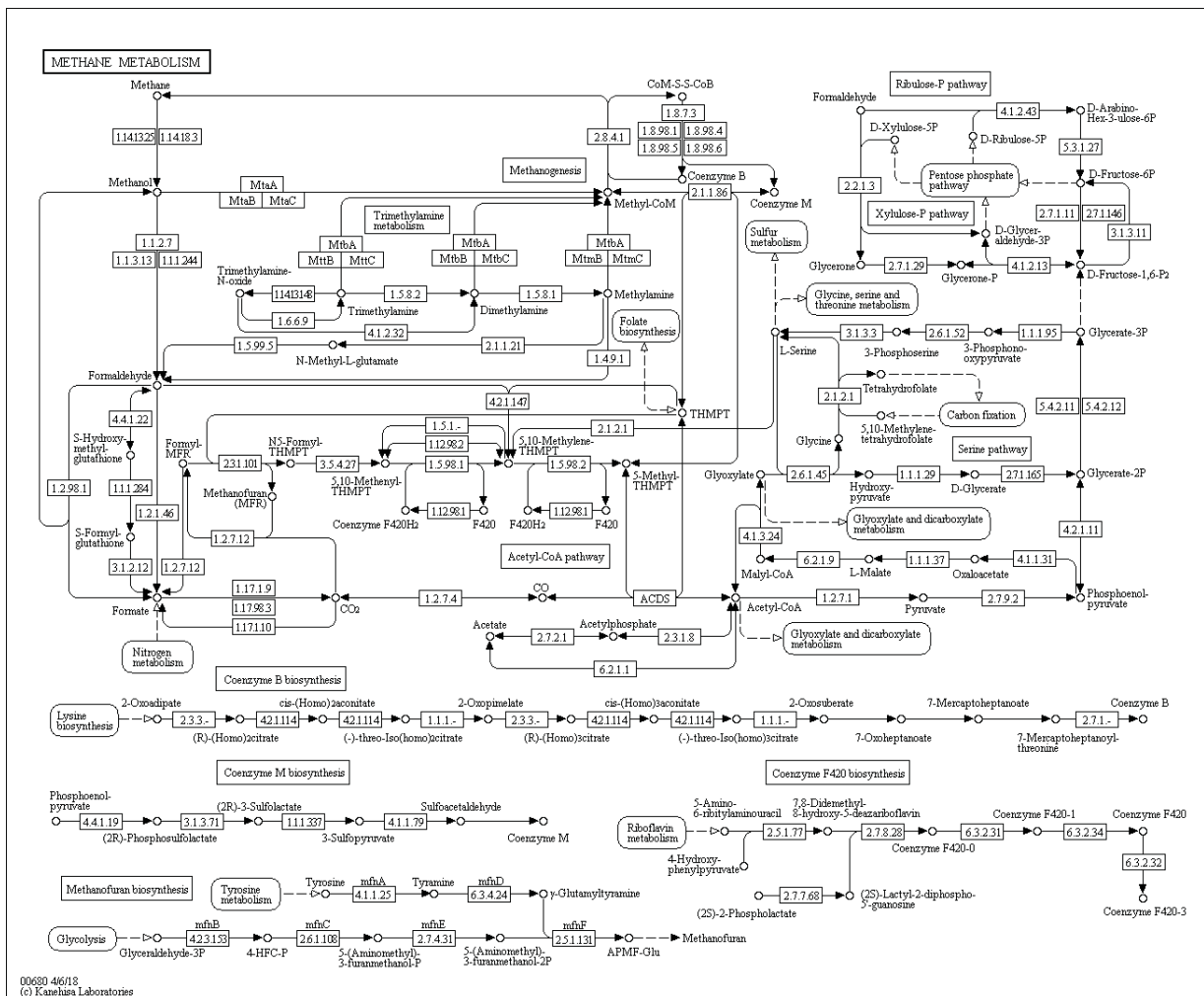


Figure 22: Métabolisme du méthane d'après Kegg

## Discussion générale & perspectives

Par ailleurs, en prenant en considération, dans le groupe Traité, la diminution des concentrations en acide acétique et en acide lactique synthétisé à partir de l'acide butyrique dans les cellules épithéliales du rumen, ainsi que l'augmentation des concentrations en glucose, on peut suggérer que la diminution des émissions de méthane dans le groupe Traité est associée à une modification du ratio acide acétique/acide propionique dans le rumen (Dijkstra et al., 1993). Klein et al. (2013) ont tenté d'établir des relations entre les métabolites du plasma. Ils ont émis l'hypothèse que l'augmentation des concentrations plasmatiques en glycine est liée à une mobilisation des protéines musculaires dans les stades précoces de lactation. Il serait intéressant de doser, dans notre étude, les taux protéiques du sang et de vérifier ainsi toutes différences entre les groupes Témoin et Traité. Par ailleurs, dans cette même étude, ils émettent l'hypothèse que l'augmentation des concentrations en glycine en serine ainsi que la diminution des concentrations en leucine, isoleucine et valine, comme cela a été observé dans notre étude, peuvent être liées à une carence en vitamine B<sub>6</sub>, issue de l'alimentation ou du métabolisme ruminal. Le dosage de cette molécule dans le plasma et le rumen pourrait, dans notre étude, nous apporter des éléments de réponse.

**Le lait** représente la matrice la plus adaptée pour évaluer les émissions de méthane d'un point de vue pratique, car la collecte non invasive se fait quotidiennement. De nombreux travaux ont montré le potentiel de l'analyse de la composition laitière pour établir des corrélations avec les émissions de méthane, particulièrement l'analyse des acides gras (Chilliard et al., 2009; Dehareng et al., 2012). Dans notre étude, il a été jugé nécessaire de réaliser une optimisation de la préparation des échantillons avant analyse métabolomique du lait. L'étape de préparation d'échantillons est cruciale en métabolomique car elle a un impact sur les résultats et les interprétations biologiques (Vuckovic, 2012). En effet, d'après la littérature scientifique, différentes méthodes de préparation d'échantillons ont été utilisées pour analyser le métabolome du lait. La comparaison de ces méthodes en RMN a été réalisée en s'appuyant sur des paramètres d'évaluation tels que la répétabilité et la capacité d'extraction des métabolites. La méthode de préparation d'échantillons employant le méthanol est celle qui répondait le mieux aux critères d'évaluation.

Il a été observé une association significative entre la diminution des émissions de méthane dans le groupe Traité et des modifications d'expression de 16 métabolites dans le lait. De nombreux métabolites responsables de la discrimination des groupes, sont des acides aminés. Des indices laissent à penser que la synthèse d'acides gras semble être impactée.

#### Discussion générale & perspectives

En effet, l'analyse des réseaux métaboliques a mis en évidence les voies affectées, notamment le métabolisme de la valine, de la leucine et de l'isoleucine. Ces trois métabolites sont impliqués dans la synthèse d'acides gras ramifiés chez les ruminants (Massart-Leën and Massart, 1981). Par ailleurs l'acide bêta-hydroxybutyrique qui intervient dans la synthèse des acides gras dans la glande mammaire est réduit dans le groupe Traité. L'analyse des profils d'acides gras du lait pourrait confirmer cette hypothèse (analyse en cours en cours).

Parmi les métabolites discriminants identifiés dans le plasma et le lait, on retrouve des acides aminés essentiels tels que la leucine, l'isoleucine et la valine ; des composés issus du métabolisme des microorganismes du rumen tels que le diméthylsulfone et la pyrrolidine. La variation d'expressions de ces métabolites entre les groupes Témoin et Traité dans les matrices biologiques étudiées est vraisemblablement liée à une modification de l'activité des microorganismes du rumen, elle-même associée à la réduction des émissions de méthane. La méthionine joue un rôle central dans la synthèse de la diméthylsulfone. On peut penser, que les concentrations plus importantes de méthionine dans le groupe Traité peuvent être liées à une plus faible absorption par les méthanogènes. Dans le rumen le principal produit de la dégradation de la méthionine est le méthanethiol qui produit le diméthylsulfone. Ce dernier peut se retrouver par diffusions passive dans le plasma et dans le lait. Par ailleurs, la pyrrolidine, produit de décarboxylation de la proline réalisée par des bactéries, se retrouve réduite dans le groupe Traité aussi bien au niveau du plasma que du lait. Les acides aminés branchés interviennent dans de nombreux processus, notamment la synthèse d'acides gras branchés par les microorganismes du rumen, la synthèse protéique. Il représente, avec leurs produits de synthèse un reflet du métabolisme ruminal. Une attention particulière devrait être apportée à ces marqueurs issus du rumen pour le développement de proxies des émissions de méthane.

**Des limites liées aux analyses métabolomiques** peuvent être mentionnées. L'identification de métabolites discriminants aussi bien en RMN qu'en spectrométrie de masse représente l'étape limitante. Pour l'analyse RMN du lait, la présence de signaux importants du lactose complexifie la confirmation des annotations en RMN 2D (Niveau 1 suivant les recommandations de la MSI). L'identification de composés au niveau 1 (MSI) en LC-MS est complexe.

Elle nécessite d'avoir des ions avec des intensités suffisantes pour réaliser des fragmentations MS-MS et en outre pour des métabolites peu abondants ou atypiques, les standards ne sont pas forcément disponibles. Par ailleurs, l'analyse des réseaux métaboliques donne des informations précieuses sur les potentielles voies métaboliques affectées, mais les informations fournies par les bases de données doivent être utilisées avec beaucoup de précaution. En effet, les bases de données telles que la Human Metabolome Database, la Livestock Metabolome Database ou encore Kegg peuvent inclure des erreurs. Celles-ci concerneraient les informations relatives aux identifiants, aux propriétés physico-chimiques des métabolites. Par ailleurs, certains métabolites, qui ne présentent pas les mêmes fonctions biologiques, ni la même origine (par exemple la 1-méthylhistidine et la 3-méthylhistidine ont le même identifiant Kegg : C01152) partagent le même identifiant. Cela peut conduire à de mauvaises implémentations de métabolites dans les sous-réseaux et potentiellement à de mauvaises interprétations de données. Dans le cadre du projet, nous avons choisi de travailler uniquement sur la biosource *Bos taurus* qui a été manuellement annotée et validée. Ceci peut être considéré comme limitatif du fait que le processus de méthanogénèse ainsi que les premières conséquences de sa réduction impactent les microorganismes du rumen. Il aurait été intéressant d'implémenter les métabolites provenant du métabolisme des microorganismes ou de l'alimentation comme le diméthylsulfone ou, les acides-aminés branchés dans les réseaux métaboliques des microorganismes. Malheureusement la plupart des réseaux métaboliques des microorganismes ont été générés automatiquement à partir de données génomiques sans validation, ce qui représente un risque quant à leur utilisation.

#### 4. Perspectives

**Les principales perspectives sur un court terme** qui peuvent être envisagée seraient dans un premier temps de réaliser l'analyse des acides gras du lait en GC-MS et valider ou invalider les hypothèses proposées concernant les variations des concentrations en acides gras dans le lait entre Témoin et Traité (analyse en cours). Par la suite, il serait intéressant de réaliser une analyse métabolomique du contenu ruminal afin d'identifier des marqueurs associés à la méthanogénèse et les mettre en relation avec les résultats obtenus dans l'analyse des profils métaboliques du lait et du plasma. Cette étape pourrait apporter des connaissances fondamentales sur les processus associés à la méthanogénèse et les conséquences de sa réduction chez l'animal hôte et apporter plus de crédit à l'hypothèse d'un gain d'énergie pour ce dernier suite à la réduction des émissions de méthane. Une analyse métagénomique du contenu ruminal pourrait également apporter des informations cruciales sur les populations de microorganismes présentes et leurs activités suite à une inhibition de la méthanogénèse. L'analyse des urines pourraient apporter des éléments de réponses sur des produits de dégradations du métabolisme qui pourraient être associées à une réduction des émissions de méthane. Identifier des marqueurs spécifiques dans cette matrices pourraient simplifier l'évaluation des émissions de méthane sur le terrain.

**Les perspectives à moyen terme** qui peuvent être envisagées seraient de valider les métabolites discriminants annotés et identifiés dans le cadre du travail de thèse en termes de robustesse et de fiabilité. Cela peut consister à réaliser des analyses métabolomiques sur d'autres échantillons de lait et plasma, d'expérimentations associées à une réduction des émissions de méthane. Le travail reviendrait à valider les marqueurs identifiés en employant le même additif anti-méthane utilisé dans le cadre de l'expérimentation pour valider le caractère robuste ; tester d'autres additifs anti-méthane qui utilisent différents mécanismes d'actions ; réaliser des analyses métabolomiques sur des matrices biologiques provenant d'animaux présentant différentes stades physiologiques, afin de vérifier la robustesse des potentiels métabolites discriminants.

**Deux perspectives à long terme** peuvent être envisagées suite à la validation des biomarqueurs associés aux émissions de méthane. La première serait d'implémenter ces marqueurs dans les équations de prédictions des émissions méthane comme cela a été décrit par (van Gastelen, 2017). Ainsi l'utilisation de plusieurs proxies pourrait potentiellement améliorer le caractère prédictif des émissions de méthane. La seconde serait de développer des tests biochimiques simples de dosage

des biomarqueurs dans le lait ou dans le plasma pour évaluer les émissions de méthane. Il est important de prendre en considération les paramètres zootechniques pour réduire la variabilité liée à ces paramètres afin d'avoir une évaluation juste des émissions de méthane.



