

# AGRO CAMPUS

---

## OUEST

**Lucile HERVÉ • 8 décembre 2017**

Thèse AGROCAMPUS OUEST  
sous le label de l'Université de Bretagne Loire  
pour obtenir le grade de  
**DOCTEUR D'AGROCAMPUS OUEST**  
Spécialité Biologie et physiologie animales

ÉCOLE DOCTORALE • Écologie, Géosciences, Agronomie et  
Alimentation (EGAAL)

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

**L'exfoliation des cellules  
épithéliales mammaires :  
mécanismes de régulation, rôle  
dans la détermination  
du nombre de cellules dans la  
glande mammaire et influence  
sur la production laitière**

**Pierre Guy MARNET**

Professeur, AGROCAMPUS OUEST, Rennes / *président*

**Gerardo CAJA**

Professeur, Universitat Autònoma de Barcelona / *rapporteur*

**Christian HANZEN**

Professeur, Université de médecine vétérinaire de Liège /  
*rapporteur*

**Anne SAURET**

Docteur en Pédiatrie, CHU de Rennes / *examinatrice*

**Madia CHARLIER**

Chargée de recherche, INRA Jouy-en-Josas / *examinatrice*

**Hélène QUESNEL**

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

**Marion BOUTINAUD**

Chargée de recherche, UMR INRA-AO PEGASE / *co-encadrante*



## THESE / AGROCAMPUS OUEST

Sous le label de l'Université Bretagne Loire

pour obtenir le diplôme de :

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

Spécialité : « Biologie et Physiologie Animales »

**École Doctorale : « Écologie, Géosciences, Agronomie et Alimentation »**

présentée par :

**Lucile HERVE**

**L'EXFOLIATION DES CELLULES EPITHELIALES MAMMAIRES : MÉCANISMES  
DE RÉGULATION, RÔLE DANS LA DETERMINATION DU NOMBRE DE  
CELLULES DANS LA GLANDE MAMMAIRE ET INFLUENCE SUR LA  
PRODUCTION LAITIERE**

soutenue le 8 décembre 2017 devant la commission d'Examen

### Composition du jury :

<b>Président de jury</b>	Pierre-Guy Marnet	Professeur, Agrocampus Ouest Rennes, France
<b>Rapporteur</b>	Gerardo Caja	Professeur, Universitat Autònoma de Barcelona, Espagne
<b>Rapporteur</b>	Christian Hanzen	Professeur, Université de médecine vétérinaire de Liège, Belgique.
<b>Examineur</b>	Anne Sauret	Docteur en Pédiatrie, CHU de Rennes, France
<b>Examineur</b>	Madia Charlier	Chargée de recherche, INRA Jouy-en-Josas, France
<b>Directrice de thèse</b>	Hélène Quesnel	Directrice de recherche, INRA Saint-Gilles, France
<b>Encadrante</b>	Marion Boutinaud	Chargée de recherche, INRA Saint-Gilles, France



## Remerciements

Au travers des 8 prochaines pages sur les presque 250 que compte mon manuscrit, il m'est donné la possibilité de remercier l'ensemble des personnes qui ont contribué de près ou de loin au bon déroulement de ma thèse et qui ont fait de ces trois années une expérience inoubliable. Je n'arrive pas à croire que j'en sois déjà arrivée à ce chapitre des remerciements de ma thèse. Ces trois années sont passées tellement rapidement que j'ai l'impression que mes débuts à l'INRA de Saint-Gilles étaient hier... Et pourtant il s'en est passé des choses pendant ces trois ans !

Ces trois années de thèse représentent pour moi bien plus qu'une simple expérience professionnelle (oui, parce que on ne l'aura jamais assez répété, les doctorants ne sont pas des stagiaires !). Ces trois ans de thèse symbolisent pour moi...

### ... Trois ans de travail acharné.

Au cours de ces trois ans, il y aura eu de nombreux réveils (très) matinaux pour prélever du lait à la traite et réaliser des cinétiques sanguines, de nombreux départs tard le soir pour rédiger un dossier de demande de bourse, lancer les dernières stats et terminer un papier, et quelques week-ends passés à l'INRA pour rédiger ce manuscrit. Ce travail m'a demandé une forte implication personnelle mais avant tout, il a été rendu possible grâce à l'investissement d'un grand nombre de personnes.

Tout d'abord, ce travail n'aurait pas pu voir le jour ni être présenté lors des différents congrès auquel j'ai participé sans le soutien financier d'**Agrocampus-Ouest**, de l'**INRA** (au travers de l'équipe Lactation et du métaprogramme GISA), de la **Région Bretagne**, de l'**Association GALA**, de l'**Académie d'Agriculture de France**, l'**Université Européenne de Bretagne** et de l'**European Federation of Animal Science**.

Ma thèse a été réalisée à l'INRA de Saint-Gilles au sein de l'UMR PEGASE. Je tiens donc à remercier **Jaap van Milgen** ainsi que tous les membres de l'unité pour leur accueil. Je souhaite aussi remercier l'équipe SAD et en particulier **Christine, Laurence, Emilie, Marie-Claude** et **Laetitia** pour leur gentillesse même si je les ai souvent embêtées avec une erreur badgeuse, une publi introuvable, une commande urgente ou la logistique de ma soutenance.

Merci à l'équipe Lactation (ex et actuelle), à savoir, **Clémence, Clémentine, Colette, Éric, Fred, Hélène, Jacques, Jocelyne, Laurence, Magda, Marion, Perrine, Sabrina, Sandra, Sophie** et **Vanessa**, pour leur accueil, leur aide lors de la préparation des différents congrès mais aussi pour les moments moins studieux notamment lors des repas d'équipe.



Je remercie aussi les membres de mon comité de thèse, **Nathalie Bareille, Laurence Bernard, Valérie Gagnaire, et Pierre Germon** ainsi que mon tuteur de l'école doctorale VAS, **François Ferrière**, pour les discussions constructives et les précieux conseils délivrés lors de mes comités de thèse. Un merci plus particulier à **Laurence Bernard** pour sa gentillesse, sa bienveillance et ses encouragements.

### ... 3 ans d'expés.

Mon travail de thèse repose sur 6 expérimentations *in vivo* dont 5 ont été réalisées à la ferme expérimentale de Méjusseume. A peine arrivée à l'INRA, il donc a fallu enfilez ma cotte et mes bottes pour aller à la traite récolter de nombreux échantillons de lait et de sang. Le bon déroulement des essais a été assuré par toute l'équipe de Méju. Merci à **Jacques Lassalas** pour m'avoir permis de réaliser ces essais et pour avoir partagé avec **Marion** et moi une sympathique soirée dans les bars clermontois. Je tiens aussi à remercier **Philippe Lambert** et toute l'équipe « Physio », j'ai nommé **Daniel Chevrel, André Cozien, Jean-Luc Harel, Pierre-Yves Pennober, Maryvonne Texier** et **Jean-Yves Thébaud** ainsi que **David Sidaner** et toute l'équipe « Étable » à savoir, **Gaël Boulet, Jérémy Eslan, Antoine Eveno, Michel Fargetton, Mathieu Guilloux, Gaëlle Mandrile, Arnaud Mottin, Joseph Orinel, Jean Parois, Françoise Pichot, Patrick Pichot** et **Ginette Théaud**. Merci pour votre aide lors des nombreux prélèvements de lait et de sang. Merci de votre bonne humeur même si je vous ai obligé à prélever du lait de fin de traite à la main, à faire des prises de sang sur le roto ou encore à réaliser de nombreuses biopsies mammaires.

### ... 3 ans de labo.

Ce travail représente aussi de nombreuses heures au laboratoire. Mes prochains remerciements iront donc à tous les techniciens de labo qui m'ont apporté une aide indispensable dans l'analyse des échantillons.

Je débute par remercier **Margaux, Marion, Perrine, Sabrina** et **Sandra** pour tout le lait centrifugé et écrémé, et toutes les cellules lavées et comptées lors des nombreuses séances de cellules du lait. J'en profite aussi pour m'excuser auprès de mes collègues voisins du labo 22 pour le bruit occasionné, il paraît que l'on nous entendait rigoler jusqu'à l'autre bout du couloir...

Merci à **Colette, Maryline, Morgane, Nicole, Perrine, Sabrina, Sandra** et **Stéphanie** pour les dosages de lactose, de métalloprotéases, d'azote, de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , les IDR, les PCR, les heures passées à couper, colorer et observer des lames de glande mammaire au microscope et pour les nombreux pots à laver et tubes à stériliser. On a l'impression que je n'ai pas fait grand-chose, mais je vous jure, je les ai aidé ! :p





Je remercie aussi **Jacques** qui a énormément contribué à mon travail par le dosage des différentes hormones. Notre collaboration a commencé il y a 5 ans de ça lors de mon stage de Master 1 par le dosage de la progestérone dans plusieurs milliers d'échantillons de lait, le tout dans un petit labo pas très récent et avec un lecteur de plaques qui nous a lâchés à mi-parcours... Sache que ce fût un plaisir de pouvoir retravailler avec toi lors de ma thèse et maintenant, je te souhaite de doser de la prolactine, de l'ocytocine et du cortisol encore longtemps dans ton labo high tech du nouveau bâtiment 15 !

Et comme chaque petite pierre à l'édifice est importante, je remercie **Thibaud**, qui par le simple fait de nous allumer la centrifugeuse le matin des manips cellules du lait, nous a fait gagner un temps précieux lors de ces journées bien chargées.

J'ai aussi une pensée particulière pour **Margaux**, stagiaire (de chic et) de choc que j'ai pu encadrer lors de l'année 2016. Toujours prête à me prêter main-forte que ce soit à la ferme ou au labo, tu m'as apporté une aide indispensable, et toujours dans la bonne humeur. Sans toi, le rythme effréné imposé par les expés 1601 et 1603 aurait été difficile à tenir. Je te souhaite de trouver le boulot qui te conviendra (au Mans si possible !) et n'oublies pas de me prévenir si jamais tu repasses par Rennes, ce sera toujours un plaisir de partager du temps avec toi.

#### ... 3 ans de bureau.

Enfin, ce travail est l'aboutissement de longues heures passées dans mon bureau, devant mon ordinateur. Ces heures auraient été beaucoup moins agréables si elles n'avaient pas été passées en la compagnie de **Sabrina**. Nous sommes arrivées quasiment en même temps à l'INRA, nous avons pris nos marques ensemble et nous avons tout de suite été sur la même longueur d'onde. Merci pour ta gentillesse, ton écoute, ton aide et pour toutes les discussions que nous avons pu partager dans ce bureau. Je fais aussi un bisou sur les grosses joues de **Sarah** et **Nolan** ; même si leur naissance a impliqué que la chaise en face de moi se soit retrouvée vide pendant presque 10 mois, je vous souhaite le meilleur à toi et ta petite famille. Une petite pensée pour **Maryline**, qui partageait aussi pas mal de nos conversations de l'autre côté de sa fenêtre.

#### ... Un manuscrit et une soutenance.

Ces trois ans de travail ont permis d'aboutir à la rédaction de ce manuscrit et à la présentation de mon travail lors de ma soutenance.

Je remercie grandement les membres de mon jury, **Pierre-Guy Marnet**, **Gerardo Caja**, **Christian Hanzen**, **Madia Charlier** et **Anne Sauret** pour avoir accepté de participer à



l'évaluation de mon travail en tant que président de jury, rapporteurs et examinatrices, respectivement. Merci pour les discussions qui ont eu lieu durant la soutenance et pour vos remarques qui permettront d'enrichir les papiers à venir et qui ont amené de nouvelles perspectives à mon travail.

Lors de cette soutenance, j'ai pu avoir le soutien de ma famille (frères, oncles, tantes, cousins, cousines et grands-parents venus en force des 4 coins de la France). Merci à eux de s'être intéressé à l'exfoliation des cellules épithéliales mammaires dans le lait de vache, même si le monde de la biologie de la lactation est loin du leur. Et selon leurs dires, « c'était super et on a même compris des trucs ! ». Je remercie aussi mes parents, **Christophe** et **Marilyne**, qui m'ont toujours soutenue dans mes choix d'études et dans ma vie tout simplement (même s'ils ont mis trois ans à se souvenir que j'avais deux « directrices » de thèse et non deux « maîtres » de thèse). La présence de mes amis et de mes collègues lors de ce moment très émouvant pour moi (et oui, vous aviez vu juste, j'ai pleuré !) en a fait une journée que je n'oublierai pas de sitôt !

**... Deux encadrantes de rêve (ou même trois !).**

Dans la réalisation de cette thèse, j'ai été encadrée par deux chercheuses de choix, **Marion** et **Hélène**. Je souhaite vous remercier chaleureusement de m'avoir donné la chance de réaliser cette thèse, de m'avoir soutenue et encouragée et d'avoir toujours été présentes pour m'épauler et répondre à mes sollicitations tout en me laissant autonome dans la gestion de mon projet de thèse.

**Marion**, au début de ma thèse, tu aurais voulu que l'on participe à la formation doctorant/encadrant EDEN. La première fois, cela a été impossible à cause du planning des expés. La seconde fois, c'est moi qui ai dit que je n'avais pas trop envie d'y aller afin de ne pas prendre le risque de « dérégler notre couple », qui à mon avis, fonctionnait bien. Et tu vois, finalement, on s'en est plutôt bien sorties ! En tout cas, je te remercie d'avoir été une encadrante présente au quotidien. Je ne compte plus le nombre de fois où je suis venue frapper à ta porte et j'y ai toujours trouvé une personne attentive, prête à répondre à mes interrogations ou à me soutenir lorsque j'avais des petites baisses de moral.

**Hélène**, merci pour ta rigueur, pour ta gentillesse, pour tes conseils, pour ton intérêt et ton implication de spécialiste de la lactogénèse et du colostrum chez la truie dans la compréhension du processus d'exfoliation chez la vache laitière et pour les nombreuses discussions scientifiques et non-scientifiques. Je te remercie aussi pour tes (nombreux) commentaires sur mes demandes de bourses, mes abstracts, mes articles et sur ce manuscrit. Même si, je l'avoue, cela était parfois dur pour moi de recevoir tes corrections, je



sais que cela était toujours réalisé avec bienveillance et avait pour objectif d'améliorer mon travail.

Grâce à vous deux, ces trois années de thèse se sont déroulées dans les meilleures conditions qu'il soit. Je mesure la chance que j'ai eu d'avoir été encadrée par vous deux et je souhaite à tous les futurs thésards d'être encadrés par des personnes telles que vous.

J'ai aussi une pensée pour **Vanessa** qui s'est impliquée dans une grande partie de mon projet malgré son agenda très chargé d'enseignante-chercheuse. Merci pour ta bienveillance, tes conseils et ta gentillesse.

### ... Trois ans de voyages.

Au cours de ma thèse, j'ai eu la chance de réaliser un séjour de trois mois à Sherbrooke au Canada au sein du Centre de Recherche et Développement sur le bovin laitier et le porc d'Agriculture et Agroalimentaire Canada. Je tiens à remercier **Pierre Lacasse** pour avoir accepté de m'accueillir dans son équipe, **Frédéric Beaudoin** pour m'avoir convertie aux joies de la cytométrie de flux et pour m'avoir accueillie dans son petit chalet dans la forêt, ainsi que **Samuel Lanctot**, **Luca Lo Verso**, **Séverine Ollier**, **Véronique Roy**, **Izabella Thompson**, **JinJin Tong** et **Noémie Vanacker** pour m'avoir si gentiment intégrée au centre de recherche, pour avoir partagé avec moi quelques weekends randonnée, soirée nachos et virée au cinéma et pour m'avoir fait découvrir et aimer ce beau pays qu'est le Canada. Merci **Noémie** et **Jinjin** pour l'inoubliable soirée poney ; je me souviendrai longtemps de la route entre le centre de recherche et le centre équestre (entre **Jinjin** qui ne voulait pas conduire sa voiture car elle avait peur d'avoir un accident et **Noémie**, n'ayant pas le permis à l'époque, qui m'expliquait comment conduire une voiture automatique car je n'avais jamais fait ça de ma vie !) et de la première fois de **JinJin** sur un cheval ! Merci aussi à **Estelle Talouarn**, expatriée tout comme moi loin de la France, pour nos virées en ville et notre weekend à la découverte de Montréal ! Au passage, merci à **Sandy** et **Séverine** d'avoir pris soin de **Rozenn** pendant mon absence.

J'ai aussi eu la chance de participer à différents congrès à l'étranger. Tout d'abord le congrès de l'EAAP à Belfast en Août 2016. Nous sommes partis à une dizaine de doctorants direction l'Irlande du Nord pour un congrès qui s'annonçait studieux : un workshop, des présentations, des posters, la visite de fermes irlandaises... mais c'était sans compter sur la soirée « Prof in the pub » dont certains (ou plutôt certaine : spéciale cass-dédi à **Dr Kadérec**, le docteur le plus tatoué de l'ouest :p) se souviennent encore (ou pas d'ailleurs !).



Puis, il y a eu l'ASAS à Baltimore en Juillet 2017. Lors de ce congrès, j'ai pu rencontrer des pointures de la physiologie de la lactation et leur présenter mon travail. Mais ce congrès a aussi permis une halte à New York chez **Emilie**, ma sœur de cœur, que je n'avais pas revue depuis son expatriation. **Emilie**, c'est donc le moment de te remercier pour ton soutien et ton amitié sans faille. Maintenant que j'ai un peu plus de temps libre et que tu es de retour en France, nous allons, je l'espère, pouvoir nous voir plus souvent. Je profite de ce paragraphe pour avoir une petite pensée pour toutes mes sœurs rencontrées à Tours il y a maintenant 4 ans, **Debora** - do Brasil -, **Rebe** - mi hermana mexicana - et **Ophélie** - Elastic woman - qui malgré la distance sont toujours présentes. **Ophélie**, merci de m'avoir fait la surprise de ta présence à ma soutenance, rien n'aurait pu me faire plus plaisir !

### ... Un an d'enseignement.

Lors de ma thèse, j'ai eu l'opportunité de réaliser une mission d'enseignement au sein de l'unité pédagogique Sciences et Productions Animales d'Agrocampus Ouest. Je remercie donc toutes les personnes de l'équipe SPA, à savoir, **Anne-Lise, Catherine, Clara, Jacques, Jocelyne, Justine, Lucile, Marie-Emmanuelle, Marilyne, Pierre-Guy, Vanessa** et **Yannick**. Je vous ai tout d'abord connus en tant qu'étudiante lors de mon Master, puis en tant qu'apprentie-chercheuse au début de ma thèse et enfin en tant que collègue enseignante puisque vous m'avez considérée comme telle dès le début de ma mission. Vous m'avez laissé une grande autonomie tout en m'épaulant et me rassurant quand j'en avais besoin et je vous en remercie. Un merci particulier à **Nicolas** qui m'a accueillie dans son bureau lors des journées passées à l'Agro.

Je remercie aussi la promo 2016/2018 du Master SAED et de la spé Ingénierie Zootechnique d'avoir été de gentils étudiants lors de mes débuts en tant qu'enseignante. Je garderai un souvenir particulier de **Clarisse, Emilie, Guillaume, Mélissa, Quentin, Richard** et **Victor** avec qui j'ai pu partager ma passion de l'exfoliation lors du module de « Projet de Biologie expérimentale ».

### ... Trois ans de fous rires et de ragots.

Merci à **Catherine, Laurence, Marion, Maryline, Nicole, Perrine, Sabrina, Sandra, Sophie** et **Thibaud**, la « **Team Potins** » comme certains se plaisent à la nommer, pour tous les repas et les pauses café à débattre de sujets plus ou moins brûlants (tels que « L'amour est dans le pré ») que nous avons partagé ensemble tout au long de ces trois ans.

### ... Trois ans de mots fléchés.

Je remercie le « **Club des cruciverbistes du midi** » avec à sa tête le maître des mots-fléchés, à savoir **Jean-Noël**, suivi de près par **Thibaud** et par les aspirants au titre de docteur ès mots-





fléchés, **Alice, Cléo, David** et **Pierre** ; il ne faut pas désespérer, un jour nous arriverons à faire une grille entière et sans rature !

**... Trois ans de bons petits plats.**

Merci à **Marina et les filles** pour tous les bons repas concoctés (Et oui, c'est aussi important de reprendre des forces ! :p) et pour la pensée que vous avez eu pour moi, même si vous n'avez pas pu être présentes le jour de ma soutenance. Surtout, gardez la bonne humeur et le sourire qui vous caractérisent. Et merci aussi de vous être investies dans la préparation du repas de la JDD 2017 !

**... Trois ans de décompression.**

Puisqu'une thèse, ce n'est pas seulement du travail, du travail et encore du travail, je remercie toutes les personnes qui m'ont permis de relâcher un peu la pression au cours de ces trois ans.

Merci à **Alice, Elise, Estelle, Ophélie, Pierre** et **Tristan**, la « **Team escape game** », qui ont vaincu de fantôme de la tante Ernestine, sauvé JFK et ont (presque) sauvé le monde de la 3<sup>ème</sup> guerre mondiale !

Je remercie l'ensemble des stagiaires et doctorants, **Alice, Amélie, Auriane, Clémence, Clément, Clémentine, Cléo, David, Elise, Hieu, Luc, Magda, Margaux, Mathilde, Neus, Nico, Pierre, Sandy** et **Séverine** ainsi que mes amis **Camille, Estelle, Eva** et **Nico, Momo** et **Sarah, Flo** et **bébé Agathe**, qui m'ont permis de m'aérer l'esprit grâce à une discussion au détour d'un couloir, une balade à cheval, une soirée sushis, un sauvetage de drone, un bubble soccer, un restau, une journée à la plage...

Merci à **Isabelle** d'avoir pris soin de **Rozenn** pendant ces trois années. La savoir entre de bonnes mains m'a permis d'être plus sereine et de profiter pleinement d'elle lorsque je venais aux écuries. Merci aussi à **Anna, Audrey, Camille, Caro, Elsa, Louise, Lucie, Marie** et **Pauline** pour avoir partagé avec moi un cours, une séance en carrière, une balade ou tout simplement une petite discussion dans les écuries. Et surtout, merci à **Rozenn**, qui aura été une bulle d'oxygène me permettant de m'évader du travail pendant quelques heures par semaine. J'ai essayé de venir m'occuper de toi le plus régulièrement possible malgré le fait que ma thèse occupait une grande partie de mon emploi du temps mais maintenant, promis, je vais te consacrer le temps que tu mérites !



**... Trois ans d'amitié.**

Cette thèse symbolise aussi pour moi la rencontre avec des personnes qui sont devenues bien plus que des collègues.

**Elise**, à t'écouter, nous n'avons pas commencé du bon pied puisque je t'aurais lancé un « bon tu le prends ton lait ou pas ? » sur un ton des plus aimable seulement quelques jours après mon arrivée. C'est marrant parce que je ne me souviens pas du tout de ce moment. Tout ce dont je me souviens, c'est nos soirées sushis à parler jusque 3h du mat, nos balades en forêt ou à la plage, nos fous rires, nos vacances à Madère ou en Thaïlande, nos après-midi à l'Aquatonic et j'en passe. Merci pour tous ces moments passés ensemble et pour ceux à venir. Pour résumer, je te dirai simplement merci d'être toi et d'être là pour moi.

**Alice**, tu as toujours été un soutien pour moi et notamment lors de la dernière année de thèse. Nous avons partagé beaucoup de discussions ensemble, dans la cafèt ou dans ton petit bureau. Nous avons aussi beaucoup ri et quelque fois pleuré. Nous avons surtout vécu notre fin de thèse à 15 jours d'intervalle, partagé les quelques weekends passés à l'INRA, le stress que nos papiers soient acceptés, mais aussi la fierté lors de l'impression de nos manuscrits. Tout cela a sans doute permis d'encore plus nous rapprocher et je souhaite que notre amitié dure encore longtemps.

**Pierre**, je te remercie pour toutes les gentilleses que tu m'as dites pendant ces trois ans et pour toutes celles que tu me diras dans les années à venir, pour tous les fils au coca que tu n'as pas voulu me donner et pour tous les moments que nous avons partagés.

**David**, nous sommes bien différents tous les deux mais je crois que ton humour a tout de suite matché avec le mien. Tu m'auras provoqué de nombreux fous rires à la pause-café ou lors des repas à la cantine notamment avec l'invention d'expressions mythiques qu'il n'est pas possible d'écrire ici.

**Sandra**, ma petite maman de l'INRA. Merci pour ta gentillesse, pour m'avoir écoutée pendant de nombreuses heures lors des petits moments de doute, de déprime, de tristesse mais aussi de joie ! Tout simplement merci pour ta présence au quotidien, je sais que la fin de cette thèse ne marque pas la fin de notre amitié.

**Bref, merci à tous ceux qui ont fait partie de mon quotidien pendant ces trois ans  
inoublables !**

**C'est parti pour de nouvelles aventures !**



# SOMMAIRE

<i>Liste des publications</i> .....	4
<i>Liste des figures et tableaux</i> .....	7
<i>Liste des abréviations</i> .....	14
<i>Introduction</i> .....	16
<i>Synthèse bibliographique</i> .....	19
<b>Chapitre 1 - La glande mammaire, organe spécialisé dans la production du lait</b> .....	<b>21</b>
1. Description morphologique et anatomique de la glande mammaire .....	21
2. Développement de la glande mammaire .....	22
2.1. De l'embryogenèse à la puberté .....	23
2.2. Au cours de la vie adulte .....	23
3. Composition du lait, synthèse et voie de sécrétion des différents constituants du lait par la cellule épithéliale mammaire .....	24
3.1. Constituants majeurs du lait .....	25
<i>Les protéines.</i> .....	25
<i>Les lipides.</i> .....	26
<i>Les glucides.</i> .....	26
<i>Autres constituants.</i> .....	27
3.2. Cellules du lait .....	27
<b>L'essentiel</b> .....	<b>30</b>
<b>Chapitre 2 - La lactation, une fonction régulée par de nombreuses hormones</b> .....	<b>32</b>
1. La prolactine .....	32
2. L'ocytocine .....	33
3. L'hormone de croissance .....	34
4. Les facteurs de croissance de la famille des insulin-like growth factors .....	35
5. Les stéroïdes ovariens .....	36
6. Les glucocorticoïdes .....	37
<b>L'essentiel</b> .....	<b>39</b>
<b>Chapitre 3 - Le nombre de cellules épithéliales mammaires dans la glande mammaire, un facteur déterminant de la production laitière</b> .....	<b>41</b>
1. Mécanismes de régulation du nombre de cellules épithéliales mammaires dans la glande mammaire .....	41
1.1. Equilibre entre prolifération cellulaire et mort cellulaire par apoptose .....	41
<i>Prolifération cellulaire.</i> .....	41
<i>Mort cellulaire par apoptose.</i> .....	42
<i>Equilibre entre prolifération cellulaire et apoptose dans la glande mammaire.</i> .....	43
1.2. Exfoliation des cellules épithéliales mammaires dans le lait .....	43
2. Facteurs influençant la production laitière et le nombre de cellules épithéliales mammaires dans la glande mammaire .....	44



2.1. Statut endocrinien et stade de lactation .....	44
<i>Avancée de la lactation.</i> .....	44
<i>Stéroïdes ovariens.</i> .....	45
<i>Inhibition de la prolactine au cours de la lactation.</i> .....	46
<i>Inhibition de la prolactine pendant l'involution mammaire.</i> .....	47
<i>Sérotonine et involution mammaire.</i> .....	48
<i>Hormone de croissance.</i> .....	49
2.2. Pratiques d'élevage .....	49
<i>Fréquence de traite.</i> .....	49
<i>Photopériode.</i> .....	51
<i>Alimentation.</i> .....	53
2.3. Statut infectieux .....	54
<b>L'essentiel .....</b>	<b>56</b>
<b>Chapitre 4 - La perte d'intégrité de l'épithélium mammaire, phénomène concomitant à l'exfoliation .....</b>	<b>58</b>
1. Les jonctions cellulaires garantissent l'intégrité de l'épithélium mammaire .....	58
2. La régulation hormonale de l'intégrité de l'épithélium mammaire .....	58
3. Les indicateurs de l'intégrité de l'épithélium mammaire .....	59
4. Le lien entre l'exfoliation des cellules épithéliales mammaires et l'intégrité de l'épithélium .....	60
<b>L'essentiel .....</b>	<b>63</b>
<b><i>Objectifs et Stratégie expérimentale .....</i></b>	<b><i>64</i></b>
<b><i>Résultats .....</i></b>	<b><i>70</i></b>
<b>Chapitre 1 - La régulation du processus d'exfoliation des cellules épithéliales mammaires au moment de la traite .....</b>	<b>71</b>
Partie 1 - Le lien entre les hormones libérées à la traite, l'intégrité de l'épithélium mammaire et l'exfoliation des cellules épithéliales mammaires au cours de la traite .....	72
Partie 2 - L'ocytocine participe à la régulation du processus d'exfoliation et à la perte de l'intégrité de l'épithélium chez la vache laitière .....	74
<b>Chapitre 2 - Rôle du processus d'exfoliation dans la détermination du nombre de cellules épithéliales mammaires dans la glande mammaire et influence sur la production laitière .....</b>	<b>89</b>
Partie 1 - Effet de l'alimentation .....	90
1.1. Effet d'une restriction alimentaire et de la nature du fourrage .....	90
1.2. Effet d'une restriction alimentaire .....	100
Partie 2 - Effet de la photopériode et de l'inhibition de la prolactine au cours de la lactation .....	122
Partie 3 - Effet d'un traitement à l'hormone de croissance bovine .....	138
<b><i>Discussion .....</i></b>	<b><i>146</i></b>
1. Limites méthodologiques de l'estimation du taux d'exfoliation .....	148
1.1. Les techniques d'estimation du taux d'exfoliation .....	148
1.2. Le taux d'exfoliation, un paramètre très variable .....	151
2. Les mécanismes biologiques impliqués dans la régulation du processus d'exfoliation .....	152
2.1. L'exfoliation est sous contrôle des hormones libérées à la traite .....	152
<i>L'ocytocine.</i> .....	152
<i>La prolactine.</i> .....	154
<i>Le cortisol.</i> .....	155





2.2.	L'exfoliation est-elle sous contrôle d'autres hormones ? .....	155
2.3.	Lien entre exfoliation des CEM et intégrité de l'épithélium mammaire .....	157
	<i>L'intégrité de l'épithélium mammaire est-elle modulée en réponse à différents facteurs ? .....</i>	<i>157</i>
	<i>L'exfoliation des CEM est-elle associée à une perte d'intégrité de l'épithélium ? .....</i>	<i>159</i>
	<i>Exfoliation des CEM et perte d'intégrité de l'épithélium : cause ou conséquence ? .....</i>	<i>160</i>
3.	<b>Le rôle du processus d'exfoliation dans la régulation du nombre de cellules épithéliales mammaires et influence sur la production laitière .....</b>	<b>161</b>
3.1.	L'exfoliation est influencée par certains facteurs d'élevage et environnementaux .....	161
3.2.	Le lien entre exfoliation et production laitière.....	162
4.	<b>Le taux d'exfoliation, un marqueur phénotypique de la persistance de la lactation ?.....</b>	<b>165</b>
	<b><i>Conclusion .....</i></b>	<b><i>167</i></b>
	<b><i>Références bibliographiques .....</i></b>	<b><i>170</i></b>
	<b><i>Annexes.....</i></b>	<b><i>191</i></b>



## Liste des publications

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont fait l'objet des publications et communications suivantes :

### Articles scientifiques

M. Boutinaud, **L. Herve**, V. Lollivier (2015). Mammary epithelial cells isolated from milk are a valuable, non-invasive source of mammary transcripts. *Frontiers in Genetics* 6:323.

**L. Herve**, H. Quesnel, V. Lollivier, M. Boutinaud (2016). Regulation of cell number in the mammary gland by controlling the exfoliation process in milk in ruminants. *Journal of Dairy Science* 99:854–863.

**L. Herve**, H. Quesnel, V. Lollivier, J. Portanguen, R. M. Bruckmaier, M. Boutinaud (2017). Mammary epithelium disruption and mammary epithelial cell exfoliation during milking in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 100 (12):9824-9834 doi : <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2017-13166>

**L. Herve**, V. Lollivier, H. Quesnel, M. Boutinaud (2017). Oxytocin stimulates mammary epithelial cell exfoliation and epithelium disruption. *Journal of Endocrinology* (Soumis).

**L. Herve**, H. Quesnel, V. Lollivier, M. Veron, R. M. Bruckmaier, M. Boutinaud (2017). Milk yield loss is associated with mammary epithelial cell exfoliation in response to feed-restriction in dairy cows. *Journal of Dairy Science* (En préparation).

**L. Herve**, V. Lollivier, H. Quesnel, M. Veron, R. M. Bruckmaier, M. Boutinaud (2017). *Journal of Dairy Science* (En préparation).

### Communications orales en congrès international

**L. Herve**, V. Lollivier, H. Quesnel, M. Boutinaud (2015). Regulation of cell number in the mammary gland via the control of the exfoliation process in milk in ruminants. ADSA-ASAS Joint Annual Meeting, 12-16 July 2015, Orlando, USA.

**L. Herve**, H. Quesnel, S. Wiart, P. Lamberton, C. Mustière, V. Lollivier, M. Boutinaud (2016). Myoepithelial cell contraction participates in mammary epithelial cell exfoliation in cow milk. 67th Annual Meeting of the European Federation of Animal Science, 29 Aug-2 Sept 2016, Belfast, United Kingdom.

**L. Herve**, M. Veron, P. Lamberton, S. Wiart, P. Debournoux, S. Philau, C. Mustière, H. Quesnel, M. Boutinaud (2017). Feed restriction increases mammary epithelial cell exfoliation rate in dairy cows. ASAS-CSAS Annual Meeting & Trade Show, 8-12 July 2017, Baltimore, USA.



### **Communication orale en congrès national**

**L. Herve**, V. Lollivier, H. Quesnel, M. Boutinaud (2016). Les cellules épithéliales mammaires dans le lait comme indicateur du turnover cellulaire dans la mamelle. XVe Journées de l'animation transversale Glande mammaire, Lait, 17 et 18 novembre 2016, Theix, France.

### **Affiches en congrès international**

**L. Herve**, M. Veron, E. Vanbergue, H. Quesnel, C. Hurtaud, M. Boutinaud (2017). Effect of feed restriction and nature of forage on the mammary exfoliation rate in dairy cows. ASAS-CSAS Annual Meeting, BOLFA symposium: The Biology of Lactation - From Genes to Cells to Milk, 8 July 2017, Baltimore, USA.

**L. Herve**, V. Lollivier, P. Lamberton, S. Wiart, S. Philau, H. Quesnel, M. Boutinaud (2016). Caractérisation du processus d'exfoliation des cellules épithéliales mammaires au cours de la traite chez la vache laitière. Rencontres autour des Recherches sur les Ruminants, Paris, France.

**L. Herve**, V. Lollivier, P. Lamberton, S. Wiart, S. Philau, H. Quesnel, M. Boutinaud (2016). Characterizing the mammary epithelial cell exfoliation process during milking in dairy cows. 67th Annual Meeting of the European Federation of Animal Science, 29 Aug-2 Sept 2016, Belfast, United Kingdom.

### **Affiches en congrès national**

**M. Boutinaud**, **L. Herve**, P. Debournoux, S. Wiart, V. Lollivier (2015). Les cellules épithéliales du lait comme alternative aux biopsies mammaires, Colloque OPAL & FRANCOPIA « Place des méthodes de remplacement en expérimentation biologique », 4 novembre 2015, Paris, France.

### **Communications internes à l'UMR PEGASE**

**L. Herve** (2015). Caractérisation de l'exfoliation des cellules épithéliales mammaires au cours de la traite chez la vache laitière. Présentation des résultats aux Installations Expérimentales Production Laitière (IEPL), Le Rheu, France.

**L. Herve** (2016). L'exfoliation des cellules épithéliales mammaires est stimulée par la contraction des cellules myoépithéliales. Journée des Doctorants. Saint-Gilles, France.

**L. Herve** (2016). Effet de la restriction alimentaire sur l'exfoliation des cellules épithéliales mammaires dans le lait chez la vache laitière. Présentation des résultats aux Installations Expérimentales Production Laitière (IEPL), Le Rheu, France.



**L. Herve** (2017). Rôle du processus d'exfoliation dans la régulation du nombre de cellules épithéliales mammaires dans la mamelle et influence sur la production laitière. Journée des Doctorants. Saint-Gilles, France.

**L. Herve** (2017). Effet de la prolactine et de la photopériode sur l'exfoliation des cellules épithéliales mammaires dans le lait chez la vache laitière. Présentation des résultats aux Installations Expérimentales Production Laitière (IEPL), Le Rheu, France.

### **Vulgarisation scientifique**

Animation de l'atelier « A la découverte des cellules productrices de lait ». Portes ouvertes pour les 70 ans de l'INRA, 27 et 28 mai 2016.

### **Bourses**

Bourse de mobilité sortante des doctorants du Collège Doctoral International de l'Université Européenne de Bretagne pour participer au projet « Rôle de l'hormone de croissance dans la régulation de l'exfoliation des cellules épithéliales mammaires dans le lait » au Centre de Recherche et Développement sur le bovin laitier et le porc (Agriculture et Agroalimentaire Canada, Sherbrooke, QC, Canada) - Montant : 2000 €

Bourse de l'European Federation of Animal Science (EAAP) pour la présentation sous forme de communication orale de « Myoepithelial cell contraction participates in mammary epithelial cell exfoliation in cow milk » au congrès annuel de l'EAAP 2016 (Belfast, UK) - Montant : 800 €

Bourse Jean et Marie-Louise Dufrenoy de l'Académie d'Agriculture de France pour la présentation sous forme d'une communication orale de « Feed restriction increases mammary epithelial cell exfoliation rate in dairy cows » au congrès annuel de l'American Society of Animal Science 2017 (Baltimore, USA) - Montant : 2250 €





## Liste des figures et tableaux

### FIGURES

#### Synthèse bibliographique

- Figure 1** : Structure de la glande mammaire (1) de primates, rongeurs et lagomorphes et (2) de ruminants (d'après Delouis et al., 2001). 21
- Figure 2** : Structure d'une alvéole mammaire (d'après Delouis et al., 2001). 21
- Figure 3** : Structure et fonctionnement de la cellule épithéliale mammaire (d'après Williams et Daniel, 1983; Delouis et al., 2001; Radisky et al., 2003). 22
- Figure 4** : Évolution de la glande mammaire depuis la phase embryonnaire jusqu'à la lactation. Le cycle mammogénèse II-lactogénèse-galactopoïèse-involution se reproduit à chaque lactation (d'après Martinet et Houdebine, 1993). 22
- Figure 5** : Évolution des concentrations plasmatiques de progestérone (P<sub>4</sub>), d'hormone placentaire lactogène (PL), de prolactine (PRL) et d'oestradiol (E<sub>2</sub>) chez la brebis pendant la gestation et la lactation (d'après Delouis et al., 2001). 24
- Figure 6** : Régulation hormonale de la fonction de lactation (d'après Yart, 2012). 32
- Figure 7** : Voie de signalisation de la prolactine (PRL, d'après Bole-Feysot et al., 1998 et Freeman et al., 2000). 32
- Figure 8** : Réflexe neuroendocrine d'éjection du lait. 33
- Figure 9** : Voie de signalisation des hormones stéroïdiennes (oestradiol et progestérone, Yart, 2012). 36
- Figure 10** : Cycle cellulaire de la cellule épithéliale mammaire (Delouis et al., 2001). 41
- Figure 11** : Evolution des caractéristiques morphologiques des cellules au cours du processus d'apoptose (d'après Kerr et al., 1972). 42
- Figure 12** : Les différentes voies d'induction de l'apoptose (Hengartner, 2000). 42
- Figure 13** : Evolution de la production laitière et de l'équilibre entre la prolifération et la mort cellulaire par apoptose au cours de la lactation (d'après Stefanon et al., 2002). 43
- Figure 14** : Taux d'exfoliation des cellules épithéliales mammaires (CEM) dans le lait de chèvres en réponse à la monotraite. 51
- Figure 15** : Résumé de l'effet des principaux facteurs physiologiques, d'élevage et environnementaux connus pour affecter la production laitière sur le processus d'exfoliation des cellules épithéliales mammaires (CEM) dans le lait. 56
- Figure 16** : Localisation des principales jonctions cellulaires. 58



**Figure 17** : Structure moléculaire des jonctions serrées (Escudero-Esparza et al., 2011). 58

**Figure 18** : Alvéole mammaire (A) et résumé des effets de facteurs d'élevage et hormonaux sur l'intégrité de l'épithélium mammaire (B) et sur le processus d'exfoliation des cellules épithéliales mammaires (C) (d'après Herve et al., 2016). 62

## Résultats

### - Chapitre 1, Partie 1

**Figure 1.** Plasma concentrations of (A) oxytocin (OT), (B) prolactin (PRL) and (C) cortisol (Cort) before, during and after milking, relative to milking-unit attachment (t = 0) in 9 Holstein dairy cows.

**Figure 2.** Plasma concentrations of lactose before, during and after milking relative to milking-unit attachment (t = 0) in 9 Holstein dairy cows.

### - Chapitre 1, Partie 2

**Figure 1** : Description of the treatments. 80

**Figure 2** : Plasma oxytocin (OT) concentration in 8 Holstein dairy cows submitted to the Control+OT treatment. 82

**Figure 3.** Lactose concentration in plasma of 8 Holstein dairy cows submitted to the Control+Oxytocin (OT) treatment (■) or the Atosiban (Ato)+OT treatment (□) during 2 consecutive milkings. 84

### - Chapitre 2, Partie 1.1.

**Figure 1** : Schéma expérimental de l'essai « Nature du fourrage / Restriction 75 % ». 94

### - Chapitre 2, Partie 1.2.

**Figure 1** : Experimental design. 106

**Figure 2** : Milk yield of dairy cows from the feed-restricted group (n = 10, red line) and the control group (n = 9, green line) during a 29-d period of feed restriction (Period 1) and a 35-d period back to ad libitum feeding (Period 2). 115

### - Chapitre 2, Partie 2.

**Figure 1** : Plasma concentration of prolactin before, during, and after milking relative to the milking-unit attachment in dairy cows submitted to the long-day photoperiod (LDP) or short-day photoperiod (SDP) and injected with the vehicle (Control) or Cabergoline (Cab). 131



**Figure 2** : Milk yield from dairy cows submitted to the long-day photoperiod (LDP) or short-day photoperiod (SDP) and injected with the vehicle (Control) or Cabergoline (Cab). 133

- **Chapitre 2, Partie 3.**

**Figure 1** : Schéma expérimental de l'essai « bGH ». 140

**Figure 2** : Représentation schématique de la méthode d'identification et de dénombrement des différents types de cellules somatiques du lait par cytométrie de flux. 142

**Figure 3** : Production laitière de vaches laitières (n=8) avant, pendant et après un traitement à l'hormone de croissance bovine (bGH) de 14 jours. 143

**Discussion**

**Figure 1** : Photographie de coupe de glande mammaire de vache laitière en lactation marquée à l'aide de l'anticorps anti-cytokératines 1, 5, 10 et 14 (photo A), de 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, photo B) ou double marqué (photo C) analysée par microscopie optique (Boutinaud et al., 2015). 149

**Figure 2** : Résumé des différents facteurs étudiés au cours des différents essais menés au cours de cette thèse sur l'intégrité de l'épithélium mammaire. 157

**Figure 3** : Effet des différents facteurs physiologiques, d'élevage et environnementaux étudiés au cours de cette thèse sur la production laitière (barres pleines) et sur le taux d'exfoliation des cellules épithéliales mammaires (CEM, barres hachurées). 161

**Conclusion**

**Figure 1** : Résumé de l'effet de différents facteurs physiologiques, d'élevage et environnementaux sur le processus d'exfoliation des cellules épithéliales mammaires (CEM) dans le lait sur la base de la bibliographie (en clair) et de nos résultats (en foncé). 168



**TABLEAUX****Synthèse bibliographique**

<b>Tableau 1</b> : Composition du lait de différentes espèces de mammifères (d'après Jenness, 1986).	25
<b>Tableau 2</b> : Comparaison entre la concentration en cellules somatiques dans le lait de vache, de chèvre et de brebis en milieu et fin de lactation (d'après Leitner et al., 2012).	27
<b>Tableau 3</b> : Proportions des différents types cellulaires retrouvés dans le lait de vaches non infectées ou infectées par <i>Staphylococcus aureus</i> détectés par microscopie en lumière blanche (d'après Benić et al., 2012).	28
<b>Tableau 4</b> : Concentration et pourcentage de cellules épithéliales mammaires (CEM) dans le lait chez les ruminants (d'après Herve et al., 2016).	28
<b>Tableau 5</b> : Effet de différents facteurs physiologiques, d'élevage, ou environnementaux sur le processus d'exfoliation des cellules épithéliales mammaires (CEM) chez les ruminants (d'après Herve et al., 2016).	45
<b>Tableau 6</b> : Effet de 7 jours de monotraite (1x) sur la concentration et le taux d'exfoliation des cellules épithéliales mammaires (CEM) dans le lait en comparaison à 2 traites par jour (2x, d'après Herve et al., 2016).	50

**Résultats****- Chapitre 1, Partie 1**

<b>Table 1.</b> Characteristics (raw means $\pm$ SEM) of oxytocin, prolactin and cortisol release at milking in 9 Holstein dairy cows.	
<b>Table 2.</b> Characteristics of plasma lactose at milking in 9 Holstein dairy cows.	
<b>Table 3.</b> Evolution of albumin, Na <sup>+</sup> and K <sup>+</sup> concentrations in milk during the course of milking in 9 Holstein dairy cows.	
<b>Table 4.</b> Evolution of yield and composition of milk collected each minute separately during the course of milking in 9 Holstein dairy cows.	
<b>Table 5.</b> Evolution of concentration, number and viability of milk mammary epithelial cells (MEC) during the course of milking in 9 Holstein dairy cows.	

**- Chapitre 1, Partie 2**

<b>Table 1</b> : Yield and composition of the four types of milk collected from 8 Holstein cows assigned to the 2 treatments: 1) Control+Oxytocin (OT) and 2) Atosiban (Ato)+OT.	82
--	----





<b>Table 2.</b> Concentration and viability of mammary epithelial cells (MEC) exfoliated into the milk of 8 Holstein dairy cows assigned to the 2 treatments: 1) Control+Oxytocin (OT) and 2) Atosiban (Ato)+OT.	83
--	----

- **Chapitre 2, Partie 1.1.**

<b>Tableau 1 :</b> Description des rations « Maïs 100 % » et « Herbe 100 % ».	93
---	----

<b>Tableau 2 :</b> Effet du niveau d'alimentation et de la nature du fourrage dans la ration sur la production laitière et la composition du lait.	95
--	----

<b>Tableau 3 :</b> Effet du niveau d'alimentation et de la nature du fourrage dans la ration sur le taux d'exfoliation des cellules épithéliales mammaires (CEM), la viabilité et le pourcentage de CEM apoptotiques dans le lait.	96
--	----

<b>Tableau 4 :</b> Effet du niveau d'alimentation et de la nature du fourrage dans la ration sur les indicateurs de l'intégrité de l'épithélium.	96
--	----

- **Chapitre 2, Partie 1.2.**

<b>Table 1 :</b> Chemical composition and nutritive value of feedstuffs.	107
--	-----

<b>Table 2 :</b> Average weight, DMI, and energy and protein intake and balance of dairy cows from the feed-restricted group (n = 10) and the control group (n = 9) during a 29-d period of feed restriction (Period 1) and a 35-d period switch back to ad libitum feeding (Period 2).	113
---	-----

<b>Table 3 :</b> Plasma metabolites concentration of dairy cows from the feed-restricted group (n = 10) and the control group (n = 9) during a 29-d period of feed restriction (Period 1) and a 35-d period switch back to ad libitum feeding (Period 2).	114
---	-----

<b>Table 4 :</b> Milk composition of dairy cows from the feed-restricted group (n = 10) and the control group (n = 9) during a 29-d period of feed restriction (Period 1) and a 35-d period switch back to ad libitum feeding (Period 2).	115
---	-----

<b>Table 5 :</b> Concentration, number and viability of milk mammary epithelial cells (MEC) of dairy cows from the feed-restricted group (n = 10) and the control group (n = 9) during a 29-d period of feed restriction (Period 1) and a 35-d period switch back to ad libitum feeding (Period 2).	116
---	-----

<b>Table 6 :</b> Plasma concentration of insulin-like growth factor-I (IGF-I), insulin (Ins) and prolactin (PRL) of dairy cows from the feed-restricted group (n = 10) and the control group (n = 9) during a 29-d period of feed restriction (Period 1) and a 35-d period switch back to ad libitum feeding (Period 2).	116
--	-----

<b>Table 7 :</b> Percentage of apoptotic and proliferative cells, DNA concentration and morphometric analysis of mammary tissue of dairy cows from the feed-restricted	
--	--



group (n = 10) and the control group (n = 9) collected at the end of a 29-d period of feed restriction (Period 1) and at the end of a 35-d period back to ad libitum feeding (Period 2). 117

**Table 8 :** Abundance of mRNA quantified by real-time PCR in mammary tissue of dairy cows from the feed-restricted group (n = 10) and the control group (n = 9) collected at the end of a 29-d period of feed restriction (Period 1) and at the end of a 35-d period back to ad libitum feeding (Period 2). 118

**Table 9 :** Abundance of mRNA quantified by real-time PCR in purified milk mammary epithelial cells (MEC) of dairy cows from the feed-restricted group (n = 10) and the control group (n = 9) during a 29-d period of feed restriction (Period 1) and a 35-d period switch back to ad libitum feeding (Period 2). 119

**Table 10 :** Mammary epithelium integrity indicators of dairy cows from the feed-restricted group (n = 10) and the control group (n = 9) during a 29-d period of feed restriction (Period 1) and a 35-d period switch back to ad libitum feeding (Period 2). 120

- **Chapitre 2, Partie 2.**

**Table 1 :** Characteristics of prolactin (PRL) release at milking in dairy cows submitted to the long-day photoperiod (LDP) or short-day photoperiod (SDP) and injected with the vehicle (Control) or Cabergoline (Cab). 132

**Table 2 :** Composition of milk from dairy cows submitted to the long-day photoperiod (LDP) or short-day photoperiod (SDP) and injected with the vehicle (Control) or Cabergoline (Cab). 134

**Table 3 :** Concentration, number and viability of mammary epithelial cells in milk of dairy cows submitted to the long-day photoperiod (LDP) or short-day photoperiod (SDP) and injected with the vehicle (Control) or Cabergoline (Cab). 134

**Table 4 :** Characteristics of plasma lactose at milking in dairy cows submitted to the long-day photoperiod (LDP) or short-day photoperiod (SDP) and injected with the vehicle (Control) or Cabergoline (Cab). 135

**Table 5 :** Concentration of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>:K<sup>+</sup> ratio and casein:whey protein ratio in milk of dairy cows submitted to the long-day photoperiod (LDP) or short-day photoperiod (SDP) and injected with the vehicle (Control) or Cabergoline (Cab). 135

**Table 6 :** Abundance of mRNA quantified by real-time PCR in purified milk mammary epithelial cells (MEC) of dairy cows submitted to the long-day photoperiod (LDP) or short-day photoperiod (SDP) and injected with the vehicle (Control) or Cabergoline (Cab). 136



- **Chapitre 2, Partie 3.**

<b>Tableau 1</b> : Composition du lait de vaches laitières (n=8) pendant et après un traitement à l'hormone de croissance bovine (bGH) de 14 jours.	143
<b>Tableau 2</b> : Concentration et nombre des différents types de cellules somatiques dans le lait de vaches laitières (n=8) pendant et après un traitement à l'hormone de croissance bovine (bGH) de 14 jours.	144



## Liste des abréviations

<b>α-LA</b>	α-lactalbumine
<b>κ-CN</b>	Caséine κ
<b>ADN</b>	Acide Désoxyribonucléique
<b>ARNm</b>	Acide Ribonucléique messenger
<b>Ato</b>	Atosiban
<b>AUC</b>	Area under the curve
<b>bGH</b>	bovine Growth Hormone (Hormone de croissance bovine)
<b>BSA</b>	Bovine Serun Albumin
<b>Cab</b>	Cabergoline
<b>CCS</b>	Comptage des Cellules Somatiques
<b>CEM</b>	Cellule Epithéliale Mammaire (ou Mammary Epithelial Cell, <b>MEC</b> )
<b>Cort</b>	Cortisol
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-phenylindole
<b>DIM</b>	Day In Milk
<b>DM</b>	Dry Matter
<b>EGF</b>	Epidermal Growth Factor
<b>EpCAM</b>	Epithelial Cell Adhesion Molecule
<b>FSH</b>	Folliculo-Stimulating Hormone
<b>GHIH</b>	Growth Hormone Inhibiting Hormone
<b>GHRH</b>	Growth Hormone Releasing Hormone
<b>GNRH</b>	Gonadotropin Releasing Hormone
<b>IGF</b>	Insulin-like Growth Factor
<b>Ins</b>	Insuline
<b>JS</b>	Jonction Serrée
<b>LDP</b>	Long-Day Photoperiod
<b>LH</b>	Luteinizing Hormone
<b>MAT</b>	Matière Azotée Totale
<b>MSI</b>	Matière Sèche Ingérée





<b>NCN</b>	Azote non caséinique
<b>NEFA</b>	Non-Esterified Fatty Acids
<b>NGS</b>	Normal Goat Serum
<b>NPN</b>	Azote non protéique
<b>OT</b>	Ocytocine
<b>PBS</b>	Phosphate-Buffered Saline
<b>PCNA</b>	Proliferating Cell Nuclear Antigen
<b>PDI</b>	Peotein Digested in the small Intestin
<b>PRL</b>	Prolactine
<b>qRT PCR</b>	quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
<b>RIN</b>	RNA Integrity Number
<b>RPRL</b>	Récepteur à la prolactine
<b>SDP</b>	Short-Day Photoperiod
<b>SEM</b>	Standard Error of the Mean
<b>STAT</b>	Signal Transducer and Activator of Transcription
<b>TB</b>	Taux Butyreux
<b>TBS</b>	Tris-Buffered Saline
<b>TP</b>	Taux Protéique
<b>TUNEL</b>	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labelling



# Introduction



De nombreuses hypothèses ont été formulées concernant l'origine et l'évolution de la fonction de lactation (Blackburn et al., 1989). Quelle que soit l'hypothèse considérée, l'évolution des mammifères ancestraux aux mammifères contemporains a abouti à l'acquisition d'une glande mammaire spécialisée permettant à la femelle mammifère de produire la principale source d'énergie nécessaire au développement et à la croissance de sa progéniture : le lait. Suite à la domestication de certaines espèces animales (dont les ruminants laitiers) par l'Homme, cette caractéristique propre aux mammifères a été valorisée puisque le lait de ruminant (vaches, chèvres, brebis, bufflonnes...) est utilisé comme une source alimentaire dans l'alimentation humaine (Capuco et Akers, 2009).

Depuis la domestication des ruminants, la filière de production de lait s'est organisée et le lait de vache est, à l'heure actuelle, produit dans des fermes laitières spécialisées. Ces fermes laitières sont soumises à de nombreuses contraintes économiques (coût de production et prix de vente), politiques (réglementations européennes), environnementales (protection de l'environnement, rejets azotés et eutrophisation) et sociétales (qualités des produits et bien-être animal). Malgré ces contraintes, elles doivent répondre à la demande de la filière laitière notamment en termes de niveaux de production laitière. L'acquisition de connaissances concernant les facteurs physiologiques, d'élevage et environnementaux influençant la production laitière, et sur les mécanismes biologiques (moléculaires ou cellulaires) sous-jacents aux variations de production laitière permettrait de comprendre comment les femelles laitières en lactation peuvent s'adapter à des systèmes de production très changeants. Cela peut aussi permettre d'identifier des pratiques d'élevage améliorant la maîtrise de la production (c'est-à-dire la quantité de lait produit et sa composition) des femelles laitières.

La quantité de lait produit par la glande mammaire est déterminée par nombre de cellules épithéliales mammaires (**CEM**) présentes dans le tissu mammaire et leur activité métabolique. Il est établi depuis de nombreuses années que le nombre de CEM dans la glande mammaire dépend de l'équilibre entre la prolifération cellulaire et la mort cellulaire par apoptose (Capuco et al., 2003), un taux de prolifération plus élevé que le taux d'apoptose conduisant la diminution de ce nombre et inversement. Cependant, des CEM sont exfoliées, c'est-à-dire décrochées de l'épithélium mammaire et évacuées dans le lait, tout au long de la lactation. Le processus d'exfoliation des CEM a donc récemment été



proposé comme un mécanisme potentiel de régulation du nombre de CEM dans la glande mammaire, les variations du taux d'exfoliation étant opposées aux variations du nombre de CEM et aux variations de production laitière. Cependant, cela reste à valider. De plus, les mécanismes biologiques conduisant à l'exfoliation des CEM dans le lait restent à élucider.

Cette thèse, dans laquelle l'attention a été portée sur le processus d'exfoliation des CEM, a pour objectifs d'identifier les mécanismes de régulation de ce processus et de comprendre son rôle dans la régulation du nombre de CEM dans la glande mammaire et dans les variations de production laitière chez la vache laitière. Elle s'inscrit donc dans la problématique d'identification des mécanismes de régulation de production des ruminants laitiers. La première partie de cette thèse permettra de faire un état des lieux des connaissances sur la glande mammaire et sa capacité à produire du lait, sur la régulation hormonale de la lactation, sur le nombre de CEM comme déterminant de la production laitière et sur le lien entre exfoliation et intégrité de l'épithélium mammaire. La deuxième partie sera consacrée à la présentation des résultats des essais menés au cours de cette thèse concernant les mécanismes de régulation de l'exfoliation et son rôle dans la régulation du nombre de CEM dans la glande mammaire et de la production laitière. Enfin, les résultats nouvellement acquis seront discutés et mis en perspective dans la dernière partie de cette thèse.



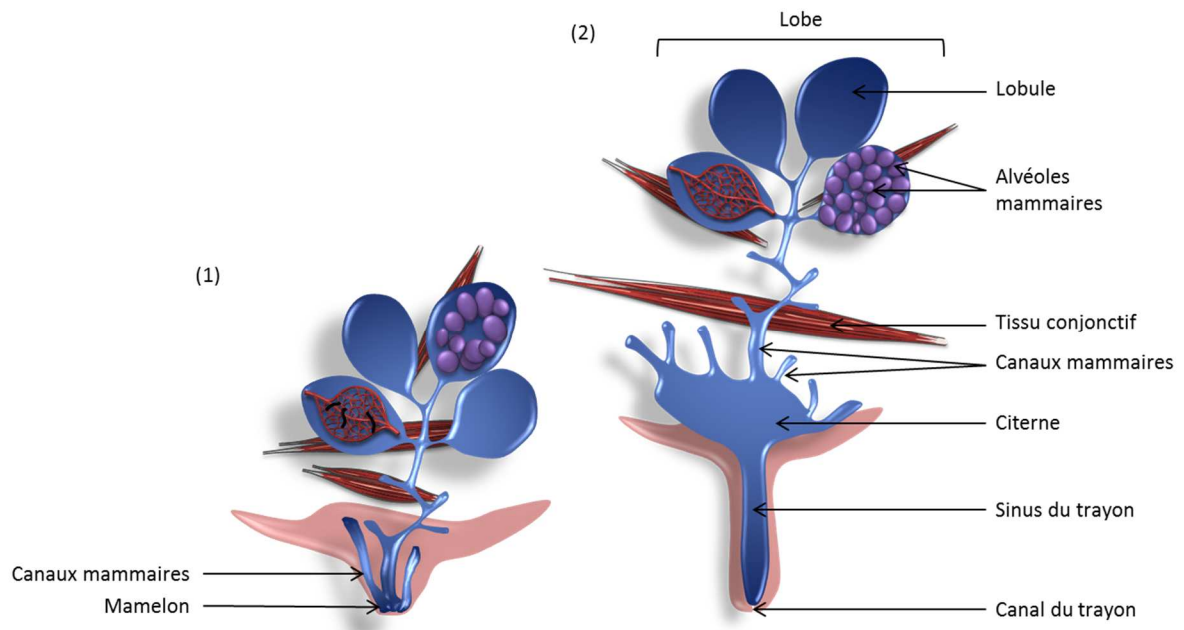


# **Synthèse bibliographique**

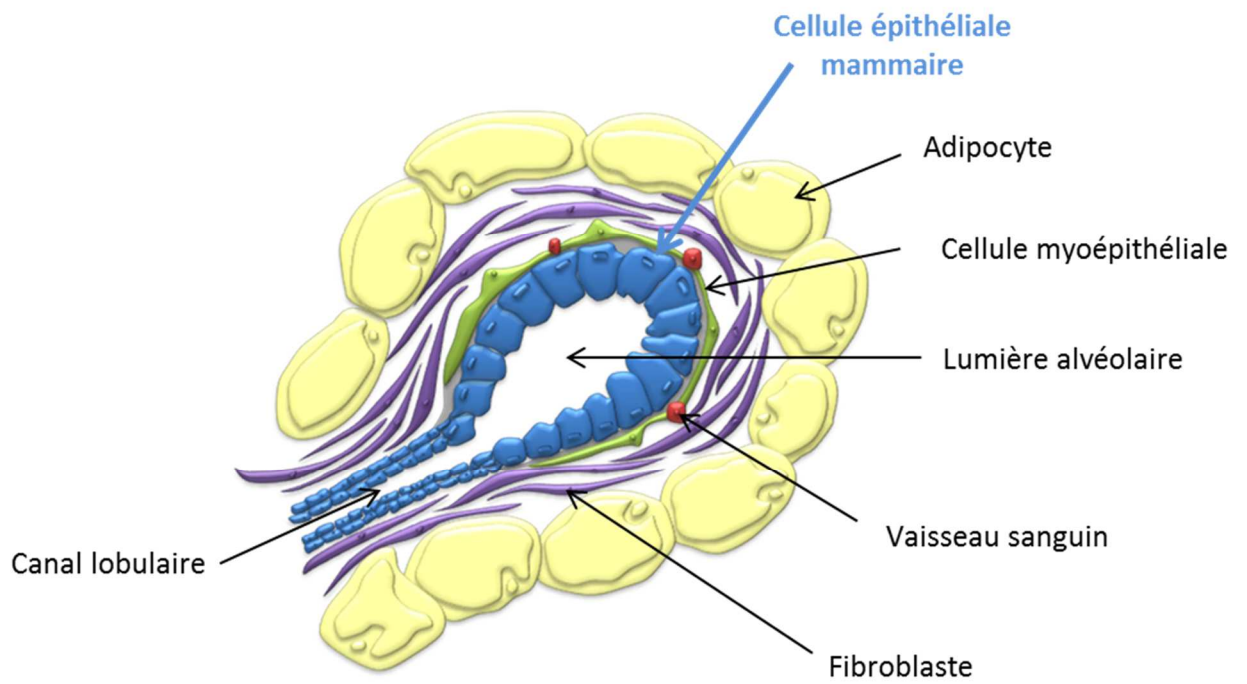


# **Chapitre 1**

La glande mammaire, organe  
spécialisé dans la production  
du lait



**Figure 1** : Structure de la glande mammaire (1) de primates, rongeurs et lagomorphes et (2) de ruminants (d'après Delouis et al., 2001).



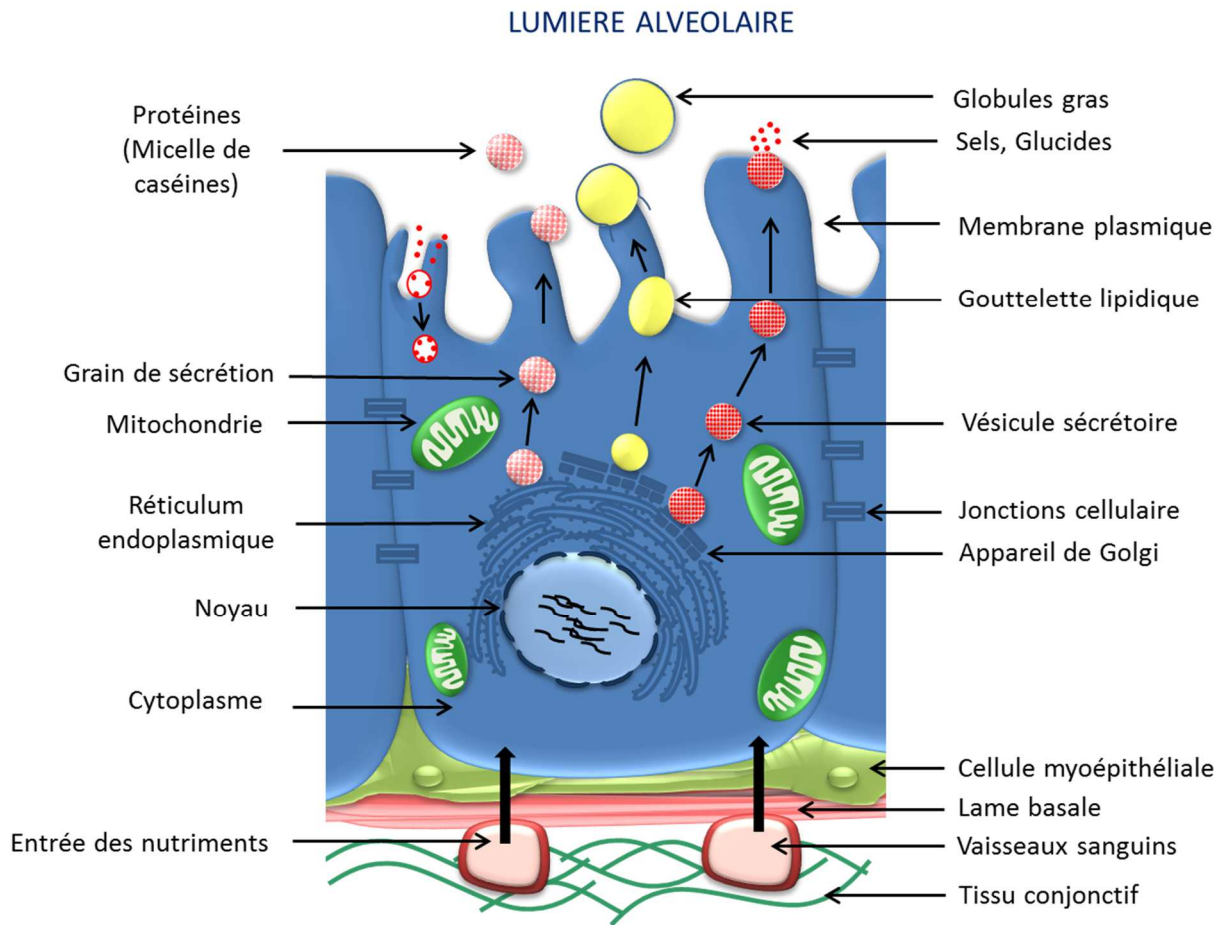
**Figure 2** : Structure d'une alvéole mammaire (d'après Delouis et al., 2001).

## Chapitre 1 - La glande mammaire, organe spécialisé dans la production du lait

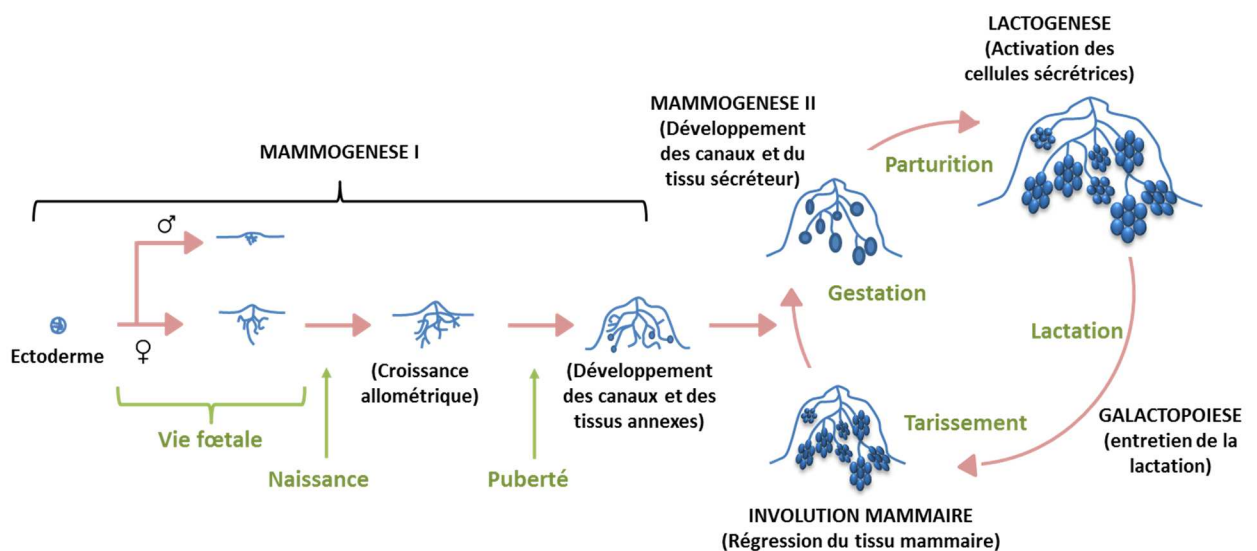
La fonction de lactation, correspondant à la synthèse de lait, est une fonction propre aux femelles mammifères et est assurée par la glande mammaire. La production de lait permet à la femelle d'apporter à sa progéniture tous les nutriments et les facteurs nécessaires à sa croissance et à son développement ainsi que des facteurs lui permettant de se protéger des agressions par des agents pathogènes.

### 1. Description morphologique et anatomique de la glande mammaire

La glande mammaire présente une structure et une organisation lui permettant d'assurer sa fonction de lactation, de la synthèse à l'éjection du lait (**Figure 1**). La glande mammaire de vache laitière est constituée de 4 quartiers. Chaque quartier est structuré de façon similaire et comprend du tissu sécréteur et du stroma. Chez la femelle en lactation, le tissu sécréteur, représentant entre 70 et 80 % du tissu mammaire, est le tissu majoritaire retrouvé dans la glande mammaire (Capuco et al., 2001). Il est structuré en lobes, renfermant les lobules, eux-mêmes constitués d'acini, autrement appelés alvéoles mammaires (**Figure 2**). Les alvéoles mammaires sont les unités fonctionnelles de la synthèse du lait. Elles sont constituées d'une couche unique de CEM polarisées constituant l'épithélium mammaire (**Figure 3**). Les CEM sont des cellules très différenciées qui présentent une organisation caractéristique des cellules sécrétrices. Ces cellules possèdent un volume très important de cytoplasme, de nombreuses mitochondries, un appareil de Golgi proche du noyau cellulaire et très développé ainsi qu'un réticulum endoplasmique abondant. La présence de vésicules de sécrétion et de gouttelettes lipidiques prouve aussi l'activité métabolique élevée de ces cellules. Les CEM sont entourées par les cellules myoépithéliales, cellules musculaires qui se contractent lors du réflexe d'éjection du lait. L'épithélium mammaire repose sur une lame basale à travers laquelle se font les échanges avec le stroma. Ce stroma est composé d'une matrice extracellulaire et de différents types cellulaires : les adipocytes, les fibroblastes et les cellules endothéliales. Les adipocytes participent au stockage de réserves lipidiques et les fibroblastes participent au soutien du



**Figure 3 :** Structure et fonctionnement de la cellule épithéliale mammaire (d'après Williams et Daniel, 1983; Delouis et al., 2001; Radisky et al., 2003).



**Figure 4 :** Évolution de la glande mammaire depuis la phase embryonnaire jusqu'à la lactation. Le cycle mammogénèse II-lactogénèse-galactopoïèse-involution se reproduit à chaque lactation (d'après Martinet et Houdebine, 1993).

tissu mammaire. Les cellules endothéliales constituent la paroi des vaisseaux sanguins et permettent l'apport à la CEM des précurseurs nécessaires à la synthèse des différents constituants du lait via la circulation sanguine. Le pôle apical des CEM présente d'importantes villosités donnant sur la lumière alvéolaire dans laquelle le lait est sécrété. Grâce aux jonctions cellulaires présentes entre les CEM, l'épithélium mammaire est jointif et sépare le milieu intérieur de la lumière alvéolaire. La localisation des jonctions cellulaires en zone apicale des CEM détermine la polarité et l'organisation intracellulaire des CEM permettant ainsi d'orienter la synthèse et la sécrétion du lait vers la lumière alvéolaire. Le tissu sécrétoire est drainé par un réseau de canaux galactophores lobulaires, lobaires et mammaires. Ces canaux galactophores permettent le transport du lait et débouchent directement sur le mamelon dans de nombreuses espèces de mammifères telles que les primates ou les rongeurs. Chez les ruminants, les canaux galactophores débouchent sur la citerne, organe de stockage du lait entre deux tétées ou deux traites puis, au moment de la traite ou de la tétée, le lait est évacué par un unique canal au niveau du trayon.

## 2. Développement de la glande mammaire

Lorsque la glande mammaire a atteint sa maturité de développement et que l'animal est en pleine lactation, la glande mammaire peut produire une quantité de lait par jour plus importante que son propre poids (Knight et Peaker, 1982). L'acquisition par la glande mammaire de la structure spécifique lui permettant d'assurer cette fonction de synthèse du lait se fait en plusieurs étapes (**Figure 4**). La première étape est la mammogénèse qui commence dès la vie embryonnaire, se poursuit lors de la puberté et se termine lors de la première gestation. La phase suivante est la lactogénèse et correspond à l'acquisition avant la mise-bas par la glande mammaire de ses capacités sécrétoires et à l'initiation de la sécrétion lactée. La phase qui suit est la galactopoïèse correspondant à l'entretien de la lactation. Enfin, lors du sevrage pour les animaux allaitant leur(s) jeune(s) ou lors de l'arrêt de la traite pour les animaux producteurs de lait, la glande mammaire entre dans une phase d'involution et régresse donc jusqu'à la gestation suivante.



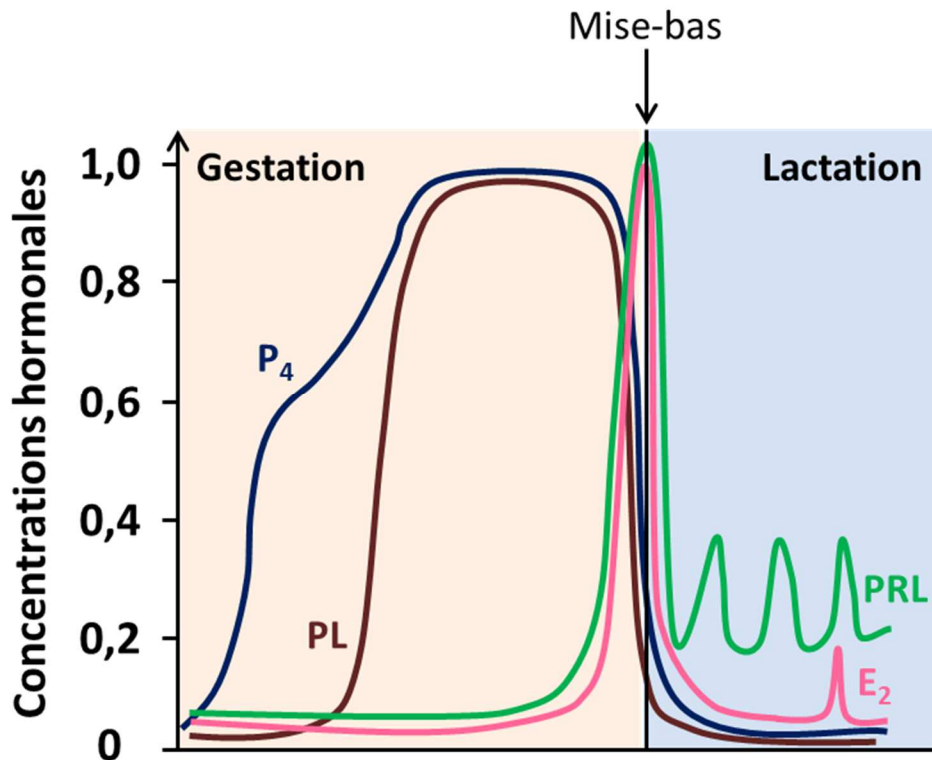


## **2.1. De l'embryogenèse à la puberté**

Le développement de la glande mammaire commence dès l'embryogenèse par la mammogenèse I qui correspond essentiellement à la mise en place des canaux mammaires. Cette mammogenèse débute avec la formation des premières ébauches mammaires par invagination de structures ectodermiques. Les ébauches mammaires épithéliales d'origine ectodermique forment ensuite un début d'arborisation qui sera à l'origine des principaux canaux galactophores et du canal du trayon chez les ruminants. La mise en place de ces premiers canaux se fait essentiellement sous le contrôle de l'hormone de croissance (**GH**), de la prolactine (**PRL**) et des glucocorticoïdes (Veltmaat et al., 2003). Chez le mâle, ces ébauches mammaires vont régresser suite à l'induction de la nécrose des structures épithéliales par les androgènes fœtaux. A la naissance, la glande mammaire de ruminant comprend donc un ensemble de canaux rudimentaires entourés de cellules mésenchymateuses qui formeront le futur stroma. L'arborisation de canaux rudimentaires débouche sur la cavité cisternale. Après la naissance, la glande mammaire suit une croissance isométrique et se développe donc à la même vitesse que le reste de l'organisme. Avant la puberté, vers l'âge de 2 à 3 mois chez la génisse, la glande mammaire croît plus rapidement que le reste de l'organisme (croissance allométrique positive) avec le développement rapide du tissu ductal qui progresse dans le stroma par ramification des canaux ainsi que l'apparition de quelques structures lobulo-alvéolaires aux extrémités distales de ces canaux (Berry et al., 2003 ; Akers et al., 2005). Cette croissance allométrique va continuer jusqu'à la puberté (vers l'âge de 9 mois chez la génisse). Au moment de la mise en place de la cyclicité ovarienne lors de la puberté, les stéroïdes sécrétés par les ovaires vont jouer un rôle primordial dans la mammogenèse en favorisant la croissance du tissu sécréteur par stimulation de la prolifération des CEM (Akers et al., 2005; Yart et al., 2012b, 2014).

## **2.2. Au cours de la vie adulte**

Au cours de la vie adulte de la femelle et au fil des différentes étapes du cycle de reproduction, la glande mammaire subit plus de changements en termes de taille, de structure, de composition cellulaire et d'activité métabolique que n'importe quel autre organe de l'organisme. En effet, la glande mammaire atteint sa maturité et subit ensuite des cycles de développement/régression calquées sur les cycles de reproduction. Le cycle de



**Figure 5** : Évolution des concentrations plasmatiques de progestérone (P<sub>4</sub>), d'hormone placentaire lactogène (PL), de prolactine (PRL) et d'oestradiol (E<sub>2</sub>) chez la brebis pendant la gestation et la lactation (d'après Delouis et al., 2001).

Les valeurs sont exprimées en proportion de la valeur la plus élevée observée pendant le cycle de reproduction.

développement de la glande mammaire est initié par la gestation. C'est en effet au cours de la première gestation qu'a lieu la mise en place de la majorité du tissu sécréteur lors de la mammogénèse II avec l'expansion de la population de CEM (Knight et Peaker, 1982). En parallèle, le tissu ductal poursuit son développement en augmentant en taille et en complexité. Cette phase de mammogénèse est régulée par les stéroïdes sexuels (œstrogènes et progestérone) sécrétés par les ovaires et l'unité fœto-placentaire, et par la PRL, la GH et l'hormone lactogène placentaire (Soares et al., 1998; Horseman, 1999; Yart et al., 2014). Les stéroïdes ovariens et l'hormone lactogène placentaire sécrétés pendant la gestation stimulent la prolifération des CEM (Horseman, 1999; Clarke, 2000) puis à la fin de la gestation, sous l'action de la PRL et de la GH, les CEM se différencient et acquièrent leur capacité de synthèse des différents constituants du lait (Yart et al., 2014). Par la suite, la lactogénèse est stimulée par la chute de la sécrétion de progestérone associée à la parturition (**Figure 5**). Après la parturition, la femelle commence par sécréter du colostrum et produit ensuite progressivement du lait. Puis, la galactopoïèse est stimulée par la sécrétion des hormones galactopoïétiques induite par la traite ou la tétée. Enfin, la dernière étape du cycle de développement/régression de la glande mammaire est l'involution. Cette étape correspond à la régression du tissu sécréteur au moment du tarissement provoqué par le sevrage du jeune ou la cessation de la traite. Cette régression est causée par l'accumulation du lait et l'absence des pics de sécrétion des hormones galactopoïétiques induites par la tétée ou la traite (Lamote et al., 2004). Le processus d'involution implique un remodelage du tissu mammaire, une dégradation de la matrice extracellulaire par les métalloprotéases (Streuli et Gilmore, 1999) et l'apoptose des CEM (Capuco et Akers, 1999; Stefanon et al., 2002).

### **3. Composition du lait, synthèse et voie de sécrétion des différents constituants du lait par la cellule épithéliale mammaire**

Le lait est un fluide biologique présentant une composition complexe permettant notamment à la mère d'apporter de l'énergie à son jeune. Le lait est principalement composé d'eau, de lipides, de protéines, de glucides et de minéraux mais contient aussi des cellules somatiques, des immunoglobulines, des vitamines, des facteurs de croissance, des hormones... Cependant, la composition du lait en termes de quantité et de proportion des

**Tableau 1** : Composition du lait de différentes espèces de mammifères (d'après Jenness, 1986).

Espèce	Pourcentage en masse des constituants majeurs du lait						Energie (kcal/100g)
	Eau	Lipides	Caséines	Protéines solubles	Lactose	Minéraux	
Vache	87,3	3,9	2,6	0,6	4,6	0,7	66
Chèvre	86,7	4,5	2,6	0,6	4,3	0,8	70
Brebis	82,0	7,2	3,9	0,7	4,8	0,9	102
Bufflonne	82,8	7,4	3,2	0,6	4,8	0,8	101
Zébuté	86,5	4,7	2,6	0,6	4,7	0,7	74
Jument	88,8	1,9	1,3	1,2	6,2	0,5	52
Truie	81,2	6,8	2,8	2,0	5,5	1,0	102
Ratte	72,4	9,3	7,2	1,0	3,7	1,4	131
Femme	87,1	4,5	0,4	0,5	7,1	0,2	72

différents constituants et donc d'énergie apportée varie fortement entre les différentes espèces de mammifères (**Tableau 1**, Jenness, 1986) et suivant le stade physiologique de l'animal. Le colostrum, sécrété dans les premiers jours suivants la parturition, est pauvre en glucides mais se caractérise par sa richesse en immunoglobulines, donc en protéines, ce qui apporte une immunité passive au jeune. Le lait est, quant à lui, plus riche en glucides et en lipides qu'en protéines.

### 3.1. Constituants majeurs du lait

#### **Les protéines.**

Le taux de matières protéiques (**TP**) dans le lait varie suivant les espèces et est en moyenne de 30 à 35 g/L chez la vache laitière. La majorité des protéines du lait sont synthétisées par les CEM. Parmi les protéines synthétisées par les CEM, les caséines, protéines majeures du lait, représentent 80 à 90 % de la matière azotée totale contenue dans le lait. Il existe différents types de caséines ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\kappa$  et  $\gamma$ ). Quel que soit le type de caséines, celles-ci sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique avant d'être transférées dans l'appareil de Golgi où elles subissent des modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation et la glycosylation (**Figure 3**). C'est aussi dans l'appareil de Golgi que les caséines vont s'agréger afin de former des micelles avant d'être sécrétées dans la lumière alvéolaire par exocytose. La matière azotée du lait restante est constituée de protéines solubles (Wang et al., 2009). Les protéines solubles, quant à elles, correspondent essentiellement à la  $\beta$ -lactoglobuline ( $\approx$  50 % des protéines solubles) et à l' $\alpha$ -lactalbumine (enzyme impliquée dans la synthèse du lactose,  $\approx$  25 % des protéines solubles). D'autres protéines solubles telles que des protéines de liaison aux métaux (lactoferrine et transferrine) ou des enzymes (notamment la galactosyltransferase et la lipoprotéine lipase) sont aussi retrouvées dans le lait mais en concentrations moins importantes. Le lait contient aussi de nombreuses hormones telles que la GH, la PRL, la progestérone, la GH Releasing Hormone (**GHRH**), ou encore la Gonadotropin Releasing Hormone (**GNRH**), et des facteurs de croissance tels que l'Epidermal Growth Factor (**EGF**) et l'insulin-like growth factor (**IGF**) -I (Koldovsky, 1980; Peaker et Neville, 1991; Ollivier-Bousquet, 1993). Ces hormones et facteur de croissance sont soit synthétisés par les CEM ou proviennent de la circulation sanguine. Enfin, d'autres protéines retrouvées dans le lait telles que l'albumine et les



immunoglobulines peuvent notamment passer du compartiment sanguin à la lumière alvéolaire par transcytose ou par voie paracellulaire.

### **Les lipides.**

Chez la vache laitière, le taux de matières grasses (appelé taux butyreux, **TB**) est en moyenne de 35 à 45 g/L de lait. Dans le lait, les lipides sont principalement retrouvés sous forme de triglycérides ( $\approx 98$  % des lipides totaux) mais le lait contient aussi des phospholipides, des acides gras libres et du cholestérol. Une grande partie des triglycérides est synthétisée par les CEM à partir du glucose et des acides gras, le reste est directement fourni par l'alimentation. Les triglycérides sont synthétisés dans le réticulum endoplasmique et sont ensuite libérés dans le cytoplasme sous forme de gouttelettes lipidiques. Les gouttelettes lipidiques sont entourées de phospholipides dérivés de la membrane du réticulum endoplasmique. Elles migrent ensuite vers le pôle apical de la CEM tout en continuant leur croissance. Plusieurs gouttelettes lipidiques peuvent fusionner entre elles contribuant ainsi à l'augmentation de leur taille. Lors de la sécrétion des gouttelettes lipidiques dans la lumière alvéolaire, celles-ci s'entourent de membrane plasmique des CEM pour former des globules gras d'une taille moyenne de 3  $\mu\text{m}$  (Couvreur et Hurtaud, 2007).

### **Les glucides.**

Le lait de vache laitière contient en moyenne 50 g de glucides par litre. Le lactose est le glucide majoritaire et spécifique du lait. C'est un disaccharide synthétisé uniquement par les CEM, à partir de deux molécules de glucose prélevées dans la circulation sanguine. La synthèse du lactose débute donc dans le réticulum endoplasmique par la formation d'UDP-galactose à partir de la première molécule de glucose. La synthèse du lactose se poursuit dans l'appareil de Golgi où a lieu la dernière étape de la synthèse du lactose. Cette étape consiste à la formation d'un disaccharide d'UDP-galactose et de glucose sous l'action de la galactosyltransférase en présence de son cofacteur, l' $\alpha$ -lactalbumine. Seules les CEM sont capables de synthétiser du lactose puisque ce sont les seules cellules de l'organisme à synthétiser l' $\alpha$ -lactalbumine. Le transport du glucose s'effectue principalement par « diffusion facilitée » grâce à des transporteurs de type SLC2A1 enchâssés dans la membrane basolatérale des CEM. Du fait de son pouvoir osmotique, le lactose participe à la régulation

**Tableau 2** : Comparaison entre la concentration en cellules somatiques dans le lait de vache, de chèvre et de brebis en milieu et fin de lactation (d'après Leitner et al., 2012).

Espèce	Vache	Chèvre	Brebis
<b>Milieu de lactation</b>			
<b>Jour de lactation</b>	<b>154</b>	<b>129</b>	<b>62</b>
CCS (x 10 <sup>3</sup> cellules/mL)	49 ± 3	464 ± 74	99 ± 19
<b>Fin de lactation</b>			
<b>Jour de lactation</b>	<b>426</b>	<b>253</b>	<b>172</b>
CCS (x 10 <sup>3</sup> cellules/mL)	441 ± 35	7694 ± 1090	235 ± 93



de l'entrée de l'eau dans la lumière alvéolaire et détermine donc en grande partie le volume de lait produit (Linzell et Peaker, 1971a).

### **Autres constituants.**

Le lait est source de nombreuses vitamines puisqu'il contient notamment de la vitamine A, de la vitamine D ou encore de la vitamine E (Öste et al., 1997). Il contient aussi différents minéraux provenant de la circulation sanguine tels que le potassium ( $K^+$ ), le sodium ( $Na^+$ ), le chlore ( $Cl^-$ ), le calcium ( $Ca^{2+}$ ), le phosphore ( $P^+$ ) ou encore le magnésium ( $Mg^{2+}$ ). Le  $K^+$ ,  $Na^+$  et le  $Cl^-$  sont retrouvés sous forme soluble dans le lait alors que le  $Ca^{2+}$ , le  $P^+$  et le  $Mg^{2+}$  sont en partie associés aux micelles de caséines (Gaucheron, 2005). Des pompes présentes sur la membrane des CEM permettent notamment le passage du  $Na^+$  et du  $K^+$  du cytoplasme vers le lait ou l'entrée du  $Ca^{2+}$  dans la CEM à partir du compartiment sanguin. Dans certaines conditions physiologiques ou en réponse à des facteurs d'élevage ou environnementaux, les jonctions cellulaires peuvent laisser passer certains minéraux tels que le  $Na^+$  et le  $K^+$  par voie paracellulaire (Cf. Chapitre 4).

### **3.2. Cellules du lait<sup>1</sup>**

Des cellules somatiques sont retrouvées dans les sécrétions mammaires de tous les mammifères. La concentration en cellules somatiques dans les sécrétions mammaires varie en fonction des espèces et du stade de lactation des animaux (Leitner et al., 2012). Par exemple, le lait de chèvre et le lait de brebis sont plus concentrés en cellules somatiques que le lait de vache. Le lait des animaux en milieu de lactation est moins concentré en cellules somatiques que le lait des animaux en fin de lactation (**Tableau 2**). Les cellules somatiques retrouvées dans les sécrétions mammaires sont de différents types. On retrouve notamment des cellules immunitaires telles que les lymphocytes, les macrophages, les neutrophiles et les éosinophiles, et ce, même si les sécrétions proviennent de glandes mammaires non infectées par des pathogènes. Cependant, en réponse à une infection intramammaire, le comptage de cellules somatiques (**CCS**) dans le lait augmente fortement principalement à

---

<sup>1</sup> Cette partie a été valorisée par la publication d'une revue de synthèse intitulée « Regulation of cell number in the mammary gland by controlling the exfoliation process in milk in ruminants » dans Journal of Dairy Science (**Annexe 1**), et par deux communications orales (**Annexes 2 et 3**).

**Tableau 3 :** Proportions des différents types cellulaires retrouvés dans le lait de vaches non infectées ou infectées par *Staphylococcus aureus* détectés par microscopie en lumière blanche (d'après Benić et al., 2012).

Type cellulaire	GM non-infectée	GM infectée par <i>S. aureus</i>
Granulocytes (%)	16 ± 2,5	61 ± 9,6
Monocytes (%)	26 ± 5,1	20 ± 4,5
Lymphocytes (%)	23 ± 6,9	12 ± 4,8
CEM (%)	36 ± 8,0	6 ± 2,8

**Tableau 4 :** Concentration et pourcentage de cellules épithéliales mammaires (CEM) dans le lait chez les ruminants (d'après Herve et al., 2016).

Espèce	Pourcentage de CEM dans le lait (% des cellules somatiques totales)	Concentration en CEM dans le lait (10 <sup>3</sup> cellules/mL)	Méthode	Référence
Vache	36 ± 8	-	Microscopie en lumière blanche	Benic et al. (2012)
	2	-	Microscopie en lumière blanche	Feng et al. (2007)
	45 ± 25	-	Microscopie en lumière blanche	Leitner et al. (2000)
	2,7 ± 2	-	Cytométrie de flux	Wagner et al. (2009)
	9,3 ± 1,9	14,7 ± 4,1	Purification immuno-magnétique	Boutinaud et al. (2012)
	2,2 ± 0,1	1,5 ± 0,9	Purification immuno-magnétique	Boutinaud et al. (2008)
Chèvre	4,6 ± 0,6	23 ± 4	Purification immuno-magnétique	Ben Chedly et al. (2011)
	27,2 ± 1,5	11,2 ± 1,2	Microscopie en lumière blanche	Boutinaud and Jammes (2002)
Brebis	2-3	-	-	Bergonier et al., (2003)
	2,2 ± 1,6	1,1 ± 1,3	Microscopie en lumière blanche	Morgante et al. (1996)

cause de l'afflux de cellules immunitaires provenant de la circulation sanguine et passant dans la lumière alvéolaire. Cet afflux participe à la protection de la glande mammaire contre les agents pathogènes (Benić et al., 2012). La proportion de chaque type de cellules immunitaires dans le lait dépend aussi de la présence ou de l'absence d'un agent pathogène dans la glande mammaire (**Tableau 3**, Morgante et al., 1996; Leitner et al., 2000; Benić et al., 2012).

Les sécrétions mammaires contiennent aussi des cellules non-immunitaires puisque la présence de CEM a été observée, il y a de nombreuses années, dans le lait de femme (Papanicolaou et al., 1958; King et al., 1975; Ho et al., 1979), de primates non-humains (Rie et al., 1976) et de ruminants (Kitchen, 1981). Plus récemment, il a été montré que dans le lait de femme ces cellules non-immunitaires correspondaient à des CEM et des cellules myoépithéliales matures et différenciées, à des cellules mammaires progénitrices et à des cellules souches. Les cellules différenciées retrouvées dans le lait sont des cellules provenant de l'épithélium mammaire ductal ou luminal. Les cellules souches présentes dans le lait sont pluripotentes et ont donc la capacité d'entrer dans l'une des deux principales voies de différenciation des cellules mammaires, à savoir se différencier en CEM ou en cellule myoépithéliale (Hassiotou et Hartmann, 2014).

Contrairement au lait humain dans lequel les CEM représentent plus de 90 % des cellules somatiques (Ho et al., 1979), les CEM représentent la minorité des cellules somatiques présentes dans le lait des ruminants. La concentration et la proportion de CEM dans le lait est donc très variable suivant les espèces (**Tableau 4**). Par exemple, la concentration en CEM est moins élevée dans le lait de vache que dans le lait de chèvre (Boutinaud et Jammes, 2002). Chez la brebis, les CEM représentent moins de 2 à 3 % des cellules somatiques totales (Bergonier et al., 2003). Enfin, la présence de CEM dans le lait a aussi été rapportée chez la bufflonne (Yadav et al., 2015) et la zébrure (Janjanam et al., 2013).

Les CEM exfoliées dans le lait peuvent être des cellules apoptotiques. Cependant, la majorité des CEM exfoliées ne sont pas apoptotiques puisque environ 60 à 70 % des CEM exfoliées dans le lait sont viables et présentent toutes les caractéristiques de CEM sécrétrices différenciées (Boutinaud et al., 2013c). De plus, il a été montré que des CEM collectées dans le lait avaient la capacité de se multiplier en culture cellulaire (Ben Chedly et al., 2010; Sorg et al., 2012). La proportion de CEM viables et de CEM apoptotiques exfoliées



dans le lait reste cependant très variable entre les espèces et suivant les modèles expérimentaux. Le processus d'exfoliation est donc un processus engendrant la perte simultanée de CEM viables ou apoptotiques dans des proportions variables. Chez la femme, il a été émis l'hypothèse que l'exfoliation des CEM de l'épithélium ductal ou luminal est la conséquence soit du turnover des cellules sécrétrices soit des pressions mécaniques associées aux cycles de remplissage et de vidange engendrés par la synthèse de lait et l'allaitement (Cregan et al., 2007). En effet, la tétée ou la traite induit une contraction des cellules myoépithéliales qui pourrait à son tour participer à l'exfoliation des CEM. Cependant les mécanismes biologiques conduisant à l'exfoliation des CEM dans le lait ne sont pas connus à ce jour et le rôle de la contraction des cellules myoépithéliales dans le processus d'exfoliation reste une hypothèse.



### **L'essentiel**

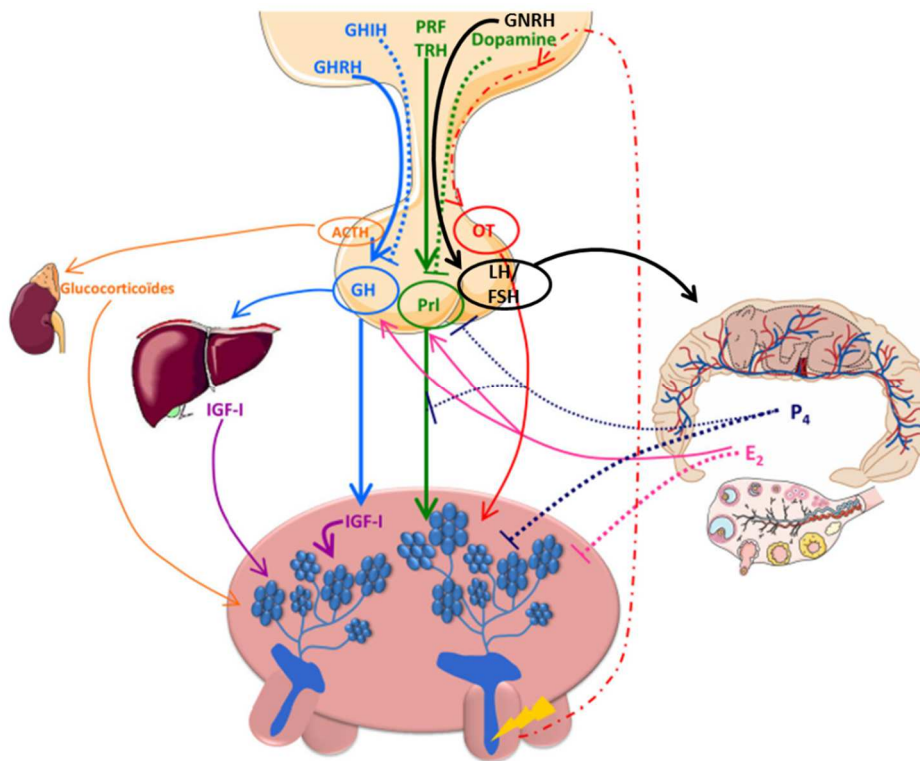
La glande mammaire possède une structure spécifique lui permettant d'assurer la fonction de synthèse et de sécrétion de lait. Cette structure commence à se mettre en place dès la vie embryonnaire. La glande mammaire se développe au moment de la puberté sous l'action des stéroïdes ovariens et atteint sa maturité au moment de la 1ère gestation ce qui lui permet d'assurer la fonction de lactation dès la parturition. La lactation est ensuite entretenue par les hormones galactopoïétiques libérées à la traite. A la fin de la lactation, au moment du sevrage ou du tarissement, la glande mammaire régresse lors de l'involution mammaire. La glande mammaire est composée de différents types cellulaires composant le stroma (les adipocytes, les fibroblastes et les cellules endothéliales) et de cellules myoépithéliales et est, pendant la lactation, majoritairement constituée de CEM, unités de synthèse du lait. Ces CEM synthétisent constituants majeurs du lait que sont les protéines (principalement les caséines), les lipides (sous forme de triglycérides) et les glucides (majoritairement représentés par le lactose). Le lait contient aussi différents types de cellules somatiques et notamment des cellules immunitaires nécessaires à la protection de la glande mammaire contre les agents pathogènes. Des CEM exfoliées de l'épithélium mammaire sont aussi retrouvées dans le lait. La proportion de chaque type cellulaire dépend de l'espèce considérée puisque chez la femme, les CEM représentent 90 % des cellules somatiques du lait alors que chez les ruminants les CEM représentent de 3 à 45 % des cellules somatiques. Les mécanismes biologiques conduisant à la présence de CEM dans le lait restent encore à élucider.





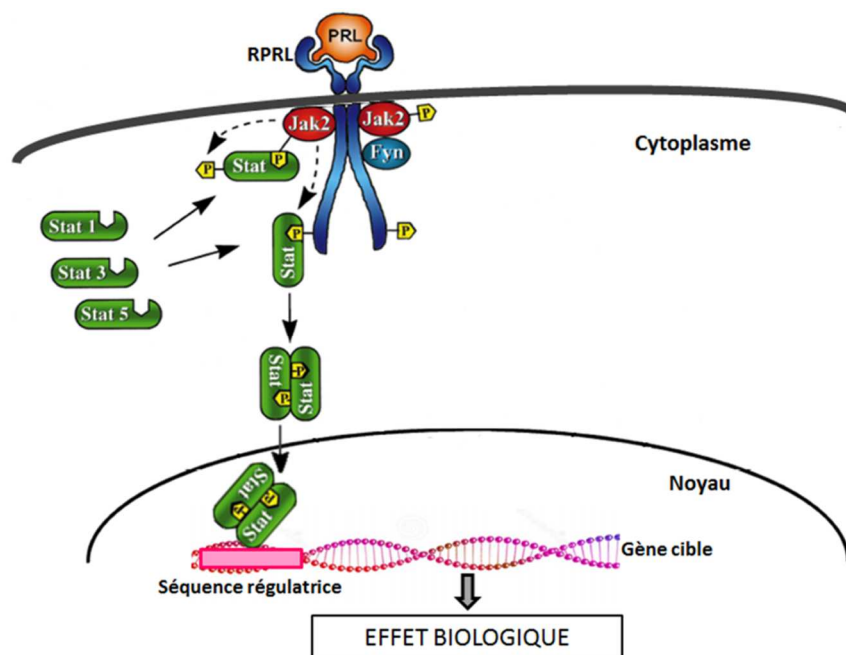
# **Chapitre 2**

La lactation, une fonction  
régulée par de nombreuses  
hormones



**Figure 6 :** Régulation hormonale de la fonction de lactation (d'après Yart, 2012).

ACTH : Hormone corticotrope ; E<sub>2</sub> : Oestradiol ; FSH : Folliculo-Stimulating Hormone ; GH : Growth Hormone ; GHIH : Growth Hormone Inhibiting Hormone ; GHRH : Growth Hormone Releasing Hormone ; GNRH : Gonadotropin Releasing Hormone ; IGF-I : Insuline-like Growth Factor I ; LH : Luteinizing Hormone ; OT : Ocytocine ; PRF : Prolactin Releasing Factor ; Prl : Prolactine ; TRH : Thyrotropin Releasing Hormone ; P<sub>4</sub> : Progestérone.



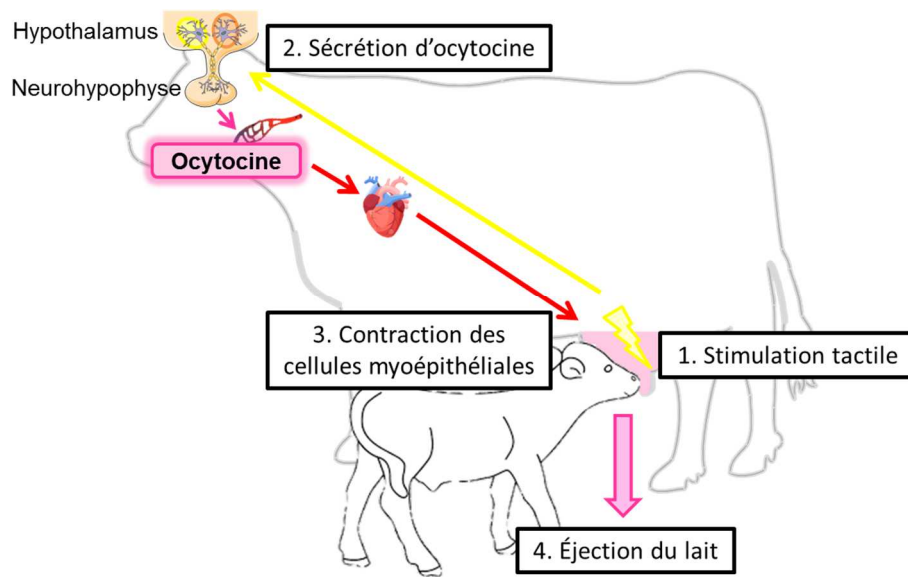
**Figure 7 :** Voie de signalisation de la prolactine (PRL, d'après Bole-Feysot et al., 1998 et Freeman et al., 2000).

## Chapitre 2 - La lactation, une fonction régulée par de nombreuses hormones

La lactation depuis l'initiation (la lactogénèse), à l'arrêt (l'involution mammaire) en passant par le maintien de la lactation (la galactopoïèse) est une fonction placée sous contrôle hormonal (**Figure 6**). La PRL, l'ocytocine (**OT**), et la GH sont les 3 principales hormones régulant la lactation : la PRL est principalement impliquée dans l'initiation de la lactation à la mise-bas et le maintien de la lactation, l'OT est responsable de l'éjection du lait lors de la traite ou de la tétée et la GH est principalement impliquée dans la partition des nutriments et leur prélèvement par la glande mammaire. Cependant, de nombreuses autres hormones sont impliquées dans la régulation de la fonction de lactation : les stéroïdes ovariens, l'insuline et les IGF, les glucocorticoïdes, la leptine, les prostaglandines, les hormones thyroïdiennes, la sérotonine...

### 1. La prolactine

La PRL est une hormone peptidique principalement synthétisée par les cellules lactotropes de l'adénohypophyse (Freeman et al., 2000). La sécrétion de PRL est stimulée par des Prolactin Releasing Factors (**PRF**) tels que la Thyrotropin Releasing Hormone (**TRH**). Au contraire, la dopamine, neurotransmetteur et neurohormone produite par l'hypothalamus, a pour principale fonction d'inhiber la sécrétion de PRL en se fixant sur ses récepteurs localisés sur les cellules lactotropes (Freeman et al., 2000). La fixation de la PRL sur ses récepteurs spécifiques (**RPRL**) induit l'activation de la voie de signalisation de la PRL (**Figure 7**) grâce à la dimérisation puis la phosphorylation des RPRL. L'homodimère de RPRL active alors la voie JAK/STAT par phosphorylation de la protéine JAK et recrutement d'un facteur de transcription de la famille des STAT (principalement STAT5). Le facteur de transcription STAT est ensuite phosphorylé et se dimérise avec un autre STAT. L'homodimère de facteurs de transcription STAT est alors transloqué dans le noyau et se lie sur sa séquence régulatrice au niveau de l'ADN pour inhiber ou activer l'expression d'un gène cible (Bole-Feysot et al., 1998; Freeman et al., 2000). Via l'activation de la voie JAK/STAT, la PRL a alors différents effets biologiques et participe ainsi à la régulation de la fonction de lactation. La



**Figure 8 :** Réflexe neuroendocrine d'éjection du lait.

La stimulation tactile du trayon lors de la tétée ou la traite (1.) envoie un signal nerveux engendrant la libération d'ocytocine dans la circulation sanguine par la neurohypophyse (2.). Dans la glande mammaire, l'ocytocine se fixe sur ses récepteurs spécifiques provoquant la contraction des cellules myoépithéliales (3.). Les pressions mécaniques exercées sur l'épithélium mammaire suite à la contraction des cellules myépithéliales induisent l'éjection du lait (4.).

PRL est l'hormone lactogène par excellence, son action est donc requise dans la glande mammaire peu avant la mise-bas pour l'initiation de la lactation (Jahn et al., 1997; Stiening et al., 2008). A la mise-bas est observé un pic de sécrétion de PRL ainsi qu'une augmentation de la sensibilité de la glande mammaire à la PRL via l'augmentation du nombre de RPR (Djiane et al., 1977). Pendant la lactation, la traite ou la tétée induit un pic de sécrétion de PRL (Koprowski et Tucker, 1973; Gorewit et al., 1992) ; ce pic de sécrétion étant de moins en moins important avec l'avancée de la lactation (Koprowski et Tucker, 1973). Cependant, chez les ruminants laitiers, le rôle galactopoïétique de la PRL a longtemps été controversé. En effet, la PRL a longtemps été considérée comme ayant un rôle dans l'initiation mais pas dans le maintien de la lactation (Knight, 2001). Des études plus récentes ont néanmoins démontré que la PRL est aussi une hormone essentielle au maintien de la lactation puisque l'inhibition de la PRL pendant la lactation entraîne une baisse de la production laitière (Lacasse et al., 2012). Cette baisse est expliquée par une diminution du taux de prolifération entraînant une diminution du nombre de CEM dans la glande mammaire et par une diminution de l'activité métabolique des CEM (Boutinaud et al., 2012). En effet, la PRL est connue pour être un facteur de survie des CEM en stimulant leur prolifération cellulaire (Olazabal et al., 2000) et en inhibant leur mort par apoptose (Accorsi et al., 2002). La PRL est aussi connue pour participer au maintien de l'état de différenciation des CEM et stimuler la synthèse de différentes protéines du lait telles que les caséines  $\alpha$ S1,  $\alpha$ S2,  $\beta$  et  $\kappa$ , l' $\alpha$ -lactalbumine et la  $\beta$ -lactoglobuline (Rosen et al., 1999).