Discussion générale & perspectives

**BIBLIOGRAPHIE**

## Bibliographie

- Agabriel, J. (2010). *Alimentation des bovins, ovins et caprins. Besoins des animaux-Valeurs des aliments: Tables Inra 2010. Édition remaniée*. Quae éditions.
- Aguinaga Casanas, M.A., Rangkasenee, N., Krattenmacher, N., Thaller, G., Metges, C.C., and Kuhla, B. (2015). Methyl-coenzyme M reductase A as an indicator to estimate methane production from dairy cows. *Journal of Dairy Science* 98(6), 4074-4083. doi: 10.3168/jds.2015-9310.
- Alexander, T.W., and Plaizier, J.C. (2016). From the Editors: The importance of microbiota in ruminant production. *Animal Frontiers* 6(2), 4-7. doi: 10.2527/af.2016-0016.
- Allen, M.S., Bradford, B.J., and Harvatine, K.J. (2005). The cow as a model to study food intake regulation. *Annual review of nutrition* 25, 523-547. doi: 10.1146/annurev.nutr.25.050304.092704.
- Álvarez-Sánchez, B., Priego-Capote, F., and Luque de Castro, M.D. (2010). Metabolomics analysis I. Selection of biological samples and practical aspects preceding sample preparation. *Trends in Analytical Chemistry* 29(2), 111-119. doi: 10.1016/j.trac.2009.12.003.
- Andreas, N.J., Hyde, M.J., Gomez-Romero, M., Lopez-Gonzalvez, M.A., Villasenor, A., Wijeyesekera, A., et al. (2015). Multiplatform characterization of dynamic changes in breast milk during lactation. *Electrophoresis* 11(10), 201500011. doi: 10.1002/elps.201500011.
- Andreotti, G., Lamanna, R., Trivellone, E., and Motta, A. (2002). <sup>13</sup>C NMR spectra of TAG: An easy way to distinguish milks from different animal species. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 79(2), 123-127. doi: 10.1007/s11746-002-0445-2.
- Andreotti, G., Trivellone, E., Lamanna, R., Di Luccia, A., and Motta, A. (2000). Milk identification of different species: <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy of triacylglycerols from cows and buffaloes' milks. *Journal of Dairy Science* 83(11), 2432-2437. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(00)75133-2.
- Antunes-Fernandes, E.C., van Gastelen, S., Dijkstra, J., Hettinga, K.A., and Vervoort, J. (2016). Milk metabolome relates enteric methane emission to milk synthesis and energy metabolism pathways. *Journal of Dairy Science* 99(8), 6251-6262. doi: 10.3168/jds.2015-10248.
- Arbre, M., Rochette, Y., Guyader, J., Lascoux, C., Gomez, L.M., Eugene, M., et al. (2016). Repeatability of enteric methane determinations from cattle using either the SF6 tracer technique or the GreenFeed system. *Animal Production Science* 56(2-3), 238-243. doi: 10.1071/an15512.
- Artegoitia, V.M., Foote, A.P., Lewis, R.M., and Freetly, H.C. (2017). Rumen Fluid Metabolomics Analysis Associated with Feed Efficiency on Crossbred Steers. *Scientific Reports* 7(1), 2864. doi: 10.1038/s41598-017-02856-0.
- Aschenbach, J.R., Kristensen, N.B., Donkin, S.S., Hammon, H.M., and Penner, G.B. (2010). Gluconeogenesis in dairy cows: the secret of making sweet milk from sour dough. *IUBMB Life* 62(12), 869-877. doi: 10.1002/iub.400.
- Balch, W.E., Fox, G.E., Magrum, L.J., Woese, C.R., and Wolfe, R.S. (1979). Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiol Rev* 43(2), 260-296.
- Baldwin, R.L., France, J., Beaver, D.E., Gill, M., and Thornley, J.H. (1987a). Metabolism of the lactating cow. III. Properties of mechanistic models suitable for evaluation of energetic

## Bibliographie

- relationships and factors involved in the partition of nutrients. *The Journal of Dairy Research* 54(1), 133-145.
- Baldwin, R.L., France, J., and Gill, M. (1987b). Metabolism of the lactating cow. I. Animal elements of a mechanistic model. *The Journal of Dairy Research* 54(1), 77-105.
- Baskaran, R., Cullen, R., and Colombo, S. (2009). Estimating values of environmental impacts of dairy farming in New Zealand. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 52(4), 377-389. doi: Doi 10.1080/00288230909510520.
- Bauman, D.E., and Griinari, J.M. (2003). Nutritional regulation of milk fat synthesis. *Annual review of nutrition* 23, 203-227. doi: 10.1146/annurev.nutr.23.011702.073408.
- Beauchemin, K.A., McAllister, T.A., and McGinn, S.M. (2009). Dietary mitigation of enteric methane from cattle. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources* 4(035), 1-18.
- Beckonert, O., Keun, H.C., Ebbels, T.M., Bundy, J., Holmes, E., Lindon, J.C., et al. (2007). Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nature protocols* 2(11), 2692-2703. doi: 10.1038/nprot.2007.376.
- Bell, M., Eckard, R., Moate, P.J., and Yan, T. (2016). Modelling the effect of diet composition on enteric methane emissions across sheep, beef cattle and dairy cows. *Animals* 6(9), 54.
- Bellier, S. (2010). Interprétation et valeurs usuelles des paramètres sanguins en biochimie clinique vétérinaire. *Revue Francophone des Laboratoires* 2010(420), 43-56. doi: [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(10\)70420-2](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(10)70420-2).
- Bharti, S.K., and Roy, R. (2012). Quantitative <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *Trends in Analytical Chemistry* 35, 5-26. doi: 10.1016/j.trac.2012.02.007.
- Block, R.J., Stekol, J.A., and Loosli, J.K. (1951). Synthesis of sulfur amino acids from inorganic sulfate by ruminants. II. Synthesis of cystine and methionine from sodium sulfate by the goat and by the microorganisms of the rumen of the ewe. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 33(3), 353-363. doi: [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(51\)90123-3](https://doi.org/10.1016/0003-9861(51)90123-3).
- Booth, S.C., Weljie, A.M., and Turner, R.J. (2013). Computational tools for the secondary analysis of metabolomics experiments. *Computational and Structural Biotechnology Journal* 4(4), e201301003. doi: 10.5936/csbj.201301003.
- Boudah, S., Roux, A., and Junot, C. (2012). Mise à jour des connaissances-Analyse métabolomique par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse à haute résolution: état des lieux et perspectives. *Spectra Biologie* 31(193), 22.
- Brade, W., and Nurnberg, K. (2016). Fatty acids in the milk: Biosynthesis and possible using as specific biomarkers. *Zuchtingkunde* 88(3), 216-232.
- Bril, F., Millan, L., Kalavalapalli, S., McPhaul, M.J., Caulfield, M.P., Martinez-Arranz, I., et al. (2018). Use of a metabolomic approach to non-invasively diagnose non-alcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes, obesity & metabolism* 12(10), 13285. doi: 10.1111/dom.13285.
- Brul, S., and Stumm, C.K. (1994). Symbionts and organelles in anaerobic protozoa and fungi. *Trends in ecology & evolution* 9(9), 319-324. doi: 10.1016/0169-5347(94)90151-1.
- Bu, D., Bionaz, M., Wang, M., Nan, X., Ma, L., and Wang, J. (2017). Transcriptome difference and potential crosstalk between liver and mammary tissue in mid-lactation primiparous dairy cows. *PLoS One* 12(3), e0173082. doi: 10.1371/journal.pone.0173082.

## Bibliographie

- Büscher, J.M., Czernik, D., Ewald, J.C., Sauer, U., and Zamboni, N. (2009). Cross-Platform Comparison of Methods for Quantitative Metabolomics of Primary Metabolism. *Analytical Chemistry* 81(6), 2135-2143. doi: 10.1021/ac8022857.
- Bylesjo, M., Rantalainen, M., Cloarec, O., Nicholson, J.K., Holmes, E., and Trygg, J. (2006). OPLS discriminant analysis: combining the strengths of PLS-DA and SIMCA classification. *Journal of Chemometrics* 20(8-10), 341-351. doi: 10.1002/cem.1006.
- Cabaton, N.J., Canlet, C., Wadia, P.R., Tremblay-Franco, M., Gautier, R., Molina, J., et al. (2013). Effects of low doses of bisphenol A on the metabolome of perinatally exposed CD-1 mice. *Environmental health perspectives* 121(5), 586-593. doi: 10.1289/ehp.1205588.
- Caspi, R., Altman, T., Dreher, K., Fulcher, C.A., Subhraveti, P., Keseler, I.M., et al. (2012). The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of pathway/genome databases. *Nucleic acids research* 40, D742-753. doi: 10.1093/nar/gkr1014.
- Castro-Montoya, J.M., Peiren, N., Veneman, J., De Baets, B., De Campeneere, S., and Fievez, V. (2017). Predictions of methane emission levels and categories based on milk fatty acid profiles from dairy cows. *Animal* 11(7), 1153-1162.
- Chagunda, M.G.G. (2013). Opportunities and challenges in the use of the Laser Methane Detector to monitor enteric methane emissions from ruminants. *Animal* 7, 394-400. doi: 10.1017/S1751731113000724.
- Chagunda, M.G.G., Ross, D., Rooke, J., Yan, T., Douglas, J.L., Poret, L., et al. (2013). Measurement of enteric methane from ruminants using a hand-held laser methane detector. *Acta Agriculturae Scandinavica Section a-Animal Science* 63(2), 68-75. doi: 10.1080/09064702.2013.797487.
- Chazalviel, M., Frainay, C., Poupin, N., Vinson, F., Merlet, B., Gloaguen, Y., et al. (2017). MetExploreViz: web component for interactive metabolic network visualization. *Bioinformatics* 34(2), 312-313.
- Chilliard, Y., Glasser, F., Ferlay, A., Bernard, L., Rouel, J., and Doreau, M. (2007). Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat. *European Journal of Lipid Science and Technology* 109(8), 828-855. doi: 10.1002/ejlt.200700080.
- Chilliard, Y., Martin, C., Rouel, J., and Doreau, M. (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. doi: 10.3168/jds.2009-2375.
- Costa, K.C., and Leigh, J.A. (2014). Metabolic versatility in methanogens. *Current opinion in biotechnology* 29, 70-75. doi: 10.1016/j.copbio.2014.02.012.
- Cottret, L., Wildridge, D., Vinson, F., Barrett, M.P., Charles, H., Sagot, M.F., et al. (2010). MetExplore: a web server to link metabolomic experiments and genome-scale metabolic networks. *Nucleic acids research* 38, W132-137. doi: 10.1093/nar/gkq312.
- Curtis, R.V., Kim, J.J.M., Doelman, J., and Cant, J.P. (2018). Maintenance of plasma branched-chain amino acid concentrations during glucose infusion directs essential amino acids to extra-mammary tissues in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 101(5), 4542-4553. doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13236>.
- de Graaf, R.A., Prinsen, H., Giannini, C., Caprio, S., and Herzog, R.I. (2015). Quantification of (1)H NMR Spectra from Human Plasma. *Metabolomics* 11(6), 1702-1707. doi: 10.1007/s11306-015-0828-1.
- De Haas, Y., Windig, J., Calus, M., Dijkstra, J., De Haan, M., Bannink, A., et al. (2011). Genetic parameters for predicted methane production and potential for reducing enteric emissions

## Bibliographie

- through genomic selection. *Journal of Dairy Science* 94(12), 6122-6134. doi: 10.3168/jds.2011-4439.
- De Marco, A. (1977). pH dependence of internal references. *Journal of Magnetic Resonance (1969)* 26(3), 527-528.
- Deda, O., Chatziioannou, A.C., Fasoula, S., Palachanis, D., Raikos, N., Theodoridis, G.A., et al. (2016). Sample preparation optimization in fecal metabolic profiling. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 28(16), 30445-30447. doi: 10.1016/j.jchromb.2016.06.047.
- Dehareng, F., Delfosse, C., Froidmont, E., Soyeurt, H., Martin, C., Gengler, N., et al. (2012). Potential use of milk mid-infrared spectra to predict individual methane emission of dairy cows. *Animal* 6(10), 1694-1701. doi: 10.1017/S1751731112000456.
- Dehority, B.A.B.A. (2003). *Rumen microbiology*.
- Di Marzo, L., and Barbano, D.M. (2016). Effect of homogenizer performance on accuracy and repeatability of mid-infrared predicted values for major milk components. *Journal of Dairy Science* 99(12), 9471-9482. doi: 10.3168/jds.2016-11618.
- Dieme, B., Mavel, S., Blasco, H., Tripi, G., Bonnet-Brilhault, F., Malvy, J., et al. (2015). Metabolomics Study of Urine in Autism Spectrum Disorders Using a Multiplatform Analytical Methodology. *Journal of proteome research* 14(12), 5273-5282. doi: 10.1021/acs.jproteome.5b00699.
- Dijkstra, J., Boer, H., Van Bruchem, J., Bruining, M., and Tamminga, S. (1993). Absorption of volatile fatty acids from the rumen of lactating dairy cows as influenced by volatile fatty acid concentration, pH and rumen liquid volume. *The British journal of nutrition* 69(2), 385-396.
- Dijkstra, J., van Zijderveld, S.M., Apajalahti, J.A., Bannink, A., Gerrits, W.J.J., Newbold, J.R., et al. (2011). Relationships between methane production and milk fatty acid profiles in dairy cattle. *Animal Feed Science and Technology* 166-167(0), 590-595. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.04.042>.
- Dodd, K.M., and Tee, A.R. (2012). Leucine and mTORC1: a complex relationship. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 302(11), E1329-1342. doi: 10.1152/ajpendo.00525.2011.
- Dollé, J., Agabriel, J., Peyraud, J.-L., Faverdin, P., Manneville, V., Raison, C., et al. (2011). Les gaz à effet de serre en élevage bovin: évaluation et leviers d'action. *Productions Animales* 24(5), 415.
- Dona, A.C., Kyriakides, M., Scott, F., Shephard, E.A., Varshavi, D., Veselkov, K., et al. (2016). A guide to the identification of metabolites in NMR-based metabolomics/metabolomics experiments. *Computational and Structural Biotechnology Journal* 14, 135-153. doi: 10.1016/j.csbj.2016.02.005.
- Doreau, M., Arbre, M., Rochette, Y., Lascoux, C., Eugène, M., and Martin, C. (2018). Comparison of 3 methods for estimating enteric methane and carbon dioxide emission in nonlactating cows. *Journal of Animal Science*, sky033-sky033. doi: 10.1093/jas/sky033.
- Doreau, M., Ferlay, A., Rochette, Y., and Martin, C. (2014). Effects of dehydrated lucerne and soya bean meal on milk production and composition, nutrient digestion, and methane and nitrogen losses in dairy cows receiving two different forages. *Animal* 8(3), 420-430. doi: 10.1017/S1751731113002206.