## 2. L'ocytocine

L'OT est une hormone peptidique jouant un rôle primordial dans la fonction de lactation puisqu'elle est l'hormone responsable de la contraction des cellules myoépithéliales lors du réflexe d'éjection du lait (**Figure 8**). Chez les ruminants, seulement 20 % du lait produit est stocké dans la citerne et est directement disponible pour le jeune ou la machine à traire (Davis et al., 1998). La majorité du lait produit est localisé dans le compartiment alvéolaire. La vidange complète du lait contenu dans les alvéoles mammaires et les canaux galactophores requiert donc le réflexe d'éjection du lait (Bruckmaier, 2001). Le réflexe d'éjection du lait est un réflexe neuroendocrine qui a lieu en réponse à la stimulation tactile, lors de la tétée ou de la traite, des récepteurs sensoriels situés sur le trayon (Crowley



et Armstrong, 1992). Un signal nerveux est alors envoyé via ces récepteurs jusqu'aux noyaux paraventriculaire et supraoptique de l'hypothalamus. Les neurones localisés dans ces noyaux hypothalamiques synthétisent l'OT qui est ensuite transportée via les axones vers la neurohypophyse. Les neurones des noyaux hypothalamiques transmettent ensuite un signal à la neurohypophyse provoquant la sécrétion de l'OT dans la circulation sanguine. La concentration en OT dans le sang augmente donc très fortement et rapidement suite à la stimulation tactile du trayon (Bruckmaier et al., 1993; Lollivier et Marnet, 2005). Dans la glande mammaire, l'OT se fixe sur son récepteur spécifique localisé sur les cellules myoépithéliales et provoque la contraction de ces cellules musculaires entourant les alvéoles mammaires. En se contractant, les cellules myoépithéliales exercent des pressions mécaniques sur l'épithélium mammaire engendrant ainsi l'éjection du lait contenu dans le compartiment alvéolaire vers la citerne (Bruckmaier, 2001). En plus de son rôle dans le réflexe d'éjection du lait, l'OT joue un rôle sur la quantité de lait produite puisque l'administration d'OT avant la traite permet d'augmenter la production laitière de manière dose-dépendante (Lollivier et al., 2002). L'OT possède aussi des récepteurs sur les CEM et stimule la synthèse des constituants du lait en accélérant le processus d'exocytose des vésicules de sécrétion et des gouttelettes lipidiques (Lollivier et al., 2006; Masedunskas et al., 2017).

### 3. L'hormone de croissance

La GH est une hormone peptidique sécrétée par les cellules somatotropes de l'adénohypophyse. Sa sécrétion est sous contrôle du système nerveux central puisqu'elle est régulée par deux hormones peptidiques synthétisées par l'hypothalamus : la GHRH ayant une action stimulatrice et la GH Inhibiting Hormone (**GHIH**) ayant une action inhibitrice. L'action de la GH passe principalement par l'activation de la voie de signalisation JAK/STAT initiée par la liaison entre la GH et son récepteur membranaire (Sotiropoulos et al., 1996). L'organe cible de la GH est le foie dans lequel le nombre de récepteurs à la GH est élevé. Néanmoins, la GH présente des récepteurs dans de nombreux organes et tissus dont la glande mammaire. Même s'il a longtemps été pensé que la glande mammaire ne présentait pas de récepteurs à la GH, la présence de tels récepteurs à la surface des CEM et des cellules du stroma dans la glande mammaire de vache laitière a été mise en évidence par

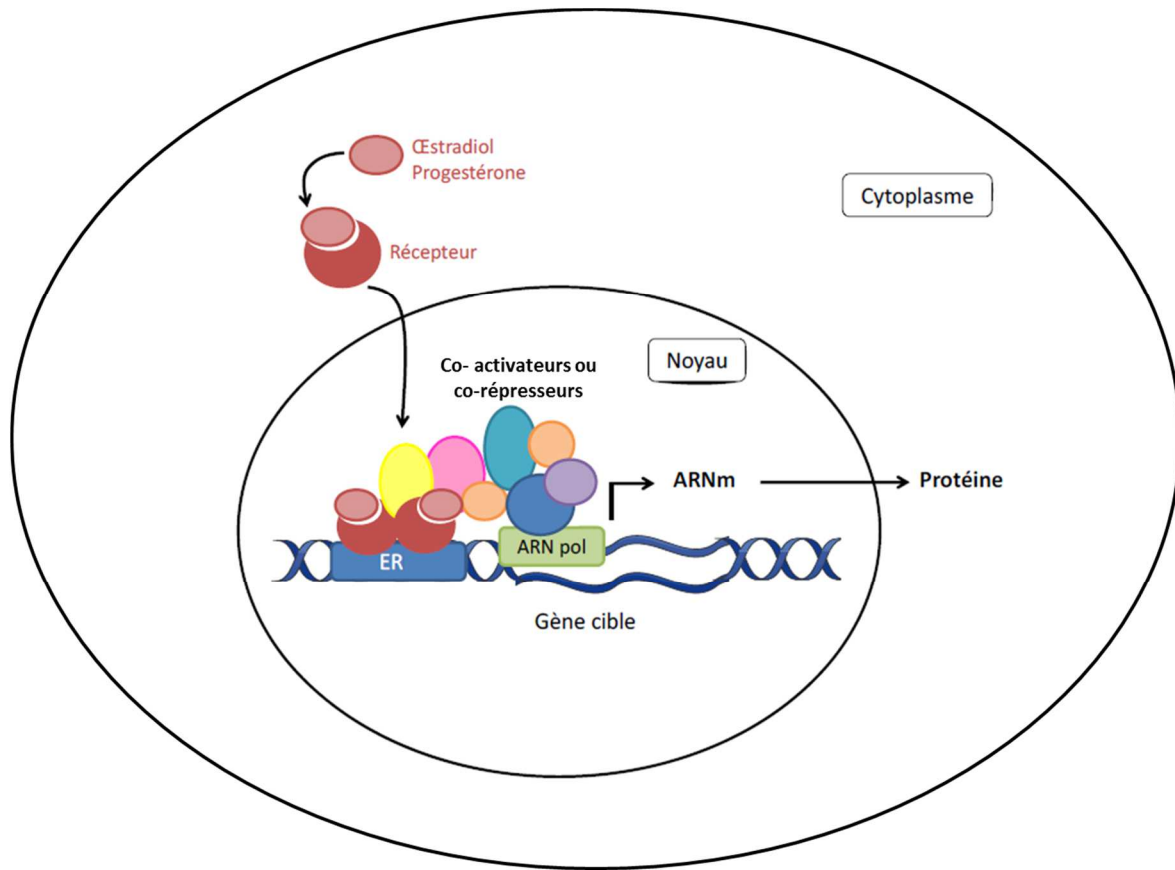




immunohistochimie et la présence de son ARN a été mise en évidence par hybridation *in situ* (Sinowatz et al., 2000). Une preuve de la présence de récepteur à la GH a aussi été montrée *in vitro* puisque la GH est capable d'activer la voie JAK/STAT dans une lignée de CEM canines (Van Garderen et al., 2001). La GH a un effet galactopoïétique mis en évidence par une augmentation de la production laitière chez les ruminants (vaches, brebis, chèvres et bufflonnes) recevant de la GH exogène (Baldi, 1999; Bauman, 1999), et au contraire une diminution de la production laitière lorsque la sécrétion de la GH est inhibée chez le rat (Flint et Vernon, 1998). De plus, il a notamment été observé chez la chèvre que la traite induit un pic de sécrétion de la GH (Hart et Linzell, 1977). Du fait de l'effet galactopoïétique de la GH, des injections de GH exogène sont aujourd'hui utilisées aux États-Unis comme biotechnologie pour augmenter la production laitière des vaches laitières. Son utilisation est toutefois interdite dans l'Union Européenne. La GH engendre une augmentation du débit sanguin dans la mamelle jouant ainsi un rôle dans la partition des nutriments absorbés qui, sous l'action de cette dernière, sont dirigés prioritairement vers la glande mammaire pour la fonction de lactation au détriment des autres fonctions, expliquant ainsi l'effet galactopoïétique de la GH (Bauman, 1999). Au niveau de la glande mammaire, la GH engendre une augmentation de l'activité métabolique des CEM et stimule notamment la synthèse des protéines du lait en régulant l'expression de leurs gènes chez la chèvre en lactation (Boutinaud et al., 2002, 2003). La GH induit aussi une augmentation du nombre de CEM dans le tissu mammaire (Capuco et al., 2001; Baldi et al., 2002; Boutinaud et al., 2003) via une action stimulatrice sur le taux de prolifération cellulaire (Capuco et al., 2001).

#### **4. Les facteurs de croissance de la famille des insulin-like growth factors**

L'IGF-I et l'IGF-II sont des facteurs de croissance de la famille des IGF. Ils sont principalement synthétisés par le foie en réponse à la stimulation de ce dernier par la GH. Les IGF sont sécrétés dans la circulation sanguine et agissent par voie endocrine sur leurs organes cibles dont la glande mammaire. Cependant, la glande mammaire en lactation est aussi capable de synthétiser les IGF. Dans la glande mammaire, l'IGF-I est synthétisé par les cellules stromales et dans une plus faible mesure par les CEM et l'IGF-II est synthétisé par les CEM (Hovey et al., 1998; Baumrucker et Erondou, 2000). Les IGF synthétisés par la glande mammaire agissent alors par les voies autocrine et paracrine. L'IGF-I et l'IGF-II agissent



**Figure 9** : Voie de signalisation des hormones stéroïdiennes (oestradiol et progestérone, Yart, 2012).

ER : Élément de réponse ; ANR pol : ARN polymérase.

directement sur les CEM grâce leurs récepteurs spécifiques présents sur ces cellules (Baumrucker et Erondou, 2000). Leur biodisponibilité et leur activité sont modulées positivement ou négativement par leur liaison avec l'une des 6 protéines de liaison de la famille des Insulin-like growth factor binding proteins (**IGFBP**, Cohick, 1998) dont par exemple l'IGFBP 5 qui en se liant à l'IGF-I diminue sa biodisponibilité. L'IGF-I et l'IGF-II participent à la croissance et au développement de la glande mammaire lors de la mammogénèse (Baumrucker et Erondou, 2000) mais régulent aussi la fonction de lactation puisqu'il a été montré que la perfusion d'IGF-I et d'IGF-II in vivo stimulait la production laitière chez la chèvre (Prosser et al., 1990, 1994). L'IGF-I a un effet stimulateur sur la prolifération cellulaire (Shamay et al., 1988; Baumrucker et Stemberger, 1989; Forsyth, 1996) et au contraire un effet inhibiteur sur la mort cellulaire par apoptose des CEM (Flint et Knight, 1997; Accorsi et al., 2002). Enfin, l'IGF-I est aussi un médiateur de l'action de la GH dans la glande mammaire (Baumrucker et Erondou, 2000).

## 5. Les stéroïdes ovariens

Les stéroïdes ovariens (la progestérone et les œstrogènes) sont majoritairement synthétisés dans les ovaires par les cellules folliculaires à partir du cholestérol. La synthèse de ces hormones stéroïdiennes est sous le contrôle de deux gonadotrophines synthétisées par l'adénohypophyse, à savoir la Luteinizing Hormone (**LH**) et la Folliculo-Stimulating Hormone (**FSH**). Ces gonadotrophines sont, elles-mêmes, sous le contrôle de la GNRH, hormone peptidique sécrétée par les neurones du noyau arqué de l'hypothalamus. Chez la femelle non gestante, les ovaires sont la principale source de progestérone et d'œstrogènes. Cependant, d'autres sources de progestérone et d'œstrogènes ont été identifiées, telles que la glande mammaire mais surtout l'unité fœto-placentaire chez la femelle gestante (Yart et al., 2014). Les stéroïdes ovariens exercent leurs fonctions biologiques via leur fixation sur leurs récepteurs intracellulaires. Le complexe formé par l'hormone et son récepteur est transloqué dans le noyau et se lie à un 2<sup>ème</sup> complexe pour former un dimère. Ce dimère se lie à l'ADN sur des régions spécifiques appelées « élément de réponse » et joue le rôle de facteur de transcription afin d'activer ou d'inhiber la transcription des gènes cibles grâce au recrutement de co-activateurs ou de co-répresseurs (**Figure 9**). Les hormones stéroïdiennes jouent alors un rôle dans la régulation de la fonction de lactation. Tout d'abord, la chute de



la concentration de progestérone responsable de l'initiation de la mise-bas est nécessaire à l'initiation de la lactation (Neville et al., 2001). En effet, pendant la gestation, la progestérone est l'inhibiteur majeur de la synthèse de lait (Neville et al., 2001) puisqu'elle inhibe la synthèse de PRL en stimulant l'action inhibitrice de la dopamine (Andrews, 2005) et réduit la sensibilité de la glande mammaire à la PRL par l'inhibition de l'augmentation du nombre de RPRL dans la glande mammaire (Djiane et Durand, 1977). Des injections d'œstrogènes associées ou non à des injections de progestérone ou la sécrétion endogène de ces hormones stéroïdiennes par l'unité fœto-placentaire a un effet négatif sur la production laitière chez la vache laitière (Mollett et al., 1976; Bachman et al., 1988; Delbecchi et al., 2005), ce qui explique que les vaches laitières qui mènent simultanément une gestation et une lactation produisent moins de lait que les vaches en lactation et non gestantes. Au contraire, la suppression des stéroïdes ovariens par ovariectomie engendre une augmentation de la production laitière et une meilleure persistance de lactation (Yart et al., 2012a). L'œstradiol affecte aussi l'activité de synthèse des CEM puisque des injections d'œstradiol exogène réduisent le taux d'ARNm de la caséine  $\beta$  chez des vaches en lactation (Delbecchi et al., 2005). Les stéroïdes ovariens ont donc un fort effet négatif sur la fonction de lactation chez la vache laitière.

## 6. Les glucocorticoïdes

Sous l'action de l'hormone corticotrope (**ACTH**) produite par l'adénohypophyse, la zone corticale des glandes surrénales secrète les glucocorticoïdes, parmi lesquels le cortisol. Les glucocorticoïdes sont faiblement sécrétés pendant la gestation puis leur sécrétion augmente fortement au moment de la mise-bas. Le pic de sécrétion de glucocorticoïdes à la mise-bas est nécessaire à la formation des jonctions cellulaires lors de la transition gestation/lactation et est donc primordial dans le démarrage de la lactation. Pendant la lactation, un pic de sécrétion de cortisol est observé au moment de la traite (Bruckmaier et al., 1993; Rushen et al., 2001; Negrao et al., 2004). L'effet des glucocorticoïdes sur la fonction de lactation serait plutôt indirect, étant donné qu'ils sont impliqués dans la régulation du flux des nutriments dans l'organisme (Neville et al.). Cependant, des preuves de l'effet des glucocorticoïdes sur la synthèse des constituants du lait ont été mises en évidence grâce à des études *in vitro* et *in vivo*. En effet, l'addition de cortisol dans le milieu de culture (contenant de la PRL et de



l'insuline) d'explants mammaires de souris induit une augmentation de la synthèse de l' $\alpha$ -lactalbumine et des caséines (Nagamatsu et Oka, 1983). *In vivo*, l'ablation des glandes surrénales de souris entraîne une diminution de l'expression des ARNm des caséines dans le tissu mammaire alors qu'au contraire, l'injection de cortisol induit une augmentation de l'expression de ces ARNm (Ganguly et al., 1979). Les glucocorticoïdes inhibent aussi la mort cellulaire par apoptose et l'involution mammaire *in vivo* chez la souris (Feng et al., 1995). La régulation de la lactation par les glucocorticoïdes pourrait aussi passer par la régulation de l'intégrité de l'épithélium. En effet, la perte de l'intégrité de l'épithélium est associée à une baisse de la production laitière (Stelwagen et al., 2000; Delamaire et Guinard-Flament, 2006) et les glucocorticoïdes ont un rôle essentiel dans la régulation de l'intégrité de l'épithélium puisqu'ils participent à la fois à la formation des jonctions cellulaires lors de la transition gestation/lactation et à leur maintien pendant la lactation (Cf. Chapitre 4).





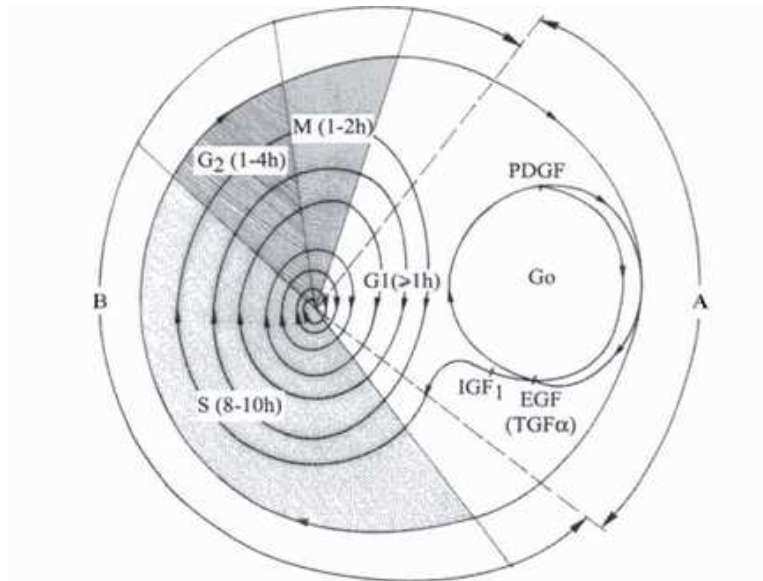
### **L'essentiel**

La fonction de lactation, de l'initiation lors de la phase de lactogenèse à son arrêt lors de l'involution mammaire, est régulée par de nombreuses hormones. La PRL est primordiale à l'initiation et au maintien de la lactation puisqu'elle agit comme un facteur de survie des CEM et stimule la synthèse des constituants du lait. La GH, en participant à la répartition des nutriments et en stimulant l'activité métabolique et la prolifération des CEM, participe aussi à la régulation de la fonction de lactation. Enfin, l'OT est indispensable par son rôle dans le réflexe d'éjection du lait. La lactation est aussi régulée par d'autres hormones telles que les facteurs de croissance IGF-I et IGF-II et les glucocorticoïdes qui stimulent la synthèse de lait. Au contraire, les stéroïdes sexuels ont plutôt un effet négatif sur la fonction de lactation.



# Chapitre 3

Le nombre de cellules  
épithéliales mammaires dans  
la glande mammaire, un  
facteur déterminant de la  
production laitière



**Figure 10** : Cycle cellulaire de la cellule épithéliale mammaire (Delouis et al., 2001).

La cellule épithéliale mammaire se trouve dans deux états schématisés par A et B. En A, la cellule est au repos ; en B, elle se multiplie. La phase A a une durée qui varie de 1 heure lorsque la cellule mammaire est en multiplication très active (G1), à plusieurs jours voire plusieurs années lorsque la femelle n'est pas dans un cycle de reproduction (G0). La phase B a une durée pratiquement constante : la synthèse d'ADN dure 8 à 10 heures (S), la mitose dure 1 à 2 heures (M) après une période de repos cellulaire de 1 à 4 heures (G2) (Delouis et al., 2001).

## **Chapitre 3 - Le nombre de cellules épithéliales mammaires dans la glande mammaire, un facteur déterminant de la production laitière**

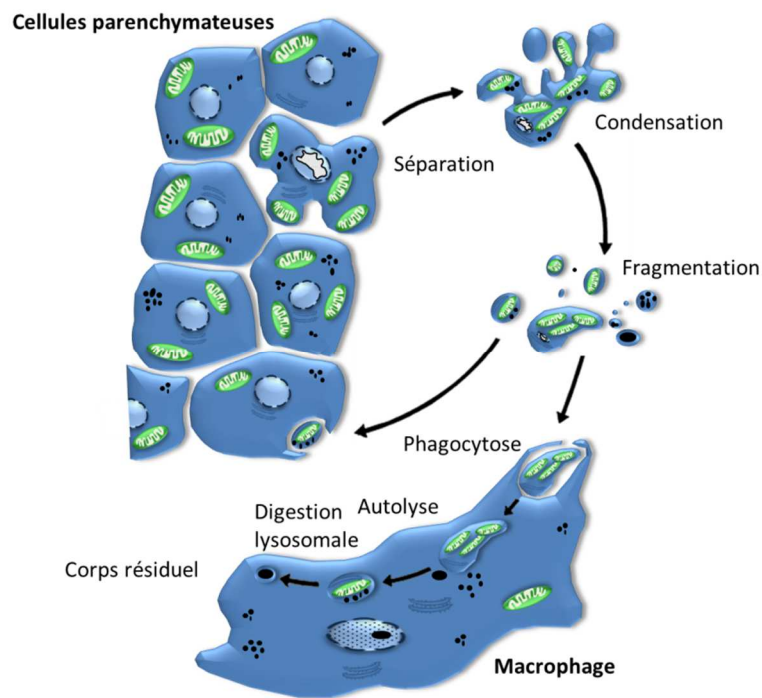
La quantité de lait produit par la glande mammaire dépend de deux facteurs déterminants que sont le nombre de CEM dans le tissu mammaire et l'activité métabolique de ces cellules (Boutinaud et al., 2004a). Dans ce chapitre, seul le facteur « nombre de CEM dans le tissu mammaire » sera discuté puisque le nombre de CEM est le principal facteur déterminant la production laitière (Knight, 2000).

### **1. Mécanismes de régulation du nombre de cellules épithéliales mammaires dans la glande mammaire**

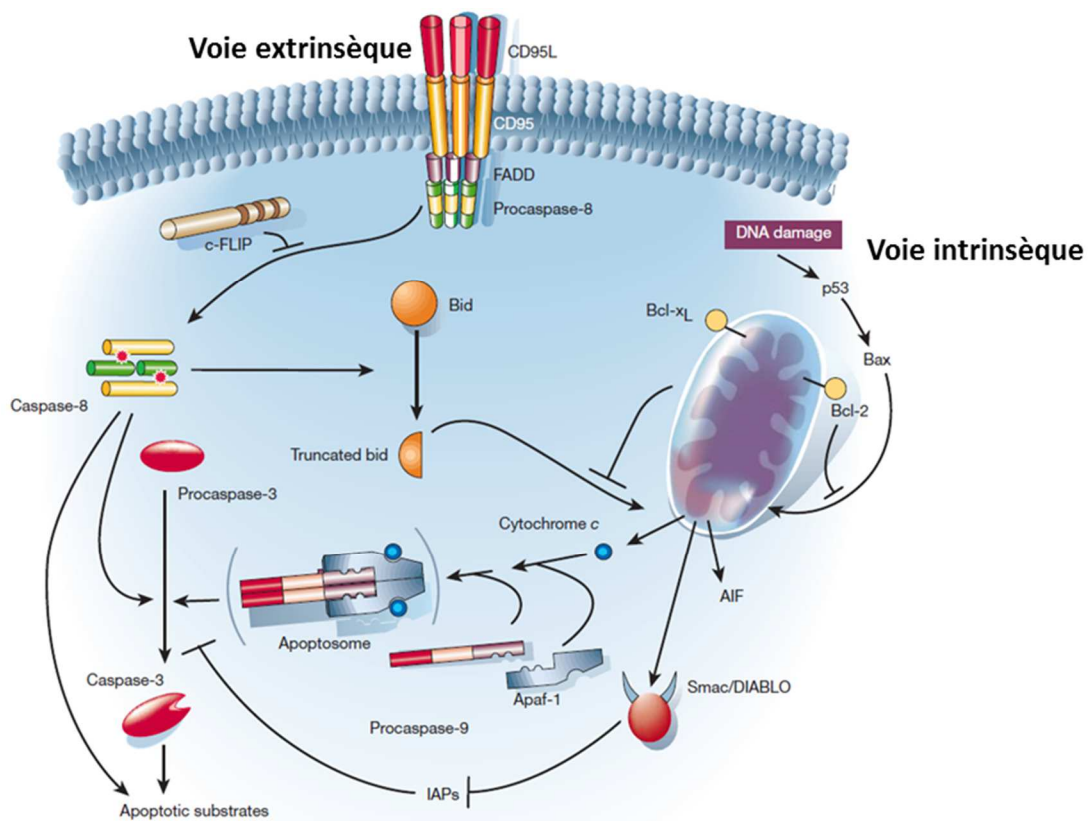
#### **1.1. Equilibre entre prolifération cellulaire et mort cellulaire par apoptose**

##### ***Prolifération cellulaire.***

La prolifération cellulaire est un processus universel qui est à la base de la croissance et du développement de tous les organismes eucaryotes, des levures aux métazoaires (Nurse, 2000). La cellule dans un état de quiescence (phase G<sub>0</sub>) entre en prolifération suite à un stimulus prolifératif (**Figure 10**). Le cycle cellulaire commence par une interphase composée de la phase G<sub>1</sub> (phase de préparation à la réplication de l'ADN), la phase S (phase de réplication de l'ADN) et de la phase G<sub>2</sub> (phase de vérification de la réplication). S'en suit la phase de mitose (phase M), phase de division cellulaire donnant naissance à deux cellules génétiquement identiques (Nurse, 2000). Il est possible d'étudier le taux de cellules en prolifération dans le tissu mammaire en mesurant le nombre de cellules exprimant le Proliferating cell nuclear antigen (**PCNA**), protéine auxiliaire de l'ADN polymérase  $\gamma$  (Colitti et al., 2005; Wiart et al., 2013).



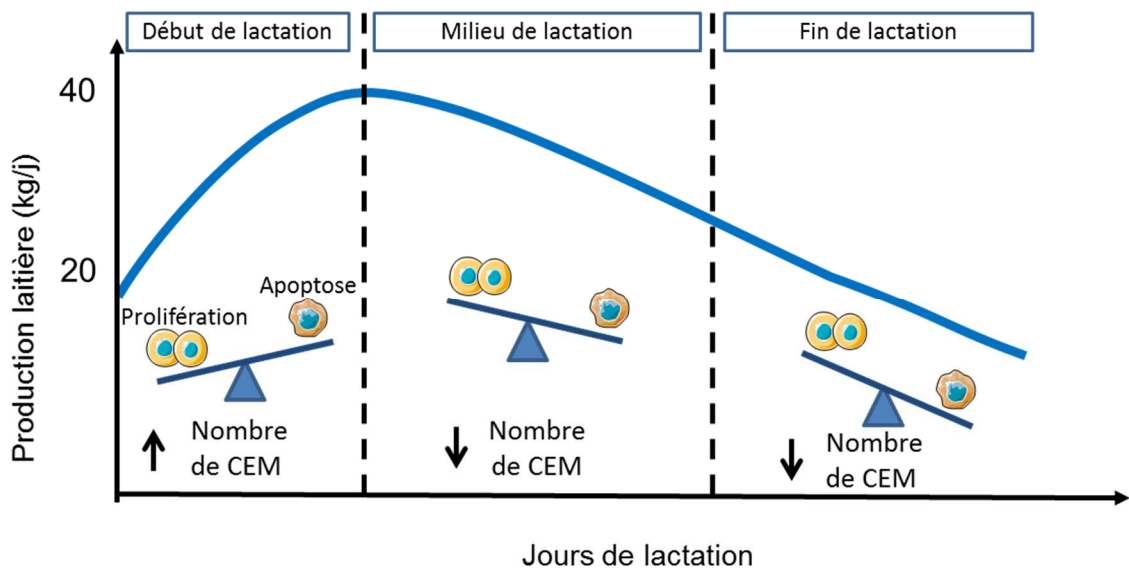
**Figure 11** : Evolution des caractéristiques morphologiques des cellules au cours du processus d'apoptose (d'après Kerr et al., 1972).



**Figure 12** : Les différentes voies d'induction de l'apoptose (Hengartner, 2000).

### ***Mort cellulaire par apoptose.***

L'apoptose, définie comme la mort programmée de la cellule, est un processus complexe. Au cours de ce processus, la cellule va subir des changements morphologiques caractéristiques (**Figure 11**) dont résultent la formation de corps apoptotiques : la cellule se sépare tout d'abord des cellules voisines, son cytoplasme et son noyau se condensent et enfin des protubérances formées à la surface de la cellule se séparent du reste de la cellule (Kerr et al., 1972). Il existe différentes voies d'induction de l'apoptose (Hengartner, 2000), dont les deux principales sont la voie intrinsèque (ou voie mitochondriale) et la voie extrinsèque (ou voie des récepteurs de mort). La voie mitochondriale est initiée en réponse à des dommages cellulaires tels que des dommages au niveau de l'ADN. Cette voie implique l'action des protéines de la famille Bcl-2. Le signal pro-apoptotique amène les protéines pro-apoptotiques telles que Bax, Bad ou Bid à se diriger vers la mitochondrie, induisant le relargage de cytochrome c par cette dernière (Hengartner, 2000). Le cytochrome c se lie alors avec la protéine activatrice Apaf-1 et la pro-caspase 9, déclenchant ainsi l'activation de la caspase-9 (Reed, 2000). Le complexe cytochrome c/Apaf-1/caspase-9 activée forment un complexe appelé l'apoptosome, complexe responsable de l'activation des caspases effectrices telle que la caspase-3 (**Figure 12**). La voie extrinsèque est quant à elle, comme son nom l'indique, déclenchée par un signal pro-apoptotique externe à la cellule. La liaison entre un ligand de mort (tel que le FasL) et un récepteur membranaire de mort (tel que le Fas) induit la trimérisation des récepteurs et la formation d'un complexe de signalisation de l'apoptose appelé complexe DISC (Death-Inducing Signaling Complex) grâce à la liaison de la protéine FADD (Fas-Associated Death Domain protein). Ce complexe recrute par la suite des pro-caspases-8 ou -10 qui vont être activées. Les caspases-8 ou -10 actives, caspases initiatrices, sont alors libérées dans le cytoplasme et activent les caspases effectrices (**Figure 12**). Les caspases initiatrices -8 et -10 peuvent activer la voie intrinsèque via le clivage de la protéine pro-apoptotique Bid qui stimule le relargage de cytochrome c et amplifie ainsi le signal pro-apoptotique (Hengartner, 2000). Il est possible de d'étudier le taux d'apoptose dans le tissu mammaire en mesurant, grâce à la méthode Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labelling (**TUNEL**), le nombre de cellules dont l'ADN est fragmenté (Wiar et al., 2013), ou en mesurant le niveau d'expression des ARN codant pour les protéines impliquées dans la voie de signalisation de l'apoptose.



**Figure 13 :** Evolution de la production laitière et de l'équilibre entre la prolifération et la mort cellulaire par apoptose au cours de la lactation (d'après Stefanon et al., 2002).

CEM : cellule épithéliale mammaire



### ***Equilibre entre prolifération cellulaire et apoptose dans la glande mammaire.***

Le nombre de CEM dans le tissu mammaire résulte en partie de l'équilibre entre la prolifération cellulaire et l'apoptose ; le nombre de CEM diminuant lorsque le taux de prolifération cellulaire est moins élevé que le taux d'apoptose et inversement (Capuco et al., 2003). Le taux de prolifération cellulaire est principalement élevé en fin de gestation lors de la mammogenèse II résultant en une expansion de la population de CEM (Knight, 2000). Bien que les CEM gardent la capacité à se diviser, le taux de prolifération est moins important pendant la lactation (Knight, 2000). Cependant, le nombre de CEM dans le tissu mammaire augmente au début de la lactation et ce jusqu'au pic de lactation (**Figure 13**). Cette augmentation du nombre de CEM est la résultante d'un taux de prolifération plus élevé que le taux d'apoptose (Stefanon et al., 2002). Après le pic de lactation, le taux d'apoptose prend le dessus conduisant à la diminution du nombre de CEM dans le tissu mammaire (Knight et Peaker, 1984; Capuco et al., 2001; Stefanon et al., 2002). Le taux d'apoptose augmente fortement à la fin de la lactation et participe ainsi à la régression du tissu mammaire lors du processus d'involution mammaire (Wilde et al., 1999; Stefanon et al., 2002). Capuco et al. (2001) ont estimé que dans la glande mammaire bovine en lactation, le taux moyen de prolifération était de 0,3 % par jour et le taux moyen d'apoptose de 0,56 % par jour. Ils ont aussi estimé qu'au cours d'une lactation, près de la moitié de la population cellulaire est renouvelée (Capuco et al., 2001).

#### **1.2. Exfoliation des cellules épithéliales mammaires dans le lait**

Suite à la découverte de la présence de CEM exfoliées dans le lait, ces cellules ont été étudiées car, contrairement aux biopsies mammaires, celles-ci constituent une source valable et non invasive de transcrits mammaires permettant d'étudier le fonctionnement de la glande mammaire chez les ruminants laitiers<sup>1</sup>. Ces CEM sont détachées de l'épithélium mammaire et évacuées dans le lait tout au long de la lactation. Le taux d'exfoliation des CEM, défini comme le nombre de CEM exfoliées dans le lait par jour, est alors estimé en mesurant la quantité de lait produite par jour et la concentration en CEM dans le lait de la

---

<sup>1</sup> Une revue de synthèse traitant de l'utilisation des CEM exfoliées dans le lait comme source de transcrits mammaires pour l'étude du fonctionnement de la glande mammaire a été publiée dans *Frontiers in Genetics* et est disponible en **Annexe 4**. Cette technique a aussi donné lieu à un poster au colloque OPAL & FRANCOPA « Place des méthodes de remplacement en expérimentation biologique » (**Annexe 5**).



traite du matin (en faisant l'approximation que la concentration en CEM est identique dans le lait de la traite du matin et dans le lait de la traite du soir). Ce taux d'exfoliation est calculé de la façon suivante :

$$\text{Taux d'exfoliation} = [\text{CEM}]_{\text{lait du matin}} \times \text{Production laitière}_{\text{journée}}$$

La concentration en CEM dans le lait peut être déterminée par microscopie en lumière blanche (Leitner et al., 2000), par cytométrie de flux (Wagner et al., 2009) ou par une méthode de purification immuno-magnétique des CEM du lait (Boutinaud et al., 2008). Capuco et al. (2003) ont suggéré que le processus d'exfoliation ne participait pas significativement à la diminution du nombre de CEM dans le tissu mammaire des ruminants laitiers après le pic de lactation. Néanmoins, chez la vache laitière, nous avons estimé la perte journalière de CEM par exfoliation à  $390 \times 10^6$  CEM en moyenne ce qui représente 1,6 % du nombre total de CEM présentes dans la glande mammaire. De plus, comme il sera démontré dans ce chapitre, de nombreux facteurs physiologiques, d'élevage et environnementaux influencent à la fois la production laitière et le taux d'exfoliation des CEM. Le processus d'exfoliation des CEM pourrait donc participer, avec l'équilibre entre la prolifération et la mort cellulaire par apoptose, à la régulation du nombre de CEM dans la glande mammaire.

## **2. Facteurs influençant la production laitière et le nombre de cellules épithéliales mammaires dans la glande mammaire<sup>1</sup>**

### **2.1. Statut endocrinien et stade de lactation**

#### ***Avancée de la lactation.***

Comme décrit plus haut, la diminution progressive de la production laitière avec l'avancée de la lactation est associée à une diminution progressive du nombre de CEM dans le tissu mammaire (Knight et Peaker, 1984). Cette diminution du nombre de CEM dans la glande mammaire observée lors de l'avancée de la lactation est la conséquence d'un taux d'apoptose plus élevé que le taux de prolifération (Capuco et al., 2001; Stefanon et al., 2002;

---

<sup>1</sup> Cette partie a été valorisée par la publication d'une revue de synthèse intitulée « Regulation of cell number in the mammary gland by controlling the exfoliation process in milk in ruminants » dans Journal of Dairy Science (**Annexe 1**), et par deux communications orales (**Annexes 2 et 3**).

**Tableau 5 :** Effet de différents facteurs physiologiques, d'élevage, ou environnementaux sur le processus d'exfoliation des cellules épithéliales mammaires (CEM) chez les ruminants (d'après Herve et al., 2016).

Espèce	Traitement	Durée du traitement (jour)	Effet sur le taux d'exfoliation des CEM		Effet sur la production laitière (PL)		Référence
			Variation (% du taux d'exfoliation des animaux témoins)	P-value	Variation (% de la PL des animaux témoins)	P-value	
Vache	Avancée de la lactation	182	+ 272	< 0,05	- 54	< 0,001	Boutinaud et al. (2013c)
Vache	Ovariectomie	269	- 71	< 0,05	+ 28	< 0,01	Boutinaud et al. (2013c)
Vache	Inhibition de la prolactine	5	+ 60	< 0,05	- 10	< 0,05	Lollivier et al. (2015)
Chèvre	Monotraite <sup>1</sup>	28	+ 137	< 0,05	- 22	< 0,001	Ben Chedly et al. (2013)
Vache	Jours courts	13	+ 53	< 0,05	Pas de variation	NS	Boutinaud et al. (2014)
Vache	Restriction alimentaire	14	Pas de variation	NS	- 14	< 0,05	Boutinaud et al., données non publiées <sup>2</sup>

<sup>1</sup> La monotraite correspond à l'abaissement de la fréquence de traite à une par jour au lieu de deux.

<sup>2</sup>Cinq vaches Prim'Holstein multipares ont été soumises à une alimentation apportant 98 % ou 70 % de leurs besoins et traitées 2 fois par jour pendant 2 semaines. Les traitements alimentaires ont été inversés lors de la période suivante. Le 14<sup>ème</sup> jour de chaque période, des échantillons de lait (3,5 kg) ont été collectés pour isoler les cellules somatiques du lait et purifier les CEM par la méthode de purification immuno-magnétique à l'aide d'un anticorps anti-cytokératine 8 spécifique des CEM bovines, comme décrit par Boutinaud et al. (2008).

Capuco et al., 2003). L'avancée de la lactation engendre aussi une augmentation progressive de la concentration en CEM dans le lait (Boutinaud et al., 2013). La concentration en CEM dans le lait passe de 3 900 CEM/mL à 21 semaines de lactation à 46 300 CEM/mL à 47 semaines de lactation, représentant ainsi une augmentation de 272 % de la concentration en CEM dans le lait avec l'avancée de la lactation (**Tableau 5**, Boutinaud et al., 2013). L'avancée de la lactation a donc un effet négatif sur la production laitière en inhibant la prolifération cellulaire et en stimulant l'apoptose et l'exfoliation des CEM dans le lait.

### ***Stéroïdes ovariens.***

La sécrétion d'œstrogènes par l'unité fœto-placentaire lors d'une gestation est connue pour être associée, chez la vache laitière en lactation, à une diminution de la production laitière (Bachman et al., 1988). De plus, des injections quotidiennes d'œstradiol exogène avec (Mollett et al., 1976) ou sans progestérone (Delbecchi et al., 2005) induisent une forte diminution de la production laitière pouvant atteindre une perte de lait de 82 % 11 jours après la 1<sup>ère</sup> injection (Delbecchi et al., 2005). Les stéroïdes ovariens ont donc un fort effet négatif sur la production laitière chez la vache laitière en lactation. La diminution de la production laitière induite par les stéroïdes ovariens n'est pas associée à des variations de l'expression de gènes de protéines impliquées dans la voie de signalisation de l'apoptose telles que Bax et Bcl-2 (Delbecchi et al., 2005). Par contre, la suppression des stéroïdes ovariens par ovariectomie au moment du pic de lactation engendre une augmentation de 36 % de la production laitière après 14 mois de lactation (Yart et al., 2012a). Elle résulte aussi en une meilleure persistance de la lactation puisqu'il a été observé un gain moyen de 2,5 kg de lait par jour entre le 6<sup>ème</sup> et le 14<sup>ème</sup> mois de lactation chez des vaches laitières ovariectomisées (Yart et al., 2012a). En plus de ces effets sur la production laitière, la suppression des stéroïdes ovariens par ovariectomie pourrait diminuer le taux d'apoptose dans le tissu mammaire puisqu'une diminution significative de la concentration en Poly(ADP-ribose) dans le tissu mammaire, protéine impliquée dans la fragmentation de l'ADN au cours du stade final de l'apoptose, a été observée (Yart et al., 2012a). Chez les vaches laitières ovariectomisées, la suppression des stéroïdes ovariens engendre aussi une diminution de l'exfoliation des CEM comparativement à des vaches laitières témoins chirurgicaux après 47 semaines de lactation (**Tableau 5**, Boutinaud et al., 2013).



***Inhibition de la prolactine au cours de la lactation.***

Le rôle de la PRL dans la régulation de la production laitière a été étudié grâce à des inhibiteurs de la sécrétion de la PRL, tels que la cabergoline et la quinagolide. Ces deux molécules inhibent la synthèse et la sécrétion de PRL en se liant spécifiquement aux récepteurs D2 de la dopamine, localisés sur les cellules lactotropes (Brownell, 1996). Des injections quotidiennes de quinagolide pendant 9 semaines ont permis d'étudier les effets d'une inhibition de la PRL à long terme sur la production laitière et le nombre de CEM dans le tissu mammaire chez la vache laitière (Lacasse et al., 2011; Boutinaud et al., 2012). L'inhibition de la sécrétion de la PRL par les injections de quinagolide a engendré une diminution de la production laitière puisque les vaches traitées à la quinagolide produisent 14 % de lait en moins que les vaches témoins. La diminution de la production laitière induite par l'inhibition de la sécrétion de la PRL chez les vaches traitées à la quinagolide est en partie due à une diminution de l'activité métabolique des CEM comme le montre la diminution de l'expression des ARNm  $\alpha$ -LA et  $\kappa$ -CN après 4 semaines de traitement (Boutinaud et al., 2012). La diminution de production laitière en réponse à l'inhibition de la PRL peut aussi être expliquée par une diminution du nombre de CEM dans le tissu mammaire résultant d'un taux de prolifération moins important et d'un taux d'apoptose plus élevé chez les vaches traitées à la quinagolide comparativement aux vaches témoins (Boutinaud et al., 2012). Le rôle de la PRL dans la régulation de la production laitière et du nombre de CEM dans le tissu mammaire a aussi été étudié à plus court terme grâce à des injections de quinagolide, de quinagolide et de PRL exogène ou de solution témoin pendant 5 jours. Cet essai a une nouvelle fois montré que l'inhibition de la PRL par la quinagolide induit une diminution de la production laitière (Lollivier et al., 2015). Les injections simultanées de PRL bovine exogène ont eu tendance à engendrer une augmentation de la production laitière mais n'ont pas permis de restaurer complètement la production laitière au niveau de celle des vaches témoins. Dans cet essai à court terme, l'inhibition de la PRL n'a pas eu d'effet sur le pourcentage de CEM apoptotiques dans le tissu mammaire mais a eu tendance à diminuer le pourcentage de CEM en prolifération. Au contraire, la PRL exogène a induit une augmentation du pourcentage de CEM en prolifération. L'inhibition de la sécrétion de PRL par la quinagolide a aussi engendré une augmentation de 60 % du taux d'exfoliation (**Tableau 5**), tandis que les injections de PRL bovine exogène ont eu tendance à réduire cet effet négatif de la quinagolide en limitant le taux d'exfoliation des CEM. De plus, les





injections de PRL bovine exogène ont engendré une augmentation de la proportion de CEM viables parmi toutes les CEM exfoliées dans le lait, cette proportion de CEM viables passant de 57 % à 69 %. Ces résultats sont en accord avec les effets connus de la PRL sur les cultures cellulaires de CEM. En effet, la PRL stimule la prolifération des CEM in vitro (Olazabal et al., 2000) et protège les CEM de la mort cellulaire par apoptose en inhibant l'expression d'une protéine de liaison à l'IGF-I, à savoir l'IGFBP-5 (Accorsi et al., 2002), permettant ainsi à l'IGF-I de jouer son rôle de facteur de survie des CEM. L'ensemble de ces résultats suggèrent qu'en parallèle de son effet activateur de la prolifération cellulaire et inhibiteur de la mort des CEM par apoptose dans le tissu mammaire, la PRL participe à la régulation du nombre de CEM dans le tissu mammaire également en limitant le processus d'exfoliation des CEM.

#### ***Inhibition de la prolactine pendant l'involution mammaire.***

Au moment du tarissement, l'arrêt de la traite par l'éleveur engendre un arrêt brutal de la sécrétion de lait par la glande mammaire qui se traduit par une baisse de 90 % de la quantité de lait produit seulement 7 jours après le tarissement (Hurley, 1989; Wilde et al., 1999). La diminution de la production laitière est en partie due à une diminution du nombre de CEM dans le tissu mammaire provoquée par le processus d'involution. En effet, lors de l'involution mammaire, le tissu sécréteur régresse suite à l'induction de l'apoptose des CEM (Jaggi et al., 1996; Wilde et al., 1997; Accorsi et al., 2002). La diminution des concentrations d'hormones galactopoïétiques dont la PRL au moment du tarissement est en partie responsable de l'induction de l'apoptose dans le tissu mammaire (Accorsi et al., 2002). La PRL pourrait aussi réguler le processus d'exfoliation observé lors de la 1<sup>ère</sup> phase de l'involution mammaire (Wilde et al., 1997; Watson, 2006; Stein et al., 2007). Chez la vache laitière, l'inhibition de la sécrétion de la PRL par la cabergoline au moment du tarissement stimule l'exfoliation des CEM comme indiqué par une concentration en CEM 28 % plus élevée chez des vaches traitées à la cabergoline que chez les vaches témoins, 14 jours après le tarissement (Boutinaud et al., 2013b, 2017). De plus, 3 et 4 jours après le tarissement, la proportion de CEM viables exfoliées dans les sécrétions mammaires chez des vaches traitées à la cabergoline est moins élevée que chez des vaches témoins (Boutinaud et al., 2013b, 2017). Cela confirme que le remodelage du tissu mammaire pendant l'involution implique la



perte de CEM dans le lait par exfoliation et que cette exfoliation pendant l'involution mammaire semble elle-même être régulée par la PRL.

### ***Sérotonine et involution mammaire.***

La sérotonine est une hormone et un neurotransmetteur synthétisé à partir du tryptophane dans le cerveau par les neurones sérotoninergiques et dans l'intestin par les cellules chromaffines. Cependant, la sérotonine est aussi synthétisée par les CEM puis sécrétée dans la lumière alvéolaire avec les autres constituants du lait. Elle agit alors par les voies de communication autocrine et paracrine en se fixant à ses récepteurs présents à la surface des CEM (Matsuda et al., 2004; Collier et al., 2012). Dans la glande mammaire, elle est connue pour jouer un rôle dans la régulation de la sécrétion du lait chez de nombreuses espèces dont la vache laitière (Collier et al., 2012). Elle est en effet connue pour avoir un rôle de rétrocontrôle négatif sur la fonction de lactation (Matsuda et al., 2004; Stull et al., 2007). Ce rétrocontrôle négatif a été mis en évidence chez la vache laitière grâce à la perfusion intramammaire d'un inhibiteur de la réabsorption de la sérotonine permettant ainsi d'augmenter l'exposition des CEM à la sérotonine. Cette infusion a engendré une augmentation de 11 % de la perte de lait observée au moment du tarissement (Hernandez et al., 2008). Son action au moment du tarissement est aussi essentielle à la régulation du remodelage tissulaire lors du processus d'involution mammaire (Matsuda et al., 2004). La 1<sup>ère</sup> phase de l'involution mammaire est caractérisée par une forte augmentation de la mort cellulaire par apoptose et par la perte de ces CEM apoptotiques dans la lumière alvéolaire (Wilde et al., 1997; Watson, 2006; Stein et al., 2007). Lors cette phase de l'involution mammaire, les pressions mécaniques associées à l'accumulation du lait induisent une augmentation de la sécrétion de sérotonine par les CEM, résultant en des concentrations élevées de sérotonine dans la lumière alvéolaire (Matsuda et al., 2004; Suárez-Trujillo et al., 2016). Des essais menés *in vitro* sur une lignée de CEM humaines immortalisées (MCF10A) et *in vivo* chez la souris ont permis de montrer que la sérotonine stimulait l'exfoliation des CEM induite par la stase du lait lors de l'involution mammaire (Pai et Horseman, 2011). Ces résultats suggèrent que la sérotonine est nécessaire à la régulation du nombre de CEM dans la glande mammaire au moment du tarissement puisque cette hormone accentue la diminution de la production laitière et la régression de l'épithélium mammaire associées à



l'involution mammaire en induisant à la fois la mort des CEM par apoptose et l'exfoliation des CEM dans le lait.

### ***Hormone de croissance.***

L'administration de GH bovine (**bGH**, aussi appelée somatotropine bovine) exogène est largement connue pour stimuler la production laitière des vaches laitières (Bauman, 1999). Un traitement à la bGH induit aussi une augmentation du nombre de CEM dans le tissu mammaire comme indiqué par l'augmentation du poids des mamelles, du nombre d'alvéoles mammaires et de la quantité d'ADN dans le tissu mammaire (Knight et al., 1990; Baldi et al., 2002; Boutinaud et al., 2003). Cette augmentation du nombre de CEM dans le tissu mammaire en réponse à un traitement à la bGH est due à une augmentation du taux de prolifération cellulaire (Capuco et al., 2001). La bGH agit via la stimulation de la synthèse du facteur de survie des CEM IGF-I par le foie. A ce jour, il n'est pas connu si l'augmentation du nombre de CEM en réponse à la bGH implique aussi une réduction du taux d'exfoliation des CEM.

## **2.2. Pratiques d'élevage**

### ***Fréquence de traite.***

Chez les ruminants laitiers en lactation, la glande mammaire répond aux changements de fréquence de traite en modulant la production laitière, que le changement de fréquence de traite consiste en une augmentation ou une diminution du nombre de traites par jour.

- **Augmentation de la fréquence de traite** : L'augmentation de la fréquence de traite est utilisée en élevage comme levier d'action permettant d'augmenter la production laitière des vaches laitières. En effet, comparativement à des vaches traites selon le rythme habituel de 2 fois par jour, des vaches dont la fréquence de traite est augmentée à 3 fois par jour produisent en moyenne 15 à 20 % de lait en plus par jour (Wall et McFadden, 2012). Lorsque la fréquence de traite est une nouvelle fois augmentée pour atteindre 4 traites par jour, la production laitière augmente encore de 7 % (Wall et McFadden, 2012). Chez la chèvre laitière, l'augmentation de la production laitière avec l'augmentation de la fréquence de traite est associée à une augmentation du nombre de cellules dans le tissu

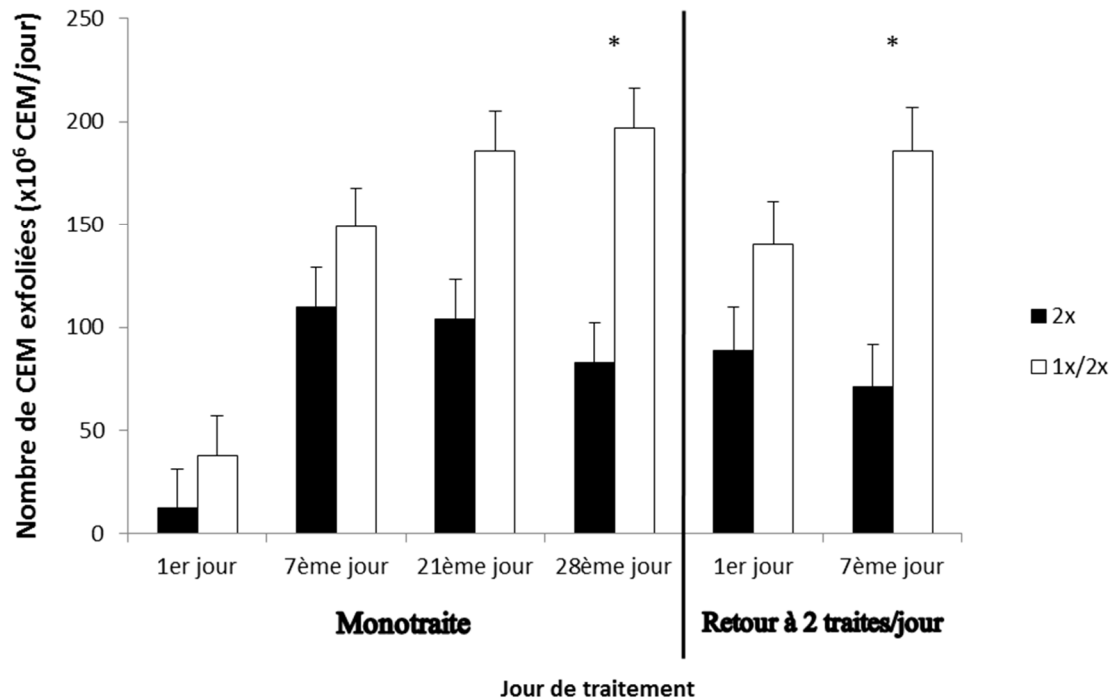
**Tableau 6** : Effet de 7 jours de monotraite (1x) sur la concentration et le taux d'exfoliation des cellules épithéliales mammaires (CEM) dans le lait en comparaison à 2 traites par jour (2x, d'après Herve et al., 2016).