## Bibliographie

- Doreau, M., Martin, C., Eugène, M., Popova, M., and Morgavi, D.P. (2011). Leviers d'action pour réduire la production de méthane entérique par les ruminants. *Productions Animales* 24(5), 461.
- Dunn, W.B., and Ellis, D.I. (2005). Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. *Trends in Analytical Chemistry* 24(4), 285-294. doi: 10.1016/j.trac.2004.11.021.
- Dunn, W.B., Erban, A., Weber, R.J.M., Creek, D.J., Brown, M., Breitling, R., et al. (2013). Mass appeal: metabolite identification in mass spectrometry-focused untargeted metabolomics. *Metabolomics* 9(1), 44-66. doi: 10.1007/s11306-012-0434-4.
- Duportet, X., Aggio, R.B.M., Carneiro, S., and Villas-Boas, S.G. (2012). The biological interpretation of metabolomic data can be misled by the extraction method used. *Metabolomics* 8(3), 410-421. doi: 10.1007/s11306-011-0324-1.
- Ellis, J.E., McIntyre, P.S., Saleh, M., Williams, A.G., and Lloyd, D. (1991). Influence of CO<sub>2</sub> and low concentrations of O<sub>2</sub> on fermentative metabolism of the ruminal ciliate *Polyplastron multivesiculatum*. *Applied and Environmental Microbiology* 57(5), 1400-1407.
- Elsik, C.G., Tellam, R.L., Worley, K.C., Gibbs, R.A., Muzny, D.M., Weinstock, G.M., et al. (2009). The genome sequence of taurine cattle: a window to ruminant biology and evolution. *Science* 324(5926), 522-528. doi: 10.1126/science.1169588.
- Fardet, A., Canlet, C.c., Gottardi, G.I., Lyan, B., Llorach, R.I., Rémésy, C., et al. (2007). Whole-Grain and Refined Wheat Flours Show Distinct Metabolic Profiles in Rats as Assessed by a <sup>1</sup>H NMR-Based Metabonomic Approach. *The Journal of Nutrition* 137(4), 923-929. doi: 10.1093/jn/137.4.923.
- Ferreira, A.M., Bislev, S.L., Bendixen, E., and Almeida, A.M. (2013). The mammary gland in domestic ruminants: a systems biology perspective. *Journal of Proteomics* 94, 110-123. doi: 10.1016/j.jprot.2013.09.012.
- Fiehn, O. (2001). Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. *Comparative and functional genomics* 2(3), 155-168. doi: 10.1002/cfg.82.
- Folch, J., Lees, M., and Sloane Stanley, G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* 226(1), 497-509.
- Gäbel, G., and Aschenbach, J. (2006). Ruminant SCFA absorption: channelling acids without harm. *Ruminant physiology: digestion, metabolism and impact of nutrition on gene expression, immunology and stress* (ed. K Sejrsen, T Hvelplund and MO Nielsen), 173-195.
- Galindo, A.B.C.V., Aguirre, L.R., Araya, L., and Geldes, J. (2013). Developing Indicators of Use of Medical Equipment from Variables Obtained and Transported by the HL7 standard in the Intensive Care Unit. *5th Latin American Congress on Biomedical Engineering (Clab 2011): Sustainable Technologies for the Health of All, Pts 1 and 2* 33(1-2), 567-570.
- Garnsworthy, P.C., Craigon, J., Hernandez-Medrano, J.H., and Saunders, N. (2012a). On-farm methane measurements during milking correlate with total methane production by individual dairy cows. *Journal of Dairy Science* 95(6), 3166-3180. doi: 10.3168/jds.2011-4605.
- Garnsworthy, P.C., Craigon, J., Hernandez-Medrano, J.H., and Saunders, N. (2012b). Variation among individual dairy cows in methane measurements made on farm during milking. *Journal of Dairy Science* 95(6), 3181-3189. doi: 10.3168/jds.2011-4606.

## Bibliographie



- Garnsworthy, P.C., Masson, L.L., Lock, A.L., and Mottram, T.T. (2006). Variation of milk citrate with stage of lactation and de novo fatty acid synthesis in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 89(5), 1604-1612. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(06)72227-5.
- Gerber, P.J., Steinfeld, H., Henderson, B., Mottet, A., Opio, C., Dijkman, J., et al. (2013). *Tackling climate change through livestock: a global assessment of emissions and mitigation opportunities*. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).
- Giacomini, F., Le Corguille, G., Monsoor, M., Landi, M., Pericard, P., Petera, M., et al. (2015). Workflow4Metabolomics: a collaborative research infrastructure for computational metabolomics. *Bioinformatics* 31(9), 1493-1495. doi: 10.1093/bioinformatics/btu813.
- Gidlund, H., Hetta, M., Krizsan, S.J., Lemosquet, S., and Huhtanen, P. (2015). Effects of soybean meal or canola meal on milk production and methane emissions in lactating dairy cows fed grass silage-based diets. *Journal of Dairy Science* 98(11), 8093-8106. doi: 10.3168/jds.2015-9757.
- Go, E.P. (2010). Database resources in metabolomics: an overview. *Journal of neuroimmune pharmacology* 5(1), 18-30. doi: 10.1007/s11481-009-9157-3.
- Goldansaz, S.A., Guo, A.C., Sajed, T., Steele, M.A., Plastow, G.S., and Wishart, D.S. (2017). Livestock metabolomics and the livestock metabolome: A systematic review. *PLoS One* 12(5), e0177675. doi: 10.1371/journal.pone.0177675.
- Gowda, G.A., Zhang, S., Gu, H., Asiago, V., Shanaiah, N., and Raftery, D. (2008). Metabolomics-based methods for early disease diagnostics. *Expert review of molecular diagnostics* 8(5), 617-633. doi: 10.1586/14737159.8.5.617.
- Gowda, G.A.N., and Raftery, D. (2014). Quantitating Metabolites in Protein Precipitated Serum Using NMR Spectroscopy. *Analytical Chemistry* 86(11), 5433-5440. doi: 10.1021/ac5005103.
- Grainger, C., Clarke, T., McGinn, S.M., Auldist, M.J., Beauchemin, K.A., Hannah, M.C., et al. (2007). Methane emissions from dairy cows measured using the sulfur hexafluoride (SF6) tracer and chamber techniques. *Journal of Dairy Science* 90(6), 2755-2766. doi: 10.3168/jds.2006-697.
- Grissa, D., Pétera, M., Brandolini, M., Napoli, A., Comte, B., and Pujos-Guillot, E. (2016). Feature Selection Methods for Early Predictive Biomarker Discovery Using Untargeted Metabolomic Data. *Frontiers in Molecular Biosciences* 3(30). doi: 10.3389/fmolb.2016.00030.
- Guitton, Y., Tremblay-Franco, M., Le Corguille, G., Martin, J.F., Petera, M., Roger-Mele, P., et al. (2017). Create, run, share, publish, and reference your LC-MS, FIA-MS, GC-MS, and NMR data analysis workflows with the Workflow4Metabolomics 3.0 Galaxy online infrastructure for metabolomics. *The international journal of biochemistry & cell biology* 93, 89-101. doi: 10.1016/j.biocel.2017.07.002.
- Guyader, J. (2015). *Manipulation of the hydrogen pool available in the rumen to reduce methane emissions from ruminants*. Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II.
- Guyader, J., Doreau, M., Morgavi, D.P., Gerard, C., Loncke, C., and Martin, C. (2016). Long-term effect of linseed plus nitrate fed to dairy cows on enteric methane emission and nitrate and nitrite residuals in milk. *Animal* 10(7), 1173-1181. doi: 10.1017/S1751731115002852.
- Guyader, J., Eugène, M., Doreau, M., Morgavi, D., Gérard, C., Loncke, C., et al. (2015a). Nitrate but not tea saponin feed additives decreased enteric methane emissions in nonlactating cows. *Journal of Animal Science* 93(11), 5367-5377.

## Bibliographie

- Guyader, J., Eugene, M., Doreau, M., Morgavi, D.P., Gerard, C., Loncke, C., et al. (2015b). Nitrate but not tea saponin feed additives decreased enteric methane emissions in nonlactating cows. *Journal of Animal Science* 93(11), 5367-5377. doi: 10.2527/jas.2015-9367.
- Guyader, J., Eugene, M., Meunier, B., Doreau, M., Morgavi, D.P., Silberberg, M., et al. (2015c). Additive methane-mitigating effect between linseed oil and nitrate fed to cattle. *Journal of Animal Science* 93(7), 3564-3577. doi: 10.2527/jas.2014-8196.
- Hammond, K., Crompton, L.A., Bannink, A., Dijkstra, J., Yanez-Ruiz, D.R., O'Kiely, P., et al. (2016). Review of current in vivo measurement techniques for quantifying enteric methane emission from ruminants. *Animal Feed Science and Technology* 219, 13-30. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2016.05.018.
- Hanigan, M.D., Bateman, H.G., Fadel, J.G., and McNamara, J.P. (2006). Metabolic models of ruminant metabolism: recent improvements and current status. *Journal of Dairy Science* 89 Suppl 1(1), E52-64. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(06)72363-3.
- Hart, K.J., Huntington, J.A., Wilkinson, R.G., Bartram, C.G., and Sinclair, L.A. (2015). The influence of grass silage-to-maize silage ratio and concentrate composition on methane emissions, performance and milk composition of dairy cows. *Animal* 24, 1-9.
- He, X., and Slupsky, C.M. (2014). Metabolic fingerprint of dimethyl sulfone (DMSO<sub>2</sub>) in microbial-mammalian co-metabolism. *Journal of proteome research* 13(12), 5281-5292. doi: 10.1021/pr500629t.
- Hernell, O. (2011). Human milk vs. cow's milk and the evolution of infant formulas. *Nestle Nutrition Workshop Series. Paediatric Programme* 67, 17-28. doi: 10.1159/000325572.
- Hocquette, J., Boudra, H., Cassar-Malek, I., Leroux, C., Picard, B., Savary-Auzloux, I., et al. (2009). Perspectives offertes par les approches en<< omique>> pour l'amélioration de la durabilité de l'élevage des herbivores. *Productions Animales* 22(5), 385.
- Hristov, A.N., Ott, T., Tricarico, J., Rotz, A., Waghorn, G., Adesogan, A., et al. (2013). Special Topics-Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: III. A review of animal management mitigation options. *Journal of Animal Science* 91(11), 5095-5113. doi: 10.2527/jas.2013-6585.
- Hu, F., Furihata, K., Kato, Y., and Tanokura, M. (2007). Nondestructive quantification of organic compounds in whole milk without pretreatment by two-dimensional NMR spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(11), 4307-4311. doi: 10.1021/jf062803x.
- Huhtanen, P., Cabezas-Garcia, E.H., Utsumi, S., and Zimmerman, S. (2015). Comparison of methods to determine methane emissions from dairy cows in farm conditions. *Journal of Dairy Science* 98(5), 3394-3409. doi: 10.3168/jds.2014-9118.
- Ilves, A., Harzia, H., Ling, K., Ots, M., Soomets, U., and Kilk, K. (2012). Alterations in milk and blood metabolomes during the first months of lactation in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 95(10), 5788-5797. doi: 10.3168/jds.2012-5617.
- Jami, E., and Mizrahi, I. (2012). Composition and similarity of bovine rumen microbiota across individual animals. *PLoS One* 7(3), e33306. doi: 10.1371/journal.pone.0033306.
- Jarrige, R. (1988). *Alimentation des bovins ovins et caprins*. INRA.
- Jefferson, L.S., and Kimball, S.R. (2003). Amino acids as regulators of gene expression at the level of mRNA translation. *Journal of Nutrition* 133(6), 2046s-2051s.
- Jenkins, N.T., Pena, G., Risco, C., Barbosa, C.C., Vieira-Neto, A., and Galvao, K.N. (2015). Utility of inline milk fat and protein ratio to diagnose subclinical ketosis and to assign propylene glycol treatment in lactating dairy cows. *Canadian Veterinary Journal* 56(8), 850-854.

## Bibliographie

- Jeyanathan, J., Martin, C., and Morgavi, D.P. (2014). The use of direct-fed microbials for mitigation of ruminant methane emissions: a review. *Animal* 8(2), 250-261. doi: 10.1017/S1751731113002085.
- Johnson, K.A., and Johnson, D.E. (1995). Methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science* 73(8), 2483-2492.
- Kaluarachchi, M.R., Boulange, C.L., Garcia-Perez, I., Lindon, J.C., and Minet, E.F. (2016). Multiplatform serum metabolic phenotyping combined with pathway mapping to identify biochemical differences in smokers. *Bioanalysis* 8(19), 2023-2043. doi: 10.4155/bio-2016-0108.
- Kanehisa, M., Furumichi, M., Tanabe, M., Sato, Y., and Morishima, K. (2017). KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic acids research* 45(D1), D353-D361. doi: 10.1093/nar/gkw1092.
- Kim, M., Park, T., and Yu, Z. (2017). Metagenomic investigation of gastrointestinal microbiome in cattle - A review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 22(10). doi: 10.5713/ajas.17.0544.
- Klassen, A., Faccio, A.T., Canuto, G.A.B., da Cruz, P.L.R., Ribeiro, H.C., Tavares, M.F.M., et al. (2017). "Metabolomics: definitions and significance in systems biology," in *Metabolomics: From Fundamentals to Clinical Applications*. Springer), 3-17.
- Klein, M.S., Almstetter, M.F., Nurnberger, N., Sigl, G., Gronwald, W., Wiedemann, S., et al. (2013). Correlations between Milk and Plasma Levels of Amino and Carboxylic Acids in Dairy Cows. *Journal of proteome research* 12(11), 5223-5232. doi: 10.1021/pr4006537.
- Klein, M.S., Almstetter, M.F., Schlamberger, G., Nurnberger, N., Dettmer, K., Oefner, P.J., et al. (2010). Nuclear magnetic resonance and mass spectrometry-based milk metabolomics in dairy cows during early and late lactation. *Journal of Dairy Science* 93(4), 1539-1550. doi: 10.3168/jds.2009-2563.
- Klein, M.S., Buttchereit, N., Miemczyk, S.P., Immervoll, A.K., Louis, C., Wiedemann, S., et al. (2012). NMR metabolomic analysis of dairy cows reveals milk glycerophosphocholine to phosphocholine ratio as prognostic biomarker for risk of ketosis. *Journal of Proteome Research* 11(2), 1373-1381. doi: 10.1021/pr201017n.
- Klieve, A.V., and Hegarty, R.S. (1999). Opportunities for biological control of ruminal methanogenesis. *Australian Journal of Agricultural Research* 50(8), 1315-1319. doi: Doi 10.1071/Ar99006.
- Kohn, R.A. (2015). Thermodynamic and kinetic control of methane emissions from ruminants. *Livestock production and climate change*. CABI, Wallingford, 245-262.
- Kristensen, T., Mogensen, L., Knudsen, M.T., and Hermansen, J.E. (2011). Effect of production system and farming strategy on greenhouse gas emissions from commercial dairy farms in a life cycle approach. *Livestock Science* 140(1), 136-148.
- Kuhl, C., Tautenhahn, R., Bottcher, C., Larson, T.R., and Neumann, S. (2012). CAMERA: an integrated strategy for compound spectra extraction and annotation of liquid chromatography/mass spectrometry data sets. *Analytical Chemistry* 84(1), 283-289. doi: 10.1021/ac202450g.
- Lamarre, S.G., Edison, E.E., Wijekoon, E.P., Brosnan, M.E., and Brosnan, J.T. (2010). Suckling Rat Pups Accumulate Creatine Primarily via de Novo Synthesis Rather Than from Dam Milk. *Journal of Nutrition* 140(9), 1570-1573. doi: 10.3945/jn.110.125476.