Espèce	Concentration en CEM dans le lait (10 <sup>3</sup> cellules/mL)			Taux d'exfoliation des CEM (10 <sup>6</sup> cellules/jour)			Référence
	1x	2x	<i>P</i> -value	1x	2x	<i>P</i> -value	
Vache	14,2	14,2	NS	172	309	0,06	Boutinaud et al. (2012)
Vache	14,1	20,9	NS	274	469	0,15	M. Boutinaud, données non publiées <sup>1</sup>
Chèvre	23,4	13,2	NS	19	8	NS	Ben Chedly et al. (2011)
Chèvre	55,0	29,0	NS	149	110	NS	Ben Chedly et al. (2013)

<sup>1</sup>Cinq vaches Prim'Holstein multipares ont soit été traitées 1 fois par jour (intervalle de traite de 24h) soit 2 fois par jour (intervalle de traite de 12h) pendant 1 semaine. La semaine suivante, les fréquences de traite ont été inversées. Le 7<sup>ème</sup> jour de chaque semaine, des échantillons de lait (3,5 kg) ont été collectés pour isoler les cellules somatiques du lait et purifier les CEM par la méthode de purification immuno-magnétique à l'aide d'un anticorps anti-cytokératine 8 spécifique des CEM bovines, comme décrit par Boutinaud et al. (2008).

mammaire (Wilde et al., 1987). Chez la vache laitière, l'effet stimulateur de l'augmentation de la fréquence de traite sur le nombre de CEM dans le tissu mammaire est moins clair puisqu'il a été observé que l'augmentation de la fréquence de traite pouvait engendrer une augmentation du nombre de CEM dans la glande mammaire via l'augmentation du taux de prolifération (Hillerton et al., 1990; Hale et al., 2003) ou ne pas avoir d'effet sur l'équilibre entre la prolifération cellulaire et l'apoptose (Nørgaard et al., 2005; Wall et al., 2006). De plus, l'effet de l'augmentation de la fréquence de traite au-delà de 2 traites par jour sur le taux d'exfoliation des CEM n'a, à ce jour, pas été déterminé.

- **Réduction de la fréquence de traite** : Il a été rapporté à de nombreuses reprises que réduire la fréquence de traite de 2 fois à 1 fois par jour avait un effet négatif sur la production laitière des ruminants. Comparativement à 2 traites par jour, la monotraite induit une diminution de la production laitière pouvant atteindre 20 à 30 % chez la vache laitière (Rémond et Pomiès, 2005), 15 à 48 % chez la brebis laitière (Knight et al., 1993; Negro et al., 2001) et 16 à 30 % chez la chèvre laitière (Boutinaud et al., 2003; Komara et al., 2009). Chez la chèvre laitière, la diminution de production laitière engendrée par la monotraite est associée à une diminution de l'activité métabolique des CEM (Ben Chedly et al., 2013). Cependant, la monotraite affecte aussi le nombre de CEM dans le tissu mammaire puisqu'une diminution du taux de prolifération ainsi qu'une augmentation du taux d'apoptose ont été observées dans le tissu mammaire en réponse à 4 semaines de monotraite chez la chèvre laitière (Li et al., 1999) ou en réponse à 8 jours de monotraite chez la vache laitière (Boutinaud et al., 2013a). La monotraite engendre aussi une augmentation de l'expression d'ARNm de gènes impliqués dans la voie de signalisation de la mort cellulaire par apoptose (Littlejohn et al., 2010; Boutinaud et al., 2013a) ce qui concorde avec l'augmentation du taux d'apoptose dans le tissu mammaire. L'effet de la monotraite sur l'exfoliation des CEM dans le lait a aussi été étudié chez la vache et la chèvre laitière. Lorsque la monotraite a été appliquée durant 7 jours, une diminution de la production laitière a bien été observée mais aucun effet sur la concentration en CEM dans le lait ou sur le nombre de CEM exfoliées par jour n'a été mis en évidence chez la vache et la chèvre laitière (**Tableau 6**). Cependant, chez la chèvre laitière, lorsque la monotraite a été appliquée sur une période plus longue, un effet a été observé sur l'exfoliation des CEM. En effet, 28 jours après le début de la monotraite, la concentration



**Figure 14** : Taux d'exfoliation des cellules épithéliales mammaires (CEM) dans le lait de chèvres en réponse à la monotraite.

Pour les chèvres 1x/2x, la fréquence de traite est abaissée à une fois par jour pendant 28 jours puis ramenée à deux fois par jour pendant 7 jours ; elle a été maintenue à deux traites par jour pour les chèvres Témoin (2x). Les données présentées sont les moyennes  $\pm$  erreur standard à la moyenne. Les moyennes statistiquement différentes sont indiquées par un astérisque lorsque  $P < 0,05$  (Ben Chedly et al., 2013).



en CEM dans le lait et le taux d'exfoliation sont significativement plus élevés (+ 174 % et + 137 %, respectivement) chez des chèvres Alpines traites 1 fois/jour comparativement à des chèvres Alpines témoins traites 2 fois/jour (**Figure 14**, Ben Chedly et al., 2013). Après 5 semaines, les chèvres ayant subi la monotraite ont été de nouveau traites 2 fois/jour (groupe 1x/2x) alors que les chèvres témoins ont continué à être traites 2 fois/jour (groupe 2x) pendant les 5 semaines suivantes. L'effet stimulateur de la monotraite sur l'exfoliation des CEM est toujours présent après le retour à 2 traites/jour. En effet, 7 jours après que les chèvres soient repassées à 2 traites/jour, malgré des niveaux de production laitière similaires pour les 2 groupes de chèvres, le nombre de CEM exfoliées par jour est 160 % plus important chez les chèvres du groupe 1x/2x que chez les chèvres témoins du groupe 2x (**Figure 14**). Le retour à 2 traites/jour suite aux 5 semaines de monotraite pourrait avoir rapidement engendré une augmentation du nombre de CEM dans le tissu mammaire en stimulant la prolifération cellulaire (Wall et McFadden, 2012) et/ou réduisant le taux de mort cellulaire par apoptose, pouvant ainsi expliquer la restauration d'une production laitière similaire aux chèvres témoins pour les chèvres ayant subi la monotraite. Simultanément, le retour à 2 traites par jour pourrait aussi avoir induit un remodelage du tissu mammaire suivi de l'élimination des CEM sénescentes par exfoliation, expliquant le taux d'exfoliation plus élevé chez les chèvres du groupe 1x/2x après le retour à 2 traites/jour. Tous ces essais visant à étudier l'effet de la monotraite suggèrent que la diminution de la production laitière induite par la réduction de la fréquence de traite peut être, à court terme, la conséquence d'une diminution de l'activité métabolique des CEM et de variations dans le turnover cellulaire dans le tissu mammaire. A plus long terme, le processus d'exfoliation des CEM pourrait jouer un rôle dans l'ajustement du nombre de CEM dans la glande mammaire en réponse à la monotraite.

### ***Photopériode.***

Chez les ruminants laitiers, la photopériode, définie comme la durée quotidienne du jour, influence fortement la fonction de lactation. En comparaison à des vaches laitières exposées à une photopériode correspondant à des jours courts, des vaches laitières exposées à une photopériode correspondant à des jours longs produisent en moyenne 0,5 à 3,3 kg de lait



supplémentaire par jour (Dahl et al., 2000). Chez la chèvre laitière en fin de lactation, une photopériode correspondant à des jours longs (soit 16 h d'exposition lumineuse par jour) engendre une augmentation de la production laitière de 20 % (Russo et al., 2013). L'augmentation de la production laitière en réponse à des jours longs a été observée à tous les stades de lactation (Dahl et Petitclerc, 2003) et est accompagnée de concentrations circulantes d'IGF-I et de concentrations basales de PRL plus élevées (Peters et al., 1981; Dahl et al., 2012). Le nombre de CEM dans le tissu mammaire des vaches exposées à des jours longs pourrait alors être plus élevé que celui des vaches exposées à des jours courts grâce à l'effet mitogène (Deeks et al., 1988; Ruan et al., 1992) et à l'effet anti-apoptotique (Flint et Knight, 1997) de l'IGF-I. La PRL pourrait aussi renforcer l'effet de facteur de survie de l'IGF-I en réprimant l'expression de l'IGFBP-5 (Accorsi et al., 2002). Enfin, dans le cas des jours longs, l'augmentation du nombre de CEM dans le tissu mammaire pourrait aussi résulter d'une moindre exfoliation. A ce jour, l'effet de la photopériode sur le taux d'exfoliation des CEM dans le lait a seulement été étudié une fois. Pour étudier cet effet de la photopériode, des vaches laitières ont été exposées pendant 14 jours à une photopériode correspondant à des jours courts (soit 8h d'exposition lumineuse par jour) ou à une photopériode correspondant à des jours longs (soit 16h d'exposition lumineuse par jour, Boutinaud et al., 2014). Dans cet essai, la production laitière n'a pas été influencée par la photopériode, probablement à cause de la courte durée du traitement. En effet, l'augmentation de la production laitière en réponse à une exposition à des jours longs est graduelle et devient significative seulement à partir de 3 semaines de traitement lumineux (Dahl et Petitclerc, 2003). Contrairement à la production laitière, l'exfoliation des CEM dans le lait a été affectée par les 2 semaines de traitement lumineux (Boutinaud et al., 2014). Après 13 jours de traitement lumineux, le taux d'exfoliation des CEM des vaches exposées à des jours courts était significativement plus élevé que le taux d'exfoliation des CEM des vaches exposées à des jours longs. En effet, les vaches exposées à des jours courts présentaient un taux d'exfoliation de  $239 \times 10^6$  CEM/jour alors que seulement  $156 \times 10^6$  CEM/jour ont été exfoliées chez les vaches exposées à des jours longs, représentant ainsi une augmentation de 53 % du taux d'exfoliation avec l'exposition à des jours courts (**Tableau 5**). Cet effet de la photopériode sur l'exfoliation des CEM pourrait être lié aux plus faibles concentrations plasmatiques d'IGF-I et de PRL observées chez les vaches exposées à des jours courts.



### **Alimentation.**

L'alimentation, en termes de quantité offerte et de composition de la ration, est l'un des principaux facteurs d'élevage influençant la production laitière chez les ruminants laitiers.

- **Nature du fourrage** : Il a été montré dans de nombreuses études que l'inclusion d'ensilage de maïs dans la ration de vaches laitières nourries à base d'ensilage d'herbe engendrait une augmentation significative de l'ingestion des vaches et de leur production laitière pouvant atteindre presque 2 kg de lait par jour (Khan et al., 2015). Le nombre de CEM dans le tissu mammaire étant un facteur déterminant de la production laitière, les variations de production laitière observées en réponse aux changements de fourrage dans la ration pourrait résulter de variations dans le nombre de CEM dans le tissu mammaire. Cependant, l'effet de la nature du fourrage sur les déterminants du nombre de CEM dans la glande mammaire, à savoir l'équilibre entre la prolifération cellulaire et la mort cellulaire par apoptose ainsi que l'exfoliation des CEM dans le lait, n'a jusqu'à présent jamais été étudié.
- **Restriction alimentaire** : Chez la vache laitière, la restriction alimentaire induit une diminution de la production laitière (Nørgaard et al., 2005; Guinard-Flament et al., 2007; Abdelatty et al., 2017). L'ampleur de la diminution de la production laitière dépend de la durée et de l'intensité de la restriction alimentaire ainsi que du stade de lactation des animaux. Pour exemple, en comparaison à la production laitière de vaches nourries avec un régime standard, une restriction alimentaire intense (vaches nourries à hauteur de 60 % de leur ingestion *ad libitum*) mais de courte durée (4 jours) appliquée chez des vaches laitières en milieu de lactation induit une diminution de 20 % de la production laitière (Abdelatty et al., 2017) alors qu'une restriction alimentaire de 20 % appliquée à partir de 2 semaines avant la mise-bas et jusqu'à 11 semaines après la mise-bas induit une diminution de 38 % de la production laitière (Dessaige et al., 2011). Cette diminution de la production laitière était associée, chez les vaches restreintes, à une diminution du nombre de CEM dans le tissu mammaire, indiquée par une diminution du poids des glandes mammaires, une quantité d'ADN totale dans le tissu mammaire plus faible et des alvéoles mammaires plus petites (Dessaige et al., 2011). Seulement, suivant les études, la diminution du nombre de CEM dans le tissu mammaire engendrée par une restriction alimentaire a été attribuée à différents processus : soit un taux d'apoptose plus élevé



sans variation du taux de prolifération (Dessaige et al., 2011) soit à une diminution du taux de prolifération sans variation du taux d'apoptose (Nørgaard et al., 2005). De plus, à ce jour, l'effet de la restriction alimentaire sur le taux d'exfoliation n'a été étudié qu'à une seule reprise dans un essai dans lequel des vaches laitières ont été nourries avec une ration couvrant 70 % de leurs besoins pendant 2 semaines (comme décrit par Boutinaud et al., 2008). Dans cet essai, une période de 14 jours de restriction alimentaire a induit une diminution de la production laitière sans avoir d'effet sur l'exfoliation des CEM dans le lait (**Tableau 5**). L'effet de la restriction alimentaire à plus court ou plus long terme sur le l'exfoliation des CEM reste aujourd'hui à déterminer.

### **2.3. Statut infectieux**

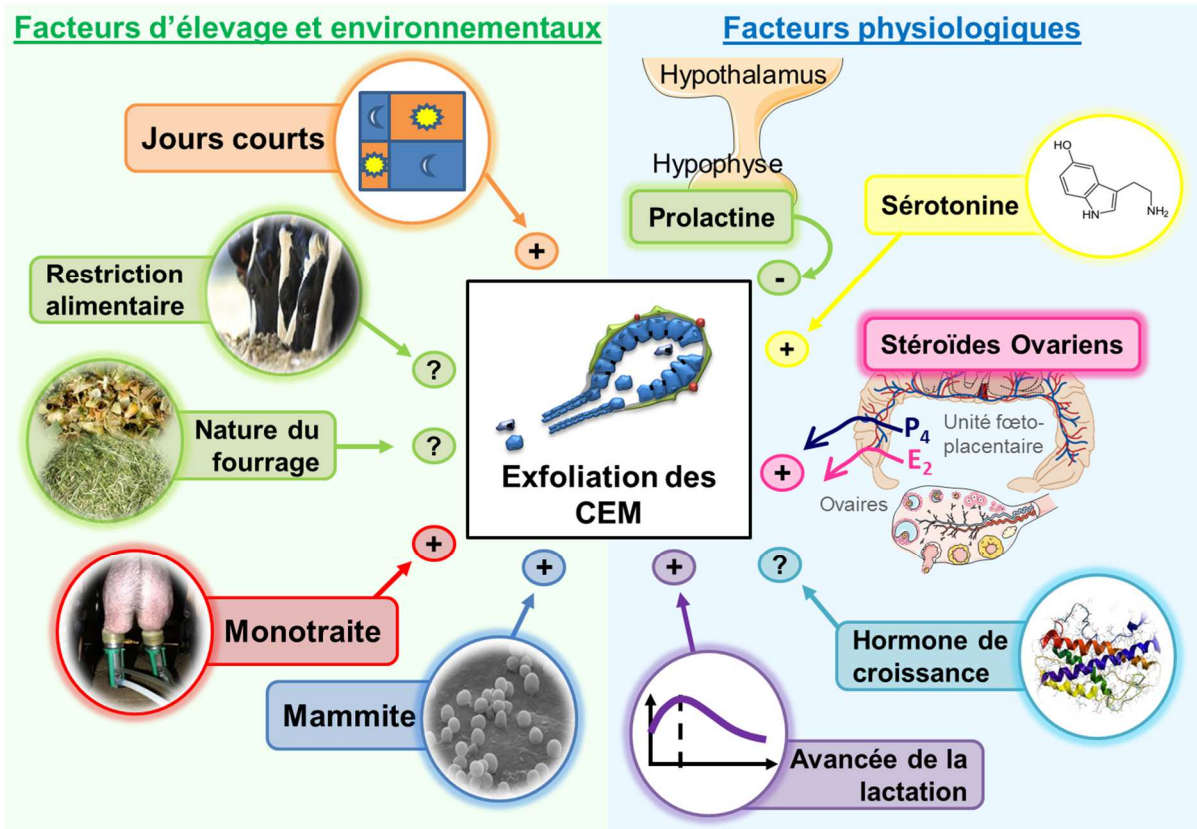
Le statut infectieux de la glande mammaire et notamment la présence d'une mammite clinique, engendre une diminution temporaire de la production laitière. Chez la vache laitière, une mammite induite par une endotoxine engendre une diminution de la production laitière pouvant atteindre 17 % seulement 11 h après la perfusion de l'endotoxine (Shuster et al., 1991). La perte de capacité à synthétiser du lait des glandes mammaires présentant une mammite est liée à une perte de l'intégrité de l'épithélium mammaire, une perte de CEM par exfoliation et un plus fort taux de mort cellulaire par apoptose (Akers et Nickerson, 2011). Il a été montré chez les vaches laitières présentant une mammite induite par une endotoxine que le pourcentage de CEM parmi toutes les cellules somatiques retrouvées dans le lait (mesuré par cytométrie de flux) augmentait de 3 % avant l'induction de la mammite à 42 % seulement 12 h après l'infusion de l'endotoxine (Wagner et al., 2009). Cet effet de l'endotoxine sur le pourcentage de CEM retrouvées dans le lait suggère que les endotoxines pourraient endommager l'épithélium entraînant l'exfoliation massive des CEM durant la phase précoce des mammites. L'effet d'une mammite subclinique sur le taux d'exfoliation des CEM n'est à ce jour pas connu.

Dans ce chapitre, il a été montré que nombreux facteurs connus pour être des facteurs de variation de la production laitière engendraient aussi des variations du taux d'exfoliation des CEM. Cependant, d'autres facteurs tels que le patrimoine génétique des





animaux ou encore les réglages de la machine à traire pourraient aussi affecter ce taux d'exfoliation des CEM.



**Figure 15** : Résumé de l'effet des principaux facteurs physiologiques, d'élevage et environnementaux connus pour affecter la production laitière sur le processus d'exfoliation des cellules épithéliales mammaires (CEM) dans le lait.

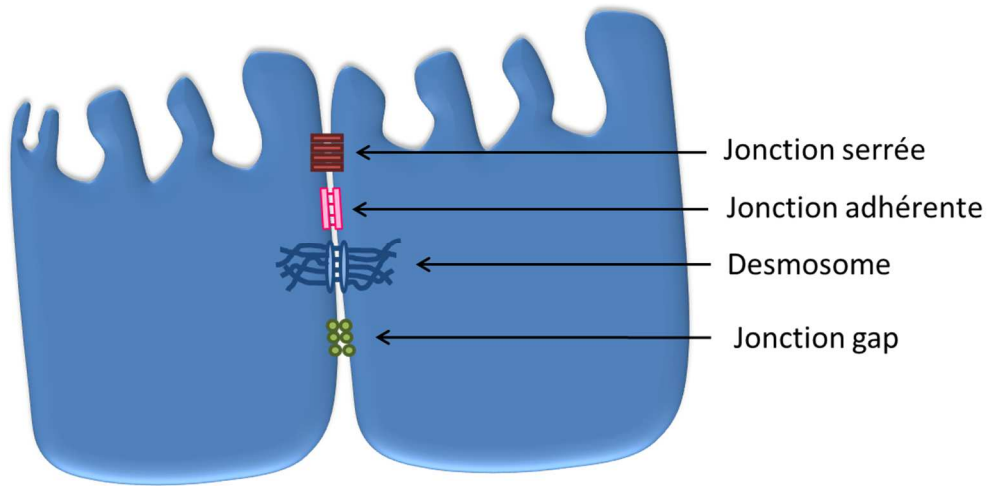
### **L'essentiel**

La quantité de lait produit par la glande mammaire est déterminée par l'activité métabolique des CEM mais surtout par le nombre de CEM dans la glande mammaire. Le nombre de CEM dans la glande mammaire dépend lui-même de l'équilibre entre la prolifération cellulaire (division cellulaire permettant à une cellule mère de donner naissance à 2 cellules filles) et l'apoptose (mort programmée des cellules). L'observation de la présence de CEM dans le lait a permis de montrer qu'une partie des CEM sont exfoliées de l'épithélium mammaire. Le taux d'exfoliation, défini comme le nombre de CEM exfoliées dans le lait par jour, peut être déterminé par microscopie en lumière blanche, par cytométrie de flux ou par purification des CEM du lait par une méthode immuno-magnétique. Dans les nombreux essais décrits dans ce chapitre, les variations de production laitière en réponse à différents facteurs physiologiques, d'élevage et environnementaux ont été attribuées à des variations du nombre de CEM dans le tissu mammaire par modification de l'équilibre entre la prolifération et la mort cellulaire par apoptose. De plus, les variations de production laitière ont été aussi, dans la plupart des essais, associées à des variations du taux d'exfoliation des CEM dans le lait ; le taux d'exfoliation des CEM diminuant lorsque la production laitière a augmenté et inversement (**Figure 15**). Cette observation appuie l'hypothèse que le processus d'exfoliation participe, en plus de l'équilibre entre prolifération et mort cellulaire, à la régulation du nombre de CEM dans la glande mammaire. Ces résultats suggèrent aussi que les variations du taux d'exfoliation des CEM et de production laitière peuvent être légèrement décalées dans le temps. Lors d'un traitement lumineux correspondant à des jours courts, il a été observé que le taux d'exfoliation des CEM augmentait avant que la production laitière diminue, suggérant que les variations de production laitière en réponse à la manipulation de la photopériode pourraient être une conséquence des variations de l'exfoliation des CEM. Au contraire, il a été montré que la baisse de production laitière en réponse à la monotraite précédait l'augmentation du taux d'exfoliation des CEM.

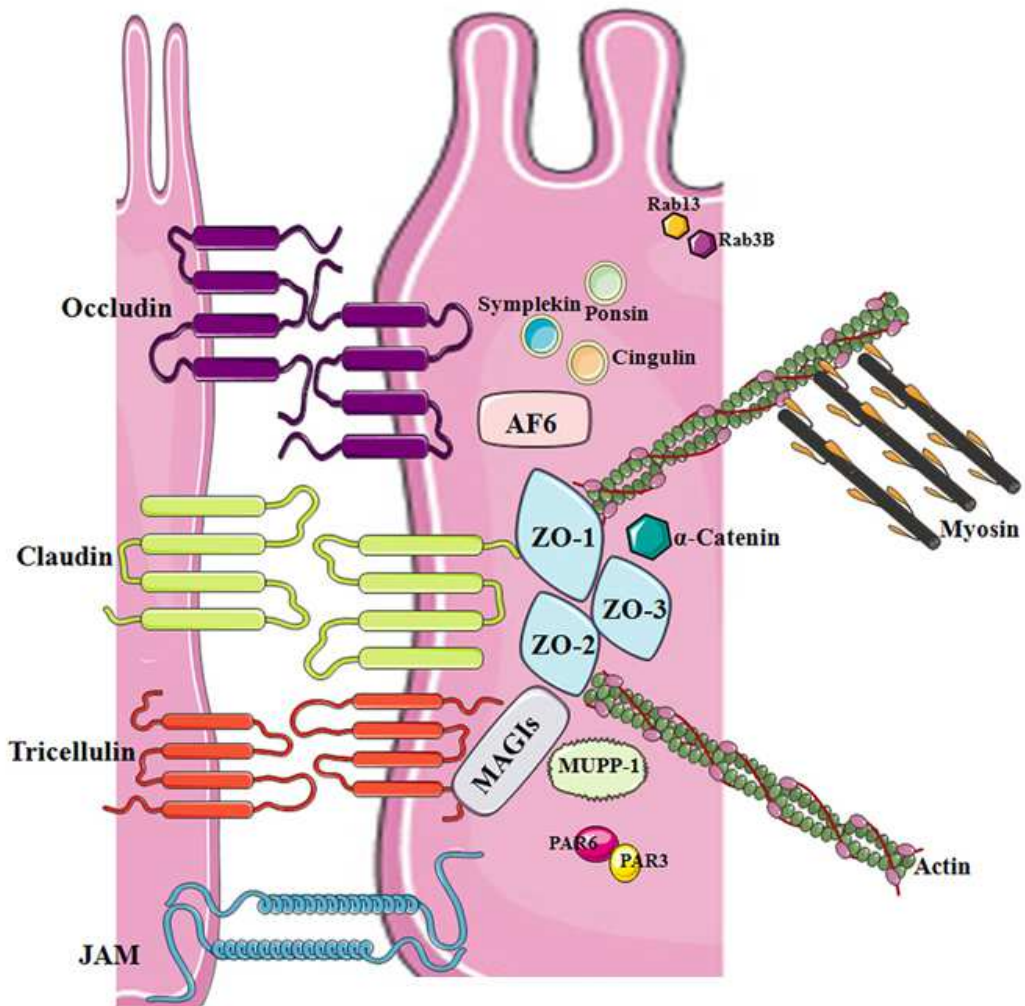


# Chapitre 4

La perte d'intégrité de  
l'épithélium mammaire,  
phénomène concomitant à  
l'exfoliation



**Figure 16** : Localisation des principales jonctions cellulaires.



**Figure 17** : Structure moléculaire des jonctions serrées (Escudero-Esparza et al., 2011).

## **Chapitre 4 - La perte d'intégrité de l'épithélium mammaire, phénomène concomitant à l'exfoliation**

### **1. Les jonctions cellulaires garantissent l'intégrité de l'épithélium mammaire**

Les CEM forment un épithélium mammaire jointif permettant la formation d'une barrière entre le milieu intérieur et la lumière alvéolaire du fait que deux CEM adjacentes sont étroitement liées par des jonctions cellulaires. Il existe différents types de jonctions cellulaires assurant ainsi l'intégrité de l'épithélium mammaire dont les principales sont les jonctions serrées (**JS**), les jonctions adhérentes, les jonctions gap et les desmosomes (Farquhar et Palade, 1963; Ebnet, 2008). Ces jonctions cellulaires sont localisées sur la membrane basolatérale des CEM (**Figure 16**). Les JS sont les jonctions cellulaires localisées au pôle apical des CEM et sont constituées de plusieurs protéines dont des protéines transmembranaires (occludine, claudine, Junctional Adhesion Molecule (**JAM**) et tricelluline), des protéines cytoplasmiques (protéines de la famille des zonula occludens, symplekine) et des protéines régulatrices telles que les protéines de la famille des Rho et des Rab (**Figure 17**, Nguyen et Neville, 1998; Escudero-Esparza et al., 2011). Toutes ces protéines permettent aux JS de restreindre le passage paracellulaire rendant les JS essentielles à la fonction de barrière des épithéliums. Néanmoins, les JS ne forment pas une barrière totalement imperméable puisque ce sont des structures dynamiques qui peuvent s'ouvrir et se refermer très rapidement en réponse à un stimuli (Stelwagen et al., 1997) engendrant ainsi des variations de l'intégrité de l'épithélium mammaire.

### **2. La régulation hormonale de l'intégrité de l'épithélium mammaire**

L'état d'ouverture des JS et par conséquent l'intégrité de l'épithélium mammaire est sous contrôle hormonal. Le rôle des glucocorticoïdes (dont le cortisol) dans la régulation de l'intégrité de l'épithélium mammaire et notamment leur importance dans formation et le maintien des JS lors de la transition gestation/lactation a été démontré *in vitro* (Zettl et al., 1992; Singer et al., 1994) et *in vivo* chez la souris (Nguyen et al., 2001) et chez la chèvre en fin de gestation (Thompson, 1996). Le cortisol réduit aussi la perméabilité de l'épithélium mammaire chez la vache laitière en lactation (Stelwagen et al., 1998). L'action des





glucocorticoïdes passerait par la modulation de la synthèse de ZO-1 et la phosphorylation de certaines protéines constituant les JS (Singer et al., 1994). Par ailleurs, des essais menés chez la souris en fin de gestation ont fourni de solides preuves montrant que contrairement aux glucocorticoïdes, la progestérone est un inhibiteur de la formation des JS (Nguyen et Neville, 1998; Nguyen et al., 2001). La formation des JS lors de la transition gestation/lactation requiert donc la chute des concentrations en progestérone et l'action des glucocorticoïdes (Nguyen et Neville, 1998). La PRL joue aussi un rôle dans la régulation de l'intégrité de l'épithélium mammaire puisqu'il a été montré que cette hormone réduisait la perméabilité de l'épithélium mammaire chez la lapine et chez la rate (Linzell et al., 1975; Flint et Gardner, 1994). Cet effet de la PRL sur l'intégrité de l'épithélium mammaire serait indirect puisque la PRL permettrait d'inhiber la mort et la perte des CEM, perte pouvant engendrer une perturbation de l'intégrité de l'épithélium mammaire (Flint et Gardner, 1994). Cependant, un effet direct de la PRL sur les JS n'est pas à exclure puisque la PRL stimule la formation des JS *in vitro* (Stelwagen et al., 1999). Enfin, l'OT participerait aussi à la régulation de l'intégrité de l'épithélium puisqu'il a été montré chez la vache laitière que des injections de doses supra-physiologiques d'OT exogène induisent l'ouverture des JS (Allen, 1990; Wall et al., 2016). Il a été fait l'hypothèse que cet effet de l'OT sur les JS résultait des forces mécaniques exercées sur l'épithélium mammaire provoquées par la contraction des cellules myoépithéliales (Stelwagen et Singh, 2014). Cependant, l'effet des doses physiologiques d'OT sécrétées à la traite sur l'intégrité de l'épithélium n'est pas connu.

### **3. Les indicateurs de l'intégrité de l'épithélium mammaire**

L'ouverture des JS engendre une perte de l'intégrité de l'épithélium permettant ainsi le passage de constituants du lait dans le sang et inversement le passage d'éléments du sang dans le lait. Différents marqueurs peuvent alors être utilisés afin d'estimer indirectement l'intégrité de l'épithélium mammaire :

- Le lactose étant un glucide spécifiquement synthétisé dans le lait par les CEM, la concentration plasmatique de lactose est considérée comme un bon indicateur de l'intégrité de l'épithélium puisque le lactose peut seulement être transféré dans le sang par voie paracellulaire lorsque les JS sont ouvertes (Kuhn et Linzell, 1970).



- L' $\alpha$ -lactalbumine étant une protéine synthétisée par les CEM et sécrétée dans le lait, la concentration en  $\alpha$ -lactalbumine plasmatique a aussi été utilisée pour estimer l'intégrité de l'épithélium mammaire.
- La diminution du ratio caséines/protéines solubles dans le lait traduit le passage de protéines solubles du sang dans le lait via des JS ouvertes faisant de ce ratio un indicateur de l'intégrité de l'épithélium mammaire.
- La concentration en  $\text{Na}^+$  est plus élevée dans le sang que dans le lait et au contraire, la concentration en  $\text{K}^+$  est plus élevée dans le lait. Lorsque les JS sont ouvertes, le  $\text{Na}^+$  peut alors être transféré dans le lait et le  $\text{K}^+$  dans le sang résultant en une augmentation du ratio  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  dans le lait. Ce ratio  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  dans le lait est donc inversement corrélé avec l'intégrité de l'épithélium mammaire (Sorensen et al., 2001).
- L'albumine est une protéine principalement synthétisée par le foie et impliquée dans le transport de nombreuses molécules telles que des hormones ou les acides gras et est la principale protéine constituant le plasma sanguin. La présence d'albumine dans le lait peut donc résulter d'un passage paracellulaire de cette protéine à travers des JS ouvertes. Cependant, il a été montré que les CEM sont capables de synthétiser de l'albumine et de la sécréter dans le lait (Shamay et al., 2005) remettant en question la pertinence de l'utilisation de la concentration en albumine dans le lait comme indicateur de l'intégrité de l'épithélium mammaire.

#### **4. Le lien entre l'exfoliation des cellules épithéliales mammaires et l'intégrité de l'épithélium<sup>1</sup>**

Dans de nombreuses études, il a été observé que les variations du taux d'exfoliation des CEM en réponse à différents facteurs physiologiques, d'élevage ou environnementaux étaient concomitantes à des variations de l'intégrité de l'épithélium mammaire. Une perte de l'intégrité de l'épithélium mammaire a été observée lorsque les animaux sont soumis à la monotraite, comme indiqué par l'augmentation du lactose plasmatique et la diminution du ratio caséines/protéines solubles (Stelwagen et al., 1994; Ben Chedly et al., 2013). Chez la chèvre laitière, une période de 28 jours de monotraite a induit une perte d'intégrité de

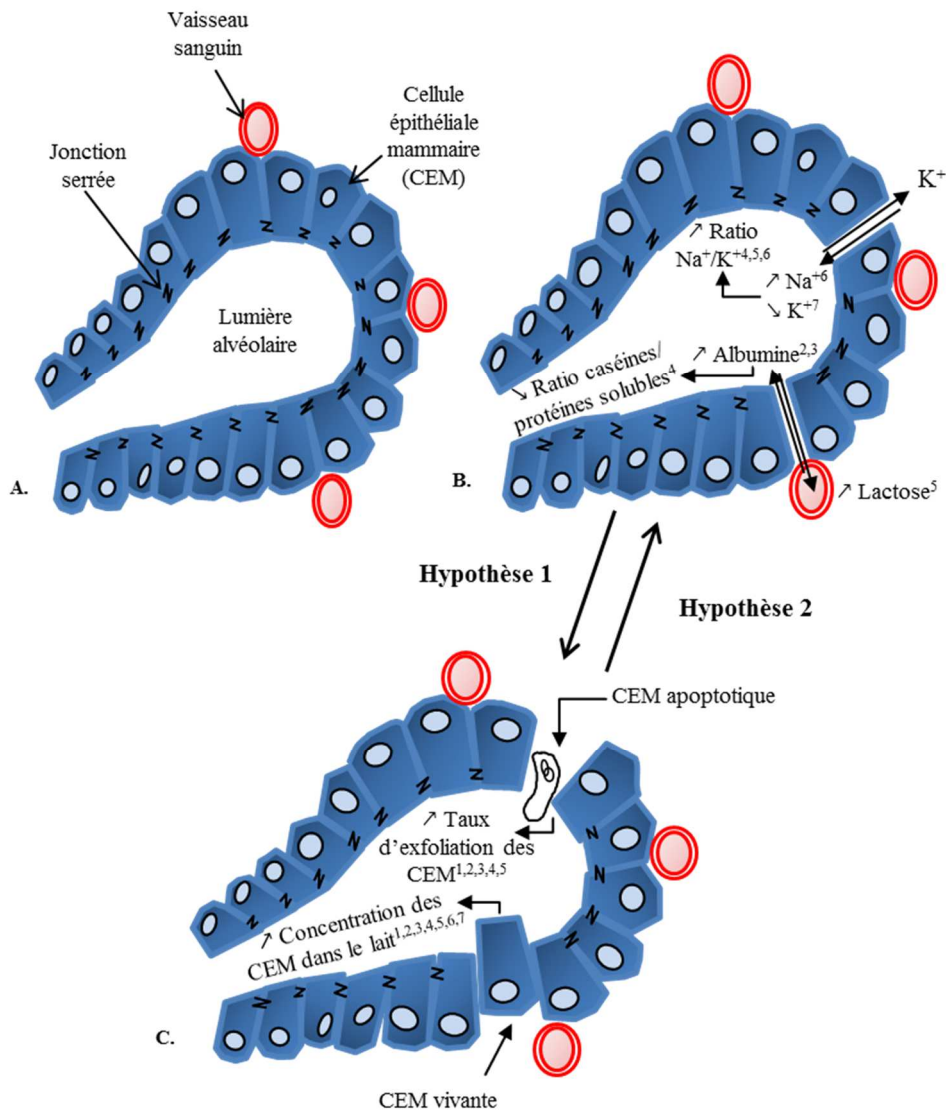
---

<sup>1</sup> Cette partie a été valorisée par la publication d'une revue de synthèse intitulée « Regulation of cell number in the mammary gland by controlling the exfoliation process in milk in ruminants » dans Journal of Dairy Science (**Annexe 1**), et par deux communications orales (**Annexes 2 et 3**).



l'épithélium mammaire, concomitante à une augmentation du taux d'exfoliation (Ben Chedly et al., 2013). Après cette période de 28 jours de monotraite, lorsque les chèvres sont retournées à une fréquence de traite de 2 fois/jour, le taux d'exfoliation des chèvres ayant été soumises à la monotraite était toujours plus élevé que le taux d'exfoliation des chèvres maintenues à 2 traites/jour durant toute l'expérimentation. De plus, le ratio caséines/protéines solubles des chèvres ayant subi la monotraite était plus faible que celui des chèvres maintenues à 2 traites/jour indiquant que les JS étaient toujours plus ouvertes (Ben Chedly et al., 2013). Le fait que les JS des chèvres ayant subi la monotraite sont toujours plus ouvertes après le retour à 2 traites par jour pourrait expliquer l'effet rémanent de la monotraite sur le taux d'exfoliation.

Par ailleurs, le taux d'exfoliation des CEM et l'intégrité de l'épithélium mammaire sont aussi affectés par le statut endocrinien des animaux. L'augmentation du taux d'exfoliation des CEM avec l'avancée de la lactation est associée à une ouverture des JS alors que la diminution du taux d'exfoliation en réponse à la suppression des stéroïdes ovariens par ovariectomie est associée à un épithélium mammaire plus jointif (Boutinaud et al., 2013c). Ces résultats sont en accord avec le fait que la progestérone est connue pour inhiber la fermeture des JS chez les rongeurs (Nguyen et al., 2001). De même, au moment du tarissement, la concentration en CEM dans les sécrétions mammaires augmente simultanément à l'ouverture des JS, comme indiqué par l'augmentation de la concentration en albumine et du ratio  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  dans le lait (Boutinaud et al., 2013b). De plus, lorsque la sécrétion de PRL est inhibée par des injections de cabergoline chez la vache laitière, l'augmentation de la concentration en CEM dans les sécrétions mammaires a tendance à être associée à une ouverture des JS comme indiqué par l'augmentation du ratio  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  dans les sécrétions mammaires (Boutinaud et al., 2013b). De plus, la sérotonine, connue pour favoriser l'exfoliation des CEM induite par l'accumulation et la stase du lait lors du processus d'involution chez les rongeurs, est aussi connue pour induire une ouverture des JS *in vitro* et *in vivo* chez la vache laitière (Stull et al., 2007; Hernandez et al., 2011). Enfin, en comparaison à des vaches soumises à des jours longs, des vaches soumises à des jours courts présentent un taux d'exfoliation plus important et un épithélium moins jointif (Boutinaud et al., 2014).



**Figure 18 :** Alvéole mammaire (A) et résumé des effets de facteurs d'élevage et hormonaux sur l'intégrité de l'épithélium mammaire (B) et sur le processus d'exfoliation des cellules épithéliales mammaires (C) (d'après Herve et al., 2016).

Les facteurs influençant l'intégrité de l'épithélium (B) et le processus d'exfoliation des cellules épithéliales mammaires sont (1) l'inhibition de la prolactine au cours de la lactation (Lollivier et al., 2015) ; (2) les stéroïdes ovariens chez des vaches témoins chirurgicaux vs. des vaches ovariectomisées (Yart et al., 2012; Boutinaud et al., 2013b) ; (3) l'avancée de la lactation (Yart et al., 2012; Boutinaud et al., 2013b) ; (4) 2 traites par jour vs. 1 traite par jour (Ben Chedly et al., 2013) ; (5) la photopériode soit des jours courts vs. des jours longs (Boutinaud et al., 2014) ; (6) l'involution mammaire (Boutinaud et al., 2013a) et (7) l'inhibition de la prolactine au tarissement (Boutinaud et al., 2013a). Les mécanismes sous-jacents au lien entre l'exfoliation des cellules épithéliales mammaires et l'intégrité de l'épithélium mammaire restent à éclaircir. L'exfoliation des cellules épithéliales mammaires pourrait être une conséquence (Hypothèse 1) ou une cause (Hypothèse 2) de la perte d'intégrité de l'épithélium.

Le fait que le taux d'exfoliation augmente simultanément avec une perte de l'intégrité de l'épithélium mammaire peut être interprété de 2 façons. L'exfoliation de CEM viables et de CEM apoptotiques pourrait être la conséquence de l'ouverture des JS (**Figure 18**, Hypothèse 1). Les CEM alors déconnectées les unes des autres pourraient être facilement évacuées dans le lait. Cela pourrait être le cas lorsque le taux d'exfoliation augmente en réponse à des modifications du statut endocrinien puisque de multiples hormones (telles que la PRL, la progestérone, la sérotonine, l'OT ou encore les glucocorticoïdes) sont connues pour influencer l'intégrité de l'épithélium mammaire (Nguyen et Neville, 1998; Stelwagen et al., 1999; Werner-Misof et al., 2007). Au contraire, l'exfoliation des CEM pourrait aussi être la cause de la perte de l'intégrité de l'épithélium mammaire (**Figure 18**, Hypothèse 2). En effet, l'exfoliation des CEM pourrait laisser des « trous » dans l'épithélium mammaire, altérant ainsi son intégrité. Il est possible que ces 2 hypothèses ne soient pas mutuellement exclusives.





### **L'essentiel**

La fonction de barrière de l'épithélium mammaire est assurée par les jonctions cellulaires présentes sur la membrane basolatérale des CEM liant ainsi deux CEM adjacentes entre elles. Les jonctions cellulaires, dont les JS, sont indispensables au maintien de l'intégrité de l'épithélium mammaire. Cependant, les JS ne forment pas une barrière totalement imperméable puisque ces jonctions peuvent s'ouvrir et se fermer rapidement en réponse à différents stimuli et ainsi laisser passer des molécules par voie paracellulaire. Plusieurs hormones sont impliquées dans la régulation de l'intégrité de l'épithélium : les glucocorticoïdes et la progestérone impliqués dans la formation des JS lors de la transition gestation/lactation, les premiers favorisant et au contraire la deuxième inhibant la formation des JS ; la PRL participant au maintien de l'intégrité et enfin l'OT et la sérotonine engendrant une perte d'intégrité de l'épithélium mammaire. L'intégrité de l'épithélium mammaire peut être estimée grâce à plusieurs indicateurs indirects : des éléments spécifiques du lait dosés dans le sang (le lactose ou l' $\alpha$ -lactalbumine) ou inversement des éléments spécifiques du sang dosés dans le lait (l'albumine). Les ratios  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  et caséines/protéines solubles sont aussi des indicateurs de l'intégrité de l'épithélium mammaire. Dans de nombreux modèles expérimentaux, les variations de l'intégrité de l'épithélium mammaire sont concomitantes à des variations du taux d'exfoliation ; le taux d'exfoliation augmentant simultanément à une perte de l'intégrité de l'épithélium mammaire et inversement. Deux hypothèses ont été émises concernant le lien entre l'exfoliation des CEM : l'exfoliation des CEM dans le lait pourrait être une conséquence de la perte d'intégrité de l'épithélium ou au contraire en être la cause.



# **Objectifs et Stratégie expérimentale**



L'observation de la présence de CEM dans le lait des ruminants a permis de mettre en évidence qu'une partie des CEM sont exfoliées de l'épithélium mammaire dans le lait. Cependant, les mécanismes biologiques conduisant à l'exfoliation des CEM ne sont pas connus.

**Le 1<sup>er</sup> objectif de cette thèse est de caractériser le processus d'exfoliation et d'identifier les mécanismes biologiques impliqués dans la régulation de ce processus.**

*Pour répondre à ce 1<sup>er</sup> objectif, nous avons choisi d'étudier la régulation du processus d'exfoliation des CEM au moment de la traite et le lien entre le processus d'exfoliation des CEM et l'intégrité de l'épithélium mammaire.*

### **1. Régulation du processus d'exfoliation au moment de la traite**

Au moment de la traite, de nombreuses hormones sont libérées en réponse à la stimulation tactile du trayon. La sécrétion d'OT induite par la traite induit la contraction des cellules myoépithéliales dont résulte des pressions mécaniques sur l'épithélium mammaire et l'éjection du lait alvéolaire. L'OT pourrait aussi induire une perte d'intégrité de l'épithélium mammaire. Au contraire, la PRL et le cortisol, aussi sécrétés au moment de la traite pourraient limiter cette perte d'intégrité de l'épithélium mammaire. La traite, par l'intermédiaire des pressions mécaniques exercées sur l'épithélium mammaire et des décharges hormonales, pourrait donc constituer un moment privilégié pour l'exfoliation des CEM.

*Cette 1<sup>ère</sup> partie a été déclinée en 2 questions de recherche ayant donné lieu à 2 expérimentations in vivo menées chez la vache laitière en lactation au sein de la ferme expérimentale INRA de Méjusse (UMR PEGASE, Le Rheu, France) :*

- ***Quel est le lien entre les hormones libérées à la traite, l'intégrité de l'épithélium mammaire et l'exfoliation des CEM ?***

*Afin de répondre à cette question, nous avons déterminé l'évolution du taux d'exfoliation des CEM, des concentrations plasmatiques d'OT, de PRL et de cortisol et de l'intégrité de l'épithélium mammaire au cours de la traite.*

- ***Quel est le rôle de l'OT et de la contraction des cellules myoépithéliales dans la régulation du processus d'exfoliation des CEM ?***



*Pour répondre à cette question, nous avons inhibé ou induit la contraction des cellules myoépithéliales en administrant à des vaches laitières de l'atosiban, un antagoniste des récepteurs de l'OT, ou de l'OT exogène au moment de la traite.*

## **2. Etude du lien entre le processus d'exfoliation des CEM et l'intégrité de l'épithélium mammaire**

Il a été observé dans différentes études que les variations du taux d'exfoliation en réponse à différents facteurs étaient concomitantes à des variations de l'intégrité de l'épithélium mammaire, nous amenant à nous demander :

### ***- Y a-t-il un lien entre l'exfoliation des CEM et l'intégrité de l'épithélium mammaire ?***

*Afin de répondre à cette question, l'intégrité de l'épithélium mammaire a été évaluée dans l'ensemble des essais de cette thèse, par la mesure de différents indicateurs indirects dosés dans le lait ou dans le sang. Dans le lait, des indicateurs classiques ont été mesurés, à savoir le ratio  $Na^+/K^+$ , le ratio caséines/protéines solubles et la concentration en albumine. Dans le sang, un indicateur classique a été utilisé, à savoir une mesure de la concentration basale en lactose plasmatique (mesurée avant le début de la traite). Cependant, une approche originale d'évaluation de l'intégrité de l'épithélium mammaire a été utilisée dans 3 modèles expérimentaux, à savoir une cinétique de concentration du lactose plasmatique au cours de la traite. Par la suite, afin de limiter la lourdeur expérimentale liée à cette cinétique réalisée au cours de la traite, seules les mesures des concentrations basales ont été effectuées.*

Comme il a pu être montré au travers de la synthèse bibliographique de cette thèse, de nombreux facteurs physiologiques, d'élevage et environnementaux sont connus pour engendrer des variations de production laitière et de nombre de CEM. Les variations du nombre de CEM dans la glande mammaire ont été attribuées à des modifications de l'équilibre entre la prolifération cellulaire et la mort cellulaire par apoptose. Il a été récemment suggéré que le processus d'exfoliation pouvait aussi participer aux variations de production laitière en réponse à ces différents facteurs en régulant le nombre de CEM dans la glande mammaire.





**Le 2<sup>ème</sup> objectif de cette thèse est d'étudier le rôle du processus d'exfoliation dans la régulation du nombre de CEM dans la glande mammaire et son influence sur la production laitière.**

*Pour répondre à ce 2<sup>ème</sup> objectif nous avons choisi d'étudier l'effet de différents facteurs engendrant des variations de production laitière que sont l'alimentation (restriction alimentaire et nature du fourrage), l'inhibition de la PRL, la photopériode et le traitement à la bGH.*

**1. Effet de l'alimentation**

L'alimentation, en termes de quantités offertes et de composition de la ration, est un des principaux facteurs d'élevage induisant des variations de production laitière et de nombre de CEM dans la glande mammaire. L'effet de ce facteur clé de l'élevage des vaches laitières sur l'exfoliation des CEM n'a été étudié qu'à une seule occasion au travers d'un essai ayant pour objectif d'étudier l'effet d'une restriction alimentaire (vaches nourries à hauteur de 98 % vs. 70 % de leurs besoins). Dans cet essai, après 15 jours de restriction, aucun effet sur l'exfoliation des CEM n'a été observé. Toutefois, cet essai n'a pas permis de déterminer l'effet de la nature du fourrage, de la durée et de l'intensité de la restriction alimentaire et ses éventuels effets rémanents, nous amenant à nous poser la question suivante :

- ***Quel est l'effet d'une restriction alimentaire et de la nature du fourrage dans la ration sur l'exfoliation des CEM ?***

*Pour répondre à cette question, 2 expérimentations in vivo ont été menées chez la vache laitière en lactation au sein de la ferme expérimentale INRA de Méjusseume.*

*Le premier essai avait pour objectif d'étudier l'effet d'une restriction alimentaire courte (vaches nourries ad libitum vs. vaches nourries à hauteur de 75 % de l'ad libitum pendant 15 jours) et de la nature du fourrage (ration à base de maïs vs. ration à base d'herbe conservée) sur l'exfoliation des CEM.*

*Le deuxième essai visait à étudier l'effet d'une restriction alimentaire moins intense et plus longue (vaches nourries ad libitum vs. à hauteur de 80 % de l'ad libitum pendant 4 semaines) sur l'exfoliation des CEM. Afin d'étudier l'effet de la durée de la restriction alimentaire, le taux d'exfoliation a été mesuré quelques jours et 4 semaines après le début de la restriction*



alimentaire. Les effets rémanents de la restriction alimentaire ont aussi été étudiés dans cet essai en réalimentant *ad libitum* pendant 5 semaines les vaches laitières ayant été précédemment restreintes.

## 2. Effet de la photopériode

La photopériode est un facteur environnemental qui est connu pour engendrer des variations de production laitière puisque les vaches soumises à des jours courts produisent moins de lait que des vaches soumises à des jours longs. Cette diminution de la production laitière s'expliquerait par des concentrations circulantes d'IGF-I et basales de PRL moins élevées. Ces variations ont été associées à des variations du taux d'exfoliation après 13 jours de traitement lumineux. De plus, la PRL, hormone clé de la fonction de la lactation et dans la régulation du nombre de CEM dans la glande mammaire, inhibe l'exfoliation des CEM dans le lait au cours de la lactation et au moment du tarissement. Cela nous a amené à nous poser la question suivante :

### - *L'effet de la photopériode sur l'exfoliation est-il médié par la PRL ?*

*Afin de répondre à cette question, 8 vaches laitières ont été soumises à 2 traitements lumineux (jours courts = 8h d'exposition lumineuse par jour vs. jours longs = 16h d'exposition lumineuse par jour) et 2 traitements pharmacologiques (injection unique d'une solution témoin vs. injection unique d'un inhibiteur de la sécrétion de prolactine, la cabergoline) selon un carré latin de 4 périodes de 3 semaines chacune.*

## 3. Effet d'un traitement à la bGH

Le lien entre production laitière et exfoliation des CEM a été observé à de nombreuses reprises en réponse à des facteurs engendrant une diminution de production laitière. Par ailleurs, un traitement à la bGH est largement connu pour stimuler la production laitière chez les ruminants. Cet effet de la bGH pourrait passer par la stimulation de l'activité métabolique des CEM et/ou par une augmentation du nombre de CEM dans la glande mammaire via la stimulation de la prolifération cellulaire. Dans cette partie, nous avons cherché à répondre à la question suivante :



- **Quel est l'effet d'un traitement à la bGH sur l'exfoliation des CEM ?**

Pour répondre à ces questions, un essai a été mené en collaboration avec l'équipe de Pierre Lacasse à la ferme expérimentale du Centre de recherche et développement sur le bovin laitier et le porc (Agriculture et Agroalimentaire Canada). Lors de cet essai, 8 vaches laitières ont reçu des injections quotidiennes de bGH ou de solution témoin pendant 14 jours puis n'ont reçu aucune injection pendant les 21 jours suivants.

**Méthodes de mesure du taux d'exfoliation des CEM**

Afin d'étudier le processus d'exfoliation, il a été nécessaire de mesurer la concentration en CEM dans le lait. Pour cela, deux méthodes différentes ont été utilisées dans les différents essais de cette thèse : la méthode de purification des CEM du lait par immuno-séparation magnétique et la méthode d'identification et de dénombrement des CEM du lait par cytométrie de flux. La première méthode, méthode de référence à l'UMR PEGASE, a déjà été utilisée dans de nombreuses études pour mesurer la concentration en CEM dans le lait et estimer le taux d'exfoliation et a été utilisée dans 5 des 6 études réalisées au cours de cette thèse. Elle consiste à purifier les CEM du lait à l'aide d'un anticorps spécifique de ces cellules couplé à des billes magnétiques puis de mesurer la concentration en CEM dans le lait à l'aide d'un compteur automatique de cellules afin d'estimer le taux d'exfoliation des CEM. La deuxième méthode a été développée au cours de ma thèse au laboratoire du Centre de recherche et développement sur le bovin laitier et le porc (Agriculture et Agroalimentaire Canada) pour estimer le taux d'exfoliation dans le cadre de l'étude de l'effet du traitement à la bGH. Cette 2<sup>ème</sup> méthode consiste à estimer le taux d'exfoliation grâce à la détermination de la concentration en CEM dans le lait par cytométrie de flux à l'aide d'anticorps spécifiques de ces cellules et de billes de comptage. Une description et une comparaison des deux méthodes utilisées pour estimer le taux d'exfoliation sont disponibles en **Annexe 6**.



# Résultats





# **Chapitre 1**

La régulation du processus  
d'exfoliation des cellules  
épithéliales mammaires au  
moment de la traite



## **Partie 1 - Le lien entre les hormones libérées à la traite, l'intégrité de l'épithélium mammaire et l'exfoliation des cellules épithéliales mammaires au cours de la traite**

L'OT, la PRL et le cortisol sont connues pour être impliquées dans la régulation de l'intégrité de l'épithélium mammaire ; l'OT administrée à des doses supra physiologiques induit une perte d'intégrité de l'épithélium alors qu'au contraire, la PRL et le cortisol réduisent la perméabilité de l'épithélium mammaire. La traite induit une libération massive de ces trois hormones qui pourraient alors participer à la régulation du processus d'exfoliation en modulant l'intégrité de l'épithélium mammaire.

Cette première partie se base sur les résultats de l'essai « [Suivi au cours de la traite](#) » et a pour objectif de déterminer l'évolution du taux d'exfoliation des CEM dans le lait au cours de la traite chez la vache laitière ainsi que d'étudier l'implication des hormones libérées à la traite et de l'intégrité de l'épithélium mammaire dans la régulation de ce processus.

Ces travaux ont fait l'objet d'un article publié dans Journal of Dairy Science (sous presse), d'un poster présenté lors des Rencontres autour des Recherches sur les Ruminants (**Annexe 7**) et d'un autre poster présenté lors du congrès de l'EAAP (European Federation of Animal Science, **Annexe 8**).



## RÉSUMÉ

Chez les ruminants, la présence de cellules épithéliales mammaires (CEM) dans le lait indique que des CEM sont exfoliées de l'épithélium mammaire. Cependant, les mécanismes de régulation du processus d'exfoliation ne sont pas connus. La traite, lors de laquelle sont observés des pics de sécrétion d'ocytocine, de prolactine et de cortisol ainsi que des forces mécaniques exercées sur l'épithélium mammaire, pourrait participer à la régulation du processus d'exfoliation. L'objectif de cette étude était donc de déterminer le taux d'exfoliation des CEM au cours de la traite et d'étudier le lien entre le taux d'exfoliation des CEM, l'intégrité de l'épithélium et la sécrétion des hormones induite par la traite. Des échantillons de lait ont été collectés au début (après 1 et 2 min), au milieu et à la fin de la traite de 9 vaches laitières Prim'Holstein produisant en moyenne  $40,6 \pm 1,36$  kg de lait/jour. Pour chaque échantillon, les CEM ont été purifiées par une méthode d'immuno-séparation magnétique. Des échantillons de sang ont été collectés avant, pendant et après la traite afin de mesurer les concentrations d'ocytocine, de prolactine et de cortisol. L'intégrité de l'épithélium mammaire a été évaluée en mesurant la concentration plasmatique de lactose et le ratio  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  dans le lait. Le comptage des cellules somatiques dans le lait a varié au cours de la traite puisque celui-ci a diminué au début de la traite puis a augmenté pour atteindre son maximum à la fin de la traite. Tous les échantillons de lait contenaient des CEM exfoliées. La présence de CEM dans le lait collecté durant la 1ère min de traite (correspondant probablement au lait citernal) suggérait que des CEM pourraient être exfoliées entre 2 traites consécutives. L'augmentation du ratio  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  dans le lait et de la concentration en lactose plasmatique indiquait une perte d'intégrité de l'épithélium mammaire pendant la traite. Le taux d'exfoliation des CEM au cours de la traite n'était corrélé avec aucune des variables décrivant la sécrétion de prolactine mais était corrélé négativement avec les variables décrivant la sécrétion de cortisol suggérant que le cortisol pourrait réguler le processus d'exfoliation en le limitant. Pour conclure, la traite a induit une perte d'intégrité de l'épithélium mammaire. Les CEM pourraient être exfoliées entre les traites en l'absence de forces mécaniques ou au contraire, être exfoliées pendant la traite en conséquence des forces mécaniques exercées sur l'épithélium mammaire et de la perte d'intégrité induites par l'ocytocine libérée à la traite.





## Mammary epithelium disruption and mammary epithelial cell exfoliation during milking in dairy cows

L. Herve,\* H. Quesnel,\* V. Lollivier,\*† J. Portanguen,\* R. M. Bruckmaier,‡ and M. Boutinaud\*<sup>1</sup>

\*PEGASE, Agrocampus Ouest, INRA, 35590 Saint-Gilles, France

†Université Bretagne Loire, 35044 Rennes, France

‡Veterinary Physiology, Vetsuisse Faculty, University of Bern, CH-3012 Bern, Switzerland

### ABSTRACT

The presence of mammary epithelial cells (MEC) in the milk of ruminants indicates that some MEC are shed from the mammary epithelium; however, the mechanisms that regulate the MEC exfoliation process are not known. Through the release of oxytocin, prolactin, and cortisol and through oxytocin-induced mechanical forces on the mammary epithelium, milking could participate in regulating the MEC exfoliation process. The aims of the present study were to determine the rate of MEC exfoliation throughout milking and to investigate its relationship to mammary epithelium integrity and milking-induced hormone release. Milk samples from 9 Holstein dairy cows producing  $40.6 \pm 1.36$  kg of milk/d were collected at the beginning (after 1 and 2 min), in the middle, and at the end of milking. Milk MEC were purified using an immunomagnetic method. Blood samples were collected before, during, and after milking, and the oxytocin, prolactin, and cortisol concentrations in the samples were measured. Tight junction opening was assessed by plasma lactose concentration and the  $\text{Na}^+:\text{K}^+$  ratio in milk. The somatic cell count in milk varied during the course of milking; it decreased at the beginning of milking and then increased, reaching the highest values at the end of milking. Exfoliated MEC were present in all milk samples collected. The presence of MEC in the milk sample collected during min 1 of milking, likely corresponding to the cisternal milk fraction, suggests that MEC were exfoliated between milkings. The observed increase in the  $\text{Na}^+:\text{K}^+$  ratio in milk and in the plasma concentration of lactose indicated that disruption of mammary epithelium integrity occurred during milking. The MEC exfoliation rate at milking was not correlated with the variables describing milking-induced prolactin release but was negatively correlated with cortisol release, suggesting that cortisol

may play a role in limiting exfoliation. In conclusion, milking induced a disruption of the mammary epithelial barrier. Mammary epithelial cells may be continuously exfoliated between milkings or exfoliated during milking as a consequence of the oxytocin-induced mechanical forces and the disruption of mammary epithelium integrity.

**Key words:** dairy cow, mammary epithelial cell exfoliation, milking, tight junction

### INTRODUCTION

Milk is synthesized by mammary epithelial cells (MEC), and milk yield is determined by the metabolic activity and the number of these cells in the mammary gland (Capuco et al., 2003; Boutinaud et al., 2004). The number of MEC in the mammary gland depends primarily on the balance between cell proliferation and apoptosis (Capuco et al., 2003). The presence of MEC in the milk of ruminants (Kitchen, 1981) indicates that MEC are shed from the mammary epithelium into milk. It was recently shown that the MEC exfoliation process participates in the regulation of MEC number in the udder and thus in milk yield variations (Herve et al., 2016). The mechanisms that regulate the MEC exfoliation process, however, are currently unknown. The MEC exfoliation process could be linked to a disruption of mammary epithelium integrity. Indeed, the MEC exfoliation rate increases concomitantly with an increase in the mammary epithelial permeability in response to various physiological, breeding, and environmental factors (Herve et al., 2016). It is not yet clear, however, whether the exfoliation of MEC is a consequence or a cause of tight junction opening.

Hormones released at milking in response to teat stimulation—namely oxytocin (OT), prolactin (PRL), and cortisol (Cort)—are likely to be involved in the regulation of mammary epithelium integrity (Nguyen and Neville, 1998). However, it is not yet known whether milking induces a disruption of the mammary epithelium integrity. Exogenous OT administered at supraphysiological doses was shown to induce tight

Received May 15, 2017.

Accepted August 19, 2017.

<sup>1</sup>Corresponding author: Marion.Boutinaud@inra.fr





junction opening in the bovine mammary gland (Allen, 1990; Wall et al., 2016), and it was speculated that tight junction integrity is compromised as a result of the mechanical forces caused by myoepithelial cell contraction (Stelwagen and Singh, 2014). The physiological OT release induced by milking also induces the contraction of myoepithelial cells and thus mechanical pressures on the mammary epithelium, allowing the complete removal of the alveolar milk. Prolactin also participates in the regulation of tight junctions because PRL stimulates tight junction formation *in vitro* (Stelwagen et al., 1999) and reduces tight junction permeability in rabbit and rat mammary glands (Linzell et al., 1975; Flint and Gardner, 1994). Finally, Cort is known to be a key regulator of mammary epithelium integrity; it stimulates tight junction formation and maintenance *in vitro* (Zettl et al., 1992; Singer et al., 1994), is necessary for tight junction closure *in vivo* during the transition from pregnancy to lactation in mice (Nguyen et al., 2001), and reduces tight junction permeability *in vivo* in the bovine mammary gland (Stelwagen et al., 1998).

The milking-induced release of OT could disrupt mammary epithelium integrity during milking, whereas PRL and Cort, which are also released upon milking, could reduce mammary epithelial permeability. We therefore hypothesized that milking, through the release of OT, PRL, and Cort and the OT-induced mechanical forces on the mammary epithelium, could play a role in regulating the MEC exfoliation process by modulating the integrity of the mammary epithelium. Thus, the aim of the present study was to determine the rate of MEC exfoliation during the time course of milking and to investigate the relationships between milking-induced hormone release, mammary epithelium integrity, and the MEC exfoliation process in dairy cows.

## MATERIALS AND METHODS

All procedures used on animals were approved by the local Ethics Committee in Animal Experiment of Rennes (France) in compliance with French regulations (decree no. 2001-464; May 29, 2001; <https://www.legifrance.gouv.fr/eli/decret/2001/5/29/AGRG0001697D/jo/texte>).

### *Animals and Experimental Procedures*

Nine multiparous Holstein dairy cows (lactation 2 to 5), at peak lactation ( $57 \pm 5$  DIM) and producing  $40.6 \pm 1.36$  kg of milk/d at the beginning of the experiment, were used in this study. The cows were selected to have a low SCC; thus, they presented on average  $36 \pm 11 \times 10^3$  cells/mL of milk before the beginning of

the experiment. The experiment was conducted at the INRA experimental farm (UMR PEGASE, Le Rheu, France). Two weeks before the beginning of the experiment, the cows were housed in individual tiestalls to allow them to adapt to their new environment. The cows were fed according to the INRA recommendations and milked twice a day at 0700 and 1700 h. The milking routine included teat cleaning for approximately 30 s and foremilk hand milking to confirm the absence of mastitis, indicated by the absence of clotted milk. During one morning milking (after a routine 14-h milking interval), milk samples were collected separately each minute using 2 milking devices alternately. Milk yield was recorded each minute, and a milk sample (50 mL) was taken for SCC and milk composition (fat, protein, and lactose content) determination using an infrared method (Lillab, Châteaugiron, France).

### *Blood Sampling and Hormonal Assays*

The cows were surgically equipped with permanent catheters (Silclear medical-grade silicone tubing, 1.02 mm i.d., 2.16 mm o.d.; Degania Silicone, Degania Bet, Israel) inserted into the jugular vein. The catheters were inserted 4 d before the beginning of the experiment. On the day of the experiment, blood samples were collected before, during, and after the morning milking at  $-5$ ,  $-2$ , 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 15, 25, 35, and 45 min relative to milking unit attachment. Monovette syringes coated with sodium heparin (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) were used to collect samples for the measurement of plasma OT and lactose concentrations, and Monovette syringes coated with EDTA (Sarstedt) were used to collect samples for the measurement of plasma PRL and Cort concentrations. The plasma was separated by centrifugation at  $3,000 \times g$  for 15 min at  $4^\circ\text{C}$  and stored at  $-20^\circ\text{C}$  until analysis. Plasma OT concentration was measured using the ELISA method as described by Marnet et al. (1994). The plasma concentration of Cort was assessed using the ELISA method developed by Komara and Marnet (2009). The ELISA plates were coated with 200  $\mu\text{L}$ /well of mouse monoclonal antirabbit immunoglobulin antibody (Bertin Pharma, Montigny-le-Bretonneux, France) dissolved at 10 mg/L in 0.05 M phosphate buffer and incubated at  $4^\circ\text{C}$  overnight. The plates were then washed, and 300  $\mu\text{L}$  of ELISA buffer (0.1 M phosphate buffer containing 0.15 M sodium chloride and 0.1% BSA, pH 7.4) was added to each well. Cortisol was extracted from the plasma samples as follows: 100  $\mu\text{L}$  of plasma was mixed with 1 mL of absolute ethanol and incubated for 10 min on ice. After centrifugation at  $8,000 \times g$  for 10 min at  $4^\circ\text{C}$ , 250  $\mu\text{L}$  of the supernatant was desiccated in a



vacuum concentrator (SpeedVac Savant; ThermoFisher Scientific, Waltham, MA). The plates and plasma samples were stored at 4 and  $-20^{\circ}\text{C}$ , respectively, until plasma Cort concentration analysis. After washing the plates with 300  $\mu\text{L}$  of washing buffer (0.01 M phosphate buffer containing 0.05% Tween 20, pH 7.4) per well, the plasma samples were reconstituted with 200  $\mu\text{L}$  of ELISA buffer. Then, 50  $\mu\text{L}$  of anticortisol antiserum (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) diluted 1:16,000 in ELISA buffer, 50  $\mu\text{L}$  of standard (ranging from 12,500 to 48 pg/mL) or reconstituted plasma sample, and 50  $\mu\text{L}$  of Cort/peroxidase conjugate (diluted 1:2,000 in ELISA buffer) were dispensed into the plate wells. The plates were incubated at  $4^{\circ}\text{C}$  for 24 h and then washed twice. After 45 min of incubation with 200  $\mu\text{L}$  of 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic-acid, the absorbance was read using a plate reader (VersaMax ELISA microplate reader; Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Finally, plasma concentrations of PRL were measured by RIA as described by Bruckmaier et al. (1992). For the OT, Cort, and PRL assays, the detection limits were 48.5, 19.5, and 500 pg/mL, respectively; the intra-assay coefficients of variation were 1.9, 3.7, and 2.3%, respectively; and the interassay coefficients of variation were 3.5, 7.0, and 8.4%, respectively.

### **Estimation of Mammary Epithelium Integrity**

Mammary epithelium integrity was estimated by measuring the lactose concentration in plasma. Plasma concentrations of lactose were measured using a multiparameter analyzer (Kone Instrument Corp., Espoo, Finland) and a kit for the detection of lactose/D-galactose (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). Mammary epithelium integrity was also assessed by measuring the concentrations of various indicators in milk. First, a 100- $\mu\text{L}$  sample of milk was used for total milk  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  analysis by atomic absorption spectrophotometry (Spectra AA220, Varian, Palo Alto, CA) as described by Murthy and Rhea (1967). Then, a 1.5-mL sample of skim milk was used for milk albumin content determination by radial immune diffusion with a specific kit (IDBiotech, Issoire, France) as previously described (Yart et al., 2013).

### **Purification of Milk MEC**

Fresh milk samples collected at min 1, min 2, and the middle and end of milking were used for MEC purification using the immunomagnetic separation technique as described by Boutinaud et al. (2008) with some modifications. For each cow, the middle sample and the end sample differed depending on the dura-

tion of milking: the middle sample corresponded to min  $5 \pm 1$  of milking, and the end sample corresponded to min  $7 \pm 2$  of milking. Fresh milk (1.8 kg for the samples collected at min 1 and 2 and at the middle of milking, and 0.9 kg for the sample collected at the end of milking) was defatted by centrifugation, and the skim milk was removed to recover the milk somatic cell pellet. The total milk somatic cell suspension was analyzed for cell count determination using a Vi-Cell XR analyzer (Beckman Coulter, Brea, CA). The total milk somatic cell suspension was then used for milk MEC purification. First, Dynabeads (Pan Mouse IgG, DYNAL Biotech, Invitrogen, Carlsbad, CA) were coated with a monoclonal mouse antibody directed against human cytokeratins 1, 5, 10, and 14 (clone 34 $\beta$ E12; Dako, Trappes, France); the total milk cell suspension was then incubated with the antibody/beads complex. After 1 h of incubation, specifically bound cells corresponding to MEC were collected by placing the sample vials in a magnetic particle concentrator (MPC-S; DYNAL Biotech, Invitrogen) for a few seconds followed by aspiration of the supernatant containing nonbound cells corresponding to leukocytes. The cell count and cell viability of the purified MEC suspension was analyzed using a Vi-Cell XR analyzer. The proportion of apoptotic cells in the purified milk MEC suspension was also determined by flow cytometry after staining of the cell suspension with the Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit (Molecular Probes Inc., Eugene, OR) according to the manufacturer's instructions. The cell suspension was diluted to approximately  $5.0 \times 10^5$  cells per vial. After centrifugation at  $500 \times g$  for 5 min at  $4^{\circ}\text{C}$ , the supernatant was discarded, and the milk MEC were resuspended in 60  $\mu\text{L}$  of  $1 \times$  annexin-binding buffer. Each MEC sample was separated into one control and one labeled sample of 25  $\mu\text{L}$  each. The labeled MEC samples were incubated with 25  $\mu\text{L}$  of labeling solution containing Alexa Fluor 488-annexin V and propidium iodide (Molecular Probes Inc.), and the control samples were incubated with 25  $\mu\text{L}$  of  $1 \times$  annexin-binding buffer. After incubation for 15 min at room temperature, 250  $\mu\text{L}$  of  $1 \times$  annexin-binding buffer was added to each sample. Finally, flow cytometry analysis was performed using a MACSQuant Analyzer 10 cytometer (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), and forward scatter, side scatter, and fluorescent staining properties were recorded. The number of events was stopped at 20,000 counts. The data were analyzed using MACSQuantify analysis software (Miltenyi Biotec). After exclusion of doublets and cell debris, the percentage of apoptotic MEC was determined by dot-plot analysis as the difference between the percentage of annexin V/propidium iodide-stained MEC in the labeled and control samples.



### Calculations and Statistical Analyses

The total number of somatic cells in the milk samples collected at each time point of milking was determined by multiplying the SCC by the milk yield. The MEC exfoliation rate at milking was defined as the sum of the number of exfoliated MEC obtained during each minute of milking. To calculate the exfoliation rate at milking, the number of MEC exfoliated during min 1, min 2, and the middle and end of milking was determined by multiplying the measured MEC concentration in milk by the milk yield. The MEC concentration in milk was not measured at each minute of milking; thus, the number of MEC exfoliated during the remaining minutes was estimated by multiplying the average measured MEC concentration in milk by the yield of milk collected each minute.

The basal concentrations of OT, PRL, Cort, and lactose were determined as the average plasma concentrations of these compounds at 5 and 2 min before attachment of the milking unit. The OT, PRL, Cort, and lactose delta at milking were defined as the differences between the maximal and the basal concentrations. To describe the OT, PRL, and Cort release and the leakage of lactose at milking, we calculated the areas under the curve (AUC) from the beginning of milking to 15 min after the beginning of milking for OT, 45 min for PRL, 25 min for Cort, and 45 min for lactose after subtracting the basal concentrations of the compounds.

Because the duration of milking was different for each cow (the duration ranged from 7 to 13 min), we created a 7-point time scale for the statistical analysis of milk yield and milk composition variables. The first 3 points corresponded to the first 3 min of milking of each cow, and the last 3 points corresponded to the last 3 min of milking of each cow. Point 4 in the scale corresponded to the mean value obtained for the intermediate minutes. For milk cell variables, the time scale consisted of 4 points (min 1, min 2, the middle of milking, and the end of milking). The SCC and cell variables were not normally distributed; therefore,  $\log_{10}$  transformation of the data was performed before the analyses. The data were analyzed by ANOVA using the SAS Mixed procedure with repeated statements (SAS Institute Inc., Cary, NC). Time was used as the repeated parameter, and cow was used as the subject for repeated measures. The duration of milking of each cow was used as the covariate. In addition, for plasma hormone and lactose concentration data, the basal concentration was also used as the covariate. The time at which the hormone and lactose concentrations returned to the basal level was determined by the matched-pairs *t*-test using the SAS T-Test procedure. The SAS Corr procedure was used to generate the Spearman correlation coefficient

(*r*), which measured the strength of association between pairs of variables describing hormone release (basal and maximal concentrations, delta, and AUC), indicators of mammary epithelium integrity, and the MEC exfoliation rate at milking without specifying dependencies.

All data are expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean. For data on milk yield and composition and mammary epithelium integrity indicators, the tables show the means estimated by the statistical model. For plasma hormone and lactose concentration data, the graphs show the means estimated by the statistical model, and the tables show the raw means. For all variables, differences were considered statistically significant when  $P < 0.05$  and a tendency when  $0.05 < P \leq 0.10$ .

## RESULTS

### Milking-Induced Hormone Release

The concentrations of OT, PRL, and Cort in plasma varied with time relative to milking unit attachment (Figure 1;  $P < 0.001$ ). The concentration of OT rapidly and markedly increased from  $68.5 \pm 5.8$  pg/mL before the beginning of milking to  $380.4 \pm 85.8$  pg/mL at  $4.3 \pm 1$  min after milking unit attachment. The OT concentration remained high and stable until the end of milking; it then markedly and quickly decreased, returning to the basal concentration between 15 and 25 min after the beginning of milking. The AUC of OT represented  $2,527 \pm 673$  pg/mL  $\times$  15 min (Table 1). The plasma concentrations of OT were highly variable among cows during milking and slightly variable after milking (see Supplemental Figure S1; <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13166>). The milking-induced increase in the PRL concentration was slightly delayed compared with the increase in OT concentration. The concentration of PRL increased from  $55.7 \pm 10.4$  ng/mL before milking unit attachment to  $171.2 \pm 12.3$  ng/mL at  $6.2 \pm 0.8$  min after milking unit attachment ( $P < 0.001$ ; Table 1). The PRL concentration then gradually decreased ( $P < 0.001$ ) and tended to return to the basal concentration 45 min after the beginning of milking ( $P = 0.054$ ). The AUC of PRL represented  $2,584 \pm 544$  ng/mL  $\times$  45 min. Compared with OT and PRL, the increase in Cort concentration occurred later relative to the beginning of milking. Every cow presented 2 Cort peaks at milking—a first peak at the beginning of milking and a second peak after the end of milking. For 3 cows, the first peak was larger than the second peak. Overall, as shown in Figure 1, the Cort concentration increased from  $6.7 \pm 1.8$  ng/mL before the beginning of milking to  $13.0 \pm 2.0$  ng/mL at  $14.4 \pm 0.6$  min after the beginning of milking ( $P < 0.001$ ; Table 1). The



Cort plasma concentration then decreased ( $P < 0.001$ ) until, at 25 min after the beginning of milking, it had returned to the basal concentration ( $P > 0.10$ ). The AUC of Cort represented  $69 \pm 28$  ng/mL  $\times$  25 min. Thereafter, the Cort concentration tended to decrease to a level below the basal level until 45 min after the beginning of milking ( $P < 0.10$ ).

### Indicators of Mammary Epithelium Integrity

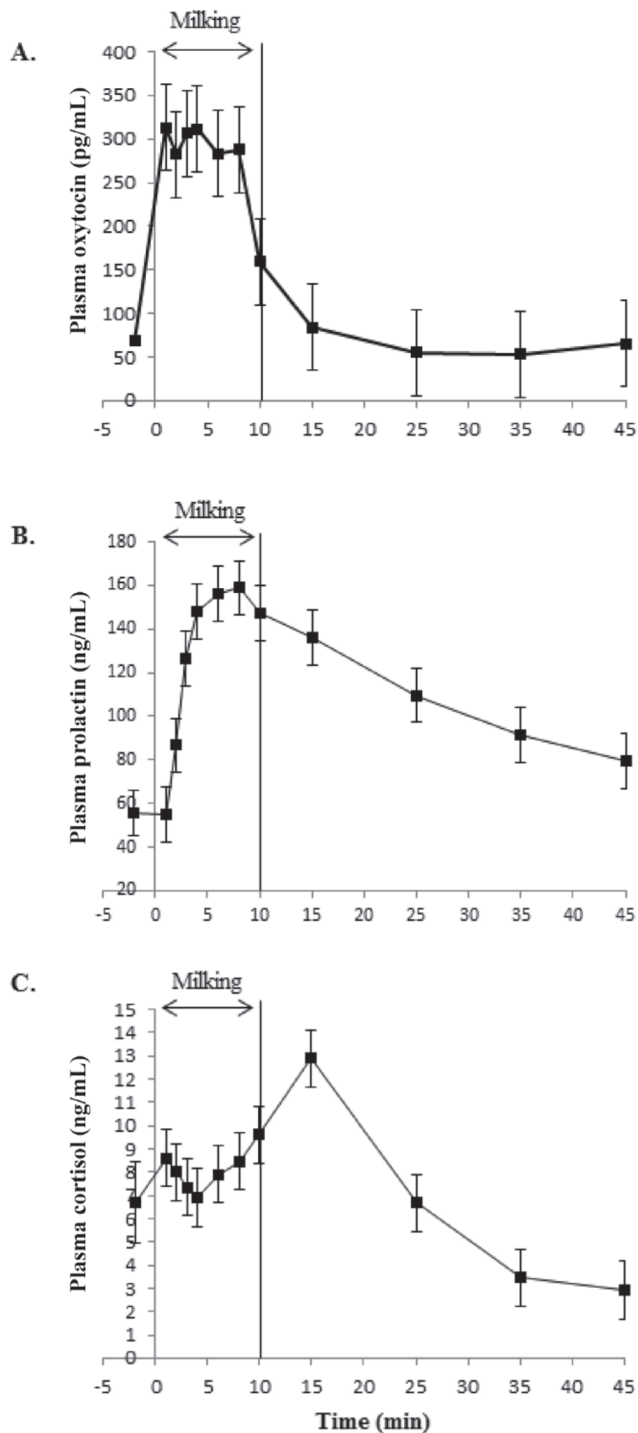
The lactose concentration in plasma gradually increased from 29.1 mg/L before the beginning of milking to 34.1 mg/L at the end of milking (Figure 2;  $P < 0.001$ ). After the end of milking, the plasma lactose concentration gradually decreased until it had returned to the basal concentration 35 min after the beginning of milking ( $P > 0.10$ ). At milking, on average, 95 mg/L  $\times$  45 min of lactose crossed the mammary epithelium from the milk to the blood (Table 2). The  $\text{Na}^+$  concentration in milk did not vary between time points 1 and 4 of milking, but it was higher at time points 5, 6, and 7 (Table 3;  $P < 0.01$ ). The concentration of  $\text{K}^+$  in the milk remained stable between time points 1 and 3 and decreased thereafter, reaching its lowest value at time point 6 ( $P < 0.05$ ). As a result, the  $\text{Na}^+:\text{K}^+$  ratio did not vary at the beginning of milking and was greater at time point 6 ( $P < 0.01$ ). The maximal concentration of plasma lactose and the maximal  $\text{Na}^+:\text{K}^+$  ratio in milk were positively correlated ( $r = 0.67$ ;  $P < 0.05$ ). Finally, the milk albumin content was lower at time point 5 of milking than at the first 3 time points of milking.

### Milk Yield and Composition

The volume and composition of milk varied greatly during milking (Table 4;  $P < 0.001$ ). Milk yield increased until time point 3 and then gradually decreased as milking progressed. The fat content of the milk progressively increased from 6.9 to 78.9 g/kg ( $P < 0.001$ ), whereas the protein content of the milk progressively decreased from 28.1 to 25.9 g/kg ( $P < 0.001$ ). The lactose content decreased from time point 3 until the end of milking ( $P < 0.001$ ).

### Milk Somatic Cells and Exfoliated MEC

The SCC decreased between time points 1 and 2 of milking. The SCC then progressively increased from  $25 \times 10^3$  cells/mL at time point 2 to  $126 \times 10^3$  cells/mL at the end of milking, representing a 500% increase over the course of milking (Table 4;  $P < 0.001$ ). The concentration of MEC in milk tended to vary during the course of milking. The concentration of MEC first decreased between time points 1 and 2 of milking and



**Figure 1.** Plasma concentrations of (A) oxytocin, (B) prolactin, and (C) cortisol before, during, and after milking relative to milking unit attachment ( $t = 0$ ) in 9 Holstein dairy cows. Data were analyzed using the SAS Mixed procedure with repeated statements (SAS Institute Inc., Cary, NC). Time was used as the repeated parameter, and cow was used as the subject for repeated measure. The duration of milking of each cow and the basal concentration of oxytocin, prolactin, or cortisol (calculated as the average concentration at 5 and 2 min before the onset of milking) were used as covariates. Time effect:  $P < 0.001$ . Data are presented as the means estimated by the statistical model  $\pm$  SEM.





**Table 1.** Characteristics (raw means  $\pm$  SEM) of oxytocin, prolactin, and cortisol release at milking in 9 Holstein dairy cows

Item	Oxytocin	Prolactin	Cortisol
Basal concentration <sup>1</sup>	68.5 $\pm$ 5.8 pg/mL	55.7 $\pm$ 10.4 ng/mL	6.7 $\pm$ 1.8 ng/mL
Maximal concentration	380.4 $\pm$ 85.8 pg/mL	171.2 $\pm$ 12.3 ng/mL	13.0 $\pm$ 2.0 ng/mL
Delta <sup>2</sup>	312.0 $\pm$ 82.1 pg/mL	115.5 $\pm$ 12.6 ng/mL	6.5 $\pm$ 1.2 ng/mL
Time of maximal concentration	4.3 $\pm$ 1.0 min	6.2 $\pm$ 0.8 min	14.4 $\pm$ 0.6 min
AUC <sup>3</sup>	2,527 $\pm$ 673 pg/mL $\times$ 15 min	2,584 $\pm$ 544 ng/mL $\times$ 45 min	69 $\pm$ 28 ng/mL $\times$ 25 min

<sup>1</sup>Corresponds to the average plasma concentration of oxytocin, prolactin, and cortisol at 5 and 2 min before attachment of the milking unit.

<sup>2</sup>Corresponds to the differences between the maximal and basal concentrations of oxytocin, prolactin, and cortisol.

<sup>3</sup>Area under the curve from the beginning of milking to 15 min after the beginning of milking for oxytocin, 45 min for prolactin, and 25 min for cortisol after subtracting the basal concentration.

then increased by 230% from time point 2 to the end of milking (Table 5;  $P = 0.10$ ). However, this increase was lower than the increase in the SCC, resulting in a progressive decrease in the percentage of MEC among the total milk somatic cells during the time course of milking (Table 5;  $P < 0.05$ ). In parallel, the number of leukocytes as a percentage of the total somatic cells increased. The total number of somatic cells in the milk increased between min 2 and the middle of milking and decreased at the end of milking ( $P < 0.05$ ; Table 4). In parallel, the number of MEC in the milk remained stable until the middle of milking and was the lowest at the end of milking ( $P < 0.01$ ; Table 5). The proportion of viable MEC and apoptotic MEC exfoliated in milk did not vary during milking ( $P > 0.10$ ; Table 5) and

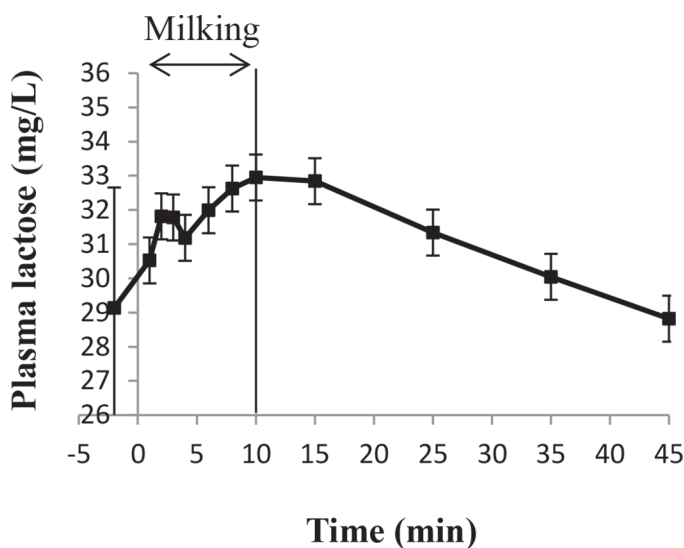
represented on average 50 and 35% of the total exfoliated MEC, respectively.

### Association Between Hormonal Status, Mammary Epithelium Integrity, and Exfoliation Rate During Milking

The rate of MEC exfoliation at milking was negatively correlated with the AUC of Cort 25 min after the beginning of milking and with the Cort delta ( $r = -0.70$  and  $-0.77$ , respectively;  $P < 0.05$ ). No correlation was found between the MEC exfoliation rate at milking and PRL and OT release or indicators of mammary epithelium integrity.

## DISCUSSION

Consistent with the results of several previous studies, in the present study OT was found to be released into the blood during milking in response to tactile stimulation of the teat (Bruckmaier et al., 1993; Lollivier and Marnet, 2005). The plasma concentration of OT dramatically increased at the beginning of milking and remained elevated throughout milking. As previously reported, the plasma concentration of PRL increased to its maximal value approximately 6 min after the beginning of milking, whereas the maximal plasma



**Figure 2.** Plasma concentrations of lactose before, during, and after milking relative to milking unit attachment ( $t = 0$ ) in 9 Holstein dairy cows. Data were analyzed using the SAS Mixed procedure with repeated statements (SAS Institute Inc., Cary, NC). Time was used as the repeated parameter, and cow was used as the subject for repeated measure. The duration of milking of each cow and the basal lactose concentration were used as covariates. Data are presented as the means estimated by the statistical model  $\pm$  SEM. Time effect:  $P < 0.001$ .

**Table 2.** Characteristics of plasma lactose at milking in 9 Holstein dairy cows

Item	Mean	SEM
Basal lactose concentration <sup>1</sup> (mg/L)	29.1	3.5
Maximal lactose concentration (mg/L)	34.1	3.6
Lactose delta <sup>2</sup> (mg/L)	4.9	0.7
Time of maximal concentration (min)	13.7	3.5
AUC <sup>3</sup> (mg/L $\times$ 45 min)	95	26

<sup>1</sup>Corresponds to the average plasma concentration of lactose at 5 and 2 min before attachment of the milking unit.

<sup>2</sup>Corresponds to the difference between the maximal and basal concentrations of lactose.

<sup>3</sup>Area under the curve from the beginning of milking to 45 min after the beginning of milking after subtracting the basal concentration.



**Table 3.** Evolution of albumin, Na<sup>+</sup>, and K<sup>+</sup> concentrations in milk during the course of milking in 9 Holstein dairy cows

Item	Time scale <sup>1</sup>							P-value <sup>2</sup>		
	1	2	3	4	5	6	7	SEM	Time	Milking duration
Milk Na <sup>+</sup> concentration (mg/kg)	352 <sup>abc</sup>	307 <sup>c</sup>	307 <sup>c</sup>	335 <sup>bc</sup>	361 <sup>ab</sup>	388 <sup>a</sup>	371 <sup>ab</sup>	21.7	<0.01	0.09
Milk K <sup>+</sup> concentration (mg/kg)	1,664 <sup>ab</sup>	1,686 <sup>a</sup>	1,663 <sup>ab</sup>	1,616 <sup>bc</sup>	1,612 <sup>bc</sup>	1,583 <sup>c</sup>	1,605 <sup>bc</sup>	56.2	<0.05	0.59
Milk Na <sup>+</sup> :K <sup>+</sup> ratio	0.214 <sup>abc</sup>	0.186 <sup>c</sup>	0.184 <sup>c</sup>	0.211 <sup>bc</sup>	0.230 <sup>ab</sup>	0.254 <sup>a</sup>	0.237 <sup>ab</sup>	0.0211	<0.01	0.21
Milk albumin concentration (µg/mL)	167.4 <sup>a</sup>	170.6 <sup>a</sup>	171.6 <sup>a</sup>	157.6 <sup>ab</sup>	142.9 <sup>b</sup>	158.1 <sup>ab</sup>	156.1 <sup>ab</sup>	7.10	<0.05	0.79

<sup>a-d</sup>Means within a row without a common superscript differ ( $P < 0.05$ ).

<sup>1</sup>A 7-point time scale was used for the statistical analysis. The first 3 points corresponded to the first 3 min of milking, the last 3 points corresponded to the last 3 min of milking, and point 4 corresponded to the mean value obtained for the intermediate minutes of milking of each cow.

<sup>2</sup>The data were analyzed using the SAS Mixed procedure with repeated statements (SAS Institute Inc., Cary, NC). Time was used as the repeated parameter, and cow was used as the subject for repeated measures. The duration of milking of each cow was used as the covariate. The data are presented as means estimated by the statistical model  $\pm$  SEM.

Cort concentration occurred after the end of milking (i.e., 14 min after the beginning of milking; Bruckmaier et al., 1993; Rushen et al., 2001; Negrão et al., 2004; Lollivier and Marnet, 2005). We hypothesized that the release of hormones during milking might regulate tight junction permeability. The tightness of the mammary epithelial barrier was assessed through several indicators. Lactose, which is synthesized exclusively by MEC, can be transferred from milk to blood only via a paracellular pathway through disrupted tight junctions (Kuhn and Linzell, 1970). The Na<sup>+</sup>:K<sup>+</sup> ratio in milk is known to be inversely correlated with mammary epithelium integrity during lactation (Sorensen et al., 2001). In the present study, the observed variations in the albumin concentration in milk during milking were not consistent with the observed variations in plasma lactose and milk Na<sup>+</sup>:K<sup>+</sup> ratio. This result confirms that milk albumin content is not a valuable marker for assessing mammary epithelium integrity, especially because albumin is synthesized by MEC and secreted into milk (Shamay et al., 2005). During milking, the lactose concentration in plasma and the Na<sup>+</sup>:K<sup>+</sup> ratio in milk increased progressively, and both reached maximal values at the end of milking, showing for the first time that the opening of tight junctions occurred throughout milking. The degree of tight junction opening may be greater during milk accumulation than during milking because greater basal concentrations of plasma lactose were observed when milk accumulation occurred over a long milking interval (Guinard-Flament et al., 2011). Interestingly, variations among individuals in the degree of tight junction opening were suggested by the positive correlation between the maximal concentration of plasma lactose and the maximal Na<sup>+</sup>:K<sup>+</sup> ratio in milk. The opening of tight junctions during milking occurred when OT concentrations were high. Given that exogenous and supraphysiological OT treatment is known to induce tight junction opening in dairy cows (Allen, 1990; Werner-Misof et al., 2007), the milking-induced OT release could be responsible for the disruption of mammary epithelium integrity during milking. The fact that the lactose concentration returned to its basal concentration after the end of milking shows that the integrity of the mammary epithelium was recovered after the end of milking. The recovery of mammary epithelium integrity occurred after the observed increase in Cort concentration. Thus, Cort may induce the recovery of the mammary epithelium integrity after the end of milking; this is consistent with the known positive effects of Cort on tight junction closure in vitro (Zetl et al., 1992; Singer et al., 1994) and in vivo (Stelwagen et al., 1998; Nguyen et al., 2001). This study demonstrates for the first time that milking is associated with a transitory increase in the mammary



**Table 4.** Evolution of yield and composition of milk collected each minute separately during the course of milking in 9 Holstein dairy cows

Item	Time scale <sup>1</sup>							SEM	P-value <sup>2</sup>	
	1	2	3	4	5	6	7		Time	Milking duration
Milk yield (kg)	2.9 <sup>e</sup>	3.6 <sup>ce</sup>	3.9 <sup>cd</sup>	3.3 <sup>ce</sup>	1.2 <sup>b</sup>	0.5 <sup>ab</sup>	0.3 <sup>a</sup>	0.28	<0.001	<0.01
Milk fat content (g/kg)	6.9 <sup>f</sup>	13.1 <sup>df</sup>	21.6 <sup>de</sup>	38.0 <sup>c</sup>	57.0 <sup>b</sup>	64.3 <sup>b</sup>	78.9 <sup>a</sup>	4.05	<0.001	0.03
Milk protein content (g/kg)	28.1 <sup>a</sup>	27.5 <sup>b</sup>	27.4 <sup>b</sup>	27.1 <sup>bc</sup>	26.7 <sup>cd</sup>	26.4 <sup>de</sup>	25.9 <sup>e</sup>	0.36	<0.001	0.27
Lactose content (g/kg)	51.8 <sup>a</sup>	52.2 <sup>a</sup>	51.6 <sup>a</sup>	50.0 <sup>b</sup>	48.4 <sup>c</sup>	47.9 <sup>c</sup>	47.2 <sup>d</sup>	0.39	<0.001	0.95
Log <sub>10</sub> SCC	4.7 <sup>a</sup>	4.4 <sup>b</sup>	4.5 <sup>b</sup>	4.8 <sup>ac</sup>	4.8 <sup>ac</sup>	5.0 <sup>cd</sup>	5.1 <sup>d</sup>	0.20	<0.001	0.98
Log <sub>10</sub> somatic cell number	8.1 <sup>ab</sup>	7.9 <sup>ac</sup>	8.0 <sup>ab</sup>	8.3 <sup>b</sup>	7.7 <sup>cd</sup>	7.5 <sup>de</sup>	7.4 <sup>e</sup>	0.17	<0.001	0.74

<sup>a-f</sup>Means within a row without a common superscript differ ( $P < 0.05$ ).

<sup>1</sup>A 7-point time scale was used for the statistical analysis. The first 3 points corresponded to the first 3 min of milking, the last 3 points corresponded to the last 3 min of milking, and point 4 corresponded to the mean value obtained for the intermediate minutes of milking of each cow.

<sup>2</sup>The data were analyzed using the SAS Mixed procedure with repeated statements (SAS Institute Inc., Cary, NC). Time was used as the repeated parameter, and cow was used as the subject for repeated measures. The duration of milking of each cow was used as the covariate. The data are presented as means estimated by the statistical model  $\pm$  SEM.

epithelial permeability that is likely regulated by the release of OT and Cort.

The variations in the composition of milk during milking observed in our study are consistent with the data reported in the literature (Vangroenweghe et al., 2002; Ontsouka et al., 2003; Sarikaya et al., 2005). The fat content of milk gradually increased from the beginning to the end of milking, whereas the protein and lactose contents of the milk decreased throughout milking. Milk also contains a variety of somatic cell types, namely MEC and leukocytes (lymphocytes, macrophages, neutrophils, and eosinophils). The observed variations in SCC during milking (i.e., a decrease at the beginning of milking followed by a marked increase at the end of milking) were also in agreement with reports from previous studies in which SCC was shown to be high in the cisternal fraction and lowest in the first alveolar fraction and to increase gradually during alveolar milk ejection (Ontsouka et al., 2003; Sarikaya

et al., 2005). To our knowledge, this experiment is the first one describing the variations of the number and the concentration of MEC during the time course of milking. An average of  $125 \times 10^6$  MEC were exfoliated in 1 milking, a value that is consistent with the reported daily exfoliation rate of between 200 and  $390 \times 10^6$  MEC exfoliated per day with 2 milkings (Lollivier et al., 2015; Herve et al., 2016). Moreover, half of the MEC exfoliated during milking were living cells, indicating that the exfoliation process makes it possible to eliminate not only apoptotic but also living MEC. During min 1 of milking, an average of  $17 \times 10^6$  MEC were exfoliated into the milk; this represented 13% of the total MEC exfoliated during milking. The milk obtained during min 1 of milking is likely to have been cisternal milk that accumulated between 2 milkings. Indeed, milk yield averaged 2.9 kg, which represents the average yield of cisternal milk in dairy cows (Ayadi et al., 2003). Therefore, the presence of MEC in the

**Table 5.** Evolution of concentration, number, and viability of milk mammary epithelial cells (MEC) during the course of milking in 9 Holstein dairy cows

Item	Time scale <sup>1</sup>				SEM	P-value <sup>2</sup>	
	1	2	Middle	End		Time	Milking duration
Milk MEC ( $10^3$ cells/mL)	7.2 <sup>a</sup>	3.3 <sup>b</sup>	5.1 <sup>ab</sup>	7.5 <sup>a</sup>	2.65	0.10	0.57
Log <sub>10</sub> milk MEC number <sup>3</sup>	7.1 <sup>a</sup>	6.9 <sup>a</sup>	7.0 <sup>a</sup>	6.7 <sup>b</sup>	0.15	<0.01	0.14
MEC in milk cells (%)	26.3 <sup>ab</sup>	32.4 <sup>a</sup>	21.1 <sup>bc</sup>	14.1 <sup>cd</sup>	4.86	<0.05	0.43
Milk MEC viability (%)	54.3	50.2	50.2	45.0	5.49	0.52	0.68
Apoptotic cells (%)	33.0	33.4	34.9	38.2	6.11	0.51	0.96

<sup>a-d</sup>Means within a row without a common superscript differ ( $P < 0.05$ ).

<sup>1</sup>A 4-point time scale corresponding to the sample collected at min 1, min 2, the middle of milking (corresponding to min  $5 \pm 1$  of milking), and the end of milking (corresponding to min  $7 \pm 2$  of milking) was used for the statistical analysis.

<sup>2</sup>The data were analyzed using the SAS Mixed procedure with repeated statements (SAS Institute Inc., Cary, NC). Time was used as the repeated parameter, and cow was used as the subject for repeated measures. The duration of milking of each cow was used as the covariate. The data are presented as means estimated by the statistical model  $\pm$  SEM.

<sup>3</sup>The milk MEC number was determined by multiplying the milk MEC concentration by the milk yield. The data were not normally distributed; therefore, log<sub>10</sub> transformation was performed before the analyses.



milk sample taken during min 1 of milking suggests that MEC could have been left over from the previous milking or exfoliated as a result of the shedding from the epithelium into the cisternal milk between milkings in the absence of mechanical pressure caused by milking-induced OT release. The remaining fraction of the exfoliated MEC (i.e., 87% of the total number of exfoliated MEC) was present in the milk collected from min 2 to the end of milking, which likely corresponded to the alveolar milk.

At this time, the mechanisms that result in the presence of MEC in alveolar milk are not clear. The first hypothesis is that these MEC are continuously exfoliated between each of 2 successive milkings, trapped in the alveolar lumen, and transferred along the mammary duct to the cistern only during the alveolar milk ejection process. Indeed, the MEC exfoliation process could be comparable with that suggested for fat globule delivery due to the size of MEC (i.e., 20  $\mu\text{m}$  on average) or to capillary and adhesive forces that occur during the milking process; the latter could influence MEC transfer by positive and negative membrane potentials (Sarikaya et al., 2005). Mammary epithelial cell ejection could also occur during the ejection of fat globules due to the hydrophobic properties of somatic cells (Nielsen et al., 2005). These phenomena could explain why most of the MEC are present in the alveolar fraction. The second hypothesis regarding the presence of MEC in alveolar milk is that MEC exfoliation occurs during milking as a consequence of the mechanical forces exerted on the mammary epithelium and a disruption of the mammary epithelium integrity, both of which are caused by milking-induced OT release. In support of this hypothesis, we previously showed that greater exfoliation rates are associated with mammary epithelium disruption (Herve et al., 2016). In the present study, we showed that milking induces mammary epithelium disruption in response to OT release. However, no relationship could be established between any variable describing OT release (basal or maximal concentrations, delta, or AUC), indicators of mammary epithelium disruption, and the MEC exfoliation rate at milking. It has recently been shown that fat globules are secreted following OT stimulation (Masedunskas et al., 2017), suggesting that the progressive increase in fat content in consecutive milk fractions during milking is attributable to active secretion of fat globules during milking. If again we may draw a parallel between fat content and MEC concentration in milk, these findings argue in favor of MEC exfoliation during milking and against the accumulation of MEC in the alveolar milk fraction between milkings. Administration of an OT receptor antagonist such as atosiban, which is known

to inhibit the OT-induced contraction of myoepithelial cells in dairy cows (Bruckmaier et al., 1997), could offer a tool for investigating the role of OT in regulating the MEC exfoliation process during milking. These 2 hypotheses concerning MEC exfoliation, one viewing it as a continuous mechanism and the other viewing it as a process stimulated by milking, are not mutually exclusive.

The presence of MEC in milk throughout the milking process was concomitant with the release of PRL. The MEC exfoliation process could be partly regulated by PRL; however, no correlation between PRL release and the MEC exfoliation rate at milking was observed. Nevertheless, the MEC concentration in milk increased during milking even when the plasma concentration of PRL was high. This finding contrasts with the known inhibitory effect of PRL on MEC exfoliation during lactation (Lollivier et al., 2015) and mammary involution (Boutinaud et al., 2013). The release of PRL following OT release could limit the stimulatory effect of OT on the MEC exfoliation process via stimulation of the expression of genes involved in tight junction formation, as has been previously suggested in rodents (Gass et al., 2003).

Finally, to date, there is no evidence that Cort plays a role in regulating the MEC exfoliation process. The Cort concentration peaked at the end of milking; therefore, Cort may limit MEC exfoliation by reducing mammary epithelial permeability following the end of milking. Furthermore, in the present study, the MEC exfoliation rate at milking was negatively correlated with the AUC for Cort and with the Cort delta, suggesting that Cort may play a role in limiting the MEC exfoliation process. Further investigations are needed to study the potential role of Cort in regulating MEC exfoliation.

## CONCLUSIONS

This study demonstrated that a transitory disruption of the mammary epithelium integrity that could be induced by OT and restored by Cort occurs during milking. A small proportion of MEC were exfoliated into cisternal milk, left over from the previous milking or as a result of the shedding from the epithelium in the absence of the mechanical pressures caused by milking-induced OT release. However, most of the exfoliated MEC were present in the alveolar fraction. These MEC could have been either continuously exfoliated and delivered from the alveolar lumen during the milk ejection process or exfoliated during milking as a consequence of the OT-induced mechanical forces and a disruption of the mammary epithelium integrity or both.





## ACKNOWLEDGMENTS

The authors are very grateful to Philippe Lambertson, Daniel Chevrel, André Cozien, Jean-Yves Thébault, Pierre-Yves Pennober, Jean-Luc Harel, and Maryvonne Texier of the Physiology Team of the INRA experimental farm of Méjusseau (INRA UMR PEGASE, Le Rheu, France) for caring for the animals and assisting with blood and milk sampling. The authors also thank Sandra Wiart, Sabrina Philau, Colette Mustière, and Morgane Kerboas (INRA UMR PEGASE, Saint Gilles, France) for technical assistance; Clément Cirot (INRA UMR PEGASE, Saint Gilles, France) for help with the statistical analyses; and Pierre-Guy Marnet (Agrocampus-Ouest, Rennes, France) for providing the antibody and the label for oxytocin assays. This study was conducted with the financial support of the GALA association (Janzé, France) and INRA through the RUMINFLAME project funded by the GISA metaprogram 2012. Lucile Herve was supported by a PhD studentship funded by Région Bretagne and Agrocampus-Ouest (Rennes, France).

## REFERENCES

- Allen, J. C. 1990. Milk synthesis and secretion rates in cows with milk composition changed by oxytocin. *J. Dairy Sci.* 73:975–984.
- Ayadi, M., G. Caja, X. Such, and C. H. Knight. 2003. Use of ultrasonography to estimate cistern size and milk storage at different milking intervals in the udder of dairy cows. *J. Dairy Res.* 70:1–7. <https://doi.org/10.1017/S0022029902005873>.
- Boutinaud, M., M. H. Ben Chedly, E. Delamaire, and J. Guinard-Flament. 2008. Milking and feed restriction regulate transcripts of mammary epithelial cells purified from milk. *J. Dairy Sci.* 91:988–998. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0587>.
- Boutinaud, M., J. Guinard-Flament, and H. Jammes. 2004. The number and activity of mammary epithelial cells, determining factors for milk production. *Reprod. Nutr. Dev.* 44:499–508. <https://doi.org/10.1051/rnd:2004054>.
- Boutinaud, M., N. Isaka, A. Deflandre, E. Gandemer, P.-G. Marnet, F. Dessauge, and V. Lollivier. 2013. Prolactin-inhibitor cabergoline enhanced the mammary remodeling during drying-off in dairy cows. *J. Anim. Sci.* 91(E-Suppl. 2):151.
- Bruckmaier, R. M., D. Schams, and J. W. Blum. 1992. Aetiology of disturbed milk ejection in parturient primiparous cows. *J. Dairy Res.* 59:479–489.
- Bruckmaier, R. M., D. Schams, and J. W. Blum. 1993. Milk removal in familiar and unfamiliar surroundings: Concentrations of oxytocin, prolactin, cortisol and  $\beta$ -endorphin. *J. Dairy Res.* 60:449–456. <https://doi.org/10.1017/S0022029900027813>.
- Bruckmaier, R. M., O. Wellnitz, and J. W. Blum. 1997. Inhibition of milk ejection in cows by oxytocin receptor blockade,  $\alpha$ -adrenergic receptor stimulation and in unfamiliar surroundings. *J. Dairy Res.* 64:315–325.
- Capuco, A. V., S. E. Ellis, S. A. Hale, E. Long, R. A. Erdman, X. Zhao, and M. J. Paape. 2003. Lactation persistency insights from mammary cell proliferation studies. *J. Anim. Sci.* 81:18–31.
- Flint, D. J., and M. Gardner. 1994. Evidence that growth hormone stimulates milk synthesis by direct action on the mammary gland and that prolactin exerts effects on milk secretion by maintenance of mammary deoxyribonucleic acid content and tight junction status. *Endocrinology* 135:1119–1124.
- Gass, S., J. Harris, C. Ormandy, and C. Briskin. 2003. Using gene expression arrays to elucidate transcriptional profiles underlying prolactin function. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 8:269–285.
- Guinard-Flament, J., Y. Gallard, and H. Larroque. 2011. Lactose in blood plasma and the ability of dairy cows to tolerate once-daily milking in terms of milk loss and milk recovery. *J. Dairy Sci.* 94:3446–3454. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-4081>.
- Herve, L., H. Quesnel, V. Lollivier, and M. Boutinaud. 2016. Regulation of cell number in the mammary gland by controlling the exfoliation process in milk in ruminants. *J. Dairy Sci.* 99:854–863. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9964>.
- Kitchen, B. J. 1981. Bovine mastitis: Milk compositional changes and related diagnostic tests. *J. Dairy Res.* 48:167–188. <https://doi.org/10.1017/S0022029900021580>.
- Komara, M., and P. G. Marnet. 2009. Endocrine responses and milk emission characteristics in high yielding Alpine dairy goats under once daily milking management. *Small Rumin. Res.* 87:64–69. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2009.10.003>.
- Kuhn, N. J., and J. L. Linzell. 1970. Measurement of the quantity of lactose passing into mammary venous plasma and lymph in goats and in a cow. *J. Dairy Res.* 37:203–208. <https://doi.org/10.1017/S002202990001325X>.
- Linzell, J. L., M. Peaker, and J. C. Taylor. 1975. The effects of prolactin and oxytocin on milk secretion and on the permeability of the mammary epithelium in the rabbit. *J. Physiol.* 253:547–563.
- Lollivier, V., P. Lacasse, J. Angulo Arizala, P. Lambertson, S. Wiart, J. Portanguen, R. Bruckmaier, and M. Boutinaud. 2015. In vivo inhibition followed by exogenous supplementation demonstrates galactopoietic effects of prolactin on mammary tissue and milk production in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 98:8775–8787. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9853>.
- Lollivier, V., and P.-G. Marnet. 2005. Galactopoietic effect of milking in lactating Holstein cows: Role of physiological doses of oxytocin. *Livest. Prod. Sci.* 95:131–142. <https://doi.org/10.1016/j.livprodsci.2005.01.013>.
- Marnet, P. G., H. Volland, P. Pradelles, J. Grassi, and M. Beaufils. 1994. Subpicogram determination of oxytocin by an enzyme immunoassay using acetylcholinesterase as label. *J. Immunoassay* 15:35–53. <https://doi.org/10.1080/15321819408009570>.
- Masedunskas, A., Y. Chen, R. Stussman, R. Weigert, and I. H. Mather. 2017. Kinetics of milk lipid droplet transport, growth, and secretion revealed by intravital imaging: Lipid droplet release is intermittently stimulated by oxytocin. *Mol. Biol. Cell* 28:935–946.
- Murthy, G. K., and U. Rhea. 1967. Determination of major cation in milk by atomic absorption spectrophotometry. *J. Dairy Sci.* 50:313–317.
- Negrão, J. A., M. A. Porcionato, A. M. De Passille, and J. Rushen. 2004. Cortisol in saliva and plasma of cattle after ACTH administration and milking. *J. Dairy Sci.* 87:1713–1718.
- Nguyen, D. A., and M. C. Neville. 1998. Tight junction regulation in the mammary gland. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 3:233–246.
- Nguyen, D. A., A. F. Parlow, and M. C. Neville. 2001. Hormonal regulation of tight junction closure in the mouse mammary epithelium during the transition from pregnancy to lactation. *J. Endocrinol.* 170:347–356.
- Nielsen, N. I., T. Larsen, M. Bjerring, and K. L. Ingvarsen. 2005. Quarter health, milking interval, and sampling time during milking affect the concentration of milk constituents. *J. Dairy Sci.* 88:3186–3200.
- Ontsouka, C. E., R. M. Bruckmaier, and J. W. Blum. 2003. Fractionized milk composition during removal of colostrum and mature milk. *J. Dairy Sci.* 86:2005–2011.
- Rushen, J., L. Munksgaard, P. G. Marnet, and A. M. De Passille. 2001. Human contact and the effects of acute stress on cows at milking. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 73:1–14.
- Sarikaya, H., C. Werner-Misof, M. Atzkern, and R. M. Bruckmaier. 2005. Distribution of leucocyte populations, and milk composition, in milk fractions of healthy quarters in dairy cows. *J. Dairy Res.* 72:486–492. <https://doi.org/10.1017/S0022029905001317>.