## Bibliographie

- Lamichhane, S., Yde, C.C., Schmedes, M.S., Jensen, H.M., Meier, S., and Bertram, H.C. (2015). Strategy for Nuclear-Magnetic-Resonance-Based Metabolomics of Human Feces. *Analytical Chemistry* 87(12), 5930-5937. doi: 10.1021/acs.analchem.5b00977.
- Le Gall, G. (2015). Sample collection and preparation of biofluids and extracts for NMR spectroscopy. *Methods in Molecular Biology* 1277, 15-28. doi: 10.1007/978-1-4939-2377-9\_2.
- Li, J., Zhong, H., Ramayo-Caldas, Y., Terrapon, N., Lombard, V., Potocki-Veronese, G., et al. (2018). A catalog of microbial genes from the bovine rumen reveals the determinants of herbivory. *bioRxiv*. doi: 10.1101/272690.
- Li, Q., Yu, Z., Zhu, D., Meng, X., Pang, X., Liu, Y., et al. (2017a). The application of NMR-based milk metabolite analysis in milk authenticity identification. *Journal of the science of food and agriculture* 97(9), 2875-2882. doi: 10.1002/jsfa.8118.
- Li, S., Wang, Q., Lin, X., Jin, X., Liu, L., Wang, C., et al. (2017b). The Use of "Omics" in Lactation Research in Dairy Cows. *International Journal of Molecular Sciences* 18(5). doi: 10.3390/ijms18050983.
- Lindon, J.C., Holmes, E., and Nicholson, J.K. (2001). Pattern recognition methods and applications in biomedical magnetic resonance. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 39(1), 1-40. doi: Doi 10.1016/S0079-6565(00)00036-4.
- Lindon, J.C., and Nicholson, J.K. (2008). Spectroscopic and statistical techniques for information recovery in metabonomics and metabolomics. *annual Review of Analytical Chemistry* 1, 45-69.
- Linzell, J.L., Mephram, T.B., and Peaker, M. (1976). The secretion of citrate into milk. *The Journal of Physiology* 260(3), 739-750.
- Liu, Y., and Whitman, W.B. (2008). Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1125, 171-189. doi: 10.1196/annals.1419.019.
- Lock, A.L., and Shingfield, K.J. (2004). Optimising Milk Composition. *BSAP Occasional Publication* 29, 107-188. doi: 10.1017/s0263967x00040076.
- Lopes, J.C., de Matos, L.F., Harper, M.T., Giallongo, F., Oh, J., Gruen, D., et al. (2016). Effect of 3-nitrooxypropanol on methane and hydrogen emissions, methane isotopic signature, and ruminal fermentation in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 99(7), 5335-5344. doi: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-10832>.
- Lu, J., Antunes Fernandes, E., Paez Cano, A.E., Vinitwatanakhun, J., Boeren, S., van Hooijdonk, T., et al. (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. doi: 10.1021/pr4001306.
- Lu, J., Boeren, S., van Hooijdonk, T., Vervoort, J., and Hettinga, K. (2015). Effect of the DGAT1 K232A genotype of dairy cows on the milk metabolome and proteome. *Journal of Dairy Science* 98(5), 3460-3469.
- Machmüller, A., Soliva, C.R., and Kreuzer, M. (2007). Methane-suppressing effect of myristic acid in sheep as affected by dietary calcium and forage proportion. *British Journal of Nutrition* 90(03), 529. doi: 10.1079/bjn2003932.
- Maher, A.D., Hayes, B., Cocks, B., Marett, L., Wales, W.J., and Rochfort, S.J. (2013). Latent biochemical relationships in the blood-milk metabolic axis of dairy cows revealed by statistical integration of 1H NMR spectroscopic data. *Journal of proteome research* 12(3), 1428-1435. doi: 10.1021/pr301056q.

## Bibliographie

- Markley, J.L., Bruschweiler, R., Edison, A.S., Eghbalnia, H.R., Powers, R., Raftery, D., et al. (2017). The future of NMR-based metabolomics. *Current Opinion in Biotechnology* 43, 34-40. doi: 10.1016/j.copbio.2016.08.001.
- Martin, C., Koolaard, J., Rochette, Y., Clark, H., Jouany, J.P., and Pinares-Patino, C.S. (2012). Effect of release rate of the SF(6) tracer on methane emission estimates based on ruminal and breath gas samples. *Animal* 6(3), 518-525. doi: 10.1017/S175173111100156X.
- Martin, C., Morgavi, D.P., and Doreau, M. (2010). Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *Animal* 4(3), 351-365. doi: 10.1017/S1751731109990620.
- Martineau, E., Tea, I., Loaec, G., Giraudeau, P., and Akoka, S. (2011). Strategy for choosing extraction procedures for NMR-based metabolomic analysis of mammalian cells. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 401(7), 2133-2142. doi: 10.1007/s00216-011-5310-y.
- Martinez-Fernandez, G., Denman, S.E., Yang, C., Cheung, J., Mitsumori, M., and McSweeney, C.S. (2016). Methane Inhibition Alters the Microbial Community, Hydrogen Flow, and Fermentation Response in the Rumen of Cattle. *Frontiers in Microbiology* 7, 1122. doi: 10.3389/fmicb.2016.01122.
- Massart-Leën, A., and Massart, D. (1981). The use of clustering techniques in the elucidation or confirmation of metabolic pathways. Application to the branched-chain fatty acids present in the milk fat of lactating goats. *Biochemical journal* 196(2), 611.
- Mato, J.M., and Lu, S.C. (2007). Role of S-adenosyl-L-methionine in liver health and injury. *Hepatology* 45(5), 1306-1312. doi: 10.1002/hep.21650.
- McLean, P. (1960). Carbohydrate metabolism of mammary tissue III. Factors in the regulation of pathways of glucose catabolism in the mammary gland of the rat. *Biochimica et Biophysica Acta* 37(2), 296-309. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0006-3002\(60\)90237-7](http://dx.doi.org/10.1016/0006-3002(60)90237-7).
- Mephram, T.B. (1982). Amino acid utilization by lactating mammary gland. *Journal of Dairy Science* 65(2), 287-298. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(82)82191-7.
- Mhlongo, M.I., Piater, L.A., Madala, N.E., Labuschagne, N., and Dubery, I.A. (2018). The Chemistry of Plant-Microbe Interactions in the Rhizosphere and the Potential for Metabolomics to Reveal Signaling Related to Defense Priming and Induced Systemic Resistance. *Frontiers in plant science* 9(112), 112. doi: 10.3389/fpls.2018.00112.
- Morgavi, D.P., Forano, E., Martin, C., and Newbold, C.J. (2010). Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *Animal* 4(7), 1024-1036. doi: 10.1017/S1751731110000546.
- Morgavi, D.P., Kelly, W.J., Janssen, P.H., and Attwood, G.T. (2013). Rumen microbial (meta)genomics and its application to ruminant production. *Animal* 1, 184-201.
- Mosoni, P., Martin, C., Forano, E., and Morgavi, D. (2011). Long-term defaunation increases the abundance of cellulolytic ruminococci and methanogens but does not affect the bacterial and methanogen diversity in the rumen of sheep. *Journal of Animal Science* 89(3), 783-791.
- Murray, R.M., Bryant, A.M., and Leng, R.A. (1976). Rates of production of methane in the rumen and large intestine of sheep. *The British journal of nutrition* 36(1), 1-14.
- Nagana Gowda, G.A., Gowda, Y.N., and Raftery, D. (2015). Expanding the limits of human blood metabolite quantitation using NMR spectroscopy. *Analytical Chemistry* 87(1), 706-715. doi: 10.1021/ac503651e.
- Negussie, E., de Haas, Y., Dehareng, F., Dewhurst, R.J., Dijkstra, J., Gengler, N., et al. (2017a). Invited review: Large-scale indirect measurements for enteric methane emissions in dairy

## Bibliographie

- cattle: A review of proxies and their potential for use in management and breeding decisions. *Journal of Dairy Science* 100(4), 2433-2453. doi: 10.3168/jds.2016-12030.
- Negussie, E., Lehtinen, J., Mantysaari, P., Bayat, A.R., Liinamo, A.E., Mantysaari, E.A., et al. (2017b). Non-invasive individual methane measurement in dairy cows. *Animal* 11(5), 890-899. doi: 10.1017/S1751731116002718.
- Nichols, K., Kim, J.J.M., Carson, M., Metcalf, J.A., Cant, J.P., and Doelman, J. (2016). Glucose supplementation stimulates peripheral branched-chain amino acid catabolism in lactating dairy cows during essential amino acid infusions. *Journal of Dairy Science* 99(2), 1145-1160. doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9912>.
- Nicholson, J.K., Lindon, J.C., and Holmes, E. (1999). 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica* 29(11), 1181-1189. doi: 10.1080/004982599238047.
- Noziere, P., Ortigues-Marty, I., Loncke, C., and Sauvant, D. (2010). Carbohydrate quantitative digestion and absorption in ruminants: from feed starch and fibre to nutrients available for tissues. *Animal* 4(7), 1057-1074. doi: 10.1017/S1751731110000844.
- Odongo, N.E., Bagg, R., Vessie, G., Dick, P., Or-Rashid, M.M., Hook, S.E., et al. (2007). Long-term effects of feeding monensin on methane production in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 90(4), 1781-1788. doi: 10.3168/jds.2006-708.
- Onodera, R. (1993). Methionine and lysine metabolism in the rumen and the possible effects of their metabolites on the nutrition and physiology of ruminants. *Amino Acids* 5(2), 217-232. doi: 10.1007/bf00805984.
- Patra, A.K. (2016). Recent Advances in Measurement and Dietary Mitigation of Enteric Methane Emissions in Ruminants. *Frontiers in veterinary science* 3(39), 39. doi: 10.3389/fvets.2016.00039.
- Pennington, R.J. (1952). The metabolism of short-chain fatty acids in the sheep. I. Fatty acid utilization and ketone body production by rumen epithelium and other tissues. *The Biochemical journal* 51(2), 251-258.
- Pereira, H., Martin, J.-F., Joly, C., Sébédio, J.-L., and Pujos-Guillot, E. (2010). Development and validation of a UPLC/MS method for a nutritional metabolomic study of human plasma. *Metabolomics* 6(2), 207-218.
- Pickering, N.K., Chagunda, M.G., Banos, G., Mrode, R., McEwan, J.C., and Wall, E. (2015a). Genetic parameters for predicted methane production and laser methane detector measurements. *Journal of animal science* 93(1), 11-20. doi: 10.2527/jas.2014-8302.
- Pickering, N.K., Oddy, V.H., Basarab, J., Cammack, K., Hayes, B., Hegarty, R.S., et al. (2015b). Animal board invited review: genetic possibilities to reduce enteric methane emissions from ruminants. *Animal* 9(9), 1431-1440. doi: 10.1017/S1751731115000968.
- Pinares-Patino, C.S., Hickey, S.M., Young, E.A., Dodds, K.G., MacLean, S., Molano, G., et al. (2013). Heritability estimates of methane emissions from sheep. *Animal* 2, 316-321.
- Pinotti, L., Baldi, A., and Dell'Orto, V. (2002). Comparative mammalian choline metabolism with emphasis on the high-yielding dairy cow. *Nutrition research reviews* 15(2), 315-332. doi: 10.1079/NRR200247.
- Pinto, J., Barros, A.S., Domingues, M.R., Goodfellow, B.J., Galhano, E., Pita, C., et al. (2015). Following healthy pregnancy by NMR metabolomics of plasma and correlation to urine. *Journal of proteome research* 14(2), 1263-1274. doi: 10.1021/pr5011982.

## Bibliographie

- Pinto, J., Domingues, M.R., Galhano, E., Pita, C., Almeida Mdo, C., Carreira, I.M., et al. (2014). Human plasma stability during handling and storage: impact on NMR metabolomics. *Analyst* 139(5), 1168-1177. doi: 10.1039/c3an02188b.
- Pinto, R.C., Trygg, J., and Gottfries, J. (2012). Advantages of orthogonal inspection in chemometrics. *Journal of Chemometrics* 26(6), 231-235. doi: 10.1002/cem.2441.
- Pratico, G., Capuani, G., Tomassini, A., Baldassarre, M.E., Delfini, M., and Miccheli, A. (2014). Exploring human breast milk composition by NMR-based metabolomics. *Natural Product Research* 28(2), 95-101. doi: 10.1080/14786419.2013.843180.
- Pretsch, E., Buehlmann, P., Affolter, C., Pretsch, E., Buehlmann, P., and Affolter, C. (2000). *Structure determination of organic compounds*. Springer.
- Rhodes, C.J. (2016). The 2015 Paris Climate Change Conference: COP21. *Science progress* 99(Pt 1), 97-104.
- Ringseis, R., Keller, J., and Eder, K. (2018). Regulation of carnitine status in ruminants and efficacy of carnitine supplementation on performance and health aspects of ruminant livestock: a review. *Archives of animal nutrition* 72(1), 1-30. doi: 10.1080/1745039X.2017.1421340.
- Rist, M.J., Muhle-Goll, C., Gorling, B., Bub, A., Heissler, S., Watzl, B., et al. (2013). Influence of Freezing and Storage Procedure on Human Urine Samples in NMR-Based Metabolomics. *Metabolites* 3(2), 243-258. doi: 10.3390/metabo3020243.
- Robbins, A. (2016). "How to understand the results of the climate change summit: Conference of Parties21 (COP21) Paris 2015". Springer).
- Rocke, D.M., and Woodruff, D.L. (1996). Identification of outliers in multivariate data. *Journal of the American Statistical Association* 91(435), 1047-1061. doi: Doi 10.2307/2291724.
- Rogers, J.A., Krishnamoorthy, U., and Sniffen, C.J. (1987). Plasma amino acids and milk protein production by cows fed rumen-protected methionine and lysine. *Journal of Dairy Science* 70(4), 789-798.
- Rohart, F., Paris, A., Laurent, B., Canlet, C., Molina, J., Mercat, M.J., et al. (2012). Phenotypic prediction based on metabolomic data for growing pigs from three main European breeds. *Journal of Animal Science* 90(13), 4729-4740. doi: 10.2527/jas.2012-5338.
- Ruiz-Albarran, M., Balocchi, O.A., Noro, M., Wittwer, F., and Pulido, R.G. (2016). Effect of the type of silage on milk yield, intake and rumen metabolism of dairy cows grazing swards with low herbage mass. *Animal science journal* 87(7), 878-884. doi: 10.1111/asj.12513.
- Sauvant, D., and Noziere, P. (2016). Quantification of the main digestive processes in ruminants: the equations involved in the renewed energy and protein feed evaluation systems. *Animal* 10(5), 755-770. doi: 10.1017/S1751731115002670.
- Scheller, S., Goenrich, M., Thauer, R.K., and Jaun, B. (2013). Methyl-coenzyme M reductase from methanogenic archaea: isotope effects on the formation and anaerobic oxidation of methane. *Journal of the American Chemical Society* 135(40), 14975-14984. doi: 10.1021/ja406485z.
- Selmer, T., Kahnt, J., Goubeaud, M., Shima, S., Grabarse, W., Ermler, U., et al. (2000). The biosynthesis of methylated amino acids in the active site region of methyl-coenzyme M reductase. *Journal of Biological Chemistry* 275(6), 3755-3760.
- Seshadri, R., Leahy, S.C., Attwood, G.T., Teh, K.H., Lambie, S.C., Cookson, A.L., et al. (2018). Cultivation and sequencing of rumen microbiome members from the Hungate1000 Collection. *Nat Biotechnol* 36(4), 359-367. doi: 10.1038/nbt.4110.