- Shamay, A., R. Homans, Y. Fuerman, I. Levin, H. Barash, N. Silankove, and S. J. Mabjeesh. 2005. Expression of albumin in nonhepatic tissues and its synthesis by the bovine mammary gland. *J. Dairy Sci.* 88:569–576.
- Singer, K. L., B. R. Stevenson, P. L. Woo, and G. L. Firestone. 1994. Relationship of serine/threonine phosphorylation/dephosphorylation signaling to glucocorticoid regulation of tight junction permeability and ZO-1 distribution in nontransformed mammary epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 269:16108–16115.
- Sorensen, B. A., D. D. Muir, and C. H. Knight. 2001. Thrice-daily milking throughout lactation maintains epithelial integrity and thereby improves milk protein quality. *J. Dairy Res.* 68:15–25.
- Stelwagen, K., H. A. McFadden, and J. Demmer. 1999. Prolactin, alone or in combination with glucocorticoids, enhances tight junction formation and expression of the tight junction protein occludin in mammary cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 156:55–61.
- Stelwagen, K., and K. Singh. 2014. The role of tight junctions in mammary gland function. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 19:131–138. <https://doi.org/10.1007/s10911-013-9309-1>.
- Stelwagen, K., D. C. Van Espen, G. A. Verkerk, H. A. McFadden, and V. C. Farr. 1998. Elevated plasma cortisol reduces permeability of mammary tight junctions in the lactating bovine mammary epithelium. *J. Endocrinol.* 159:173–178.
- Vangroenweghe, F., H. Dosogne, and C. Burvenich. 2002. Composition and milk cell characteristics in quarter milk fractions of dairy cows with low cell count. *Vet. J.* 164:254–260. <https://doi.org/10.1053/tvjl.2002.0725>.
- Wall, S. K., O. Wellnitz, L. E. Hernández-Castellano, A. Ahmadpour, and R. M. Bruckmaier. 2016. Supraphysiological oxytocin increases the transfer of immunoglobulins and other blood components to milk during lipopolysaccharide- and lipoteichoic acid-induced mastitis in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 99:9165–9173. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11548>.
- Werner-Misof, C., M. W. Pfaffl, H. H. D. Meyer, and R. M. Bruckmaier. 2007. Effect of chronic oxytocin-treatment on the bovine mammary gland immune system. *Vet. Med. (Prague)* 52:475–486.
- Yart, L., V. Lollivier, L. Finot, J. Dupont, S. Wiart, M. Boutinaud, P. G. Marnet, and F. Dessauge. 2013. Changes in mammary secretory tissue during lactation in ovariectomized dairy cows. *Steroids* 78:973–981. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2013.06.003>.
- Zettl, K. S., M. D. Sjaastad, P. M. Riskin, G. Parry, T. E. Machen, and G. L. Firestone. 1992. Glucocorticoid-induced formation of tight junctions in mouse mammary epithelial cells in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:9069–9073.



## **Partie 2 - L'ocytocine participe à la régulation du processus d'exfoliation et à la perte de l'intégrité de l'épithélium chez la vache laitière**

Au moment de la traite, lors du réflexe d'éjection du lait, l'OT induit la contraction des cellules myoépithéliales qui exercent alors des forces mécaniques sur l'épithélium mammaire. Ces forces mécaniques pourraient induire une perte d'intégrité de l'épithélium mammaire et stimuler l'exfoliation des CEM.

Cette 2<sup>ème</sup> partie se basant sur les résultats de l'essai « **Rôle de l'OT** » a pour objectif d'étudier plus spécifiquement le rôle de l'OT et de la contraction des cellules myoépithéliales dans la régulation du processus d'exfoliation. Une nouvelle fois, le lien entre l'intégrité de l'épithélium et l'exfoliation des CEM dans le lait sera étudié.

Ces travaux ont fait l'objet d'un article soumis pour publication dans Journal of Endocrinology et d'une communication orale lors du congrès de l'EAAP (**Annexe 9**).



## RÉSUMÉ

Des cellules épithéliales mammaires (CEM) sont exfoliées dans le lait, engendrant des variations du nombre de CEM dans le tissu mammaire. Ce processus est associé à une perte d'intégrité de l'épithélium mammaire. La libération d'ocytocine (OT) en réponse à la traite induit la contraction des cellules myoépithéliales qui, en exerçant des forces mécaniques sur l'épithélium, pourrait stimuler l'exfoliation. Afin d'étudier le rôle de l'OT dans la régulation du processus d'exfoliation, nous avons inhibé ou induit la contraction des cellules myoépithéliales en injectant respectivement de l'atosiban (Ato), un antagoniste des récepteurs de l'OT, ou une dose supra physiologique d'OT exogène. Huit vaches laitières ont été soumises à 2 traitements lors de 2 traites différentes selon un schéma expérimental en inversion : le traitement Témoin+OT (les vaches ont été traitées pour collecter le lait standard et ont ensuite reçu 5 UI d'OT afin de collecter le lait alvéolaire résiduel grâce à une seconde traite) et le traitement Ato+OT (les vaches ont reçu une injection d'Ato -50 µg/kg de poids vif- et ont été traitées afin de collecter le lait citernal, puis ont reçu 5 UI d'OT afin de collecter le lait alvéolaire grâce à une seconde traite). Les CEM ont été purifiées afin de déterminer la concentration et le nombre de CEM dans le lait. L'intégrité de l'épithélium mammaire a été estimée grâce à la détermination de la concentration en lactose plasmatique en cinétique tout au long des traitements. L'inhibition de la contraction des cellules myoépithéliales par l'injection d'Ato a induit une diminution du nombre de CEM exfoliées dans le lait. L'injection d'OT a, au contraire, induit une augmentation de la concentration en CEM dans le lait alvéolaire résiduel et du nombre de CEM exfoliées dans le lait alvéolaire. L'injection d'Ato a induit une diminution de la concentration en lactose plasmatique tandis que dans les 2 traitements, l'injection d'OT a induit une augmentation de la concentration en lactose plasmatique. Nos résultats montrent donc que la contraction des cellules myoépithéliales induite par l'OT stimule l'exfoliation des CEM et est associée à une perte d'intégrité de l'épithélium.





## **Oxytocin stimulates mammary epithelial cell exfoliation and epithelium disruption**

**L Herve<sup>1</sup>, V Lollivier<sup>1,2</sup>, H Quesnel<sup>1</sup>, M Boutinaud<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>PEGASE, Agrocampus Ouest, INRA, 35590 Saint-Gilles, France

<sup>2</sup> Université Bretagne Loire, 35044 Rennes, France

Corresponding author: Marion Boutinaud

Postal address: PEGASE, Agrocampus Ouest, INRA, 35590 Saint-Gilles, France

Email address: Marion.Boutinaud@inra.fr

**Short title: Effect of Oxytocin on mammary epithelium**

**Key words:** oxytocin, mammary epithelial cell, exfoliation, myoepithelial cell contraction, dairy cow.



## Abstract

Mammary epithelial cells (MEC) are exfoliated from the epithelium into milk, influencing the number of MEC in the udder. This process is associated with epithelium integrity. The release of oxytocin (OT) induced by milking causes myoepithelial cell contraction, which, in turn, may stimulate MEC exfoliation through mechanical forces. To investigate the role of OT in MEC exfoliation, we inhibited or induced myoepithelial cell contraction by injecting the OT receptor antagonist atosiban (Ato) or a supraphysiological dose of OT, respectively. Eight cows were assigned to 2 treatments during 2 milkings according to a crossover experimental design: Control+OT (cows were first milked to collect standard milk and then received 5 IU of OT to collect residual milk through a second milking) and Ato+OT (cows were injected with Ato (50 µg/kg of body weight) and milked to collect cisternal milk, then received 5 IU of OT to collect alveolar milk through a second milking). Milk MEC were purified to determine their concentration and number in milk. Mammary epithelium integrity was assessed by measuring the kinetics of plasma lactose concentration. Inhibiting myoepithelial cell contraction by Ato injection decreased the number of exfoliated MEC in milk. In contrast, OT injection increased the concentration of MEC in the residual milk and the number of MEC in the alveolar milk. Ato injection reduced plasma lactose concentration, whereas, in both treatments, OT injections increased it. Thus, our results showed that myoepithelial cell contraction caused by OT stimulated MEC exfoliation into milk and was associated with epithelium disruption.



## Introduction

The mammary secretions of mammals contain different somatic cell types including immune cells (lymphocytes, macrophages, neutrophils, and eosinophils) and mammary epithelial cells (MEC), as shown in various species (Papanicolaou et al., 1958; Rie et al., 1976; Kitchen, 1981). The MEC present in milk are exfoliated through shedding from the epithelium. Most of the MEC exfoliated into milk are viable and exhibit characteristics of differentiated alveolar cells (Boutinaud and Jammes, 2002). It was recently shown in ruminants that the MEC exfoliation process likely participates in regulating MEC number in the mammary gland and thereby participates in milk yield variations during lactation or in response to environmental or management factors (Herve et al., 2016). However, the mechanisms that regulate MEC exfoliation remain unknown.

In humans, it has been hypothesized that either the cell turnover in the secretory tissue or the pressures associated with the continued filling and emptying cycle associated with milk synthesis and breastfeeding could be responsible for MEC exfoliation from the ductal or luminal layer (Cregan et al., 2007). In response to the tactile stimulation of the teat during suckling or milking, a neural signal is carried to the brain resulting in the release of oxytocin (OT) into the general blood circulation by the neural lobe of the pituitary gland. In the mammary gland, OT binds to its specific receptors located on the myoepithelial cells, which surround the mammary epithelium, and induces the contraction of the myoepithelial cells. As a consequence of the mechanical forces exerted on the mammary epithelium, milk contained in the alveoli is expelled through the ducts into the nipple or the teat and becomes available for the offspring or is collected by the milking machine (Lincoln and Paisley, 1982). This milk ejection reflex is similar in all mammalian species from rodents to ruminants and humans (Cross and Silver, 1956; Lincoln and Paisley, 1982). In ruminants, however, before being expelled through the teat, the alveolar milk descends into a specific organ ensuring the storage of milk between two suckling or milking bouts, namely, the cistern (Bruckmaier, 2005).

In ruminants submitted to various physiological, breeding or environmental conditions, the increase in the rate of MEC exfoliation was associated with disruption of the mammary epithelium (Herve et al., 2016). Moreover, in dairy cows, OT administered at a supraphysiological dose has been shown to increase the permeability of the mammary



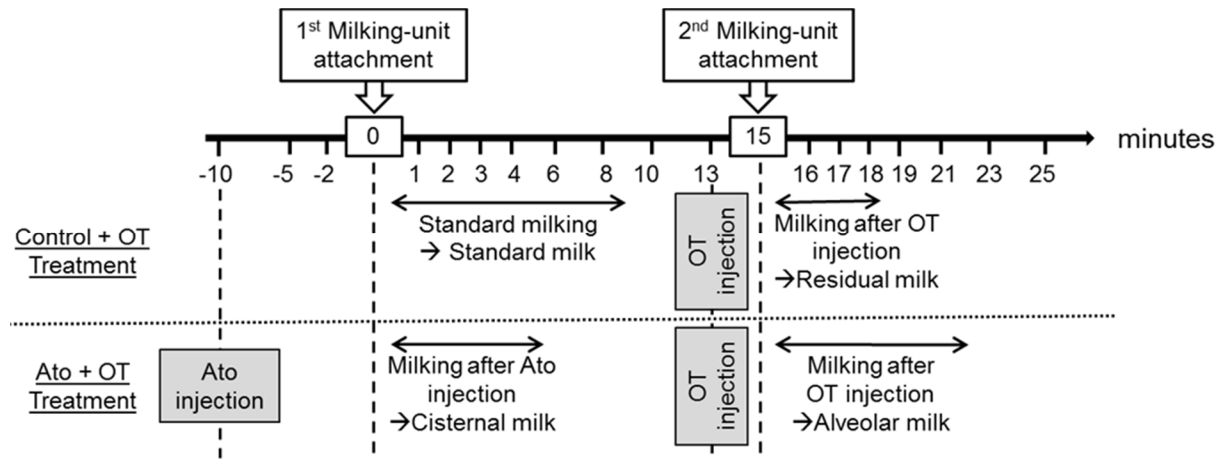
epithelium (Allen, 1990; Werner-Misof et al., 2007; Wall et al., 2016). Milking has also been shown to disrupt the mammary epithelium. This mammary epithelium disruption at milking was concomitant with the exfoliation of MEC (Herve et al., 2017). We therefore hypothesized that the milking-induced release of OT induces myoepithelial cell contraction, which, in turn, could induce mammary epithelium disruption and stimulate MEC exfoliation through mechanical forces exerted on the mammary epithelium. To investigate the role of myoepithelial cell contraction in MEC exfoliation, we inhibited or induced the contraction of myoepithelial cells at milking by administering the OT receptor antagonist atosiban (**Ato**) or exogenous OT, respectively. Since the MEC exfoliation observed at milking was reported to be concomitant with mammary epithelium disruption, we also investigated tight junction opening in response to these treatments.

## Materials and methods

All procedures applied to animals were approved by the local Ethics Committee on Animal Experimentation of Rennes (France) in compliance with French regulations (Decree No. 2001-464; May 29, 2001).

### Animals and experimental procedures

Eight multiparous Holstein cows (lactation 2 to 5) that were in peak lactation ( $64 \pm 6$  days in milk) at the beginning of the experiment were used in this study. The cows were housed at the INRA experimental farm of Mejusteume (UMR PEGASE, Le Rheu, France). During the entire experimental period, the cows were fed according to the INRA recommendations and milked twice a day at 0700 h and 1700 h. The cows were divided into 2 batches of 4 cows each according to their calving date so that we could study cows at the same stage of lactation. First, after local anesthesia of the skin by s.c. injection of 40 mg of Lidocaine (Vetoquinol, Lure, France), the cows were surgically equipped with permanent catheters (Silclear medical-grade silicone tubing, i.d. 1.02 mm, o.d. 2.16 mm; Degania Silicone, Degania Bet, Israel) inserted into the jugular vein. Catheters were inserted 4 days prior to the beginning of the trial and remained there for the duration of the study. The 4 cows of the first batch were subjected to 2 treatments during two morning milkings one



**Figure 1** : Description of the treatments.



week apart, according to a crossover experimental design of 2 periods: 1) No injection followed by OT injection (= Control+OT treatment) and 2) Ato injection followed by OT injection (= Ato+OT treatment, **Figure 1**). Five weeks later, the 4 cows of the second batch were assigned to these 2 treatments according to the same experimental design. For the Control+OT treatment, cows were first milked to collect the milk as usual (= standard milk). Approximately 3 minutes after the end of this first milking, cows received an i.v. injection of OT (5 IU, Syntocinon®, Medac S.A.S., Lyon, France) in the jugular vein through the catheter. This dose is a supraphysiological dose (Bruckmaier et al., 1994). Three minutes after the OT injection, residual milk was collected through a second milking. For the Ato+OT treatment, cows received an i.v. injection of atosiban (50 µg/kg of body weight, Tractocile®, Ferring, Madrid, Spain) in the jugular vein. Ten minutes after the Ato injection, the cows were milked in order to collect the cisternal milk. Approximately 7 minutes after the end of this first milking, 5 IU of OT was injected in the jugular vein of each cow; 3 minutes after this injection, the alveolar milk was collected through a second milking. These two treatments allowed us to collect 4 different types of milk separately for each cow: standard followed by residual milk during the Control+OT treatment and cisternal followed by alveolar milk during the Ato+OT treatment. The yield of each type of milk collected was recorded. The duration of each milking was also recorded for the two treatments.

### **Milk composition analysis**

A sample of each type of milk (50 mL) was used for the determination of milk fat, protein, and lactose content by mid-infrared spectrometry and somatic cell count (**SCC**) by flow cytometry (Mylab, Châteaugiron, France).

### **Purification of milk mammary epithelial cells**

To determine the concentration, the number and the viability of MEC in each type of milk collected, MEC were purified from fresh milk (1.8 kg each of standard, cisternal and alveolar milk and 0.9 kg of residual milk) using an immunomagnetic method as described by (Herve et al., 2017). The proportion of apoptotic MEC was measured by flow cytometry after staining with the Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR,



USA) according to the manufacturer's instructions and as previously described (Herve et al., 2017).

### **Blood sampling and oxytocin and lactose assays**

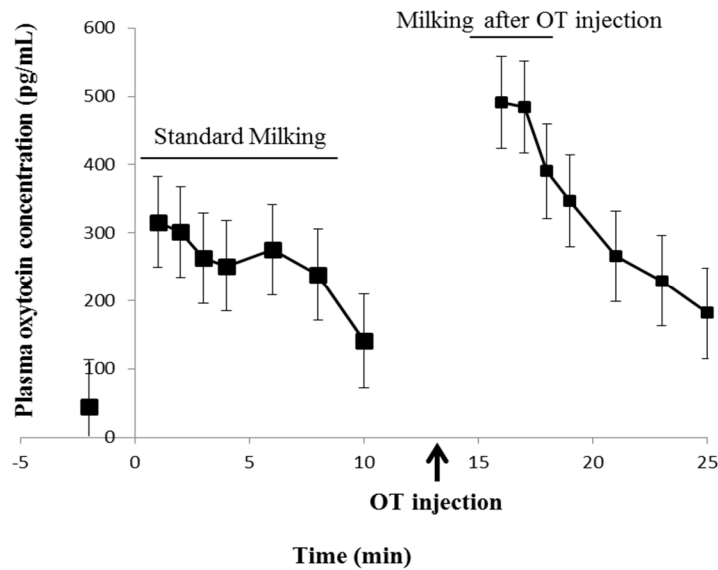
On the days of treatment, blood samples were collected before, during and after milking at -5 -2, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 23, and 25 min relative to the first attachment of the milking-unit. Monovette syringes coated with sodium heparin (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) were used to collect samples for the measurement of plasma OT and lactose concentrations. The plasma was separated by centrifugation at  $2,264 \times g$  for 15 min at 4°C and stored at -20°C until analyses were performed.

Plasma OT concentration was measured using the ELISA method described by (Marnet et al., 1994). The detection limit was 48.5 pg/mL, the intra-assay coefficient of variation was 1.9%, and the inter-assay coefficient of variation was 3.5%. Because of a cross-reaction between Ato and OT, the results of OT assays in plasma samples of Ato-treated cows could not be used. Plasma concentrations of lactose were measured using a multiparameter analyzer (Kone Instrument Corporation, Espoo, Finland) and a kit for the detection of lactose/d-galactose (Roche Diagnostics, Meylan, France).

### **Calculations and statistical analyses**

The number of MEC exfoliated into each type of milk was determined by multiplying the milk MEC concentration measured in each type of milk by the yield of each type of milk. To describe the OT release during standard milking in cows receiving the Control+OT treatment, we calculated the area under the curve (**AUC**) of OT concentration from the beginning of milking to 10 min after the beginning of milking after subtracting the basal concentrations of OT. Milk yield and composition data were analyzed using the general linear model procedures in the Windows statistical software Epsilow (L. Delaby, INRA, UMR PEGASE, St-Gilles, France) according to the following statistical model:

$$Y_{ijkl} = \mu + \text{Cow}_i + \text{Batch}_j + \text{Period}_k + \text{Type of milk}_l + e_{ijkl}$$



**Figure 2** : Plasma oxytocin (OT) concentration in 8 Holstein dairy cows submitted to the Control+OT treatment.

Cows were first milked to collect the standard milk. Then, they received an injection of 5 IU of OT, and the residual milk was collected through a second milking.

Data were analyzed using the Mixed procedure in SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC) with a repeated statement. Time was used as the repeated parameter, and Cow as the subject for repeated measures. The effect of type of milking, and of time (minutes after the milking unit attachment) and the interaction of type of milk x time were tested. The basal concentration of OT was used as a covariate. Data are presented as the means  $\pm$  SEM.

**Table 1** : Yield and composition of the four types of milk collected from 8 Holstein cows assigned to the 2 treatments: 1) Control+Oxytocin (OT) and 2) Atosiban (Ato)+OT.

	Control+OT <sup>1</sup>		Ato+OT <sup>2</sup>		Type of milk	
	Standard	Residual	Cisternal	Alveolar	SEM	P-value
Milk yield (kg)	22.9 <sup>a</sup>	3.0 <sup>b</sup>	5.9 <sup>c</sup>	13.3 <sup>d</sup>	0.69	<0.001
Milk fat content (g/kg)	27.6 <sup>a</sup>	120.3 <sup>b</sup>	9.3 <sup>c</sup>	23.8 <sup>a</sup>	3.78	<0.001
Milk protein content (g/kg)	27.4 <sup>a</sup>	22.5 <sup>b</sup>	28.6 <sup>c</sup>	27.6 <sup>a</sup>	0.25	<0.001
Lactose content (g/kg)	50.9 <sup>a</sup>	44.6 <sup>b</sup>	51.1 <sup>a</sup>	51.2 <sup>a</sup>	0.28	<0.001
Log <sub>10</sub> SCC	4.6 <sup>a</sup>	5.6 <sup>b</sup>	4.7 <sup>a</sup>	4.5 <sup>a</sup>	0.07	<0.001

<sup>a, b, c, d</sup> Within a row, means without a common superscript letter differ ( $P < 0.05$ ).

<sup>1</sup>Cows from the Control+OT treatment were first milked to collect the standard milk. Then, they received an injection of 5 IU of OT, and the residual milk was collected through a second milking.

<sup>2</sup>Cows from the Ato+OT treatment received an injection of Ato (50  $\mu$ g/kg body weight), and 10 minutes after this injection, they were milked to collect the cisternal milk. Then, they received an injection of 5 IU of OT, and the alveolar milk was collected through a second milking.

with Cow, Batch, Period and Type of milk (milking, residual, cisternal or alveolar milk) as fixed effects. The results were expressed as least squares means  $\pm$  SEM.

Plasma OT and lactose concentration data were analyzed using the Mixed procedure in SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC) with a repeated statement using the basal concentration (calculated as the average concentration at 5 and 2 min before the onset of milking) as a covariate. Time was used as the repeated parameter, and Cow as the subject for repeated measures. The effects of type of milk, and of time (minutes after milking-unit attachment) and interaction of type of milk x time were tested. For all variables, differences were considered statistically significant when  $P \leq 0.05$  and a tendency when  $0.05 < P \leq 0.10$ .

## Results

### Plasma OT concentrations in the Control+OT treatment

In the Control+OT treatment, standard milking induced a discharge of endogenous OT, detected as an increase in plasma OT concentration from  $44.3 \pm 68.85$  pg/mL prior to the beginning of milking to  $316.1 \pm 66.77$  pg/mL only 1 min after the attachment of the milking-unit ( $P < 0.001$ , **Figure 2**). The plasma OT concentration then remained stable until the end of milking (which lasted 08:29 minutes) and finally decreased after milking (time point 10 min). The AUC of OT concentration was  $2278 \pm 711$  pg/mL x 10 min.

The injection of 5 IU of OT induced an even greater increase in plasma OT concentration: the plasma OT concentration reached  $491.1 \pm 66.77$  pg/mL 4 min after the injection. The concentration then gradually decreased until the end of milking but did not return to the basal concentration 12 min after the OT injection (time point 25 min;  $P < 0.001$ ).

### Milking duration, milk yield and composition

The volume of milk collected varied greatly among milk types ( $P < 0.001$ , **Table 1**). During the Control+OT treatment, milk yield after the standard milking averaged  $22.9 \pm 0.69$  kg, while the volume of residual milk collected after the OT injection measured only  $3.0 \pm 0.69$  kg, i.e., 8 times less than the standard milk yield. The standard milking lasted an average

**Table 2.** Concentration and viability of mammary epithelial cells (MEC) exfoliated into the milk of 8 Holstein dairy cows assigned to the 2 treatments: 1) Control+Oxytocin (OT) and 2) Atosiban (Ato)+OT.

	Control+OT <sup>1</sup>		Ato+OT <sup>2</sup>		Type of milk	
	Standard	Residual	Cisternal	Alveolar	SEM	P-value
Milk MEC concentration (10 <sup>3</sup> cells/mL)	4.9 <sup>a</sup>	19.3 <sup>b</sup>	6.1 <sup>a</sup>	4.3 <sup>a</sup>	2.80	0.03
Milk MEC number (Log <sub>10</sub> )	8.0 <sup>a</sup>	7.6 <sup>bc</sup>	7.4 <sup>c</sup>	7.7 <sup>b</sup>	0.09	<0.01
MEC among total milk cells (%)	23.4 <sup>a</sup>	3.3 <sup>b</sup>	28.3 <sup>a</sup>	27.8 <sup>a</sup>	2.90	<0.001
Apoptotic MEC (%)	32.6 <sup>a</sup>	20.5 <sup>b</sup>	28.6 <sup>ab</sup>	37.6 <sup>a</sup>	3.10	<0.01

<sup>a, b, c, d</sup> Within a row, means without a common superscript letter differ (P < 0.05).

<sup>1</sup>Cows from the Control+OT treatment were first milked to collect the standard milk. Then, they received an injection of 5 IU of OT, and the residual milk was collected through a second milking.

<sup>2</sup>Cows from the Ato+OT treatment received an injection of Ato (50 µg/kg body weight), and 10 minutes after this injection, they were milked to collect the cisternal milk. Then, they received an injection of 5 IU of OT, and the alveolar milk was collected through a second milking.

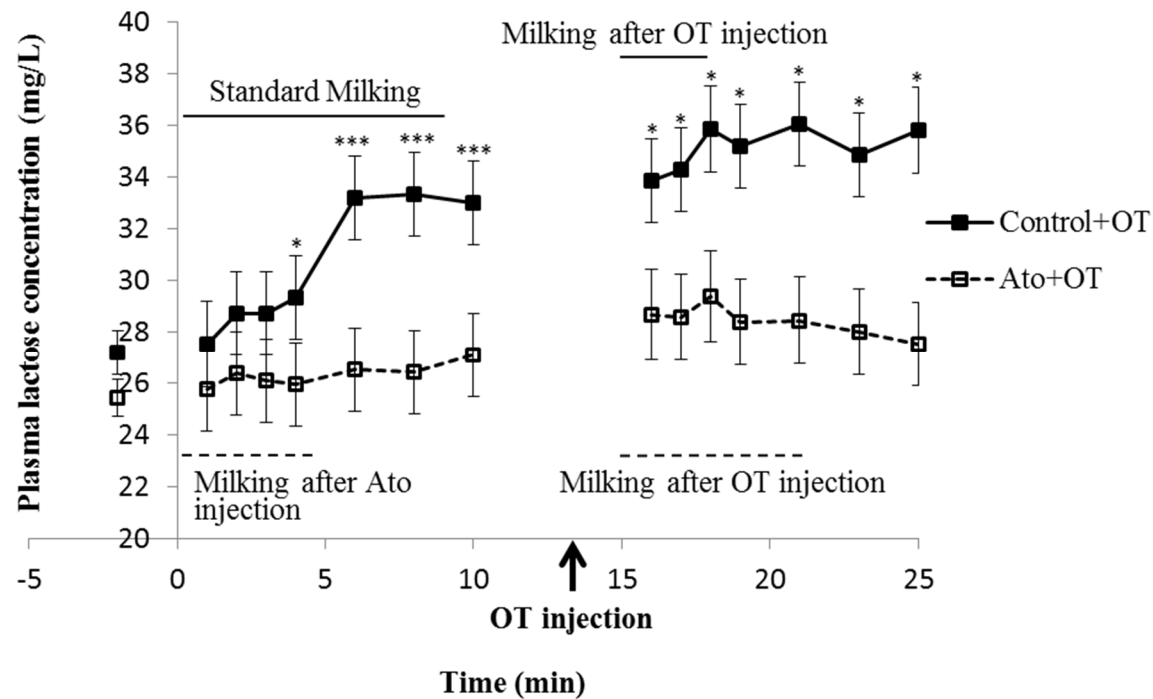
of 08:29 minutes, whereas the milking after OT injection lasted an average of 02:49 minutes. During the Ato+OT treatment, the volumes of the cisternal and alveolar milk were  $5.8 \pm 0.69$  kg and  $13.3 \pm 0.69$  kg, respectively, which represented 26% and 58% of the standard milk yield. The milking after Ato injection lasted an average of 04:01 minutes, whereas the milking after OT injection lasted an average of 05:54 minutes.

The composition of milk also varied greatly according to the type of milk ( $P < 0.001$ , **Table 1**). The cisternal milk had a lower fat content and greater protein content than the other types of milk, while the residual milk had the greatest fat content, the lowest protein content and the lowest lactose content ( $P < 0.001$ ). The concentrations of somatic cells in standard, residual, cisternal, and alveolar milk averaged 40, 398, 50, and  $32 \times 10^3$  cells/mL, respectively, showing that the residual milk also had the greatest SCC ( $P < 0.001$ ).

### Mammary epithelial cell exfoliation

The concentration and number of MEC differed among milk types (**Table 2**). During the Control+OT treatment, the number of MEC exfoliated into the standard milk averaged  $100.0 \times 10^6$  cells. The residual milk (obtained after the OT injection) contained  $39.8 \times 10^6$  MEC but, owing to its small volume, exhibited a 4-fold increase in MEC concentration compared with standard milk ( $P < 0.05$ , **Table 2**). Moreover, the percentage of MEC among total cells in the milk was lower in residual milk ( $P < 0.001$ , **Table 2**). During the Ato+OT treatment, the cisternal milk had a similar concentration of MEC but a lower number of MEC compared with the standard milk ( $25.1$  vs.  $100.0 \times 10^6$  MEC,  $P < 0.01$ ). The number of MEC exfoliated into the cisternal milk represented 28% of the number of MEC exfoliated during standard milking. The number of MEC exfoliated into the alveolar milk after the OT injection was  $50 \times 10^6$  cells, which represented 55% of the number of MEC exfoliated during standard milking.

The percentage of exfoliated MEC that were apoptotic averaged  $32.6 \pm 3.1$  % in standard milk, which did not significantly differ from the percentages in the cisternal and the alveolar milk (**Table 2**). The residual milk contained a lower percentage of apoptotic MEC than the standard or alveolar milk ( $P < 0.01$ ).



**Figure 3.** Lactose concentration in plasma of 8 Holstein dairy cows submitted to the Control+Oxytocin (OT) treatment (■) or the Atosiban (Ato)+OT treatment (□) during 2 consecutive milkings.

Cows from the Control+OT treatment were first milked to collect the standard milk. Then, they received an injection of 5 IU of OT, and the residual milk was collected through a second milking. Cows from the Ato+OT treatment received an injection of Ato (50 µg/kg body weight); 10 minutes after this injection, they were milked to collect the cisternal milk. Then, they received an injection of 5 IU of OT, and the alveolar milk was collected through a second milking.

Data were analyzed using the Mixed procedure in SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC) with a repeated statement. Time was used as the repeated parameter, and Cow as the subject for repeated measures. The effect of type of milking, of time (minutes after the milking unit attachment) and the interaction of type of milk x time effect were tested. The basal concentration of lactose was used as a covariate. Data are presented as the means ± SEM. The treatment effect is indicated by \* for  $P < 0.05$  and \*\*\* for  $P < 0.001$ .



### Concentration of plasma lactose

During the standard milking in the Control+OT treatment, plasma lactose concentration increased between the 4<sup>th</sup> and the 6<sup>th</sup> minute of milking ( $P < 0.001$ ) and remained stable until the end of milking (**Figure 3**). During the first milking in the Ato+OT treatment, plasma lactose concentration did not increase ( $P > 0.10$ ) and was, on average, lower than during the standard milking (26.3 vs. 30.6 mg/L,  $P < 0.001$ , **Figure 3**). In both treatments, the plasma lactose concentrations of the cows were greater during milkings after OT injections than during the first milkings (on average 35.1 vs 30.6 mg/L,  $P < 0.001$ , in the Control+OT treatment and 28.4 vs 26.3 mg/L,  $P < 0.01$ , in the Ato+OT treatment). The concentration of lactose in plasma following the OT injection was greater in the Control+OT treatment than in the Ato+OT treatment ( $P < 0.05$ , **Figure 3**).

### Discussion

Oxytocin, through its well-known effect of inducing myoepithelial cell contraction and therefore milk ejection, is a key hormone in nursing and in regulating milk production. Indeed, poor removal of milk from the mammary gland reduces milk synthesis as a result of local inhibition (Wilde and Knight, 1990). This hormone allows the complete removal of the alveolar milk (Graf, 1969; Bruckmaier, 2005), which is then directly available to the offspring or the milking machine. Administering Ato, an antagonist of OT receptors, inhibited this milk ejection reflex by inhibiting the contraction of the myoepithelial cells in rats (McAnulty and Burns, 2004) and dairy ruminants (Bruckmaier et al., 1997; Bruckmaier and Blum, 1998). In the present study, the Control+OT and the Ato+OT treatments allowed us to collect 4 different types of milk: the standard, the residual, the cisternal and the alveolar milk. The residual milk (i.e., collected following OT injection after the standard milking) was more concentrated in fat than standard milk as previously described (Berning et al., 1987; Sarikaya et al., 2006). This could be a result of the myoepithelial cell contraction induced by OT, which stimulates the secretion of the lipid droplets into the alveolar lumen (Masedunskas et al., 2017) and is also responsible for the active transfer of fat from the alveolar compartment to the cistern. The cisternal milk (i.e., collected without any contraction of the myoepithelial cells after the Ato injection) was similar, in terms of yield (26% of the standard milk yield)



and fat content, to cisternal milk previously described (Davis et al., 1998; Ayadi et al., 2003). Finally, the alveolar milk (i.e., collected after the OT injection in the Ato+OT treatment) had a higher concentration of fat than the cisternal milk and represented a yield 58% as high as the yield of standard milk. In the Ato+OT treatment, the total yield of milk collected (cisternal milk + alveolar milk) was only 84% as high as the yield of milk collected during the standard milking. This could be because at the time of the OT injection, Ato was not completely eliminated from the blood since the half-life of Ato is 18 min (Wellnitz et al., 1999). Thus, even if we used a supraphysiological dose of OT, Ato bound to OT receptors could have limited the binding of the exogenous OT to this same receptor, not allowing 100% recovery of the standard milk yield.

Treatments had an effect on both the number and the proportion of immune cells and MEC in milk. Residual milk presented a higher SCC than the other types of milk, in agreement with previous studies (Ontsouka et al., 2003; Sarikaya et al., 2005). The higher SCC in the residual milk might be explained by an influx of immune cells at the end of the milking, which has already been observed in cows (Paape et al., 2002; Olde Riekerink et al., 2007), or by the fact that somatic cells trapped in the alveolar lumen could be ejected at the end of milking together with fat globules, which have hydrophobic properties (Nielsen et al., 2005). In addition to immune cells, milk somatic cells also comprise MEC. In the present study, the number of MEC exfoliated during a standard milking was consistent with our previous observation (Herve et al., 2017). In the Control+OT treatment, the OT injection dramatically increased the concentration of MEC in the residual milk. As a consequence, the number of MEC exfoliated into 3 kg of residual milk was nearly half the number of MEC exfoliated into 23 kg of standard milk. Therefore, the OT injection induced a massive exfoliation of MEC from the mammary epithelium. This stimulatory effect of OT on the exfoliation of MEC was also observed after the OT injection in the Ato+OT treatment, since the number of MEC exfoliated was greater in the alveolar milk than in the cisternal milk. In contrast, the inhibition of myoepithelial cell contraction by the Ato injection reduced the number of MEC exfoliated into cisternal milk compared with the other three types of milk. It should be noted, however, that during the Ato+OT treatment, the total number of MEC exfoliated represented only 83% of the number of MEC exfoliated during a standard milking. This is likely a result of the binding competition between OT and Ato at the OT receptor. All



these findings suggest that OT participates in regulating the number of MEC exfoliated in milk during milking.

The majority of MEC exfoliated in milk consisted of viable cells, with an average of 33% apoptotic MEC in the standard milk. In comparison, the injection of a supraphysiological dose of OT after the standard milking decreased the percentage of apoptotic cells and thus increased the ratio of viable to apoptotic MEC in the residual milk. This suggests that more viable MEC can be exfoliated as a direct consequence of the intense mechanical forces imposed by the myoepithelial cell contraction caused by the injection of a supraphysiological dose of OT. We have previously investigated MEC exfoliation during milking in dairy cows (Herve et al., 2017). On the basis of our previous results, we suggested that MEC either may be continuously exfoliated between two milkings, trapped in the alveolar lumen and expelled during the ejection of the alveolar milk or may be mainly exfoliated during milking as a consequence of the OT-induced mechanical forces and the disruption of mammary epithelium integrity (Herve et al., 2017). The fact that more MEC and a greater percentage of viable MEC are exfoliated following the OT injection argues in favor of an OT-induced MEC exfoliation at milking and against the hypothesis of an accumulation of MEC in the alveolar milk fraction between milkings. Nevertheless, the number of MEC exfoliated in the cisternal milk (on average 25 million) when OT action was inhibited represented nearly 25% of the number of MEC exfoliated during a standard milking. This presence of MEC in the cisternal milk suggests that in addition to OT-induced MEC exfoliation, MEC might also be exfoliated between successive milkings. The two hypotheses concerning the mechanisms responsible for MEC exfoliation (continuous exfoliation and OT-induced exfoliation) are thus not mutually exclusive.

Variations in the MEC exfoliation rate were previously reported to be linked with mammary epithelium integrity modulation, since higher MEC exfoliation rates have been associated with disruption of the mammary epithelium (Herve et al., 2016). Such a disruption of mammary epithelium integrity due to the opening of tight junctions between MEC is indicated by the leakage of milk components into blood and vice versa. Thus, the presence of lactose in cow plasma is used as an indicator of mammary epithelium disruption (Kuhn and Linzell, 1970; Sorensen et al., 2001; Ben Chedly et al., 2011). In the present study, in accordance with our previous observation (Herve et al., 2017), the standard milking



induced mammary epithelium disruption as indicated by the increase in plasma lactose concentrations during the course of the standard milking. The injection of a supraphysiological dose of OT after the standard milking induced a further increase in the lactose concentration in plasma, indicating even greater disruption of the mammary epithelium integrity. This further disruption of the mammary epithelium could be responsible for the shedding of a greater number of viable MEC from the epithelium into residual milk. The OT injection in the Ato+OT treatment also induced an increase in the plasma lactose concentration, indicating mammary epithelium disruption. This effect is consistent with previous findings reporting that the injection of supraphysiological doses of exogenous OT compromises mammary epithelium integrity (Linzell and Peaker, 1971b; Allen, 1990). In contrast, the Ato injection prevented this mammary epithelium disruption, demonstrating that the milking-induced release of OT is responsible for the mammary epithelium disruption observed during milking. The less leaky tight junctions could have prevented MEC exfoliation, explaining the lower number of MEC exfoliated in the cisternal milk.

To conclude, this study showed that inhibiting myoepithelial cell contraction with an injection of the OT receptor antagonist Ato caused a decrease in the number of exfoliated MEC in milk. In contrast, injections of exogenous OT increased the number of MEC in milk. These results demonstrate that OT-induced myoepithelial cell contraction participated, at least in part, in the exfoliation of MEC into milk during the course of milking. This study also showed that OT is responsible for milking-induced mammary epithelium disruption. This disruption could reinforce the stimulatory effect of OT-induced myoepithelial contraction on the MEC exfoliation process.

### **Declaration of interest**

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research project.





**Funding**

This work was supported by GALA association and INRA through the RUMINFLAME project funding by GISA metaprogram 2012. L. Herve was supported by a PhD scholarship funded by Région Bretagne and Agrocampus-Ouest (Rennes, France).

**Author contributions**

MB, VL and HQ conceived the experimental design; LH, MB and VL executed the study; LH performed the statistical analysis; LH, VL, HQ and MB contributed to interpretations; LH wrote the manuscript and MB, HQ and VL revised the manuscript.

**Acknowledgements**

The authors are very grateful to Jacques Lassalas, Philippe Lambertson, Daniel Chevrel, André Cozien, Jean-Luc Harel, Pierre-Yves Pennober, Jean-Yves Thébault, and Maryvonne Texier from the Physiology team of the INRA experimental farm of Méjusseume (UMR PEGASE, Le Rheu, France) for their helpful assistance in taking care of the cows and in sampling. The authors also thank Nicole Huchet, Morgane Kerboas, Maryline Lemarchand, Colette Mustière, Sabrina Philau, Jacques Portanguen and Sandra Wiart (INRA UMR PEGASE, St-Gilles, France) for their help in analyzing samples. Finally, the authors wish to thank R. Bruckmaier (Vetsuisse Faculty, Bern, Switzerland), who kindly provided atosiban, and Pierre-Guy Marnet (Agrocampus Ouest, Rennes, France) for providing the antibody and the label for OT assays. This study was conducted with the financial support of the GALA association and INRA through the RUMINFLAME project funded by GISA metaprogram 2012.

**REFERENCES**

L'ensemble des références du manuscrit sont disponibles dans la partie « Références bibliographiques ».



# **Chapitre 2**

Rôle du processus d'exfoliation  
dans la détermination du  
nombre de cellules épithéliales  
mammaires dans la glande  
mammaire et influence sur la  
production laitière



## Partie 1 - Effet de l'alimentation

### 1.1. Effet d'une restriction alimentaire et de la nature du fourrage

L'alimentation, aussi bien en termes de composition que de quantité, est l'un des principaux facteurs d'élevage influençant les performances de production des vaches laitières. Cependant, les mécanismes impliqués dans les variations de production laitière en réponse aux changements d'alimentation ne sont pas entièrement élucidés. Dans le cas d'une restriction alimentaire, la diminution de la production laitière semble induite par une diminution du nombre de CEM dans la glande mammaire et/ou de leur activité métabolique. L'effet de la nature du fourrage sur les déterminants de la production laitière et notamment sur le taux d'exfoliation n'a jamais été étudié.

Cette partie se base sur les résultats de l'essai « **Nature du fourrage / Restriction 75 %** » et traite du rôle du processus d'exfoliation dans la régulation du nombre de CEM dans la glande mammaire et de la production laitière en réponse à une restriction alimentaire avec une ration à base de maïs ou d'herbe.

Cette partie se base sur les travaux réalisés par Margaux Veron lors de son stage de fin d'étude de Master de l'Université de Rennes 1 en 2016. Certaines parties de son rapport ont donc été intégrées dans cette partie de la thèse. J'ai co-encadré cette étudiante avec Marion Boutinaud. Cette étude a été effectuée dans le cadre d'un essai mis en place par Elise Vanbergue et Catherine Hurtaud et a fait l'objet d'un poster lors du symposium « Biology Of Lactation of Farm Animals : The Biology of Lactation - From Genes to Cells to Milk », ayant eu lieu lors du congrès annuel de l'ASAS-CSAS (American Society of Animal Science-Canadian Society of Animal Science, **Annexe 10**).



## RÉSUMÉ

Chez la vache laitière, la restriction alimentaire diminue la production laitière. Cette diminution pourrait être due à une diminution du nombre de cellules épithéliales mammaires (CEM) dans la glande mammaire, elle-même pouvant être la conséquence d'une augmentation du taux d'exfoliation dans le lait. L'effet de la nature du fourrage sur le taux d'exfoliation n'a jamais été étudié. Pour étudier l'effet de la nature du fourrage dans la ration et de la restriction alimentaire sur le taux d'exfoliation des CEM dans le lait, 16 vaches laitières ont été soit nourries *ad libitum* soit restreintes à 75 % de leur ingestion *ad libitum* et ont reçu une ration à base de maïs ou à base d'herbe selon un schéma en inversion de 2 périodes de 3 semaines chacune. Des échantillons de lait ont été récoltés 15 jours après le début de chaque période afin de purifier les CEM exfoliées dans le lait et d'estimer leur taux d'exfoliation. La restriction alimentaire a entraîné une diminution de la production laitière de 11 % sans avoir d'effet sur le taux d'exfoliation des CEM dans le lait. La nature du fourrage dans la ration n'a, quant à elle, pas eu d'effet sur la production laitière mais a entraîné une variation du taux d'exfoliation des CEM dans le lait, celui-ci étant plus élevé chez les vaches nourries avec la ration à base de maïs.





## INTRODUCTION

L'alimentation est un facteur d'élevage majeur pouvant avoir un impact sur la quantité de lait produit et sur sa composition (Chilliard et al., 2001; Nørgaard et al., 2005). Bien que la nature du fourrage dans la ration engendre des variations de production laitière (Khan et al., 2015), l'effet de la nature du fourrage sur les déterminants de la production laitière et notamment sur le nombre de CEM dans la glande mammaire n'a à notre connaissance jamais été étudié. Par ailleurs, il est connu chez les ruminants laitiers que la restriction alimentaire engendre une diminution de la production laitière (Andersen et al., 2004; Colitti et al., 2005; Radcliff et al., 2006; Boutinaud et al., 2008; Gross et al., 2011) et une modification de la composition du lait, à savoir une diminution du TP et de la concentration en lactose (Boutinaud et al., 2008; Burke et al., 2010; Dessauge et al., 2011; Gross et al., 2011). Chez la brebis, la diminution de la production laitière est notamment due à une diminution du nombre de CEM dans la glande mammaire engendrée par une stimulation de la mort cellulaire (Colitti et al., 2005). Chez la vache laitière, la restriction alimentaire engendre aussi une diminution du nombre de CEM dans la glande mammaire, comme indiqué par une diminution de 38 % du poids des glandes mammaires et de 20 % de la quantité totale d'ADN dans le tissu mammaire ainsi que par des alvéoles mammaires plus petites (Dessauge et al., 2011). Cette diminution du nombre de CEM dans la glande mammaire est due à un taux de cellules apoptotiques plus élevé chez des vaches soumises à une restriction alimentaire comparativement à des vaches nourries avec une ration standard (Dessauge et al., 2011). Nous avons fait l'hypothèse que les variations de production laitière en réponse à la restriction alimentaire et la nature du fourrage pourraient aussi en partie être dues à des variations du taux d'exfoliation des CEM dans le lait. L'objectif de cette étude est donc d'étudier d'une part l'effet de la nature du fourrage (ensilage de maïs vs. herbe conservée) et d'autre part l'effet de la restriction alimentaire (alimentation à hauteur de 100 % vs. 75 % de la matière sèche ingérée (**MSI**) *ad libitum* par l'animal) sur le processus d'exfoliation des CEM.

**Tableau 1** : Description des rations « Maïs 100 % » et « Herbe 100 % ».

La composition des rations « Maïs 75 % » et « Herbe 75 % » est identique, la seule différence étant que ces rations ne couvrent que 75 % de la matière sèche ingérée *ad libitum* par l'animal.

<b>Ration Maïs 100 %</b>		<b>Ration Herbe 100 %</b>	
(% de matière sèche de la ration totale)		(% de matière sèche de la ration totale)	
Ensilage maïs	64,7	Herbe déshydratée	40
Concentré énergétique	13,5	Enrubannage Herbe	35
Tourteau de soja	10,5	Concentré Energétique	15
Luzerne Déshydratée	10	Tourteau de soja	10
CMV <sup>1</sup>	1	CMV <sup>1</sup>	1
Sulfate	0,3	Sulfate	0,3
Carbonate de calcium	0,8	Carbonate de calcium	1

<sup>1</sup> Complément minéral vitaminé

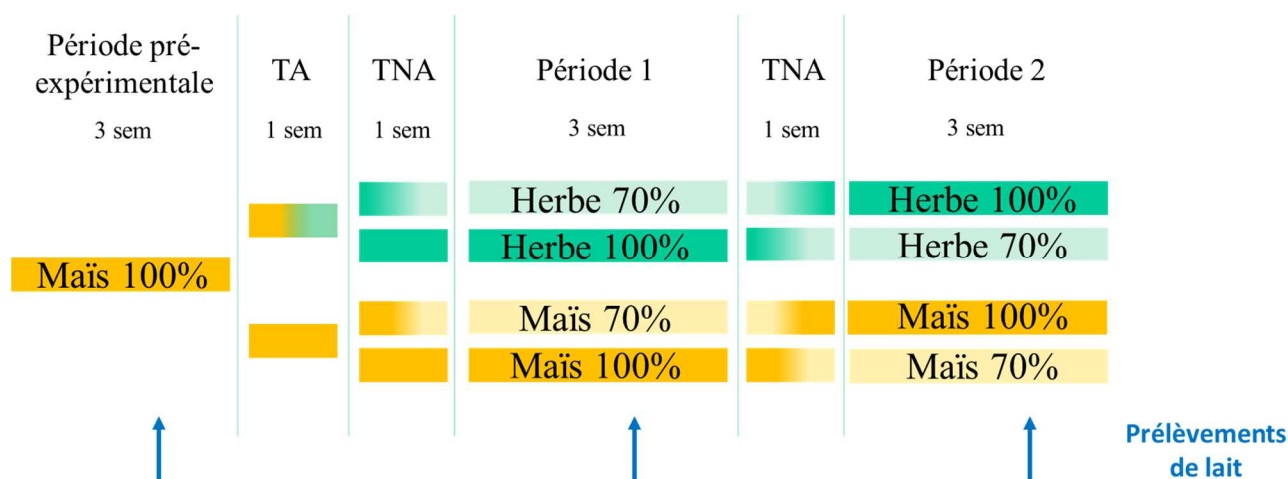
## MATERIEL ET METHODES

### *Animaux et schéma expérimental*

Seize vaches laitières Prim'Holstein multipares ( $2,8 \pm 0,20$  lactations), en milieu de lactation ( $99 \pm 4,6$  jours de lactation) produisant  $37 \pm 6,5$  kg de lait/jour ont été utilisées pour cet essai. L'essai a été mené à la ferme expérimentale INRA de Méjusseume (IEPL, UMR PEGASE, Le Rheu, France).

Les vaches ont été divisés en deux lots homogènes selon la nature du fourrage qu'elles ont reçu dans leur ration : ensilage de maïs ou herbe conservée (herbe déshydratée et enrubannage d'herbe). Chaque lot a été subdivisé en deux sous-lots selon le niveau d'alimentation apporté aux vaches : Maïs 100 % ou Maïs 75 % ; Herbe 100 % ou Herbe 75 %. Les rations Maïs 100 % et Herbe 100 % couvrent 100 % de la MSI *ad libitum* par l'animal alors que les rations Maïs 75 % et Herbe 75 % correspondent à une restriction alimentaire car elles ne couvrent que 75 % de la MSI *ad libitum* par l'animal. La composition des différentes rations est présentée dans le **tableau 1**.

Avant le début de l'essai, les vaches ont été nourries *ad libitum* avec une ration à base d'ensilage de maïs lors d'une phase pré-expérimentale de 3 semaines. Suite à la phase pré-expérimentale, l'essai a été mené selon un schéma en inversion de 2 périodes de 3 semaines chacune, précédées par une semaine de transition alimentaire pour passer d'une alimentation à base de maïs à une alimentation à base d'herbe et/ou une semaine de transition du niveau d'alimentation pour passer d'une alimentation couvrant 100 % de la MSI *ad libitum* à la restriction alimentaire (**Figure 1**). Après ces deux semaines de transition, les vaches sont entrées dans la première période expérimentale, lors de laquelle elles ont reçu les rations Maïs 100 % ou Maïs 75 %, Herbe 100 % ou Herbe 75 %, selon le lot auquel elles appartiennent. Suite à cette première période et une semaine de transition du niveau d'alimentation, ces niveaux ont été inversés : les vaches ayant reçu les rations Maïs 100 % et Herbe 100 % lors de la première période ont respectivement reçu les rations Maïs 75 % et Herbe 75 % lors de la deuxième période et inversement, pour les vaches ayant reçu les rations Maïs 75 % et Herbe 75 % (**Figure 1**). Les vaches ont été nourries individuellement vers 8 h et 18 h. Les quantités ingérées par chaque vache ont été mesurées quotidiennement. Les vaches ont été traitées deux fois par jour à 6h30 et 16h30. A fin de la période pré-expérimentale et 15 jours après le début de chaque période expérimentale, la



**Figure 1** : Schéma expérimental de l'essai « Nature du fourrage / Restriction 75 % ».

Seize vaches laitières ont été réparties en quatre lots homogènes suivant la nature du fourrage dans la ration (Maïs vs. Herbe) et le niveau d'alimentation (100 % vs. 75 % de la matière sèche ingérée *ad libitum*). La période pré-expérimentale de 3 semaines est suivie d'une semaine de transition alimentaire (TA) pour les vaches destinées à recevoir de l'herbe conservée et d'une deuxième semaine de transition du niveau d'alimentation (TNA) pour les animaux soumis à une restriction alimentaire. Lors de la première période d'expérimentation (Période 1), les vaches ont reçu l'un des 4 types de ration. A la fin de cette première période et après une semaine de transition du niveau d'alimentation, ces niveaux ont été inversés lors de la seconde période d'expérimentation (Période 2). Des prélèvements de lait ont été réalisés à la fin de la période pré-expérimentale et 15 jours après le début de chaque période expérimentale pour la purification des cellules épithéliales mammaires du lait et l'estimation du taux d'exfoliation.

production laitière a été mesurée et des échantillons de lait (50 mL) ont été prélevés pour l'analyse du TB, du TP et du lactose dans le lait par méthode infrarouge (Milkoscan, Foss Electric, Danemark), l'analyse du comptage des cellules somatiques (**CCS**) par cytométrie de flux (ANALIS, Saint-Berthevin, France) et le dosage de la concentration en  $\alpha$ -lactalbumine par immunodiffusion radiale grâce à un kit spécifique (IDBiotech, Issoire, France).

### ***Indicateurs de l'intégrité de l'épithélium***

Les échantillons de lait ont été utilisés pour le dosage de différents indicateurs de l'intégrité de l'épithélium mammaire. Tout d'abord, la Matière Azotée Totale (**MAT**), l'azote non protéique (**NPN**) et l'azote non caséinique (**NCN**) ont été analysés par la méthode de Kjeldahl afin de mesurer le ratio caséines/protéines solubles. Puis, la concentration en albumine dans le lait a été dosée par immunodiffusion radiale à l'aide d'un kit spécifique (IDBiotech, Issoire, France) comme décrit précédemment (Yart et al., 2013). Enfin, les concentrations en  $\text{Na}^+$  et en  $\text{K}^+$  ont été dosées par spectrométrie d'absorption atomique de flamme comme décrit par Murthy et Rhea (1967) afin de calculer le ratio  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  dans le lait.

### ***Purification des cellules épithéliales mammaires***

Des échantillons de lait (1,8 kg) ont été collectés à la fin de la phase pré-expérimentale et 15 jours après le début de chaque période expérimentale afin de déterminer la concentration, le nombre et la viabilité des CEM exfoliées dans le lait. Les CEM ont été purifiées par la méthode d'immunoséparation magnétique comme décrit par Herve et al. (2017). Le comptage cellulaire et l'analyse de la viabilité cellulaire ont été réalisés par la méthode de l'exclusion du bleu de trypan à l'aide de compteur automatique de cellules (Vicell XR analyzer, Beckman Coulter, Roissy, France). La proportion de CEM apoptotiques dans le lait a été mesurée par cytométrie de flux après marquage des CEM à l'aide du kit Annexin V/Dead Cell Apoptosis (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA) selon les instructions du fabricant et comme décrit précédemment par Herve et al. (2017).

**Tableau 2** : Effet du niveau d'alimentation et de la nature du fourrage dans la ration sur la production laitière et la composition du lait.

	Mais		Herbe		SEM	P-value		
	100%	75%	100%	75%		Fourrage	NAlim <sup>1</sup>	Fourrage x NAlim
Production laitière (kg/j)	33,7 <sup>a</sup>	28,8 <sup>b</sup>	29,8 <sup>ab</sup>	28,0 <sup>b</sup>	1,40	0,19	< 0,05	0,23
Taux butyreux (g/kg)	33,1 <sup>a</sup>	35,7 <sup>a</sup>	42,7 <sup>b</sup>	36,4 <sup>ab</sup>	2,08	< 0,05	0,39	0,05
Taux protéique (g/kg)	29,2 <sup>a</sup>	28,7 <sup>a</sup>	33,7 <sup>b</sup>	28,0 <sup>a</sup>	1,42	0,25	< 0,05	0,07
Quantité de matière grasse (g/j)	1100,7 <sup>ab</sup>	1012,1 <sup>a</sup>	1230,6 <sup>b</sup>	1023,5 <sup>a</sup>	45,66	0,21	< 0,01	0,15
Quantité de matières protéiques (g/j)	996,2 <sup>a</sup>	840,8 <sup>b</sup>	959,2 <sup>a</sup>	769,8 <sup>b</sup>	32,39	0,18	< 0,001	0,55
Quantité de lactose (g/j)	1638,8 <sup>a</sup>	1410,9 <sup>b</sup>	1614,3 <sup>a</sup>	1338,9 <sup>b</sup>	53,17	0,51	< 0,001	0,55
Quantité d'α-lactalbumine (g/j)	38,4 <sup>a</sup>	28,4 <sup>cb</sup>	32,9 <sup>ac</sup>	27,6 <sup>b</sup>	2,53	0,36	< 0,001	0,17
Quantité de caséines (g/j)	735,7 <sup>a</sup>	612,4 <sup>b</sup>	794,2 <sup>a</sup>	635,5 <sup>b</sup>	32,02	0,35	< 0,001	0,33
Quantité de protéines solubles (g/j)	171,8 <sup>a</sup>	144,9 <sup>cb</sup>	168,1 <sup>ac</sup>	138,5 <sup>b</sup>	7,61	0,61	< 0,001	0,80
CCS (Log <sub>10</sub> )	4,8	4,8	4,8	4,8	0,12	0,83	0,65	0,61

<sup>1</sup> Niveau d'alimentation

### **Analyses statistiques**

Le CCS et le nombre de CEM exfoliées dans le lait ne suivant pas une loi normale, les données ont été transformées en logarithme (base 10) avant l'analyse statistique. Les données ont été analysées par analyse de variance en utilisant la procédure MIXED de SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) selon le modèle statistique suivant :

$$Y_{ijklm} = \mu + \text{Vache}(\text{fourrage}_k)_i + \text{période}_j + \text{fourrage}_k + \text{niveau d'alimentation}_l + \text{fourrage}_k * \text{niveau d'alimentation}_l + \varepsilon_{ijklm} + \text{covariable}_m$$

Avec  $Y_{ijklm}$  comme la variable à étudier dépendante de la Vache  $i$  hiérarchisée au fourrage  $k$ , pendant la période  $j$  recevant la ration avec le fourrage  $k$  et le niveau énergétique de la ration  $l$  avec  $\varepsilon_{ijklm}$  l'erreur résiduelle associée à chaque observation  $ijklm$ . La vache hiérarchisée au fourrage a été considérée comme effet aléatoire, et la période, le fourrage, le niveau d'alimentation ont été considérés comme effets fixes dans ce modèle. Dans ce modèle, la covariable correspond aux données issues de la phase pré-expérimentale. Les données présentées correspondent aux moyennes ajustées des effets des traitements  $\pm$  les erreurs standard à la moyenne (**SEM**). Les différences sont considérées comme significatives lorsque  $P \leq 0,05$  et comme une tendance lorsque  $0,05 < P \leq 0,10$ .

## **RESULTATS**

### ***Production laitière et composition du lait***

Après 15 jours, la restriction alimentaire a engendré une diminution de la production laitière de 11 % ( $P < 0,05$  ; **Tableau 2**) et une modification de la composition du lait puisque le TP des vaches restreintes était moins élevé de 3,1 g/kg de lait comparativement aux vaches témoins ( $P < 0,05$  ; **Tableau 2**). Par conséquent, la quantité de matières protéiques totales produite par jour a également diminuée de 17,7 % ( $P < 0,001$ ) lorsque les vaches ont été soumises à la restriction alimentaire (**Tableau 2**). Cette diminution de la quantité de matières protéiques produite par jour a été associée à une diminution de 18,4 % de la quantité de caséines produite par jour ( $P < 0,001$  ; **Tableau 2**) et à une diminution de 16,7 % de la quantité de protéines solubles du lait ( $P < 0,001$  ; **Tableau 2**). La restriction alimentaire a également engendré une diminution de la quantité d' $\alpha$ -lactalbumine dans le lait (- 21,5 % ;  $P < 0,001$  ; **Tableau 2**). Malgré une absence de variation du TB avec la restriction alimentaire,

**Tableau 3 :** Effet du niveau d'alimentation et de la nature du fourrage dans la ration sur le taux d'exfoliation des cellules épithéliales mammaires (CEM), la viabilité et le pourcentage de CEM apoptotiques dans le lait.

	Mais		Herbe		SEM	P-value		
	100%	75%	100%	75%		Fourrage	NAlim <sup>1</sup>	Fourrage x NAlim
Taux d'exfoliation des CEM (Log <sub>10</sub> )	8,1 <sup>a</sup>	7,8 <sup>ac</sup>	7,4 <sup>ac</sup>	7,3 <sup>bc</sup>	0,22	< 0,05	0,45	0,65
CEM viables exfoliées (%)	64,6 <sup>a</sup>	58,8 <sup>ab</sup>	58,3 <sup>ab</sup>	46,2 <sup>b</sup>	4,05	0,09	< 0,05	0,42
CEM apoptotiques (%)	22,0 <sup>a</sup>	24,9 <sup>a</sup>	37,1 <sup>b</sup>	29,0 <sup>a</sup>	3,07	< 0,05	0,28	< 0,05

<sup>1</sup> Niveau d'alimentation

**Tableau 4 :** Effet du niveau d'alimentation et de la nature du fourrage dans la ration sur les indicateurs de l'intégrité de l'épithélium.

	Mais		Herbe		SEM	P-value		
	100%	75%	100%	75%		Fourrage	NAlim <sup>1</sup>	Fourrage x NAlim
Ratio Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup>	0,215 <sup>a</sup>	0,223 <sup>b</sup>	0,212 <sup>a</sup>	0,221 <sup>b</sup>	0,01	0,97	0,02	0,75
Ratio Caséines/Protéines solubles	4,4	4,3	4,7	4,6	0,21	0,22	0,12	0,96

<sup>1</sup> Niveau d'alimentation



la quantité de matières grasses produite par jour a diminué de 12,7 % ( $P < 0,01$  ; **Tableau 2**). La restriction alimentaire a aussi entraîné une diminution de la quantité de lactose dans le lait de 15,5 % ( $P < 0,001$  ; **Tableau 2**).

La nature du fourrage n'a pas eu d'effet ni sur la production laitière, ni sur la quantité de matières grasses, de matières protéiques et de lactose dans le lait. Cependant, lorsque les vaches étaient nourries *ad libitum*, le TB était plus élevé avec une ration à base d'herbe comparé à une ration à base de Maïs (**Tableau 2**).

### **Cellules somatiques dans le lait**

La restriction alimentaire n'a pas eu d'effet sur le CCS et sur le taux d'exfoliation. Cependant, la restriction alimentaire a entraîné une diminution de 14,6 % du pourcentage de CEM viables exfoliées dans le lait ( $P < 0,05$  ; **Tableau 3**).

La nature du fourrage a eu un effet sur le taux d'exfoliation des CEM puisque les vaches nourries avec une ration à base d'herbe ont présenté un taux d'exfoliation des CEM moins élevé que les vaches nourries avec une ration à base de maïs ( $P < 0,05$  ; **Tableau 3**). La nature du fourrage a eu tendance à avoir un effet sur le pourcentage de CEM viables exfoliées dans le lait, qui était moins élevé chez les vaches nourries avec une ration à base d'herbe comparativement à une ration à base de Maïs (- 15,3 % ;  $P = 0,09$  ; **Tableau 3**). Un effet de la nature du fourrage a été observé sur le pourcentage de CEM en apoptose ( $P < 0,05$  ; **Tableau 3**). Cependant, l'interaction du fourrage et de l'énergie a été significative ( $P < 0,05$ ), et l'effet de la nature du fourrage sur le pourcentage de CEM en apoptose a été observé seulement lorsque les vaches ont été nourries à hauteur de 100 % mais pas à hauteur de 75 % de la MSI *ad libitum*. En effet, à 100 %, le pourcentage de CEM en apoptose était de 37,1 % contre 22,0 % pour le fourrage herbe et Maïs, respectivement ( $P < 0,05$ ).

### **Indicateurs de l'intégrité de l'épithélium**

La restriction alimentaire a induit une augmentation de 4,8 % du ratio  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ( $P = 0,02$  ; **Tableau 4**). Cependant le ratio caséines/protéines solubles n'a pas varié significativement avec la restriction alimentaire ( $P = 0,12$ ).



La nature du fourrage n'a eu d'effet ni sur le ratio  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ni sur le ratio caséines/protéines solubles (**Tableau 4**).

## DISCUSSION

### 1. Effet de la restriction alimentaire

Il est bien connu chez la vache laitière qu'une restriction alimentaire provoque une diminution de la production laitière (Andersen et al., 2004; Colitti et al., 2005; Radcliff et al., 2006; Boutinaud et al., 2008; Gross et al., 2011). Dans cette étude, nous avons une nouvelle fois observé cette diminution de la production laitière en réponse à la restriction alimentaire. Cependant, cette diminution de la production laitière ne peut pas être expliquée par une augmentation du taux d'exfoliation. En effet, les 15 jours de restriction alimentaire n'ont pas eu d'effet sur le taux d'exfoliation des CEM dans le lait. Cette absence d'effet a déjà été observée lorsque des vaches ont été restreintes pendant 14 jours (vaches nourries avec une ration couvrant 70 % de leurs besoins, Herve et al., 2016). Il est possible que la régulation du nombre de CEM dans la glande mammaire par le processus d'exfoliation ait lieu dans les premiers jours suivants le début de la restriction alimentaire et qu'après 15 jours la restriction alimentaire n'ait plus d'effet sur le taux d'exfoliation. Néanmoins, il est aussi possible que 15 jours de restriction alimentaire ne sont peut-être pas suffisants pour engendrer une augmentation du taux d'exfoliation. L'effet de la durée de la restriction alimentaire (à plus court et à plus long terme) sur le taux d'exfoliation reste donc à étudier. Les 15 jours de restriction alimentaire ont néanmoins entraîné une diminution du pourcentage de viabilité des CEM exfoliées dans le lait. Cette diminution du pourcentage de CEM viables exfoliées a été accompagnée d'aucune variation du pourcentage de CEM apoptotiques exfoliées dans le lait. La diminution du pourcentage de CEM viables exfoliées pourrait alors être expliquée par une augmentation du pourcentage de CEM nécrotiques exfoliées dans le lait puisque la nécrose est un autre type de mort cellulaire. Effectivement, dans cette étude, la restriction alimentaire a eu tendance à augmenter le pourcentage de CEM nécrotiques exfoliées dans le lait (données non montrées,  $P = 0,07$ ). Ce résultat préliminaire est intéressant puisque la nécrose n'a jamais été mise en évidence comme mécanisme régulant le nombre de CEM dans la glande mammaire.



Il a été montré à plusieurs reprises que les variations du taux d'exfoliation étaient concomitantes à des variations de l'intégrité de l'épithélium mammaire (Herve et al., 2016). Dans notre étude, la restriction alimentaire a induit une perte de l'intégrité de l'épithélium mammaire comme indiqué par une augmentation significative du ratio  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  et une diminution du ratio caséines/protéines solubles dans le lait se rapprochant de la tendance. Cependant, cette perte d'intégrité de l'épithélium mammaire n'était pas associée à une augmentation du taux d'exfoliation mais a seulement été associée à une diminution de la viabilité des CEM exfoliées.

## 2. Effet de la nature du fourrage

Dans cette étude, la nature du fourrage dans la ration n'a pas eu d'effet sur la production laitière. En revanche, le taux d'exfoliation des CEM a été affecté par la nature du fourrage ; il a été plus élevé chez les vaches nourries avec la ration à base de maïs que chez les vaches nourries avec une ration à base d'herbe. De plus, le pourcentage de CEM viables exfoliées dans le lait des vaches nourries avec une ration à base de maïs était aussi plus élevé. Etant donné que la nature du fourrage n'a pas entraîné de variation significative de la production laitière, ces résultats peuvent suggérer un renouvellement cellulaire plus important pouvant résulter d'un taux de prolifération plus élevé chez les vaches nourries avec une ration à base de maïs que chez les vaches nourries avec une ration à base d'herbe. La moindre exfoliation de CEM avec une alimentation à base d'herbe pourrait résulter d'un effet bénéfique des antioxydants présents dans l'herbe permettant de limiter les dommages sur le tissu mammaire causés par le stress oxydatif et ainsi maintenir le nombre de CEM dans la glande mammaire.

Une nouvelle fois, nous n'avons pas retrouvé le lien entre le processus d'exfoliation et l'intégrité de l'épithélium mammaire puisque l'augmentation du taux d'exfoliation chez les vaches nourries avec une ration à base de maïs n'était pas accompagnée d'une perte d'intégrité de l'épithélium mammaire comme indiqué par l'absence de variation des indicateurs de l'intégrité de l'épithélium (ratio  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  et ratio caséines/protéines solubles dans le lait).



## CONCLUSION

Les résultats de cette étude montrent que la nature du fourrage et le niveau énergétique de la ration ont des effets bien distincts sur le processus d'exfoliation chez la vache laitière. Une restriction alimentaire de 15 jours n'a pas d'effet sur le taux d'exfoliation des CEM malgré une perte de l'intégrité de l'épithélium mammaire. Au contraire, la nature du fourrage dans la ration a un effet sur le taux d'exfoliation. Les vaches nourries avec une ration à base de maïs ont un taux d'exfoliation plus élevé que celles nourries avec une ration à base d'herbe, augmentation qui n'est pas accompagnée d'une perte d'intégrité de l'épithélium mammaire.

## REMERCIEMENTS

Merci à Elise Vanbergue et Catherine Hurtaud de nous avoir permis de participer à leur essai. Merci à J Lassalas et D. Sidaner pour le suivi de l'essai ainsi qu'à tout le personnel de la ferme expérimentale de Méjusseume (INRA, Le Rheu, France) pour la conduite des animaux et l'aide au moment des prélèvements : G. Bouillet, A. Cozien, J-B. Eon, A. Eveno, M. Fargetton, M. Guilloux, G. Mandrile, A. Mottin, J. Orinel, J. Parois, F. Pichot, P. Pichot, M. Texier, G. Théaud. Merci à N. Huchet, M. Kerboas et S. Philau de l'UMR PEGASE (Saint-Gilles, France) et à N. Torrent pour l'aide dans l'analyse des échantillons ainsi qu'à L. Delaby (UMR PEGASE, Saint-Gilles, France) pour l'aide dans l'analyse statistique des données. Cet essai a été réalisé grâce au soutien financier du Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière (CNIEL).

## REFERENCES

L'ensemble des références du manuscrit sont disponibles dans la partie « Références bibliographiques ».





## Partie 1 - Effet de l'alimentation

### 1.2. Effet d'une restriction alimentaire

Chez la vache laitière, la restriction alimentaire engendre une diminution de la production laitière. Des effets contrastés concernant les mécanismes impliqués dans cette diminution de production laitière ont été reportés. La baisse de production laitière a été attribuée à une diminution de l'activité métabolique des CEM associée ou non à une modification de l'équilibre entre la prolifération et la mort cellulaire, cet équilibre étant modifié par une diminution du taux de prolifération ou une augmentation du taux d'apoptose.

Cette partie se basant sur les résultats de l'essai « **Restriction 80 %** » a pour objectif de comprendre les mécanismes sous-jacents à la diminution de la production laitière en réponse à une restriction alimentaire. Pour cela, les déterminants de la production laitière, à savoir le nombre de CEM dans la glande mammaire et l'activité métabolique de ces cellules sont étudiés. Une attention particulière est donnée au rôle de l'exfoliation. Les effets rémanents de la restriction alimentaire sur la production laitière et le taux d'exfoliation sont aussi étudiés. Enfin, un suivi de l'intégrité de l'épithélium est réalisé afin d'étudier le lien entre intégrité de l'épithélium et exfoliation des CEM.

Ces travaux ont fait l'objet d'un article scientifique qui sera soumis dans Journal of Dairy Science et d'une communication orale lors du congrès annuel de l'ASAS-CSAS (**Annexe 11**).



## RÉSUMÉ

Chez la vache laitière, la restriction alimentaire engendre une diminution de la production laitière. Cette diminution de la production laitière résulte d'une diminution du nombre de cellules épithéliales mammaires (CEM) dans la glande mammaire due à une modification de l'équilibre entre la prolifération cellulaire et l'apoptose et/ou à une diminution de l'activité métabolique de ces cellules. Le processus d'exfoliation des CEM dans le lait est un autre mécanisme pouvant participer à la régulation du nombre de CEM pendant une restriction alimentaire. L'objectif de cet essai était de clarifier les mécanismes sous-jacents à la diminution de la production laitière en réponse à une restriction alimentaire. Dix-neuf vaches laitières Prim'Holstein à  $77 \pm 5$  jours de lactation et produisant  $40 \pm 0.7$  kg de lait/jour ont été réparties dans un groupe témoin ( $n=9$ ) et un groupe restreint ( $n=10$ ). La matière sèche ingérée (MSI) par chaque vache nourrie *ad libitum* a été mesurée pendant une période pré-expérimentale de 2 semaines. Pendant les 29 jours suivants (Période 1), les vaches ont été nourries à hauteur de 100 % ou de 80 % de leur MSI ingérée *ad libitum* pendant la période pré-expérimentale. Puis, pendant les 35 jours suivants (Période 2), toutes les vaches ont été nourries *ad libitum*. La MSI et la production laitière de chaque vache ont été mesurées quotidiennement. Des échantillons de sang ont été collectés à la fin de la période pré-expérimentale, aux jours 5, 9 et 27 de la période 1 et aux jours 5, 9 et 30 de la période 2. Afin de déterminer le taux d'exfoliation, les CEM du lait ont été purifiées par une méthode d'immuno-séparation magnétique. La lipomobilisation a été évaluée par dosage de la concentration plasmatique en acides gras non estérifiés. L'intégrité de l'épithélium mammaire a été évaluée par dosage de la concentration plasmatique de lactose, la concentration en  $\text{Na}^+$  et le ratio  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  dans le lait. Des échantillons de tissu mammaire ont été collectés par biopsie à la fin de chaque période pour l'analyse des taux de prolifération et d'apoptose ainsi que l'analyse de l'expression de gènes. La restriction alimentaire a engendré une augmentation de la concentration plasmatique en acides gras non estérifiés et une diminution de la production laitière de 3 kg de lait/jour mais n'a pas eu d'effet sur les taux de prolifération et d'apoptose dans le tissu mammaire ou sur l'expression des gènes impliqués dans la synthèse des constituants du lait. Le taux d'exfoliation était plus élevé de 65 % chez les vaches restreintes que chez les vaches témoins. La restriction alimentaire n'a pas eu d'effet sur la concentration en lactose plasmatique et le ratio  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , mais a



engendré une augmentation de la concentration en Na<sup>+</sup> dans le lait, ne nous permettant pas de conclure concernant l'intégrité de l'épithélium mammaire. Lorsque les vaches ont été réalimentées *ad libitum*, aucune différence de production laitière, du taux d'exfoliation, et de l'intégrité de l'épithélium n'a été observée entre les vaches restreintes et les vaches témoins. Cependant, le pic de prolactine à la traite a été plus élevé chez les vaches réalimentées *ad libitum* que chez les vaches témoins. Ces résultats montrent que le processus d'exfoliation pourrait jouer un rôle dans la régulation du nombre de CEM dans la glande mammaire de vache laitière lors d'une restriction alimentaire sans effet rémanent sur leur production future.



**Interpretive Summary:**

**Milk yield loss is associated with mammary epithelial cell exfoliation in response to feed-restriction in dairy cows** by Herve et al., In dairy cows, feed restriction is known to decrease milk yield by decreasing the number of mammary epithelial cells (MEC) in the udder or the metabolic activity of these cells. The MEC exfoliation process could also be implicated in the milk yield loss during feed restriction. This study aimed to clarify the underlying mechanisms of the milk yield loss induced by feed restriction. In this study, feed restriction had no effect on MEC proliferation/apoptosis balance and the metabolic activity of MEC but the milk yield loss was observed together with a higher MEC exfoliation rate.

**MAMMARY CELL NUMBER DURING FEED RESTRICTION**

**Milk yield loss is associated with mammary epithelial cell exfoliation in response to feed-restriction in dairy cows**

**L. Herve\***, **H. Quesnel\***, **M. Veron\***, **R. M. Bruckmaier†**, **M. Boutinaud\*<sup>1</sup>**

\*PEGASE, Agrocampus Ouest, INRA, 35590 Saint-Gilles, France

†Veterinary Physiology, Vetsuisse Faculty, University of Bern, Switzerland

Corresponding author: [Marion.Boutinaud@inra.fr](mailto:Marion.Boutinaud@inra.fr)





**ABSTRACT**

In dairy cows, feed restriction is known to decrease milk yield by reducing the number of mammary epithelial cells (MEC) in the udder, due to a modification in the MEC proliferation/apoptosis balance, or by reducing the metabolic activity of MEC, or both. The exfoliation of MEC from the mammary epithelium into milk is another process that could participate in regulating MEC number during feed restriction. The aim of the study was to clarify the mechanisms that underlie the milk yield loss induced by feed restriction. Nineteen Holstein dairy cows producing  $40 \pm 0.7$  kg at  $77 \pm 5$  DIM were divided into a control (n=9) and a feed-restricted (n=10) group. Ad libitum dry-matter intake (DMI) was recorded during a pre-experimental period of 2 weeks. For 29 days, cows were fed either 100% or 80% of their ad libitum DMI measured during the pre-experimental period (Period 1). Then, all cows were fed ad libitum for 35 days (Period 2). Milk production and DMI were recorded daily. Blood and milk samples were collected once during the pre-experimental period and on d5, d9 and d27 of Period 1 and d5, d9 and d30 of Period 2. Milk MEC were purified using an immuno-magnetic method to determine the rate of MEC exfoliation. Lipid mobilization was assessed by plasma non-esterified fatty acids concentration. Mammary epithelium integrity was assessed by plasma lactose concentration, milk  $\text{Na}^+$  and  $\text{Na}^+:\text{K}^+$  ratio. Mammary tissue samples were collected by biopsy at the end of each period to analyze the rate of cell proliferation and apoptosis and gene expression. Feed restriction increased plasma concentration of non-esterified fatty acids and decreased milk yield by 3 kg/d but had no effect on the rate of proliferation and apoptosis in the mammary tissue or on the expression of genes involved in milk synthesis. Daily MEC exfoliation rate was 65% greater in feed-restricted cows compared with control cows. Feed restriction had no effect on plasma lactose concentration and milk  $\text{Na}^+:\text{K}^+$  ratio but increased milk  $\text{Na}^+$  concentration, which did not allow concluding regarding the integrity of the mammary epithelium. When all cows returned to ad libitum feeding, no significant difference on milk yield, MEC exfoliation rate and mammary epithelium integrity between feed-restricted and control cows was observed but refeeding increased prolactin release at milking. These results show that the exfoliation process may play a role in regulating the number of MEC in the udder of dairy cows during a feed restriction without carryover effect on their milk production.

**Key words:** dairy cow, feed-restriction, mammary epithelial cell, exfoliation

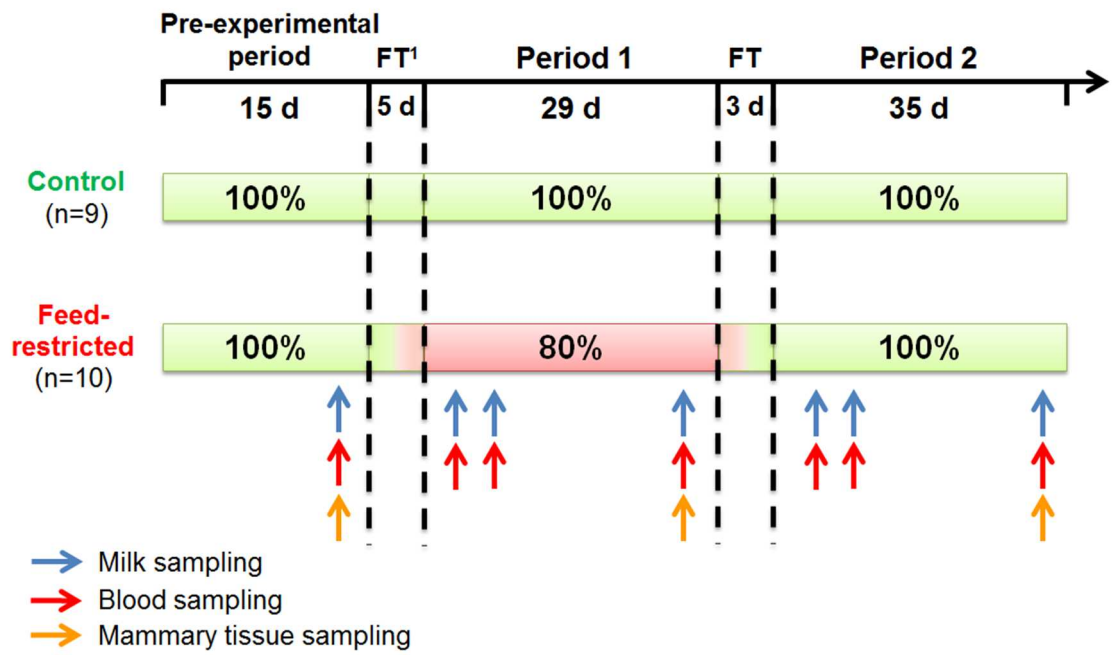


## INTRODUCTION

The lactational performances of dairy cows are influenced by numerous breeding factors. Feeding level is one of the main breeding factors affecting milk yield and the mammary gland metabolism. In lactating dairy cows, feed restriction is known to decrease milk yield (Nørgaard et al., 2005, 2008; Guinard-Flament et al., 2007; Abdelatty et al., 2017). The extent of milk loss depends on the duration and the intensity of the feed restriction and the stage of lactation of dairy cows. A short and severe feed restriction (cows fed 60% of their ad libitum intakes for 4 d) decreased milk yield of mid-lactation dairy cows by 20% (Abdelatty et al., 2017) whereas a moderate but longer feed restriction (cows fed with a control diet vs. a diet providing 80% of the control diet from 2 wk pre-partum to 11 wk post-partum) decreased milk yield by 38% (Dessaige et al., 2011). However, there is no clear explanation concerning the mechanisms that lead to this decrease in milk yield induced by feed restriction.

Milk yield of dairy cows is determined by the secretory activity of mammary epithelial cells (**MEC**, i.e., cells that synthesize milk, Capuco et al., 2003; Boutinaud et al., 2004a) and by the number of these cells which is regulated by the balance between cell proliferation and cell death by apoptosis (Knight, 2000; Capuco et al., 2003). Moreover, the exfoliation of MEC, defined as the shedding of MEC from the mammary epithelium into milk, has recently been shown to participate in the regulation of MEC number (Herve et al., 2016). Feed restriction had contradictory effects on these factors. The secretory activity of MEC has been shown to be reduced (Dessaige et al., 2011) or not affected (Nørgaard et al., 2005) by long term feed restriction. In the same way, the decreased number of MEC in the mammary tissue has been attributed to a decrease in the cell proliferation rate without variation in the apoptosis rate (Nørgaard et al., 2005) or on the contrary, to an increase in the apoptosis rate without variation in the cell proliferation rate (Dessaige et al., 2011). The effect of feed restriction on the MEC exfoliation rate has been investigated only once, showing no variation in the daily rate of MEC exfoliation in response to feed restriction (Herve et al., 2016).

The objective of this study was to better understand the mechanisms underlying the milk yield loss induced by feed restriction. The role of the determining factors for milk yield, namely the metabolic activity and the number of MEC in the mammary gland, was analyzed



**Figure 1 :** Experimental design.

<sup>1</sup>Feeding-transition

in feed-restricted cows during and after feed-restriction. A special focus was given on the role of the MEC exfoliation process in regulating the number of MEC in the mammary gland of feed-restricted cows. The carryover effects of feed-restriction on the number and the secretory activity of MEC were studied through a switch-back to ad libitum feeding period.

## MATERIALS AND METHODS

All procedures used on animals were approved by the local Ethics Committee in Animal Experiment of Rennes (France) in compliance with French regulations (Decree No. 2001-464; May 29, 2001).

### *Animals and Experimental Design*

Nineteen Holstein dairy cows (lactation 1 to 4), at early lactation ( $77 \pm 5$  DIM) and producing  $40 \pm 0.7$  kg of milk/d at the beginning of the experiment were used in this study. The experiment was conducted at the INRA experimental farm (IEPL, UMR PEGASE, Le Rheu, France). The cows were divided in 2 successive batches of 9 and 10 cows chosen according to their calving date in order to include in the study homogeneous cows in terms of stage of lactation. The 2 batches of cows followed the same experimental design one week apart (**Figure 1**). Before the beginning of the experiment (pre-experimental period), cows were fed ad libitum for 2 weeks. All along the pre-experimental period, ad libitum DMI of each cow was recorded daily. Then, cows were divided into 2 groups, control (n=9) and feed-restricted (n=10), that were balanced based on their parity, DIM, milk yield, SCC, milk fat content, milk protein content, BW and ad libitum DMI. For 29 days (Period 1), cows were submitted to 2 different feeding levels. Cows from the control group were fed 100% of their ad libitum DMI measured during the pre-experimental period whereas cows from the feed-restricted group were fed 80% of their ad libitum DMI measured during the pre-experimental period. Period 1 was preceded by 5 d of feeding-transition for feed-restricted cows in order to gradually switch between ad libitum feeding and feed-restriction: feed-restricted cows were fed 90% of their ad libitum DMI for 2 days, then 85% for 2 other days and finally 80% the 5<sup>th</sup> day of transition. Then, cows were switched back to ad libitum feeding for 35 days (Period 2). Period 2 was also preceded by a 3-d feeding-transition. Cows were weighed 3 times a week

**Table 1** : Chemical composition and nutritive value of feedstuffs.

Item	Corn silage	Energy concentrate <sup>1</sup>	Soybean meal	Dehydrated alfalfa
DM, %	33.1	91.9	90.5	92.4
OM (g/kg of DM)	961	877	928	882
N (g/kg of DM)	79	102	506	189
Cellulose (g/kg of DM)	201	63	48	252
NDF (g/kg of DM)	420	196	102	420
ADF (g/kg of DM)	247	79	61	299
Starch (g/kg of DM)	286	420	65	39
Fat (g/kg of DM)	29	36	26	29
Ca (g/kg of DM)	2.1	20.1	3.7	22.0
P (g/kg of DM)	1.7	8.7	7.2	2.9
PDIE <sup>2</sup>	70	89	255	100
NE <sub>L</sub> , MJ/kg of DM	6.75	7.03	8.53	4.83

<sup>1</sup> Energy concentrate on dry matter (DM) basis: 18.3% wheat, 18.3% corn, 18.3% barley, 18.3% beet pulp, 13.2% fine wheat bran, 3.0% cane molasses, 0.9% vegetal oil, 0.9% salts and 8.8% minerals and vitamins

<sup>2</sup> Protein truly digested in the small intestine delimited by energy supply

OM: organic matter; N: Nitrogen; NDF: neutral detergent fiber; ADF: acid detergent fiber; NE<sub>L</sub>: net energy for lactation

during the entire experiment. Cows were milked every day at 06:30 h and 16:30 h at the milking parlor, and milk yield was recorded individually at each milking. A milk sample (50 mL) was taken 4 times a week for SCC determination using a flow cytometry method, and milk composition (fat and protein content) determination using an infrared method (Mylab, Châteaugiron, France). Additional milk samples were collected once at the end of the pre-experimental period then 5, 9 and 27 days after the beginning of period 1 and 5, 9 and 30 days after the beginning of period 2 for purification of milk MEC using an immunomagnetic separation technique. The additional milk samples were also used to analyze total N content (Kjeldahl method), non-protein N content (precipitation at pH 4.6 with TCA and filtration), and non-casein N content (precipitation at pH 4.6 with 10% acetic acid and 1 M sodium acetate). Casein was determined as total N minus non-casein N, and whey protein was determined as non-casein N minus non-protein N.

### ***Diet***

All along the experiment, cows were fed individually via electronic gating. DMI and the quantity of feed refusals were recorded daily. Ingredients, chemical composition and nutritional value of the diet are given in **Table 1**. The TMR consisted of 60% corn silage, 15% energy concentrate (composed of 18.3% wheat, 18.3% corn, 18.3% barley, 18.3% beet pulp, 13.2% fine wheat bran, 3.0% cane molasses, 0.9% vegetal oil, 0.9% salts and 8.8% minerals and vitamins), 15% soybean meal, and 10% dehydrated alfalfa. The diet provided 6.9 Mcal of NE<sub>L</sub> and 103 g per kg of DM of metabolizable protein or **PDIE** (protein digested in the small intestine supplied by RUP and by microbial protein from rumen-fermented OM; INRA, 1989), its equivalent in the INRA feeding system.

### ***Purification of Milk Mammary Epithelial Cells***

In order to determine the concentration, the number and the viability of MEC in milk, MEC were purified from fresh milk (1.8 kg) using the immunomagnetic separation technique as described by (Herve et al., 2017). Then, the purified milk MEC suspension was stored in 1 mL of Trizol (Invitrogen Life Technologies) at -80°C until total RNA extraction was performed.





**Blood Sampling and Hormonal and Metabolites Assays**

Blood samples (20 mL) were collected in the tail vein 30 min before the beginning of milking once at the end of the pre-experimental period then 5, 9 and 27 days after the beginning of period 1 and 5, 9 and 30 days after the beginning of period 2. Monovette syringes coated with sodium heparin (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) were used to collect samples for the measurement of plasma lactose concentrations, and Monovette syringes coated with EDTA (Sarstedt) were used to collect samples for the measurement of plasma prolactin (**PRL**), non-esterified fatty acids (**NEFA**), glucose, urea, Ins and IGF-I concentrations. The same days, an additional blood sample was collected 15 min after the beginning of milking using Monovette syringes coated with EDTA (Sarstedt) in order to measure plasma PRL concentrations. The plasma was separated by centrifugation at 4°C and  $2,264 \times g$  for 15 min and stored at -20°C until subsequent analysis. Plasma concentrations of PRL were measured by ELISA. The ELISA plates were coated with 200 µL/well of mouse monoclonal anti-rabbit immunoglobulin antibody (Bertin Pharma, Montigny-le-Bretonneux, France) dissolved at 10 mg/L in 0.05 M phosphate buffer and incubated at 4°C overnight. The plates were then washed, and 300 µL of ELISA buffer (0.1 M phosphate buffer containing 0.15 M sodium chloride and 0.1% BSA, pH 7.4) was added to each well. The plates were stored at 4°C until plasma PRL concentration analysis. After washing the plates with 300 µL of washing buffer (0.01 M phosphate buffer containing 0.05% Tween 20, pH 7.4) per well, 50 µL of anti-prolactin antiserum (AGRO-BIO, La Ferté Saint Aubin, France) diluted 1:10,000 in ELISA buffer, 50 µL of standard (ranging from 320 to 2.5 ng/mL) or plasma sample and 50 µL of PRL/acetylcholinesterase conjugate diluted in ELISA buffer (LERI CEA Saclay, Gif sur Yvette, France) were dispensed into the plate wells. The plates were incubated at 25°C for 24 h and then washed twice. Then, 200 µL of Ellman's reagent were dispensed into each well. When the absorbance of the BO wells at 414 nm reached 0.2 Absorbance Units (A.U.), approximately after 45 to 75 min of incubation, the absorbance was read using a plate reader (VersaMax ELISA microplate reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). The detection limits was 0.89 ng/mL, the intra-assay CV was 4.6%, and the inter-assay CV was 2.8%. The plasma concentration of insulin (**Ins**) and insulin-like growth factor-1 (**IGF-I**) were assessed using the methods described by Vicari et al. (2008). Plasma glucose, urea, and NEFA concentrations were measured using a multiparameter analyzer (Kone Instrument



Corporation, Espoo, Finland) with a glucose (HK) kit (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA), an urea kit (Thermo Fischer Scientific) and a NEFA-HR kit (Wako Diagnostics, Mountain view, CA, USA).

### ***Estimation of Mammary Epithelium Integrity***

Mammary epithelium integrity was estimated by measuring the lactose concentration in plasma and the Na<sup>+</sup>:K<sup>+</sup> ratio in milk. Plasma concentrations of lactose were measured with a kit for lactose/d-galactose (R-Biopharm, Darmstadt, Germany) in blood samples collected before milking once at the end of the pre-experimental period then 5, 9 and 27 days after the beginning of period 1 and 5, 9 and 30 days after the beginning of period 2 using a multiparameter analyzer (Kone Instrument Corporation). A 100-μL sample of milk collected on those same days was used for total milk Na<sup>+</sup>, and K<sup>+</sup> analysis by atomic absorption spectrophotometry (Spectra AA220, Varian, Les Ulis, France) as reported by Murthy and Rhea (1967).

### ***Mammary Biopsies***

Mammary tissue samples were collected by biopsy 2 h before afternoon milking once at the end of the pre-experimental period and then 27 days after the beginning of period 1 and 30 days after the beginning of period 2. The day of the surgery, cows received an antibiotic by means of an i.m. injection of 165 mg of ceftiofur (Naxcel, Zoetis, Parsippany-Troy Hills, NJ, USA). Biopsies were taken, as previously described (Boutinaud et al., 2012), from the upper portion of the mammary gland using the 70 × 4-mm instrument described by Farr et al. (1996). Biopsies were harvested from the same part of the mammary gland alternating right and left rear glands between periods. Mammary tissue was rinsed in sterile saline solution to remove all traces of blood and then cut into 2 parts. One part of the mammary tissue sample was immediately frozen in liquid nitrogen and then stored at -80°C until DNA quantification and RNA expression analyses. The other part was used for immunohistochemistry and mammary tissue morphometric analyses. After a wash in phosphate-buffered saline (**PBS**), tissue samples were fixed at room temperature in 4 % paraformaldehyde for 2 h and in 0.4% paraformaldehyde for 2 d. The fixed tissue sample



used for immunohistochemistry was cryoprotected by incubation for 5 d in a 40 % sucrose–PBS solution, embedded in Tissue-Tek O.C.T. compound (Sakura Finetek Europe, LaboNord, Templemars, France), frozen in a cooled bath of isopentane (Sigma-Aldrich, Lyons, France), and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use. The fixed tissue sample used for mammary tissue morphology analyses was dehydrated in 70% ethanol and embedded in paraffin until use.

### ***Apoptotic and Proliferating Cell Detection by Immunohistochemistry in Mammary Tissue Sections***

The determination of the percentage of apoptotic cells in the mammary gland biopsy sections was based on DNA fragmentation detection using terminal deoxynucleotidyl transferase–mediated 2'-deoxyuridine, 5'-triphosphate nick-end labeling (**TUNEL**) staining, as described below. Cryosections measuring 7  $\mu\text{m}$  thick that had been mounted onto slides treated with 3-aminopropyltriethoxysilane (Sigma Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) were thawed and incubated for 20 min at  $60^{\circ}\text{C}$  in a solution of 10 mM citrate sodium (Sigma Aldrich) and 0.1% Triton (Thermo Fisher Scientific), washed in Tris-buffered saline (**TBS**), and incubated for 20 min at  $37^{\circ}\text{C}$  in 50 ng/ $\mu\text{L}$  proteinase K solution (Promega, Madison, WI, USA). The tissue sections were incubated with 1:2 diluted reagents from the DeadEnd Fluorometric TUNEL System (Promega) according to the manufacturer's instructions.

Proliferating mammary cells were identified as cells expressing the proliferating cell nuclear antigen (**PCNA**), as described below. Cryosections measuring 7  $\mu\text{m}$  thick were mounted onto Superfrost/Plus slides (Prolabo, Bondoufle, France). Mammary gland sections were incubated in TBS with 3% hydrogen peroxide and 10% methanol for 30 min. After several washes with TBS, the sections were permeabilized with TBS 1% SDS for 5 min, washed 3 times in TBS, and pre-incubated in TBS containing 1% BSA for 1 h at room temperature. The tissues were then incubated in the presence or absence of a primary antibody (M0879, monoclonal mouse clone PC10, DakoCytomation; diluted 1:200) in 1% BSA-TBS overnight at  $4^{\circ}\text{C}$ . After washes with TBS 1% BSA, the samples were incubated with 1:400-diluted second antibody (A11059, rabbit anti-mouse AlexaFluor 488–conjugated antibody, In Vitrogen, Carlsbad, CA, USA) for 1 h at room temperature.



After TUNEL or PCNA labeling, the slides were then mounted with SlowFade Gold Antifade mountant (Thermo Fisher Scientific) containing 4',6-diamidino-2-phenylindole (**DAPI**) and examined by fluorescence microscopy using an Eclipse E400 microscope (Nikon France, Le Pallet, France). The pictures were captured with a DXM 1200 digital still camera (Nikon France) and analyzed with the ImageJ software (W. Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD). Eight microscopic fields (magnification, 200×; area, 0.14 mm<sup>2</sup> per microscopic field) were examined for each staining. The percentages of apoptotic and proliferating cells in mammary tissue were determined as a ratio between the TUNEL- or PCNA-labeled cells and DAPI-counterstained nuclei.

### ***Mammary Tissue Morphometric Analyses***

The tissue samples embedded in paraffin were sliced. Serial tissue sections measuring 7 µm thick that had been mounted onto poly-lysine coated slides (VWR, Radnor, PA, USA) were stained with hematoxylin and eosin for morphometric analysis. Slides were scanned with a NanoZoomer (Hamamatsu Photonics, Japan). In one tissue section per cow, morphometric analysis included measurements of the percentage of mammary secretory tissue, the mean perimeter and the mean Feret's diameter of mammary lobules, and the number of mammary lobule per tissue section using the ImageJ software.

### ***DNA Quantification***

Mammary tissue samples (≈ 50 mg) were used to measure DNA concentration in the mammary tissue as described by Dessauge et al. (2011) with some modifications. Briefly, mammary tissue samples were first weighed and homogenized in 1 mL of sodium phosphate extraction buffer. The mixture was ground using an Ultra Turrax homogenizer, sonicated for 1 min, and centrifuged at 4,000 × *g* for 1 min. The supernatant was transferred into a new tube, whereas the pellet was resuspended in 1 mL of the extraction buffer before being re-subjected once to the successive grinding, sonication, and centrifugation extraction steps. Then, the DNA mixture was analyzed in triplicate by fluorescence using Hoechst 33258 dye (Sigma-Aldrich Chimie) using a Mithras LB940 fluorescence plate reader (Berthold Technologies, Thoiry, France).





### **RNA Extraction and Reverse Transcription**

After defrosting at room temperature, the milk MEC and the mammary tissue samples stored in Trizol were crushed and homogenized with a Turrax crusher (VWR International, Fontenay-sous-Bois, France). For each sample, 200  $\mu$ L of chloroform was added and well mixed. After 2 min of incubation at room temperature, the mixture was centrifuged at 12,000  $\times g$  for 15 at 4°C and the aqueous supernatant containing total RNA was recovered. Then, to precipitate the RNA, 500  $\mu$ L of isopropyl alcohol was added and samples were incubated overnight at -20°C. Samples were centrifuged at 12,000  $\times g$  for 10 min at 4°C and the RNA pellet was recovered after discarding the supernatant. To rinse the RNA pellet, cold 75% ethanol was mixed with each sample. Finally, after a centrifugation at 5,000  $\times g$  for 5 min at 4°C, RNA pellets were dried under and dissolved in sterile RNase-free water (Gibco, Invitrogen). The amounts of total RNA extracted from milk MEC or mammary tissue samples were determined using the DeNovix DS-11 Spectrophotometer (DeNovix Inc., Wilmington, DE, USA). Total RNA quality was assessed by the Bioanalyzer (Agilent Technologies, Massy, France) using the RNA Integrity Number (**RIN**) generated by Agilent 2100 Expert Software, version B.02 (Agilent Technologies). Samples with a RIN < 5 were not used for reverse transcription.

Complementary DNA was generated from total RNA by using a SuperScript® VILO cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 1  $\mu$ L of 10X Superscript Enzyme mix, 2  $\mu$ L of 5X VILO reaction mix and 2  $\mu$ L of DEPC-treated water and 400 ng of RNA in 5  $\mu$ L was incubated for 10 min at 25°C, 90 min at 42°C and was heated to 85°C for 5 min to inactivate the reaction. Finally, the temperature was reduced to 4°C. Reverse transcript products were stored at -80°C until PCR reactions were performed.

### **Real-Time PCR**

To measure the mRNA levels of  $\kappa$ -casein ( **$\kappa$ -CN**),  $\alpha$ S1-casein (**CSN1S1**),  $\alpha$ -lactalbumin ( **$\alpha$ -LA**), the type 1 glucose transporter (**SLC2A1**), the proapoptotic proteins caspase 3 (**CASP3**) and Bcl-2-associated X (**BAX**), the transcription factor E74-like factor 5 (**ELF5**), PRL receptor long isoform (**PRLR**), cytokeratin 8 (**KRT8**), ATP binding cassette subfamily G member 2

**Table 2 :** Average weight, DMI, and energy and protein intake and balance of dairy cows from the feed-restricted group (n = 10) and the control group (n = 9) during a 29-d period of feed restriction (Period 1) and a 35-d period switch back to ad libitum feeding (Period 2).

Items	Period	Treatment		SEM	P-value
		Control	Restricted		Treatment
Weight (kg)	1	662	626	1.1	< 0.001
	2	676	662	1.3	< 0.001
DMI (kg/d)					
Total	1	24.1	19.2	0.09	< 0.001
	2	24.5	24.6	0.10	0.37
As forage	1	16.9	13.4	0.07	< 0.001
	2	17.0	17.1	0.07	0.48
As concentrate	1	7.2	5.9	2.76	< 0.001
	2	7.4	7.5	3.20	0.28
Intake					
NE <sub>L</sub> (MJ/d)	1	158.5	123.8	1.11	< 0.001
	2	160.6	158.5	1.33	0.30
PDIE <sup>1</sup> (g/d)	1	2525	1974	17.4	< 0.001
	2	2563	2526	21.7	0.26
Balance					
NE <sub>L</sub> (MJ/d)	1	2.2	-21.4	1.15	< 0.001
	2	6.1	7.2	1.34	0.59
PDIE (g/d)	1	273	-33	19.3	< 0.001
	2	321	331	21.1	0.76

<sup>1</sup> Protein truly digested in the small intestine delimited by energy supply

DMI: dry matter intake; NEL: net energy for lactation

**(ABCG2)**, the matrix metalloproteinase-2 (**MMP2**), ribosomal protein S6 kinase polypeptide 1 (**RPS6KA1**) in purified milk MEC and mammary tissue samples, real-time PCR analyses were performed using SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) as previously described (Boutinaud et al., 2008). The primers used for real-time PCR were described in previous studies (Schmitz et al., 2004; Boutinaud et al., 2008; Ben Chedly et al., 2009; Boutinaud et al., 2012, 2013a; Sciascia et al., 2013; Sigl et al., 2014). The mRNA levels of the studied genes were expressed relative to the geometric mean of 3 housekeeping genes, namely the peptidylprolyl isomerase A (**PPIA**), the 18S ribosomal RNA (**RNA18S**) and the ribosomal protein large P0 (**RPLP0**). The primers used for real-time PCR for housekeeping genes were previously described (Robinson et al., 2007; Ben Chedly et al., 2009; Bonnet et al., 2013). For each gene, the mRNA level was expressed as a semi-absolute mRNA molecule number using the method previously reported by Boutinaud et al. (2004).

### **Calculations and Statistical Analyses**

The rate of MEC exfoliation was defined as the number of MEC exfoliated per day and was determined as the milk MEC concentration measured in milk collected during the morning milking multiplied by the daily milk yield. The SCC, milk MEC number and gene expression data were not normally distributed and thus  $\log_{10}$  transformation was applied prior to the analyses. The delta of PRL was determined as the differences between the PRL concentration after milking and the basal concentration of PRL (measured 30 min before milking).

For energy and protein intakes and balances, milk yield and composition, milk somatic cells, plasma metabolites, hormone concentrations and genes expression in purified milk MEC, data obtained during the feed restriction (Period 1) and during the switch back to ad libitum feeding (Period 2) were analyzed separately using the same statistical model. Data were analyzed by analysis of variance using the repeated measure SAS Proc Mixed procedure with repeated statements (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Day was used as the repeated parameter and cow as the subject for repeated measure. The effects of batch, day, feeding level (either 100% or 80% of the ad libitum DMI measured during the pre-experimental period) and the interaction between day and feeding level were tested. For traits analyzed in mammary tissue samples (apoptotic and proliferating cell, morphometric,

**Table 3** : Plasma metabolites concentration of dairy cows from the feed-restricted group (n = 10) and the control group (n = 9) during a 29-d period of feed restriction (Period 1) and a 35-d period switch back to ad libitum feeding (Period 2).

Items <sup>1</sup>	Period	Treatment		SEM	P-value
		Control	Restricted		Treatment
NEFA <sup>2</sup> (μmol/L)	1	95	432	27.8	<0.001
	2	93	91	7.7	0.87
Glucose (mg/L)	1	752	764	12.1	0.50
	2	764	766	11.3	0.87
Urea (mg/L)	1	279	263	6.6	0.11
	2	282	308	8.9	0.06

<sup>1</sup>Plasma samples were collected on d5, d9 and d27 after the beginning of Period 1 and d5, d9 and d30 after the beginning of Period 2 for the determination of the concentration of metabolites in plasma.

<sup>2</sup>Non-esterified fatty acids

DNA content, zymography and gene expression in the mammary tissue), data obtained during the 2 periods were analyzed together by analysis of variance using the repeated measure SAS Proc Mixed procedure (SAS Institute Inc.). Period was used as the repeated parameter and cow as the subject for repeated measure. The effects of series, period, feeding level and the interaction between period and feeding level were tested. The data obtained at the end of the pre-experimental period were used as covariates.