## Bibliographie

- Shennan, D.B., and Peaker, M. (2000). Transport of milk constituents by the mammary gland. *Physiological reviews* 80(3), 925-951. doi: 10.1152/physrev.2000.80.3.925.
- Silverstein, R.M., and Bassler, G.C. (1962). Spectrometric identification of organic compounds. *Journal of Chemical Education* 39(11), 546.
- Sirohi, S.K., Pandey, N., Singh, B., and Puniya, A.K. (2010). Rumen methanogens: a review. *Indian journal of microbiology* 50(3), 253-262. doi: 10.1007/s12088-010-0061-6.
- Smith, C.A., Want, E.J., O'Maille, G., Abagyan, R., and Siuzdak, G. (2006). XCMS: Processing mass spectrometry data for metabolite profiling using Nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Analytical Chemistry* 78(3), 779-787. doi: 10.1021/ac051437y.
- Stams, A.J., and Plugge, C.M. (2010). The microbiology of methanogenesis. *Methane and climate change*, 14-26.
- Steinfeld, H., Gerber, P., Wassenaar, T., Castel, V., and De Haan, C. (2006). *Livestock's long shadow: environmental issues and options*. Food & Agriculture Org.
- Storm, I.M., Hellwing, A.L., Nielsen, N.I., and Madsen, J. (2012). Methods for Measuring and Estimating Methane Emission from Ruminants. *Animals* 2(2), 160-183. doi: 10.3390/ani2020160.
- Sumner, L., Amberg, A., Barrett, D., Beale, M., Beger, R., Daykin, C., et al. (2007). Proposed minimum reporting standards for chemical analysis. *Metabolomics* 3(3), 211-221. doi: 10.1007/s11306-007-0082-2.
- Sun, L.W., Zhang, H.Y., Wu, L., Shu, S., Xia, C., Xu, C., et al. (2014). (1)H-Nuclear magnetic resonance-based plasma metabolic profiling of dairy cows with clinical and subclinical ketosis. *Journal of Dairy Science* 97(3), 1552-1562. doi: 10.3168/jds.2013-6757.
- Sundekilde, U.K., Frederiksen, P.D., Clausen, M.R., Larsen, L.B., and Bertram, H.C. (2011). Relationship between the Metabolite Profile and Technological Properties of Bovine Milk from Two Dairy Breeds Elucidated by NMR-Based Metabolomics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(13), 7360-7367. doi: 10.1021/jf202057x.
- Sundekilde, U.K., Larsen, L.B., and Bertram, H.C. (2013a). NMR-Based Milk Metabolomics. *Metabolites* 3(2), 204-222. doi: 10.3390/metabo3020204.
- Sundekilde, U.K., Poulsen, N.A., Larsen, L.B., and Bertram, H.C. (2013b). Nuclear magnetic resonance metabolomics reveals strong association between milk metabolites and somatic cell count in bovine milk. *Journal of Dairy Science* 96(1), 290-299. doi: 10.3168/jds.2012-5819.
- Tautenhahn, R., Bottcher, C., and Neumann, S. (2008). Highly sensitive feature detection for high resolution LC/MS. *BMC Bioinformatics* 9, 504. doi: 10.1186/1471-2105-9-504.
- Tian, H., Wang, W., Zheng, N., Cheng, J., Li, S., Zhang, Y., et al. (2015a). Identification of diagnostic biomarkers and metabolic pathway shifts of heat-stressed lactating dairy cows. *Journal of Proteomics* 125, 17-28. doi: 10.1016/j.jprot.2015.04.014.
- Tian, H., Wang, W.Y., Zheng, N., Cheng, J.B., Li, S.L., Zhang, Y.D., et al. (2015b). Identification of diagnostic biomarkers and metabolic pathway shifts of heat-stressed lactating dairy cows. *Journal of Proteomics* 125, 17-28. doi: 10.1016/j.jprot.2015.04.014.
- Trygg, J., Holmes, E., and Lundstedt, T. (2007). Chemometrics in metabolomics. *Journal of proteome research* 6(2), 469-479. doi: 10.1021/pr060594q.
- Trygg, J., and Wold, S. (2002). Orthogonal projections to latent structures (O-PLS). *Journal of Chemometrics* 16(3), 119-128. doi: 10.1002/cem.695.

## Bibliographie



- Tulipani, S., Llorach, R., Urpi-Sarda, M., and Andres-Lacueva, C. (2013). Comparative Analysis of Sample Preparation Methods To Handle the Complexity of the Blood Fluid Metabolome: When Less Is More. *Analytical Chemistry* 85(1), 341-348. doi: 10.1021/ac302919t.
- Ulrich, E.L., Akutsu, H., Doreleijers, J.F., Harano, Y., Ioannidis, Y.E., Lin, J., et al. (2008). BioMagResBank. *Nucleic Acids Research* 36, D402-408. doi: 10.1093/nar/gkm957.
- van der Kloet, F.M., Bobeldijk, I., Verheij, E.R., and Jellema, R.H. (2009). Analytical error reduction using single point calibration for accurate and precise metabolomic phenotyping. *Journal of proteome research* 8(11), 5132-5141. doi: 10.1021/pr900499r.
- van Gastelen, S. (2017). *Predicting methane emission of dairy cows using milk composition*. Wageningen University.
- van Gastelen, S., Antunes-Fernandes, E.C., Hettinga, K.A., and Dijkstra, J. (2017). Relationships between methane emission of Holstein Friesian dairy cows and fatty acids, volatile metabolites and non-volatile metabolites in milk. *Animal* 11(9), 1539-1548. doi: 10.1017/S1751731117000295.
- van Gastelen, S., Antunes-Fernandes, E.C., Hettinga, K.A., and Dijkstra, J. (2018). The relationship between milk metabolome and methane emission of Holstein Friesian dairy cows: Metabolic interpretation and prediction potential. *Journal of Dairy Science* 101(3), 2110-2126. doi: 10.3168/jds.2017-13334.
- van Lingen, H.J., Crompton, L.A., Hendriks, W.H., Reynolds, C.K., and Dijkstra, J. (2014). Meta-analysis of relationships between enteric methane yield and milk fatty acid profile in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 97(11), 7115-7132. doi: 10.3168/jds.2014-8268.
- Van Nevel, C.S., and Demeyer, D.I. (1988). "Manipulation of rumen fermentation," in *The Rumen Microbial Ecosystem*, ed. P.N. Hobson. (London and New York: Elsevier Applied Science), 387-443.
- Van Soest, P., and Allen, N. (1959). Studies on the Relationships between Rumen Acids and Fat Metabolism of Ruminants Fed on Restricted Roughage Diets. *Journal of Dairy Science* 42(12), 1977-1985.
- Villeneuve, M.P., Lebeuf, Y., Gervais, R., Tremblay, G.F., Vuillemard, J.C., Fortin, J., et al. (2013). Milk volatile organic compounds and fatty acid profile in cows fed timothy as hay, pasture, or silage. *Journal of Dairy Science* 96(11), 7181-7194. doi: 10.3168/jds.2013-6785.
- Visentin, G., Penasa, M., Gottardo, P., Cassandro, M., and De Marchi, M. (2016). Predictive ability of mid-infrared spectroscopy for major mineral composition and coagulation traits of bovine milk by using the uninformative variable selection algorithm. *Journal of Dairy Science* 99(10), 8137-8145. doi: 10.3168/jds.2016-11053.
- Vlaeminck, B., Dufour, C., van Vuuren, A.M., Cabrita, A.R., Dewhurst, R.J., Demeyer, D., et al. (2005). Use of odd and branched-chain fatty acids in rumen contents and milk as a potential microbial marker. *Journal of Dairy Science* 88(3), 1031-1042. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(05)72771-5.
- Vogels, G.D., Hoppe, W.F., and Stumm, C.K. (1980). Association of methanogenic bacteria with rumen ciliates. *Applied and Environmental Microbiology* 40(3), 608-612.
- Vuckovic, D. (2012). Current trends and challenges in sample preparation for global metabolomics using liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 403(6), 1523-1548. doi: 10.1007/s00216-012-6039-y.
- Wall, E., Simm, G., and Moran, D. (2010). Developing breeding schemes to assist mitigation of greenhouse gas emissions. *Animal* 4(3), 366-376. doi: 10.1017/S175173110999070X.

## Bibliographie

- Wallace, R., Onodera, R., and Cotta, M. (1997). "Metabolism of nitrogen-containing compounds," in *The rumen microbial ecosystem*. Springer), 283-328.
- Wallace, R.J., Snelling, T.J., McCartney, C.A., Tapio, I., and Strozzi, F. (2017). Application of meta-omics techniques to understand greenhouse gas emissions originating from ruminal metabolism. *Genetics Selection Evolution* 49(1), 017-0285.
- Wang, M.Z., Jing, Y.J., Liu, S.M., Gao, J., Shi, L.F., and Vercoe, P. (2016). Soybean oil suppresses ruminal methane production and reduces content of coenzyme F-420 in vitro fermentation. *Animal Production Science* 56(2-3), 627-633. doi: 10.1071/an15553.
- Want, E.J., O'Maille, G., Smith, C.A., Brandon, T.R., Uritboonthai, W., Qin, C., et al. (2006). Solvent-dependent metabolite distribution, clustering, and protein extraction for serum profiling with mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 78(3), 743-752. doi: 10.1021/ac051312t.
- Wedlock, D.N., Janssen, P.H., Leahy, S.C., Shu, D., and Buddle, B.M. (2013). Progress in the development of vaccines against rumen methanogens. *Animal* 7 Suppl 2(s2), 244-252. doi: 10.1017/S1751731113000682.
- Westerhuis, J.A., Hoefsloot, H.C.J., Smit, S., Vis, D.J., Smilde, A.K., van Velzen, E.J.J., et al. (2008). Assessment of PLS-DA cross validation. *Metabolomics* 4(1), 81-89. doi: 10.1007/s11306-007-0099-6.
- Wishart, D.S., Tzur, D., Knox, C., Eisner, R., Guo, A.C., Young, N., et al. (2007). HMDB: the Human Metabolome Database. *Nucleic acids research* 35(Database issue), D521-526. doi: 10.1093/nar/gkl923.
- Wojtowicz, W., Zabek, A., Deja, S., Dawiskiba, T., Pawelka, D., Glod, M., et al. (2017). Serum and urine (1)H NMR-based metabolomics in the diagnosis of selected thyroid diseases. *Scientific Reports* 7(1), 9108. doi: 10.1038/s41598-017-09203-3.
- Wold, S., Antti, H., Lindgren, F., and Öhman, J. (1998). Orthogonal signal correction of near-infrared spectra. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 44(1-2), 175-185.
- Wold, S., Esbensen, K., and Geladi, P. (1987). Principal Component Analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 2(1-3), 37-52. doi: Doi 10.1016/0169-7439(87)80084-9.
- Wu, H., Southam, A.D., Hines, A., and Viant, M.R. (2008). High-throughput tissue extraction protocol for NMR- and MS-based metabolomics. *Analytical Biochemistry* 372(2), 204-212. doi: 10.1016/j.ab.2007.10.002.
- Wu, J., Domellof, M., Zivkovic, A.M., Larsson, G., Ohman, A., and Nording, M.L. (2016). NMR-based metabolite profiling of human milk: A pilot study of methods for investigating compositional changes during lactation. *Biochemical and biophysical research communications* 469(3), 626-632. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.11.114.
- Xia, J., Broadhurst, D.I., Wilson, M., and Wishart, D.S. (2013). Translational biomarker discovery in clinical metabolomics: an introductory tutorial. *Metabolomics* 9(2), 280-299.
- Xia, J.G., Sinelnikov, I.V., Han, B., and Wishart, D.S. (2015). MetaboAnalyst 3.0-making metabolomics more meaningful. *Nucleic Acids Research* 43(W1), W251-W257. doi: 10.1093/nar/gkv380.
- Yang, Y., Zheng, N., Zhao, X., Zhang, Y., Han, R., Yang, J., et al. (2016). Metabolomic biomarkers identify differences in milk produced by Holstein cows and other minor dairy animals. *Journal of Proteomics* 136(16), 174-182. doi: 10.1016/j.jprot.2015.12.031.
- Ye, M.P., Zhou, R., Shi, Y.R., Chen, H.C., and Du, Y. (2016). Effects of heating on the secondary structure of proteins in milk powders using mid-infrared spectroscopy. *Journal of Dairy Science* 16(16), 30798-30796. doi: 10.3168/jds.2016-11443.

## Bibliographie

- Young, J.W. (1977). Gluconeogenesis in cattle: significance and methodology. *Journal of Dairy Science* 60(1), 1-15. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(77)83821-6.
- Zacharias, H.U., Hochrein, J., Klein, M., Samol, C., Oefner, J.P., and Gronwald, W. (2013). Current Experimental, Bioinformatic and Statistical Methods used in NMR Based Metabolomics. *Current Metabolomics* 1(3), 253-268. doi: <http://dx.doi.org/10.2174/2213235X113019990001>.
- Zhang, H.Y., Wu, L., Xu, C., Xia, C., Sun, L.W., and Shu, S. (2013). Plasma metabolomic profiling of dairy cows affected with ketosis using gas chromatography/mass spectrometry. *Bmc Veterinary Research* 9(1), 186. doi: Artn 186  
10.1186/1746-6148-9-186.
- Zhu, Y., Guo, Z., Zhang, L., Zhang, Y., Chen, Y., Nan, J., et al. (2015). System-wide assembly of pathways and modules hierarchically reveal metabolic mechanism of cerebral ischemia. *Scientific Reports* 5(17068).
- Zimmerman, P.R. (1993). "System for measuring metabolic gas emissions from animals". Google Patents).
- Zinder, S.H., and Brock, T.D. (1978). Methane, Carbon Dioxide, and Hydrogen Sulfide Production from the Terminal Methiol Group of Methionine by Anaerobic Lake Sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 35(2), 344-352.

**ANNEXES**



Annexe 1: caractéristiques des vaches impliquées dans l'expérimentation

Origine	INRA	Nom	Début Pre-Exp	Début Exp	Date CH4 (S6)	MSI (Kg) (S1)	PL(litre) (S1)	MSI (kg) (S5)	PL (litre) (S5)
Marcenat	2014156	PARODIE	21/11/2016	05/12/2016	09/01/2017	22.71	21.91	17.26	22.09
Theix	2014918	4918	21/11/2016	05/12/2016	09/01/2017	17.12	24.29	18.21	24.21
Marcenat	2014167	PEKINOISE	21/11/2016	05/12/2016	09/01/2017	19.56	20.43		19.31
Theix	2014900	4900	21/11/2016	05/12/2016	09/01/2017	17.89	26.63	20.15	28.00
Marcenat	2014180	POESIE	21/11/2016	05/12/2016	09/01/2017	16.78	23.10	16.85	23.86
Marcenat	2014159	PASTEL	21/11/2016	05/12/2016	09/01/2017	17.68	22.89	18.26	22.94
Marcenat	2014178	PIMPRENELLE	21/11/2016	05/12/2016	09/01/2017	16.40	17.84	18.17	21.20
Marcenat	2014168	PELOTE	21/11/2016	05/12/2016	09/01/2017	18.09	20.96	19.83	19.76
Marcenat	2014166	PEINTURE	21/11/2016	05/12/2016	09/01/2017	18.85	25.24	20.67	23.16
Marcenat	2014151	PAILLETTE	28/11/2016	12/12/2016	16/01/2017	20.09	24.86	18.90	22.77
Marcenat	2014170	PENSEE	28/11/2016	12/12/2016	16/01/2017	19.62	25.87	17.81	24.07
Marcenat	2014152	PALERME	28/11/2016	12/12/2016	16/01/2017	18.25	25.49	18.08	24.40
Marcenat	2014165	PECHE	28/11/2016	12/12/2016	16/01/2017	15.45	25.76	18.27	24.33
Theix	2014937	4937	28/11/2016	12/12/2016	16/01/2017	18.60	28.89	18.29	26.20
Theix	2014892	4892	28/11/2016	12/12/2016	16/01/2017	18.65	26.46	18.19	25.74
Marcenat	2014150	PACIFIQUE	05/12/2016	19/12/2016	23/01/2017	18.12	26.40	18.75	25.34
Marcenat	2014172	PERDRIX	05/12/2016	19/12/2016	23/01/2017	16.69	27.33	20.33	26.10
Marcenat	2014601	PAGAILLE	05/12/2016	19/12/2016	23/01/2017	17.91	28.04	20.54	25.47
Theix	2014890	4890	05/12/2016	19/12/2016	23/01/2017	16.98	25.57	17.68	23.77
Marcenat	2014155	PARACHUTE	05/12/2016	19/12/2016	23/01/2017	17.01	18.31	18.30	18.24
Theix	2014913	4913	12/12/2016	26/12/2016	30/01/2017	19.29	30.69	20.17	30.71
Marcenat	2014600	PAMELA	05/12/2016	19/12/2016	23/01/2017	20.29	30.14	23.41	30.60
Marcenat	2014153	PALESTINE	05/12/2016	19/12/2016	23/01/2017	16.71	22.47	19.08	22.57
Theix	2014938	4938	12/12/2016	26/12/2016	30/01/2017	18.29	22.77	19.47	20.89
Theix	2014941	4941	12/12/2016	26/12/2016	30/01/2017	19.07	25.23	21.95	26.24

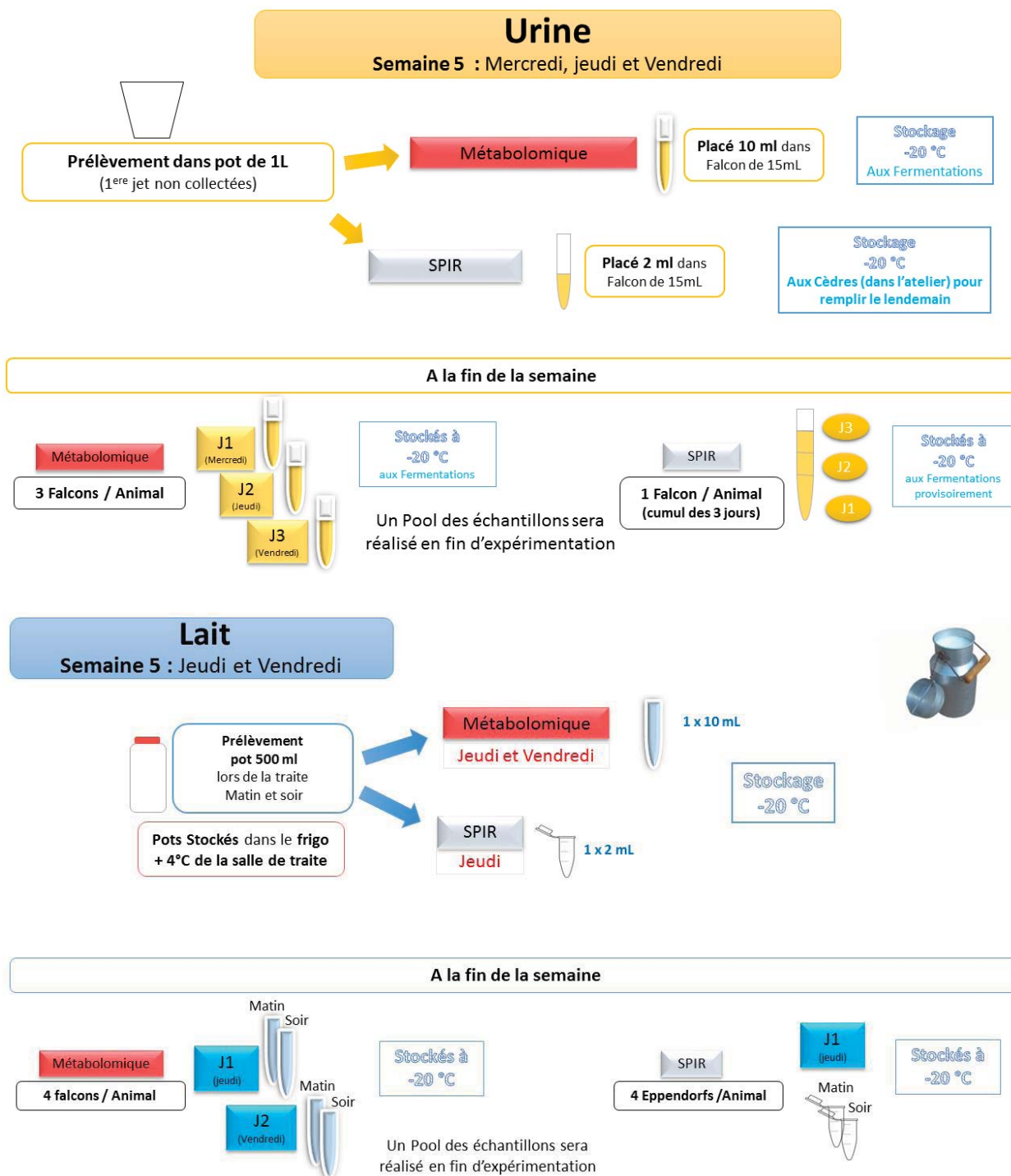
MSI= Matière sèche ingérée ; PL= Production laitière

## Annexe 2: Prélèvements et analyses

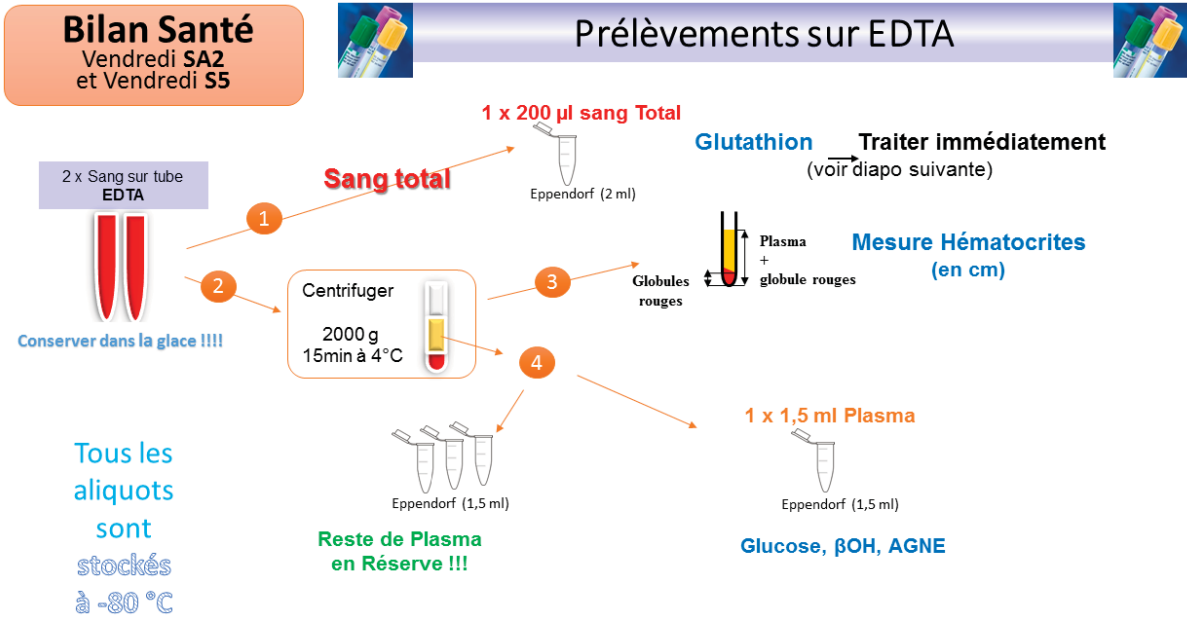
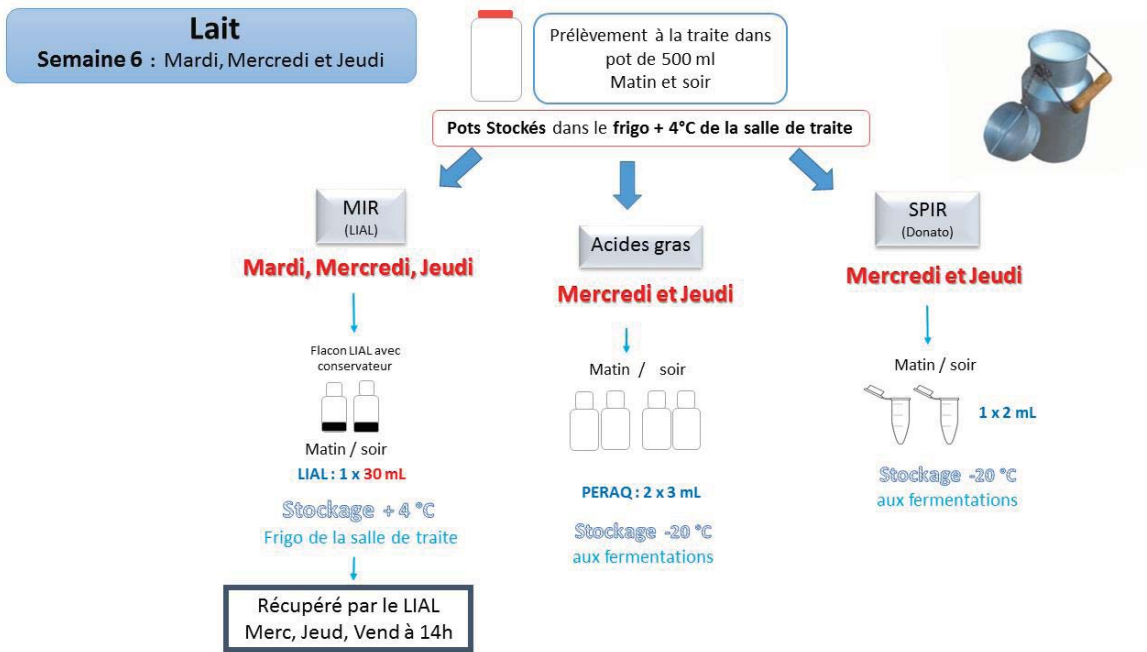
Prélèvements, mesure et analyses réalisés entre la semaine 1 et la semaine 6 pour une vache impliquée dans l'expérimentation

	Pré-expérimentation							Expérimentation																										
	Heure	L	M	M	J	V	S	D	L	M	M	J	V	S	D	L	M	M	J	V	S	D	L	M	M	J	V	S	D	L	M	M	J	V
Ingéré	Pesée offert																																	
	Pesée refus																																	
	teneur en MS Ensilage																																	
	teneur en MS concentré + foin																																	
Animaux	Pesée																																	
	Production et composition laitière																																	
mesure du méthane microbiote	07:30																																	
	15:30																																	
Prélèvement en fin d'expérimentation métabolomique	Jus de rumen																																	
	Urine																																	
	Lait matin/soir																																	
Bilan de santé	sang																																	
	Jus de rumen																																	
Sang																																		

Annexe 3: Collecte et processing des matrices prélevées pour analyses métabolomique et autres





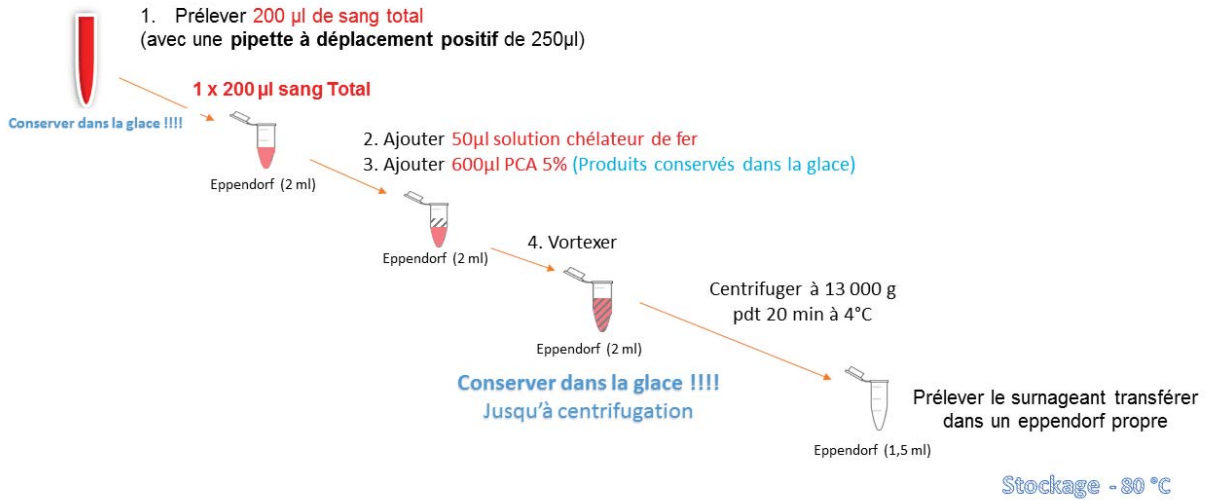


## Bilan Santé

Vendredi SA2  
et Vendredi S5

## Traitement du sang total en vue du dosage du Glutathion

Sang prélevé sur EDTA

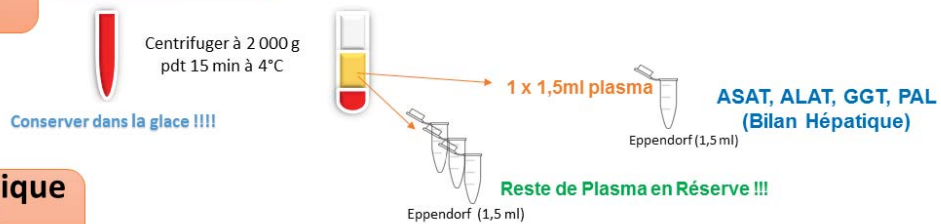


## Prélèvements sur HEPARINE

### Bilan Santé

Vendredi SA2  
et Vendredi S5

Sang prélevé sur Héparine



### Métabolomique Et SPIR

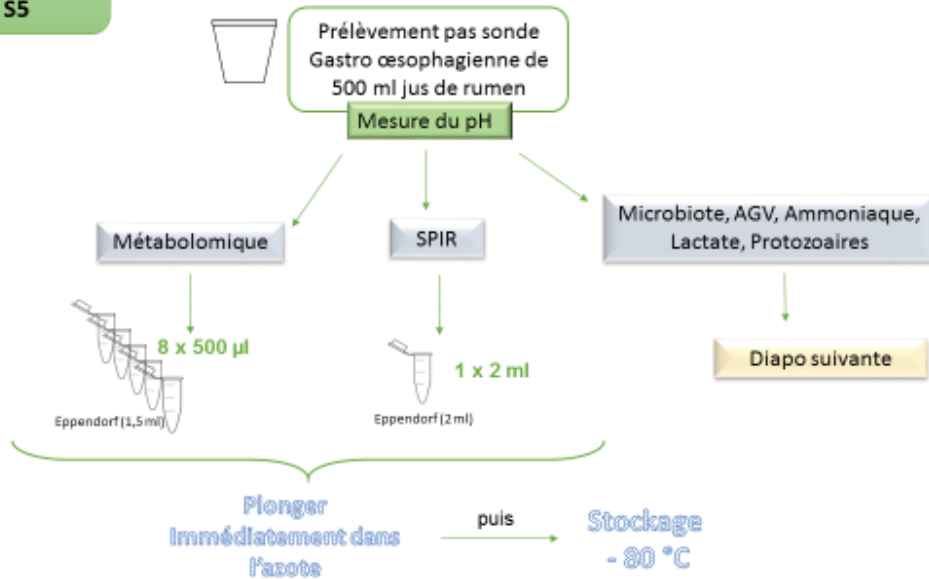
Vendredi S5

2 x Sang prélevé sur Héparine



## Jus de Rumen

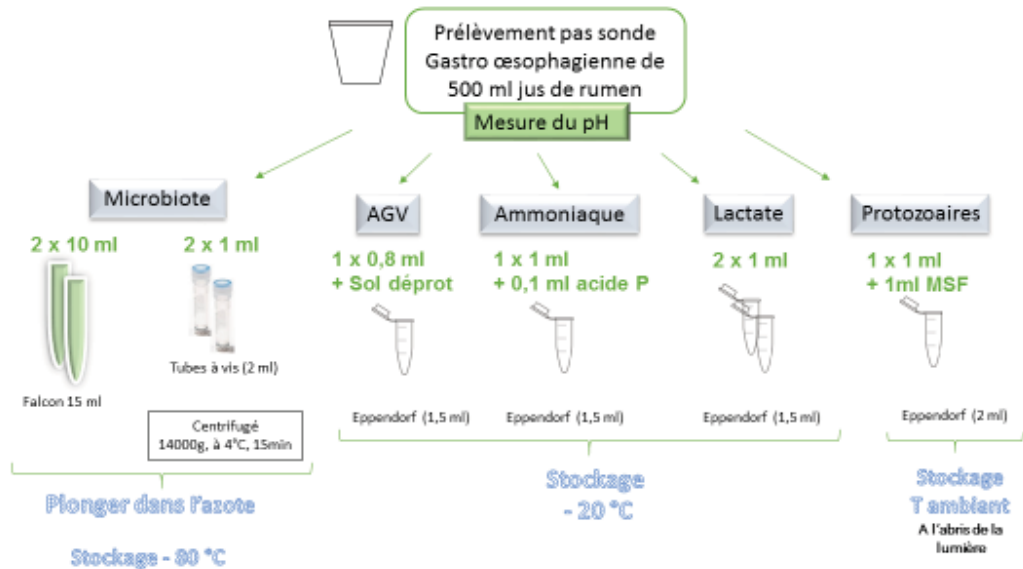
Vendredi S5



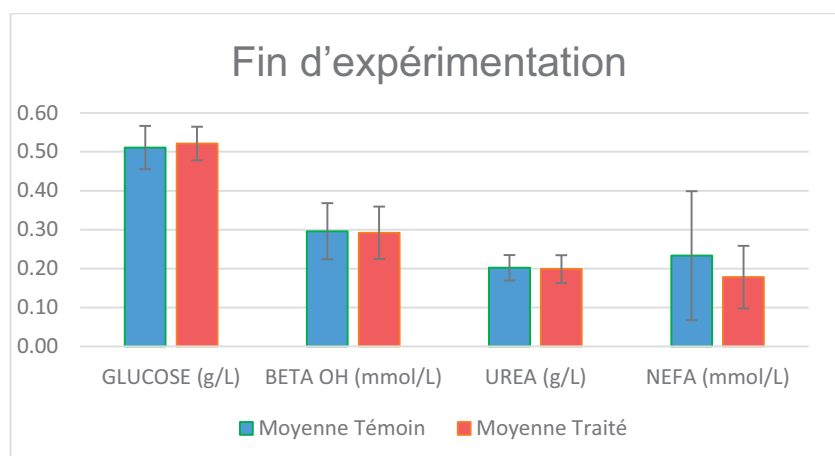
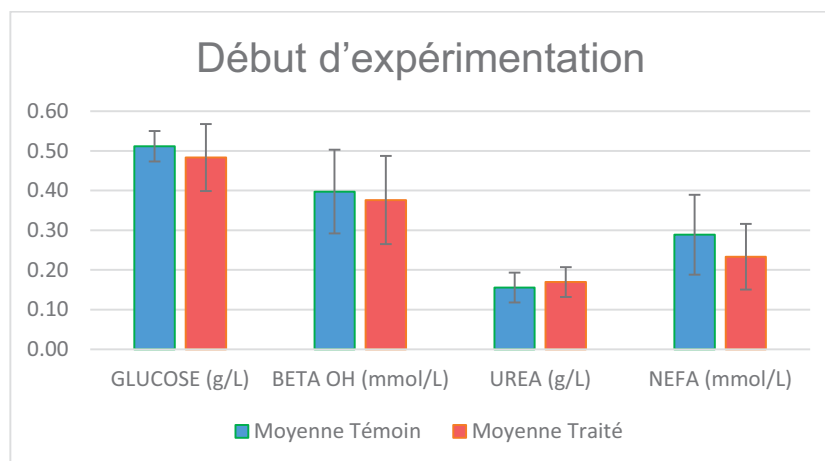
## Jus de Rumen

Vendredi S5

### Traitement du jus de rumen pour les analyses microbiologie et paramètres fermentaires



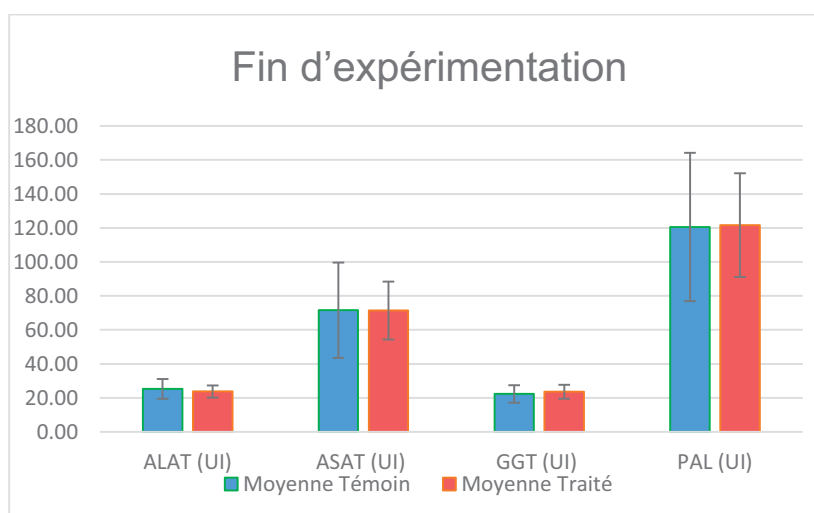
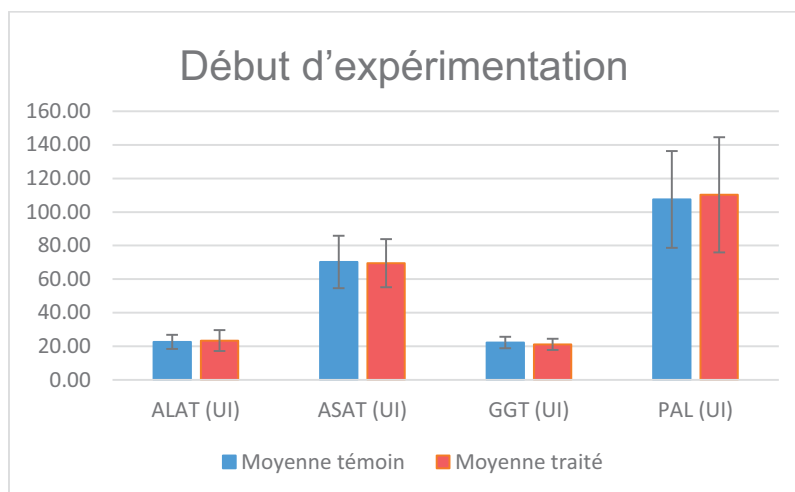
Annexe 4: Mesure par groupe des paramètres sanguins des animaux en début et fin d'expérimentation



**Valeurs usuelles**

**Glucose:** 0.5-0.7 g/L    **Urée:** 0.2-0.5 g/L

**Beta OH:** <1.1 mmol/L    **NEFA:** < 0.5 mmol/L



**Valeurs usuelles**

**ALAT:** <40 UI

**ASAT:** < 125 UI

**GGT:** <35 UI

**PAL:** < 500 UI

Annexe 5 : Mesures individuelles des émissions de méthanes des vaches conduites en enceintes respiratoires

Témoin	Traité
paire 1	paire 2

Semaine 1	Témoin	Témoin	Traité	Traité
	Vache 900 b1	Vache 166 b2	Vache 180 b1	Vache 178 b2
	Chambre 1	Chambre 2	Chambre 4	Chambre 3
	g/d	g/d	g/d	g/d
J1	399.90	325.22	274.99	287.83
J2	385.53	305.57	286.38	285.38
J3	353.68	300.21	223.49	277.92
J4	331.18	293.81	227.05	300.03
moyenne	367.57	306.20	252.98	287.79
ecart-type	31.01	13.56	32.36	9.18
CV	8%	4%	13%	3%

Semaine 2	Témoin	Témoin	Traité	Traité
	Vache 892 b1	Vache 152 b2	Vache 151 b1	Vache 170 b2
	Chambre 4	Chambre 3	Chambre 1	Chambre 2
	g/d	g/d	g/d	g/d
J1	320.84	418.73	312.91	253.49
J2	315.75	419.78	302.81	222.15
J3	297.42	386.46	328.05	224.66
J4	327.16	341.35	361.08	214.06
moyenne	315.29	391.58	326.21	228.59
ecart-type	12.80	36.88	25.45	17.21
CV	4%	9%	8%	8%

Semaine 3	Témoïn	Témoïn	Traité	Traité
	Vache 172 b1	Vache 601 b2	Vache 150 b1	Vache 890 b2
	Chambre 1	Chambre 3	Chambre 4	Chambre 2
	g/d	g/d	g/d	g/d
J1	333.24	421.25	248.69	258.89
J2	326.78	439.52	272.98	232.10
J3	360.19	442.38	262.60	260.49
J4	336.97	459.62	295.59	216.70
moyenne	339.29	440.69	269.97	242.05
ecart-type	14.55	15.71	19.77	21.33
CV	4%	4%	7%	9%

Semaine 4	Témoïn	Témoïn	Traité	Traité
	Vache 153 b2	Vache 941 b1	Vache 913 b1	Vache 600 b2
	Chambre 2	Chambre 4	Chambre 1	Chambre 3
	g/d	g/d	g/d	g/d
J1	349.44	389.05	237.01	329.51
J2	346.38	380.20	242.19	377.28
J3	334.71	377.84	236.02	436.02
J4	342.29	385.91	237.14	446.60
moyenne	343.20	383.25	238.09	397.35
ecart-type	6.38	5.14	2.78	54.55
CV	2%	1%	1%	14%

# Une approche métabolomique multiplateforme identifie des marqueurs associés aux émissions de méthane dans le lait de vaches laitières

B. Yanibada<sup>1</sup>, M. Pétéra<sup>2</sup>, C. Canlet<sup>3</sup>, U. Hohenester, C. Martin<sup>1</sup>, M. Eugène<sup>1</sup>, M. Gauthier<sup>1</sup>, F. Anglard<sup>1</sup>, D. Morgavi<sup>1</sup>, H. Boudra<sup>1</sup>

1/ Université Clermont Auvergne, INRA, VetAgroSup, UMR Herbivores, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France

2/ Université Clermont Auvergne, INRA, UNH, Plateforme d'Exploration du métabolisme, MetaboHUB Clermont, CRNH Auvergne, Clermont-Ferrand/Auvergne Rhône Alpes, France

3/ INRA, UMR 1331 Toxalim, Plateforme MetaboHUB-MetaToul-AXIOM, 180 Chemin de Tournefeuille BP 93173, 31027 Toulouse Cedex 3, France

## CONTEXTE DE L'ETUDE

- Le secteur de l'élevage participe aux émissions de gaz à effet de serre (14,5 % des émissions mondiales).
- Parmi ces gaz à effet de serre, le méthane (CH<sub>4</sub>) produit de la fermentation entérique chez les ruminants présente un pouvoir de réchauffement 25 fois plus important que le CO<sub>2</sub>.
- Plusieurs stratégies de mitigation des émissions de CH<sub>4</sub> (additifs, modification du régime alimentaire...) sont testées.
- La mesure des émissions de CH<sub>4</sub> se fait actuellement avec des méthodes coûteuses et difficilement applicables sur le terrain (Figure 1).

Figure 1. Méthodes de mesure des émissions de CH<sub>4</sub>



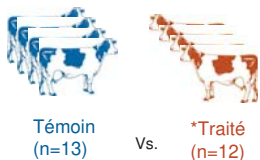
Enceinte respiratoire GreenFeed Gaz traceur (SF<sub>6</sub>)

## Objectif

Identifier dans le lait, des marqueurs associés à une réduction des émissions de CH<sub>4</sub> par une approche métabolomique ouverte multiplateforme. Ces marqueurs pourront potentiellement être utilisés pour évaluer les émissions de CH<sub>4</sub> sur le terrain.

## METHODOLOGIE

- 25 vaches primipares Holstein
- Alimentation similaire pour tous les animaux
- \*composé anti-CH<sub>4</sub> qui inhibe spécifiquement une étape de la méthanogénèse



6 semaines d'expérimentation



Mesure du CH<sub>4</sub> en enceinte respiratoire (semaine 6)

## Métabolomique

- Collecte du lait en semaine 5
- Préparation d'échantillon : Précipitation au méthanol
- Analyse en RMN & LC-QToF-MS
- Statistiques multivariées (ACP & PLS-DA)
- Implémentation des métabolites discriminants dans le réseau métabolique *Bos taurus* (Kegg)

## RESULTATS

Figure 2. Score plot du modèle OPLS-DA (R<sup>2</sup>X=0.36; Q<sup>2</sup>=0.50) des données LC-MS du lait (A) et son test de permutations (B)

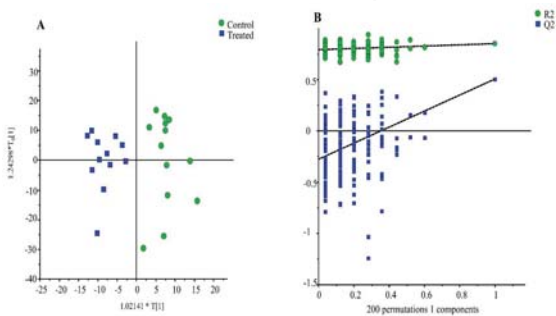
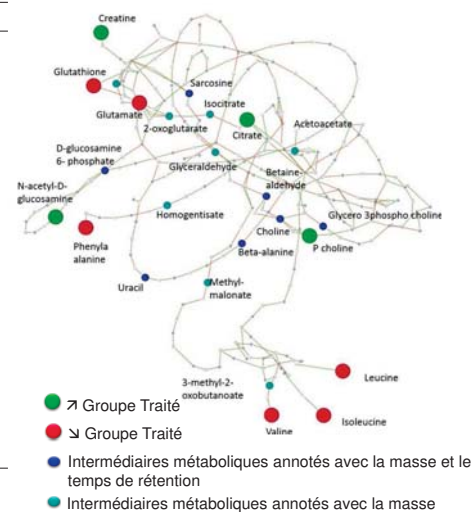


Tableau 1. Métabolites discriminants du lait entre les groupes Témoïn et Traité

Metabolites	RMN	LC-MS
3-hydroxybutanoic acid	↓	-
Acetyl L Carnitine	-	↓
Citramalic acid	↑	-
Citrate	↑	-
Creatine /Phosphate	↑	-
Dimethylsulfone	↑	-
Dimethylsulfoxyde	-	↑
Glutamic acid	↓	-
Glutathione	↓	-
Leucine	↓	↓
Isoleucine	↓	↓
N acetyl glucosamine	↑	-
Phenylalanine	-	↓
Phosphocholine	↑	-
Pyrrolidine	-	↓
Valine	↓	-

Figure 3. Sous-réseau métabolique associant les métabolites discriminants



- Émission de CH<sub>4</sub> réduite de 23 % dans le groupe Traité
- Séparation des vaches des groupes Témoïn et Traité (Figure 2)
- Au total, 16 métabolites discriminants ont été identifiés (Tableau 1)
- L'utilisation des réseaux métaboliques a permis d'identifier les voies métaboliques impactées (acides aminés et acides gras, Figure 3)

## CONCLUSION

- L'approche métabolomique multiplateforme du lait a permis de discriminer les groupes Témoïn et Traité suivant leurs émissions de CH<sub>4</sub> respectives.
- 16 métabolites appartenant à différentes familles biochimiques ont été identifiés.
- Ces marqueurs devront être validés sur des échantillons provenant d'autres expérimentations associés à une diminution des émissions de CH<sub>4</sub>.





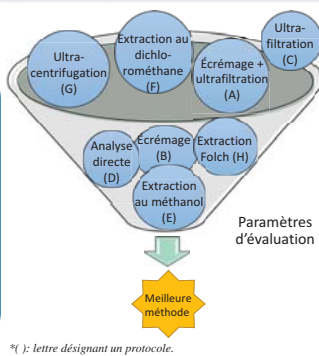


## CONTEXTE DE L'ETUDE

- Le méthane est un des principaux gaz à effet de serre. Il est produit dans le rumen des bovins par un processus de fermentation entérique impliquant de nombreux microorganismes. Cette production constitue une perte de 6 à 8% en termes d'énergie pour l'animal.
- Les méthodes de mesure du méthane utilisées tels que l'enceinte respiratoire ou le gaz traceur couplé à la chromatographie gazeuse présentent des limites. En effet elles ne sont pas adaptées au terrain. Une alternative serait de quantifier des marqueurs de production du méthane dans des matrices non invasives, et d'adopter sur ces matrices des méthodes d'analyse globale et sans a priori telle que la métabolomique.
- Objectif: Développer une méthode d'analyse du lait par RMN dans le but de rechercher des marqueurs de la production de méthane.

## METHODOLOGIE

- 8 méthodes d'extraction de métabolites polaires du lait ont été testées (n=6) à partir d'un pool d'échantillons témoin de lait.
- Les extraits de lait ont été analysés par RMN du proton sur un instrument résonnant à une fréquence de 600 MHz (spectromètre Bruker Avance III équipé d'une crysonde).
- La comparaison des protocoles a été réalisée sur des paramètres d'évaluation (tableau 1). Le calcul de ces paramètres est issu des analyses statistiques multivariées (Analyse en Composante Principale) et des données d'intégrations des spectres RMN 1D.



\*( ): lettre désignant un protocole.

Figure 1: Protocoles testés pour l'extraction des métabolites du lait

Paramètres d'évaluation	Caractéristiques
Qualité des spectres	Acquisition de signaux fins et résolus en RMN et absence de signaux de macromolécules
Reproductibilité	Variabilité aléatoire sur plusieurs déterminations d'un même échantillon effectuées de manière espacée dans le temps.
Efficacité	Capacité d'un protocole à extraire un métabolite donné
Rendement d'extraction	Taux de récupération des métabolites après l'étape d'extraction

Tableau 1: Paramètres d'évaluation et caractéristiques

## RESULTATS

### Comparaison des protocoles d'extraction du lait

- L'écrémage (B), l'ultracentrifugation (G), l'analyse directe (D) du lait, donnent des spectres avec des signaux larges qui masquent les signaux des petites molécules. (Figure 2). La qualité visuelle des spectres constitue le premier paramètre d'évaluation.
- L'extraction par écrémage + ultrafiltration (A) et l'extraction au méthanol (E) présentent la meilleure reproductibilité. (Figure 3)
- L'extraction de type Folch (H) et l'extraction au méthanol (E) présentent la meilleure efficacité. (Figure 4)
- 2 protocoles ont été retenus pour le calcul du rendement d'extraction: écrémage+ ultrafiltration (A) et extraction au méthanol (E). (Table 2)

En se basant sur tous les critères d'évaluation définis, l'extraction au méthanol est la meilleure option

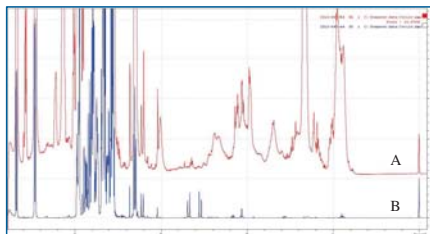


Figure 2 : Spectres RMN de lait préparés suivant 2 protocoles différents (A: écrémage + ultrafiltration et B: écrémage). Le spectre B présente des signaux larges de macromolécules masquant les déplacements chimiques de plus petites molécules.

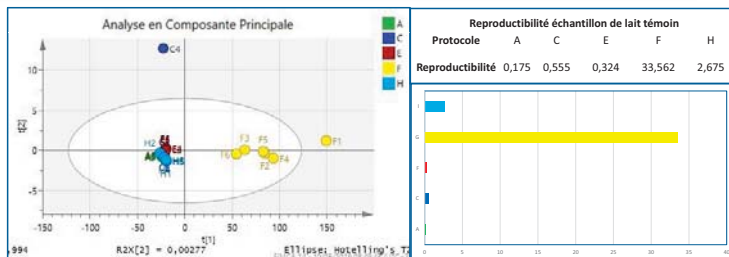


Figure 3: 3A: Analyse en composantes principales (ACP) des réplicats de 5 méthodes retenues : protocoles A (vert), C (bleu), E (rouge), F (jaune), H (bleu turquoise). 3B: Calcul et représentation graphique de la reproductibilité basés sur le produit des écart type des coordonnées de l'ACP de chaque méthode. Plus la valeur est faible, plus le protocole est reproductible.

2

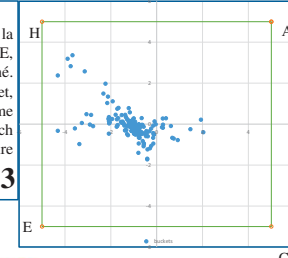


Figure 4: représentation graphique de la capacité de chaque protocole (A, C, E, H) à extraire un bucket (point) donné. Plus un point est proche d'un sommet, plus ce dernier est efficace en terme d'extraction. L'extraction de type Folch (protocole H) présente la meilleure efficacité.

3

métabolite	n (mol)		Différence	n (mol)		Ratio %
	A+STD	A		intégration	des spectres	
TSP	1,60E-07	1,60E-07	0	1,65E-07		
hippurate	1,26E-07	2,28E-08	1,03E-07	1,42E-07	72,89	
creatine	2,28E-07	1,48E-07	8,02E-08	2,00E-07	40,00	
citrate	2,61E-06	2,49E-06	1,22E-07	1,13E-06	10,74	
glutamate	2,18E-07	1,02E-07	1,16E-07	1,30E-07	88,85	
lactate	9,88E-08	2,38E-08	7,50E-08	1,12E-07	67,00	
GPC	1,02E-07	1,54E-07	2,74E-08	9,88E-08	27,72	

Table 2: Taux de récupération des métabolites après l'étape d'extraction (protocoles A et E). Le calcul des concentrations est basé sur les intégrations des signaux des métabolites.

4

métabolite	n (mol)		Différence	n (mol)		Ratio %
	E+STD	E		intégration	des spectres	
TSP	1,60E-07	1,60E-07	0	1,65E-07		
hippurate	1,70E-07	3,31E-08	1,37E-07	1,42E-07	96,46	
creatine	3,17E-07	1,94E-07	1,24E-07	2,00E-07	61,64	
citrate	2,87E-06	2,39E-06	4,77E-07	1,13E-06	42,12	
glutamate	3,00E-07	1,78E-07	1,22E-07	1,30E-07	93,64	
lactate	1,38E-07	3,65E-08	1,02E-07	1,12E-07	90,67	
GPC	2,39E-07	2,10E-07	2,85E-08	9,88E-08	28,82	

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'extraction au méthanol constitue la meilleure méthode, en se basant sur les différents paramètres d'évaluation. Cette méthode est adaptée pour l'analyse des métabolites polaires du lait de vache par RMN et sera utilisée dans le cadre d'une analyse métabolomique en vue d'identifier de potentiels biomarqueurs de la production de méthane entérique. Afin d'améliorer la couverture du métabolome du lait, d'autres méthodes basées sur la LC-MS et la GC-MS seront utilisées en complément de la RMN pour l'identification des marqueurs de la production de méthane.

Remerciements: Les auteurs remercient le consortium méthane pour le financement du projet, la plateforme MetaToul- AXIOM de Toulouse pour son accueil, le RFMF et l'infrastructure Metabohub pour sa contribution.





## Résumé

Le méthane, puissant gaz à effet de serre (GES), est produit dans le rumen des bovins par la fermentation microbienne anaérobie des aliments. Cette production est également responsable d'une perte d'énergie pour l'animal représentant 6 % à 8 % de l'apport alimentaire. Pour ces raisons, plusieurs travaux de recherches sont entrepris pour réduire ces émissions, en jouant sur la composition des aliments ou sur l'utilisation d'additifs alimentaires. Actuellement, la mesure des émissions de méthane se fait par différentes techniques, qui présentent des inconvénients, notamment le coût ou encore la difficulté d'application à grande échelle sur le terrain. De ce fait, de nombreuses recherches sont menées pour trouver des méthodes alternatives ou « proxy » pour la mesure indirecte du méthane. Mon travail de thèse a pour objectif de rechercher des marqueurs associés à la production de méthane chez la vache laitière, par une approche métabolomique multiplateforme. Ces marqueurs, une fois validés, pourront être dosés par des méthodes simples de laboratoire et appliqués à grande échelle pour évaluer les émissions de méthane. Étant donné le caractère exploratoire de l'approche et pour maximiser nos chances de réussite, nous avons combiné l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de la méthanogénèse et l'analyse des profils métaboliques de quatre matrices (le lait, le plasma, le contenu ruminal et les urines) avec différentes plateformes analytiques complémentaires : la résonance magnétique nucléaire et la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse. Les échantillons biologiques proviennent d'une expérimentation animale utilisant 25 vaches Holstein primipares, et séparées en deux groupes suivant la présence ou non de l'additif anti-méthane dans la ration. Nous avons mesuré une diminution des émissions de méthane de 22,7% chez les animaux ayant reçu l'additif. Les analyses statistiques multivariées ont montré des profils métaboliques différents entre les 2 groupes d'animaux dans le plasma (27 métabolites discriminants) et le lait (16 métabolites discriminants). Les travaux sur les urines et le contenu ruminal sont en cours. L'analyse des réseaux métaboliques a mis en évidence plusieurs voies métaboliques impactées par la réduction des émissions de méthane impliquées dans le métabolisme énergétique ou encore dans celui des acides-aminés.

## Abstract

Ruminants produce significant amount of enteric methane, which is a major contributor of greenhouse gas emissions from agricultural origin. This production also results in a loss of 6 to 8% of the energy present in the diet. The reduction of enteric methane emissions from ruminants is an active area of research that requires the use of expensive, constraining measurement methods such as respiratory chambers or the use of a tracer gas that are difficult to use outside experimental farms. Therefore, there is a need of alternative, non-invasive measurement methods that can be used on large number of animals. In this work, we used an open metabolomic approach for identifying potential metabolic biomarkers associated with the production of methane in dairy cows. These discriminant metabolites, once validated, may be used for monitoring methane emissions under field conditions. To maximize the chance of finding such biomarkers, we used a multiplatform metabolomics approach (nuclear magnetic resonance and mass spectrometry) to better cover the metabolome and analyzed four biological matrices, namely milk, plasma, ruminal fluid and urine. We carried out a study involving 25 primiparous Holstein dairy cows that were divided into two groups fed a diet with or without a specific anti-methanogenic compound. We measured 22.7% reduction of methane emissions in the Treated group compared to the Control group. We identified 27 discriminant metabolites in plasma and 16 discriminant metabolites in milk. Metabolic network analysis highlighted pathways involved in energy and amino acids metabolism suggesting a general effect on the host animal induced by a reduction in methanogenesis.