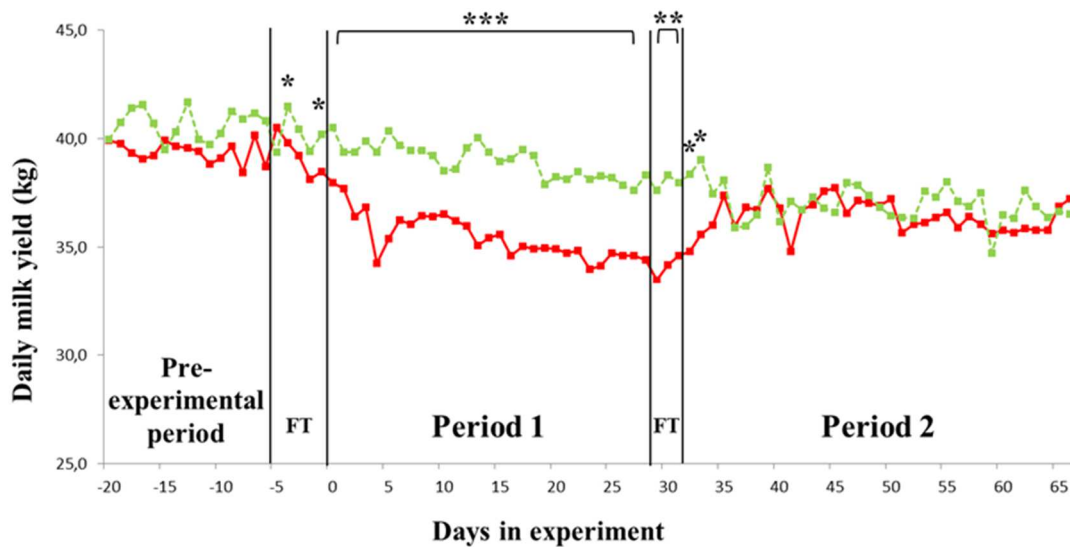
All the data were expressed as the means  $\pm$  SEM. The statistical significance threshold was set at  $P < 0.05$  and trend was set at  $0.05 < P \leq 0.10$ .

## RESULTS

### ***DMI, Body Weight, Energy and Protein Balances and Plasma Metabolites***

By design, during the feed restriction period (Period 1) the total DMI was lower in feed-restricted than in control cows (19.2 vs 24.1 kg/d, **Table 2**), representing a 20% decrease in total DMI. The lower total DMI in feed-restricted cows was due to lower intakes of forage and concentrates compared with control cows (13.4 vs 16.9 kg/d and 5.9 vs 7.2 kg/d, respectively; **Table 2**). As a consequence, the NE<sub>L</sub> and PDIE intakes were 22% lower in feed-restricted than in control cows (**Table 2**). During feed restriction, NE<sub>L</sub> and PDIE balance were therefore negative in feed-restricted cows (-21.4 MJ/d and -33 g/d) and positive in control cows (2.2 MJ/d and 273 g/d) and feed-restricted cows were on average 5% lighter than control cows (626 kg vs. 662 kg; **Table 2**). During the feed restriction period, the plasma NEFA concentration was greater in feed-restricted cows than in control cows, but no difference in plasma glucose and urea concentrations was observed (**Table 3**).

When feed-restricted cows switch back to ad libitum feeding (Period 2), no difference in total DMI, forage and concentrate intakes was observed. The NE<sub>L</sub> and PDIE intakes and balance were also similar in both groups. During period 2, however, a difference was observed in the body weight of the cows, feed-restricted cows still being 2% lighter than control cows ( $P < 0.001$ , **Table 2**). Regarding plasma metabolites, when feed-restricted cows switched back to ad libitum feeding, no difference in plasma NEFA and glucose concentrations was observed but plasma concentration of urea tended to be greater in feed-restricted cows than in control cows ( $P = 0.06$ , **Table 3**).



**Figure 2 :** Milk yield of dairy cows from the feed-restricted group (n = 10, red line) and the control group (n = 9, green line) during a 29-d period of feed restriction (Period 1) and a 35-d period back to ad libitum feeding (Period 2). The data are presented as means estimated by the statistical model. Statistically different means are indicated by \*\*\* for  $P < 0.001$ , \*\* for  $P < 0.01$ , and \* for  $P < 0.05$ .

1Feeding-transition

**Table 4 :** Milk composition of dairy cows from the feed-restricted group (n = 10) and the control group (n = 9) during a 29-d period of feed restriction (Period 1) and a 35-d period switch back to ad libitum feeding (Period 2).

Items <sup>1</sup>	Period	Treatment		SEM	P-value
		Control	Restricted		Treatment
Milk fat content (g/kg)	1	34.2	36.3	0.32	< 0.001
	2	35.8	35.9	0.32	0.86
Milk protein content (g/kg)	1	29.3	27.9	0.11	< 0.001
	2	30.8	30.2	0.14	< 0.01
Fat yield (g/d)	1	1324	1278	12.1	< 0.05
	2	1311	1302	13.5	0.68
Protein yield (g/d)	1	1132	989	8.4	< 0.001
	2	1131	1097	8.2	< 0.05
Casein (g/kg)	1	23.7	22.3	0.24	< 0.01
	2	24.6	24.4	0.36	0.64
Whey protein (g/kg)	1	5.5	5.2	0.08	0.06
	2	5.8	5.9	0.10	0.37
Log <sub>10</sub> SCC	1	4.38	4.50	0.032	< 0.05
	2	4.50	4.69	0.043	< 0.05
Log <sub>10</sub> somatic cell number	1	8.97	9.03	0.032	0.18
	2	9.07	9.23	0.043	< 0.05

<sup>1</sup>Milk samples were collected 4 times a week all along the experiment for milk composition and SCC determinations.

### **Milk Yield and Composition**

During feed restriction, feed-restricted cows produced 3.5 kg of milk/d less than control cows, representing a milk yield loss of 9 % compared with control cows ( $P < 0.001$ ; **Figure 2**). Milk of feed-restricted cows was slightly more concentrated in fat (36.3 vs 34.2 g/L;  $P < 0.001$ ; **Table 4**) and less concentrated in protein (27.9 vs 29.3 g/L;  $P < 0.001$ ; **Table 4**) than the milk of control cows, resulting in significant reductions in the amounts of fat (-3.5%) and protein (-12.6%) produced per day ( $P < 0.05$ ; **Table 4**). The decrease in milk protein content in feed-restricted cows was largely due to a lower milk casein concentration ( $P < 0.01$ ) but also to a tendency towards lower milk whey protein concentration ( $P = 0.06$ ; **Table 4**).

Three days after the beginning of the switch-back to ad libitum feeding period, milk yield was similar in feed-restricted and control cows (**Figure 2**). During this switch-back to ad libitum feeding period, milk fat content and yield were similar in both groups but milk protein content and yield were still lower in feed-restricted cows compared with control cows (-2 and -3%, respectively;  $P < 0.01$ ; **Table 4**). However, the milk casein and whey protein concentrations were similar in feed-restricted and control cows.

### **Milk Somatic Cells**

During feed restriction, the SCC was higher in feed-restricted cows compared to control cows (+ 32%,  $P < 0.05$ ; **Table 4**) but the somatic cell number did not differ between groups. The milk MEC concentration was similar in both groups but the rate of MEC exfoliation was 65% greater in feed-restricted cows than in control cows (98.7 vs. 59.9 x 10<sup>6</sup> cell/d;  $P < 0.05$ ; **Table 5**). The proportion of exfoliated MEC that were viable tended to be greater in feed-restricted cows compared with control cows ( $P = 0.08$ ; **Table 5**).

When feed-restricted cows switched back to ad libitum feeding, the SCC and the somatic cell number were greater in feed-restricted cows than in control cows (+ 194 and + 45%, respectively,  $P < 0.05$ ; **Table 4**) but no difference in milk MEC concentration, rate of MEC exfoliation and milk MEC viability was observed ( $P > 0.10$ ; **Table 5**).

**Table 5** : Concentration, number and viability of milk mammary epithelial cells (MEC) of dairy cows from the feed-restricted group (n = 10) and the control group (n = 9) during a 29-d period of feed restriction (Period 1) and a 35-d period switch back to ad libitum feeding (Period 2).

Items <sup>1</sup>	Period	Treatment		SEM	P-value
		Control	Restricted		Treatment
Milk MEC concentration (10 <sup>3</sup> cells/mL)	1	3.6	4.7	0.69	0.28
	2	7.2	10.3	2.5	0.42
Rate of MEC exfoliation (Log <sub>10</sub> cells/d)	1	7.78	7.99	0.057	< 0.05
	2	8.04	8.19	0.087	0.25
Milk MEC viability (%)	1	53.7	59.7	2.13	0.08
	2	52.1	55.6	2.05	0.26

<sup>1</sup>Milk samples were collected on d5, d9 and d27 after the beginning of Period 1 and d5, d9 and d30 after the beginning of Period 2 for the purification of MEC and the determination of the concentration, the number and the viability of milk MEC.

**Table 6** : Plasma concentration of insulin-like growth factor-I (IGF-I), insulin (Ins) and prolactin (PRL) of dairy cows from the feed-restricted group (n = 10) and the control group (n = 9) during a 29-d period of feed restriction (Period 1) and a 35-d period switch back to ad libitum feeding (Period 2).

Items <sup>1</sup>	Period	Treatment		SEM	P-value
		Control	Restricted		Treatment
IGF-I concentration (ng/mL)	1	111.4	96.7	4.26	< 0.05
	2	117.3	122.8	6.37	0.60
Ins concentration (μU/mL)	1	19.7	12.7	1.43	< 0.01
	2	18.5	20.1	1.66	0.53
PRL basal concentration (ng/mL)	1	106.2	102.5	6.38	0.70
	2	90.0	75.7	4.25	< 0.05
PRL concentration after milking (ng/mL)	1	149.2	149.8	5.59	0.94
	2	110.3	133.8	5.15	< 0.01
PRL delta (ng/mL)	1	45.0	45.0	7.45	0.99
	2	26.9	51.1	5.79	< 0.05

<sup>1</sup>Plasma samples were collected on d5, d9 and d27 after the beginning of Period 1 and d5, d9 and d30 after the beginning of Period 2 for the determination of the concentration of IGF-I, Ins and PRL.



### **Hormones**

During feed restriction, IGF-I and Ins concentrations were lower in feed-restricted than in control cows (111.4 vs 96.7 ng/mL,  $P < 0.05$  and 19.7 vs 12.7  $\mu\text{U/mL}$ ,  $P < 0.01$ , respectively; **Table 6**). Regarding PRL, neither the basal concentration nor the concentration after milking differed between groups. Consequently, the PRL delta was similar in both groups.

During the switch-back to ad libitum feeding period, IGF-I and Ins concentrations were similar in feed-restricted and control cows. Regarding PRL, whereas the basal concentration was lower ( $P < 0.05$ ; **Table 6**), the PRL concentration after milking was greater in feed-restricted cows than in control cows ( $P < 0.01$ ; **Table 6**). As a consequence the PRL delta was higher in feed-restricted cows compared to control cows (26.9 vs 51.1 ng/mL,  $P < 0.05$ ; **Table 6**).

### **Mammary Tissue Morphometric Analyses, DNA Concentration and Apoptotic and Proliferative Rates**

No difference in the percentage of apoptotic and proliferative cells between feed-restricted and control cows was observed during the feed restriction and the switch-back to ad libitum feeding periods (**Table 7**). Feed restriction had no effect on the percentage of mammary secretory tissue, the mean perimeter, the mean Feret's diameter, and the mean area of the mammary lobules but tended to increase the number of mammary lobules per  $\text{mm}^2$ . Moreover, DNA concentration in mammary tissue was on average 11% greater in feed-restricted cows compared with control cows ( $P < 0.05$ ; **Table 7**).

During the switch-back to ad libitum feeding period, the percentage of secretory tissue and DNA concentration were similar in both groups whereas feed-restricted cows tended to have greater mammary lobules indicated by a greater mean perimeter, mean Feret's diameter, and mean area of the mammary lobules ( $P < 0.10$ ; **Table 7**). Consequently, the number of mammary lobules per  $\text{mm}^2$  tended to be lower in feed-restricted cows ( $P = 0.09$ ; **Table 7**).

**Table 7 :** Percentage of apoptotic and proliferative cells, DNA concentration and morphometric analysis of mammary tissue of dairy cows from the feed-restricted group (n = 10) and the control group (n = 9) collected at the end of a 29-d period of feed restriction (Period 1) and at the end of a 35-d period back to ad libitum feeding (Period 2).

Items <sup>1</sup>	Period	Treatment		SEM	P-value
		Control	Restricted		Treatment
Percentage of apoptotic cells	1	0.16	0.27	0.052	0.18
	2	0.51	0.47	0.117	0.83
Percentage of proliferative cells	1	29.5	29.8	1.47	0.85
	2	21.4	21.0	2.06	0.90
DNA concentration (mg/g of mammary tissue)	1	2.59	2.87	0.087	< 0.05
	2	2.98	3.00	0.161	0.93
Percentage of mammary secretory tissue	1	71.0	74.1	3.55	0.56
	2	64.9	71.2	4.74	0.39
Mean perimeter of the mammary lobules (mm)	1	3.0	2.6	0.22	0.23
	2	2.4	3.0	0.21	0.08
Mean Feret's diameter of the mammary lobules (mm)	1	0.9	0.9	0.06	0.37
	2	0.8	1.0	0.06	0.08
Number of mammary lobules/mm <sup>2</sup>	1	1.8	2.2	0.16	0.08
	2	2.3	1.8	0.19	0.09
Mean area of the mammary lobules (mm <sup>2</sup> )	1	0.5	0.4	0.05	0.32
	2	0.3	0.5	0.07	0.07

<sup>1</sup>Mammary tissue samples were collected by biopsy on d27 after the beginning of Period 1 and on d30 after the beginning of Period 2 for the determination of the percentage of apoptotic and proliferative cells and morphometric analyses.

### ***Gene Expression in the Mammary Tissue and in Purified Milk Mammary Epithelial Cells***

Feed restriction had no effect on the expression of genes in the mammary tissue, except for an increase in the expression of *ABCG2* ( $P < 0.05$ ; **Table 8**). During the switch-back to ad libitum feeding period, no difference in gene expression in the mammary tissue between feed-restricted and control cows was observed.

In milk purified MEC, feed restriction tended to decrease the expression of  $\alpha$ -LA ( $P = 0.07$ ; **Table 9**). During the switch-back to ad libitum feeding period, the expression of  $\alpha$ -LA and *CASP3* tended to be lower in feed-restricted cows ( $P = 0.07$  and  $P = 0.09$ , respectively; **Table 9**).

### ***Indicators of Mammary Epithelium Integrity***

Feed restriction had no effect on plasma lactose concentration, milk  $K^+$  concentration and milk  $Na^+ : K^+$  ratio but increased milk  $Na^+$  concentration ( $P < 0.05$ , **Table 10**). When cows were switched back to ad libitum feeding, no difference in indicators of mammary epithelium integrity was observed between feed-restricted and control cows.

## **DISCUSSION**

In the present study, by design, feed restriction decreased forage and concentrate intakes, thereby decreasing total DMI by 20%. This decrease in DMI caused negative energy and protein balances in feed-restricted cows. In response to these deficiencies, cows mobilized their body lipid reserves as indicated by the increase in plasma NEFA concentration and the lower body weight. This findings are in accordance with previous experiments in which feed restriction was shown to trigger lipomobilization (Chilliard et al., 1998; Gross et al., 2011; Schütz et al., 2013). This lipomobilization should allow the maintenance of the milk production (Schütz et al., 2013). Nevertheless, the 4-wk feed restriction was associated with a 9%-decrease in milk yield. The negative effect of feed restriction on milk production was reported in many studies in dairy cows (Andersen et al., 2004; Radcliff et al., 2006; Guinard-Flament et al., 2007; Gross et al., 2011). As expected, feed restriction also affected the composition of milk by reducing milk protein content, protein yield and fat yield, as previously reported (Guinard-Flament et al., 2007; Burke et al.,

**Table 8** : Abundance of mRNA quantified by real-time PCR in mammary tissue of dairy cows from the feed-restricted group (n = 10) and the control group (n = 9) collected at the end of a 29-d period of feed restriction (Period 1) and at the end of a 35-d period back to ad libitum feeding (Period 2).

Items <sup>1</sup>	Period	Treatment		SEM	P-value
		Control	Restricted		Treatment
<i>κ-CN</i>	1	5.9	6.4	0.38	0.42
	2	5.9	5.4	0.63	0.63
<i>CSN1S1</i>	1	4.4	5.1	0.45	0.27
	2	4.1	4.4	0.33	0.53
<i>α-LA</i>	1	8.4	9.2	0.49	0.26
	2	8.3	7.9	0.89	0.75
<i>SLC2A1</i>	1	3.1	3.3	0.13	0.32
	2	3.1	2.8	0.28	0.52
<i>CASP3</i>	1	2.2	2.3	0.09	0.33
	2	2.3	2.6	0.13	0.29
<i>BAX</i>	1	0.6	0.5	0.05	0.64
	2	0.6	0.6	0.10	0.99
<i>ELF5</i>	1	5.6	5.5	0.15	0.76
	2	5.7	5.4	0.28	0.41
<i>PRLR</i>	1	2.9	2.8	0.22	0.79
	2	3.1	2.5	0.38	0.36
<i>KRT8</i>	1	3.0	3.2	0.17	0.48
	2	3.5	3.4	0.19	0.85
<i>ABCG2</i>	1	2.7	3.2	0.16	< 0.05
	2	2.7	2.7	0.32	0.98
<i>MMP2</i>	1	3.0	3.1	0.18	0.64
	2	2.6	3.0	0.19	0.19
<i>RPS6KA1</i>	1	2.9	2.6	0.32	0.48
	2	3.1	3.0	0.34	0.78
Mean of reference genes	1	7.3	7.6	0.36	0.48
	2	7.0	7.3	0.32	0.63

<sup>1</sup>Mammary tissue samples were collected by biopsy on d27 after the beginning of Period 1 and on d30 after the beginning of Period 2 for the analysis of gene expression of  $\kappa$ -casein (*κ-CN*),  $\alpha$ S1-casein (*CSN1S1*),  $\alpha$ -lactalbumin (*α-LA*), the proapoptotic proteins caspase 3 (*CASP3*) and Bcl-2-associated X (*BAX*), the transcription factor E74-like factor 5 (*ELF5*), prolactin receptor long isoform (*PRLR*), cytokeratin 8 (*KRT8*), ATP binding cassette subfamily G member 2 (*ABCG2*), the type 1 glucose transporter (*SLC2A1*), the matrix metalloproteinase-2 (*MMP2*), and ribosomal protein S6 kinase polypeptide 1 (*RPS6KA1*).

2010; Dessauge et al., 2011; Gross et al., 2011; Abdelatty et al., 2017). Probably as a consequence of the lipomobilization, the decrease in fat yield was lower than the decrease in milk yield.

The 20%-feed restriction during 4 wk had almost no effect on the metabolic activity of MEC as indicated by the absence of variation in the expression of genes involved in milk synthesis in the mammary tissue or in purified milk MEC. Only the expression of  $\alpha$ -LA, a gene coding for one of the major milk protein tended to be lower in the purified milk MEC of feed-restricted cows. The absence of significant variation in  $\kappa$ -CN and  $\alpha$ -LA gene expression in the mammary tissue is in accordance with a previous study where a 30%-feed restriction for 3 wk did not modify the expression of these two genes (Boutinaud et al., 2008). Similarly in another study, a feed restriction of 6 mo did not modify the expression of genes encoding proteins indicative of secretory activity, namely  $\alpha$ -LA, and ACC- $\alpha$  (Nørgaard et al., 2008). These results contrasts, however, with the significant decrease in these the genes coding for  $\kappa$ -CN and  $\alpha$ -LA in response to a feed restriction of 13 wk (Dessauge et al., 2011). The absence of significant variation in the expression of the gene encoding one of the main glucose transporters, namely *SLC2A1*, also contrasts with the decrease observed after a 30%-feed restriction (Boutinaud et al., 2008). The moderate intensity of the feed restriction in the present study may explain this absence of significant effect on the expression of genes involved in milk synthesis.

Feed restriction had no effect on the proportion of secretory tissue in the mammary tissue and on the size of the mammary lobules (perimeter, Feret's diameter and area) but increased by 11 % DNA concentration in the mammary tissue. This effect is in accordance with the effect of a severe feed restriction which induced a 25% increase in mammary DNA concentration (Dessauge et al., 2011). In that study, the effect on DNA concentration was associated with a decrease in the MEC number in the mammary gland as indicated by a lower mammary gland weight and a lower total DNA content in the mammary tissue (Dessauge et al., 2011). This decreased number of MEC in the mammary gland in response to feed restriction was due to an increase in the apoptosis rate in dairy cows (Dessauge et al., 2011), as previously observed in dairy ewes (Colitti et al., 2005). In our study feed restriction had no effect on the cell proliferation/apoptosis balance since the percentage of apoptotic and proliferative cells was not affected. This finding regarding apoptosis is supported by the

**Table 9** : Abundance of mRNA quantified by real-time PCR in purified milk mammary epithelial cells (MEC) of dairy cows from the feed-restricted group (n = 10) and the control group (n = 9) during a 29-d period of feed restriction (Period 1) and a 35-d period switch back to ad libitum feeding (Period 2).

Items	Period <sup>1</sup>	Treatment		SEM	P-value
		Control	Restricted		Treatment
<i>κ-CN</i>	1	5.2	5.4	0.22	0.66
	2	5.1	4.7	0.29	0.50
<i>CSN1S1</i>	1	4.3	4.3	0.14	0.99
	2	5.3	4.6	0.34	0.25
<i>α-LA</i>	1	6.7	5.3	0.45	0.07
	2	7.5	5.8	0.50	0.07
<i>SLC2A1</i>	1	4.3	4.4	0.09	0.52
	2	4.0	3.8	0.21	0.64
<i>CASP3</i>	1	2.1	2.1	0.11	0.81
	2	2.2	2.0	0.05	0.09
<i>BAX</i>	1	1.8	1.9	0.09	0.62
	2	1.9	1.9	0.08	0.62
<i>ELF5</i>	1	4.5	4.2	0.11	0.17
	2	4.5	3.9	0.22	0.14
<i>PRLR</i>	1	1.8	1.6	0.14	0.30
	2	2.1	1.6	0.22	0.26
<i>KRT8</i>	1	3.5	3.5	0.13	0.89
	2	3.8	3.4	0.18	0.20
<i>ABCG2</i>	1	3.2	3.1	0.10	0.36
	2	3.4	3.1	0.21	0.40
<i>MMP2</i>	1	1.2	1.4	0.29	0.67
	2	0.7	Non-est <sup>2</sup>	0.18	0.34
<i>RPS6KA1</i>	1	3.9	4.0	0.08	0.36
	2	3.8	3.8	0.08	0.64
Mean of reference genes	1	6.7	7.0	0.09	0.33
	2	Non-est <sup>2</sup>	7.0	0.10	0.90

<sup>1</sup>Milk samples were collected on d5, d9 and d27 after the beginning of Period 1 and d5, d9 and d30 after the beginning of Period 2 for the purification of MEC and the analysis of gene expression of  $\kappa$ -casein (*κ-CN*),  $\alpha$ S1-casein (*CSN1S1*),  $\alpha$ -lactalbumin (*α-LA*), the proapoptotic proteins caspase 3 (*CASP3*) and Bcl-2-associated X (*BAX*), the transcription factor E74-like factor 5 (*ELF5*), prolactin receptor long isoform (*PRLR*), cytokeratin 8 (*KRT8*), ATP binding cassette subfamily G member 2 (*ABCG2*), the type 1 glucose transporter (*SLC2A1*), the matrix metalloproteinase-2 (*MMP2*), and ribosomal protein S6 kinase polypeptide 1 (*RPS6KA1*).

<sup>2</sup>Non-estimated because of missing values.

lack of effect of the feeding level on the gene expression of *CASP3* and *BAX*, two genes involved in the signaling pathway of apoptosis. Similarly, Nørgaard et al. (2008) reported no effect of the feeding level on the expression of pro apoptotic genes and in cell proliferation and apoptosis balance, despite a longer treatment duration. The discrepancies between studies on the cell proliferation/apoptosis balance may be due to differences in the duration and the intensity of the feed restriction, but also to differences in the stage of lactation of dairy cows since the strongest effect was observed in early lactation (Nørgaard et al., 2005; Dessauge et al., 2011). Another explanation for the absence of variation in cell proliferation and apoptosis in our study may be the time of sampling. Indeed, mammary tissue was collected at the end of the feed restriction period, when the difference in milk yield between feed-restricted and control cows was stabilized. The decrease in milk yield in response to feed restriction occurred at the beginning of the feeding-transition period until approximately 5 d after the beginning of the feed restriction period. Thus, the cell proliferation/apoptosis balance might have been influenced by feed restriction when changes in milk yield occurred.

Another indicator of MEC number variation in mammary tissue is MEC exfoliation. In the present study, the decrease in milk yield induced by feed restriction was associated with a 65% increase in the MEC exfoliation rate. In dairy ruminants, a lower milk yield has been previously associated with a higher MEC exfoliation rate in response to various physiological, environmental or breeding factors (Herve et al., 2016). Moreover, the proportion of viable MEC exfoliated into milk tended to be higher in feed-restricted cows. This finding together with the greater DNA concentration in the mammary tissue suggests a decrease in the number of MEC in feed-restricted cows. We previously suggested that PRL might regulate the MEC exfoliation process. In the present study, nevertheless, the increase in the exfoliation rate did not depend on PRL concentrations which were not affected by feed restriction. Nevertheless, lower plasma concentrations of IGF-I and Ins were observed in feed-restricted cows. Given that IGF-I acts as a survival factor of MEC (Flint and Knight, 1997) and that both IGF-I and Ins can stimulate MEC proliferation (Turkington, 1970; Shamay et al., 1988; Baumrucker and Stemberger, 1989), we suggest that lower concentration of IGF-I or Ins may favor MEC exfoliation.

**Table 10** : Mammary epithelium integrity indicators of dairy cows from the feed-restricted group (n = 10) and the control group (n = 9) during a 29-d period of feed restriction (Period 1) and a 35-d period switch back to ad libitum feeding (Period 2).

Items <sup>1</sup>	Period	Treatment		SEM	P-value
		Control	Restricted		Treatment
Plasma lactose concentration (mg/L)	1	8.3	8.5	0.85	0.87
	2	7.0	9.1	1.43	0.32
Milk Na (mg/kg)	1	302	315	3.9	< 0.05
	2	320	332	6.6	0.23
Milk K (mg/kg)	1	1726	1748	17.0	0.40
	2	1729	1758	19.3	0.32
Milk Na:K ratio	1	0.18	0.18	0.003	0.17
	2	0.19	0.19	0.004	0.50

<sup>1</sup>Milk and plasma samples were collected on d5, d9 and d27 after the beginning of Period 1 and d5, d9 and d30 after the beginning of Period 2 for the analysis of mammary epithelium integrity indicators.



In dairy ruminants, a high MEC exfoliation rate has been associated with a disruption of the mammary epithelium (Herve et al., 2016). In the present study, the mammary epithelium integrity was assessed through the measurement of plasma lactose concentration and the Na<sup>+</sup>:K<sup>+</sup> ratio in milk. Feed restriction had no effect on plasma lactose concentration and milk Na<sup>+</sup>:K<sup>+</sup> ratio but increased milk Na<sup>+</sup> concentration, not allowing concluding about the integrity of the mammary epithelium.

After the end of the feed-restriction, cows were refed ad libitum to study the carryover effect of feed restriction. As early as 3 d after the beginning of the switch-back to ad libitum feeding period, milk yield of feed-restricted and control cows was similar showing that feed-restriction did not affect the potential of milk production of dairy cows. Feed restriction had no carryover effect on the composition of milk except for the protein content and the protein yield since feed-restricted cows had a slightly lower milk protein content (-2%) and protein yield (-3%) than control cows after the switch-back to ad libitum feeding. This carryover effect was not associated with reductions in the expression of *κ-CN* and *CSN1S1* genes or the casein content. Concerning the metabolic activity of MEC, we observed no significant carryover effect of feed-restriction. Feed restriction had also no carryover effect on the mechanisms determining the number of MEC in the mammary gland, namely the MEC exfoliation rate and the balance between the cell proliferation and apoptosis. In the same way as during the feed restriction period, variations in milk yield occurred during the feeding-transition period and at the beginning of the switch-back to ad libitum feeding period, suggesting that changes in the balance between cell proliferation and apoptosis may have occurred early during the switch-back to ad libitum period. Contrasting with the lack of carryover effects on other traits, the switch-back to an ad libitum feeding had a significant effect on plasma PRL concentrations. Indeed, feed-restricted cows had a greater PRL release at milking (a greater concentration after milking and a greater delta). Thus, the absence of carryover effect on milk yield may be due to the greater release of this galactopoietic hormone at milking.

## CONCLUSION

The lower milk yield induced by feed-restriction was not associated with any significant change in expression of genes involved in the metabolic activity of MEC. Feed



restriction had also no effect on the balance between cell proliferation and apoptosis. In the present study, however, feed restriction was associated with a higher rate of MEC exfoliation. Our results suggest that the exfoliation of MEC from the mammary epithelium may play a role in regulating the number of MEC in the udder of dairy cows during a feed restriction and thereby milk yield without carryover effect on their milk production. During the switch back to ad libitum feeding period, some other mechanisms such as the modulation of PRL release at milking may have limited the negative consequence of the MEC exfoliation on the subsequent milk production.

### ACKNOWLEDGMENTS

The authors are very grateful to J. Lassalas and all the staff at the experimental farm of Méjusseaume (INRA, UMR PEGASE, Le Rheu, France): D. Sidaner for following-up the experiment, G. Bouillet, J. Eslan, A. Eveno, M. Guilloux, P. Lamberton, G. Mandrille, A. Mottin, J. Orinel, J. Parois, F. Pichot, P. Pichot, M. Texier and G. Théaud for their role in herd management, helping for blood, mammary tissue and milk sampling and data collection. The authors also thank P. Debournoux, N. Huchet, M. Lemarchand, C. Mustière, S. Philau, J. Portenguen and S. Wiart (INRA UMR PEGASE, Saint Gilles, France) for their technical assistance, S. Lemosquet (INRA UMR PEGASE, Saint Gilles, France) for her help for the calculation of protein and energy balances, and L. Delaby (INRA UMR PEGASE, Saint Gilles, France) for his help for the statistical analysis. This study was conducted with the financial support of GALA association. L. Herve was supported by a PhD studentship funded by Région Bretagne and Agrocampus-Ouest (Rennes, France).

### REFERENCES

L'ensemble des références du manuscrit sont disponibles dans la partie « Références bibliographiques ».



## **Partie 2 - Effet de la photopériode et de l'inhibition de la prolactine au cours de la lactation**

La photopériode est connue pour engendrer des variations de production laitière associées à des variations de la concentration basale de PRL. Il a de plus déjà été montré chez la vache laitière que la photopériode a un effet sur le taux d'exfoliation ; des vaches exposées à des jours courts ayant un taux d'exfoliation plus important que des vaches exposées à des jours longs.

Cette partie se base sur les résultats de l'essai « **Photopériode x Cabergoline** » et a pour objectif de déterminer si l'effet de la photopériode sur l'exfoliation des CEM dans le lait est médié par la PRL.

Ces travaux donneront lieu à un article scientifique qui sera soumis dans Journal of Dairy Science.



## RÉSUMÉ

Comparativement à des vaches soumises à une photopériode correspondant à des jours courts (JC), la production laitière des vaches soumises à des jours longs (JL) est plus élevée. Cette augmentation de la production laitière est associée à des concentrations d'insulin-like growth factor-I et des concentrations basales prolactine (PRL) plus élevées. De plus, il a été reporté que le taux d'exfoliation des cellules épithéliales mammaires (CEM) était plus important chez des vaches soumises à des JC ou lors d'une inhibition de la PRL. L'objectif de cette étude était d'étudier si l'effet de la photopériode sur l'exfoliation des CEM est médié par la PRL. Huit vaches laitières Prim'Holstein produisant  $42 \pm 3.7$  kg de lait/jour ont été soumises à 4 traitements selon 2 réplicas simultanés d'un carré latin 4 x 4 de 4 périodes de 21 jours : 2 traitements lumineux (8 h d'exposition lumineuse/jour pour le traitement JC ou 16 h d'exposition lumineuse/jour pour le traitement JL) pendant 20 jours et 2 traitements pharmacologiques (une unique injection de 5,6 mg de cabergoline, un inhibiteur de la sécrétion de la PRL ou de solution témoin) au jour 10. Des échantillons de sang ont été collectés avant, pendant et après la fin de la traite aux jours 12 et 19 afin de mesurer la concentration en PRL. Des échantillons de lait ont été collectés aux jours 13 et 20 afin de purifier les CEM du lait par une méthode d'immuno-séparation magnétique. L'intégrité de l'épithélium mammaire a été évaluée en mesurant la concentration en lactose plasmatique et les ratios  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  et caséines/protéines solubles dans le lait. La photopériode n'a pas eu d'effet sur la sécrétion de PRL, la production laitière, le taux d'exfoliation, l'activité métabolique des CEM et l'intégrité de l'épithélium. La photopériode n'ayant pas eu d'effet ni sur la sécrétion de PRL, ni sur la production laitière, ni sur le taux d'exfoliation, nous ne pouvons pas conclure concernant le rôle de la PRL en tant que médiateur de l'effet de la photopériode sur l'exfoliation. L'injection de cabergoline a induit une diminution de la sécrétion de PRL en engendrant à la fois une diminution de la concentration basale de PRL et du pic de PRL à la traite. L'injection de cabergoline a aussi induit une diminution de la production laitière. Cette diminution de la production laitière a été associée à une diminution de l'activité métabolique des CEM. L'injection de cabergoline n'a pas eu d'effet sur le taux d'exfoliation et l'intégrité de l'épithélium. Ces résultats montrent que, dans cette étude, l'exfoliation des CEM ne participe pas à la diminution de la production laitière induite par l'injection de cabergoline.





**Interpretive Summary:**

**Effect of day length and inhibition of prolactin on the mammary epithelial cell exfoliation process** by Herve et al., In ruminants, photoperiod is known to affect milk yield, potentially through effects on IGF-I or prolactin plasma concentrations. Prolactin was shown to modify the exfoliation of mammary epithelial cell (MEC). This study aimed to investigate the potential role of prolactin as a mediator of the effect of photoperiod on MEC exfoliation by submitting cows to 2 day lengths and to prolactin inhibition. In this study, photoperiod had no effect on milk yield and MEC exfoliation. The decrease in milk yield in response to the inhibition of prolactin was not associated with an increase in exfoliation.

**PHOTOPERIOD EFFECT ON EXFOLIATION**

**Effect of day length and inhibition of prolactin on the mammary epithelial cell exfoliation process**

**L. Herve\*, V. Lollivier\*†, H. Quesnel\*, R. M. Bruckmaier‡, M. Boutinaud\*<sup>1</sup>**

\*PEGASE, Agrocampus Ouest, INRA, 35590 Saint-Gilles, France

†Université Bretagne Loire, 35044 Rennes, France

‡Veterinary Physiology, Vetsuisse Faculty, University of Bern, CH-3012, Switzerland

Corresponding author: [Marion.Boutinaud@inra.fr](mailto:Marion.Boutinaud@inra.fr)



**ABSTRACT**

In dairy cows, a long-day photoperiod (LDP) is known to increase milk yield. This increased milk yield is associated with greater concentration of insulin-like growth factor-I and prolactin (PRL). In contrast, short-day photoperiod (SDP) was shown to increase the rate of mammary epithelial cell (MEC) exfoliation as also observed after the inhibition of PRL. The aim of the present study was to investigate the potential role of PRL as a mediator of the effect of photoperiod on the MEC exfoliation process. Eight Holstein dairy cows producing  $42 \pm 3.7$  kg of milk/d were submitted to 4 treatments according to 2 simultaneous replicates of a  $4 \times 4$  Latin square design with 4 periods of 21 d: 2 day lengths (8 h of light/d for SDP or 16 h of light/d for LDP) for 20 d and 2 pharmacological treatments (a single i.m. administration of 5.6 mg of cabergoline, an inhibitor of PRL secretion, or vehicle) on d10. Blood samples were collected on d12 and d19 before, during, and after milking, and the PRL concentration in the samples was measured. Milk samples were collected on d13 and d20 for milk MEC purification using an immunomagnetic method. Tight junction opening was assessed by plasma lactose concentration and  $\text{Na}^+:\text{K}^+$  and casein:whey protein ratios in milk. Photoperiod had no effect on PRL secretion, milk yield, MEC exfoliation rate and metabolic activity, and mammary epithelium integrity. Since photoperiod treatment affected neither milk yield nor PRL secretion and MEC exfoliation rate, we cannot conclude regarding the potential role of PRL as a mediator of the effect of photoperiod on the MEC exfoliation process. Cabergoline induced a decrease in PRL secretion, by decreasing both basal concentration and the surge at milking, and induced a decrease in milk yield. This decrease in milk yield in response to cabergoline was associated with a decrease in the metabolic activity of MEC. Cabergoline had no effect on MEC exfoliation rate and the mammary epithelium integrity showing that in the present study, the MEC exfoliation process did not participate in the decrease in milk yield in response to cabergoline.

**Key words:** dairy cow, photoperiod, prolactin, mammary epithelial cell, exfoliation



## INTRODUCTION

A number of factors are known to influence the lactational performances of dairy cows during an established lactation and among these factors is included the manipulation of the photoperiod. In fact, it has been shown in numerous studies in dairy cows that increasing light exposure from a short-day photoperiod (**SDP**) of less than 12h of light/d to a long-day photoperiod (**LDP**) of 16 to 18 h of light/d increases milk yield by 0.5 to 3.3 kg/d/cow with an average gain of 2.5 kg/d/cow (Dahl et al., 2000). This finding provides evidence that LDP has a galactopoietic effect in dairy cattle. This effect of LDP on milk yield appeared to be under endocrine control of insulin-like growth factor-I (**IGF-I**), but also of prolactin (**PRL**), which are two galactopoietic factors in dairy ruminants (Prosser et al., 1990; Lacasse et al., 2016). Indeed, the plasma concentrations of these factors are greater in lactating cows submitted to LDP compared with cows submitted to SDP (Peters et al., 1981; Dahl et al., 1997, 2012). The increase in IGF-I and PRL concentration in response to LDP might increase the number of secretory cells, named mammary epithelial cells (**MEC**), since both of them act as survival factors by stimulating MEC proliferation and inhibiting MEC apoptosis (Deeks et al., 1988; Flint and Knight, 1997; Olazabal et al., 2000; Accorsi et al., 2002).

Besides the balance between cell proliferation and apoptosis, it was recently shown that the MEC exfoliation process, defined as the shedding of MEC from the mammary epithelium into milk, likely participates in regulating MEC number in the udder and thereby participates in milk yield variations in response to environmental or breeding factors (Herve et al., 2016). With regards to photoperiod, Boutinaud et al. (2014) reported that the rate of MEC exfoliation was lower in cows submitted to LDP than in cows submitted to SDP after less than 2 wk of light treatment exposure. This lower MEC exfoliation rate with LDP was associated with greater basal concentration of PRL (Boutinaud et al., 2014). Moreover, PRL is known to regulate MEC exfoliation. In lactating dairy cows, indeed, the inhibition of PRL secretion by administering an agonist of dopamine D2 receptor of the lactotroph (i.e. quinagolide) enhanced MEC loss in milk by 60% whereas exogenous PRL injections tended to limit this effect (Lollivier et al., 2015). The lower MEC exfoliation during LDP might therefore be mediated by greater concentration of PRL in plasma.



The MEC exfoliation process has been associated with a disruption of mammary epithelium integrity. Indeed, the MEC exfoliation rate increases concomitantly with an increase in the mammary epithelial permeability in response to various physiological, breeding, and environmental factors (Herve et al., 2016). The lower rate of MEC exfoliation in cows submitted to LDP than in cows submitted to SDP was associated with less leaky tight junctions (Boutinaud et al., 2014). PRL is also known to participate in the regulation of mammary epithelium integrity as demonstrated by the involvement of PRL in tight junction formation in vitro (Stelwagen et al., 1999) and in reducing the tight junction permeability of lactating mammary glands in rabbit and rat (Linzell et al., 1975; Flint and Gardner, 1994).

Based on these observations, we hypothesized that the increase in milk yield in response to LDP could be due to an increase in PRL concentration, which could in turn reduce mammary epithelial permeability and limit the exfoliation of MEC. In order to investigate the potential role of PRL as a mediator of the effect of photoperiod on the MEC exfoliation process, we tested the effect of 2 day lengths simulating LDP and SDP with metal halide lamps and the effect of cabergoline (**Cab**), a PRL release inhibitor. Since IGF-I likely participates in mediating the galactopoietic effect of LDP, we also investigated IGF-I plasma concentration in response to these treatments. Given that the MEC exfoliation process is associated with mammary epithelium integrity, the opening of tight junctions was also monitored.

## MATERIALS AND METHODS

All procedures used on animals were approved by the local Ethics Committee in Animal Experiment of Rennes (France) in compliance with French regulations (Decree No. 2001-464; May 29, 2001).

### *Animals and Experimental Design*

Eight Holstein dairy cows (lactation 2 to 4), at early lactation ( $69 \pm 3$  DIM) and producing  $42 \pm 3.7$  kg of milk/d at the beginning of the experiment were used in this study. The experiment was conducted at the INRA experimental farm (IEPL, UMR PEGASE, Le Rheu, France). Four treatments, consisting of a factorial arrangement of a photoperiod treatment





(short vs. long-day photoperiod) and a pharmacological treatment (Cab vs. Control) were applied over 4 periods of 21 d each according to 2 simultaneous replicates of a 4 x 4 latin square design. The photoperiod treatment consisted of 2 day lengths (short-day photoperiod, SDP, day length of 8 h/d vs. long-day photoperiod, LDP, day length of 16 h/d). The photoperiod treatment was applied for 20 d, the 21<sup>st</sup> d corresponding to a transition from one day length to the other. The pharmacological treatment consisted of a single aseptic 5 mL i.m. administration in the neck region of a solution containing 5.6 mg of cabergoline (Velactis<sup>®</sup>, Ceva Santé Animale, Libourne, France; Cab) or an i.m. injection of 5 mL of the same excipient used in Cab as a vehicle (Control) on d10 after the beginning of the photoperiod treatment. The 8 cows were kept in 2 chambers, one for each day length, and moved from one period to another to the treatment defined by the Latin square. The succession of treatments in the Latin square was balanced for the carryover effects. In each chamber, all the windows were covered with wood panels during the whole experiment, and special care was taken to switch off the corridor light when opening the doors. Animal feeding, milking, and care were performed under low-intensity red lights. During lightened periods of the day, light was only provided by metal halide lamps (Osram, Munich, Germany) controlled by an automatic timer. For each cow, 4 lamps were aligned from the head to the tail at a distance of 15 cm from the skin, the aim being to simulate an amount of 350 lux at the eye level of the cow. Cows were illuminated between 0700 and 1500 h for SDP and between 0500 and 2100 h for LDP. In each chamber, ambient temperature was maintained constant throughout the day at a target temperature of 17°C with a thermostatic convective heating system. In the chambers, cows were housed in individual tie stalls with individual troughs and individual water bowls with free access to water. All along the experiment, cows were fed individually according to INRA guidelines with a diet formulated to meet the nutritional demands of lactation containing (on a DM basis) 59% corn silage, 14.2% soybean meal, 12.7% energy concentrate, 13.1% dehydrated alfalfa and 1% minerals and vitamins and DMI was recorded daily. Cows were milked every day at 0730 h and 1730 h and milk yield was recorded individually at each milking. A milk sample (50 mL) was taken 4 times a week for milk composition (fat and protein content) determination using an infrared method (Mylab, Châteaugiron, France). Additional milk samples were collected d13 and d20 after the beginning of photoperiod treatment for SCC determination using a Vi-CELL XR analyzer (Beckman Coulter, Roissy, France), for MEC purification from milk using an immunomagnetic



separation technique, and for the measurements of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, casein, and whey protein contents.

### ***Purification of Milk Mammary Epithelial Cells***

In order to determine the concentration, the number and the viability of MEC in milk, MEC were purified from fresh milk (1.8 kg) collected d13 and d20 after the beginning of photoperiod treatment using the immunomagnetic separation technique as described by Herve et al. (2017). Then, the proportion of apoptotic MEC was measured by flow cytometry after staining with the Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA) according to the manufacturer's instructions and as previously described (Herve et al. 2017). Finally, the purified milk MEC suspension was stored in 1 mL of Trizol (Invitrogen Life Technologies) at -80°C until total RNA extraction was performed.

### ***Blood Sampling and Hormonal Assays***

The cows were surgically equipped with permanent catheters (Silclear medical-grade silicone tubing, i.d. 1.02 mm, o.d. 2.16 mm; Degania Silicone, Degania Bet, Israel) inserted into the jugular vein. The catheters were inserted 4 d prior to the beginning of the experiment. On d12 and d19 of each period, blood samples were collected 30 min before the morning milking. Monovette syringes coated with EDTA (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) were used to collect samples for the measurement of plasma IGF-I concentrations. Additional blood samples were collected before, during and after the morning milking at -5 - 2, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 15, 25, 35 and 45 min relative to milking-unit attachment. Monovette syringes coated with sodium heparin (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) were used to collect samples for the measurement of plasma lactose concentrations, and Monovette syringes coated with EDTA (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) were used to collect samples for the measurement of plasma PRL concentrations. The plasma was separated by centrifugation at  $2,264 \times g$  for 15 min at 4°C and stored at -20°C until analysis. Plasma concentrations of PRL were measured by ELISA. For the PRL assay, the detection limits was 0.89 ng/mL, the intra-assay CV was 4.6%, and inter-assay CV was 2.8%. Plasma concentration of IGF-I was assessed using the method described by Vicari et al. (2008). The sensitivity was < 6.5 ng/mL.

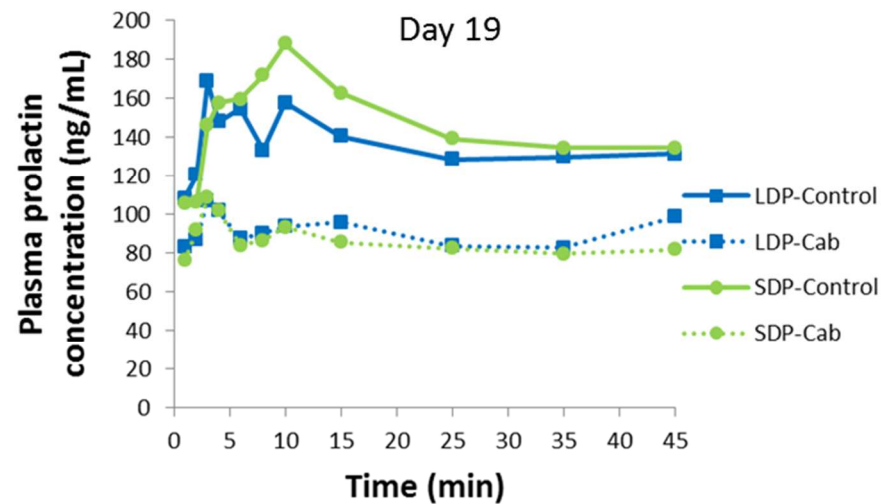
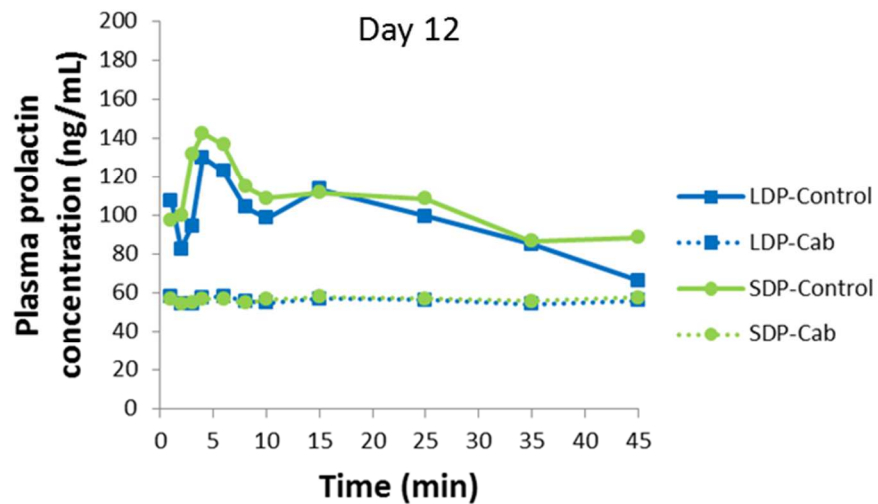


### ***Estimation of Mammary Epithelium Integrity***

Mammary epithelium integrity was estimated by measuring the lactose concentration in plasma, the Na<sup>+</sup>:K<sup>+</sup> ratio and the casein whey ratio in milk. Plasma concentrations of lactose were measured in the blood samples collected before, during and after milking on d12 and d19 of each period using a multiparameter analyzer (Kone Instrument Corporation) with a kit for lactose/d-galactose (R-Biopharm, Darmstadt, Germany). A 100- $\mu$ L sample of milk collected on d13 and d20 of each period was used for total milk Na<sup>+</sup>, and K<sup>+</sup> analysis by atomic absorption spectrophotometry (Spectra AA220, Varian, Les Ulis, France) as reported by Murthy and Rhea (1967). Finally, a 300-mL sample of milk collected on d13 and d20 of each period was used to analyze total N content (Kjeldahl method), non-protein N content (precipitation at pH 4.6 with TCA and filtration), and non-casein N content (precipitation at pH 4.6 with 10% acetic acid and 1 M sodium acetate). The casein content was determined as total N minus non-casein N, and whey protein was determined as non-casein N minus non-protein N.

### ***RNA Extraction and Real Time RT-PCR.***

RNA was extracted with Trizol (Life Technologies, Saint Aubin, France) from the milk MEC samples and then purified using the column from the RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's recommendations. The RNA pellet was suspended in RNase-free water, and the amount of total RNA extracted from milk MEC was determined using the DeNovix DS-11 Spectrophotometer (DeNovix Inc., Wilmington, DE, USA). Total RNA quality was assessed by the Bioanalyzer (Agilent Technologies, Massy, France) using the RNA Integrity Number (**RIN**) generated by Agilent 2100 Expert Software, version B.02 (Agilent Technologies). The amount of RNA was sufficient except for 6 samples where the amount was not sufficient to observe the RNA quality. The RNA quality was sufficient with a RIN of  $7.4 \pm 0.16$ . Total RNA from milk MEC samples were used for RT-qPCR analyses. Complementary DNA was obtained from 75 ng of total RNA using the First Strand cDNA kit (Promega, Lyon, France) according to the manufacturer's instructions. Real-time PCR (qPCR) was performed using Syber Green Master Mix (Applied Biosystems, Villebon sur Yvette, France) according to the manufacturer's instructions and as previously described (Boutinaud et al., 2008). PCR amplifications were performed using the primers for cyclophilin



**Figure 1** : Plasma concentration of prolactin before, during, and after milking relative to the milking-unit attachment in dairy cows submitted to the long-day photoperiod (LDP) or short-day photoperiod (SDP) and injected with the vehicle (Control) or Cabergoline (Cab).

Cows were submitted to photoperiod treatments for 20 d. They received one injection of Cab or vehicle on d10. Blood samples were collected around milking on d12 and d19. Milking started at time 0.

**(PPIA)**, *R18s*, ribosomal protein large P0 (**RPLP0**),  $\kappa$ -casein ( **$\kappa$ -CN**),  $\alpha$ -lactalbumin ( **$\alpha$ -LA**), Caspase-3 (**CASP3**), Bcl-2-associated X (**BAX**), PRL receptor (**PRLR**) long isoform, ATP binding cassette subfamily G member 2 (**ABCG2**), E74-like transcription factor 5 (**ELF5**) and matrix metalloproteinase-2 (**MMP2**) as previously described (Boutinaud et al., 2008, Ben Chedly et al., 2009, Boutinaud et al., 2012, Boutinaud et al., 2013, Sigl et al. 2014). The number of amplified mRNA molecules was determined as previously described (Boutinaud et al., 2004). The *PPIA*, *R18S* and *RPLP0* genes were evaluated as potential reference genes. Their gene expression did not vary with the treatment. The geometric mean between *PPIA*, *R18S* and *RPLP0* was therefore used as the reference gene. The results for each target gene are expressed as a ratio using this geometric mean.

### **Calculations and Statistical Analyses**

The rate of MEC exfoliation was defined as the number of MEC exfoliated per day and was determined as the milk MEC concentration measured in milk collected during the morning milking multiplied by the daily milk yield. The SCC, milk MEC number and gene expression data were not normally distributed and thus  $\log_{10}$  transformation was applied prior to the analyses.

The basal concentrations of PRL, and lactose were determined as the average plasma concentrations of these compounds at 5 and 2 min prior to attachment of the milking unit. PRL and lactose delta at milking were determined as the differences between the maximal and the basal concentrations. To describe the PRL release and the leakage of lactose at milking, we calculated the areas under the curves (**AUC**) from the beginning of milking to 45 min after the beginning of milking after subtracting the basal concentrations of the compounds.

Data were analyzed by analysis of variance using the SAS Proc Mixed procedure with repeated statements (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Day was used as the repeated parameter and cow as the subject for repeated measure. The effects of day, photoperiod (SD vs. LD), pharmacological treatment (Cab vs. Control), and the interactions between day, photoperiod and pharmacological treatment were tested.

**Table 1** : Characteristics of prolactin (PRL) release at milking in dairy cows submitted to the long-day photoperiod (LDP) or short-day photoperiod (SDP) and injected with the vehicle (Control) or Cabergoline (Cab)<sup>1</sup>.

Items	Day 12				Day 19				SEM	Photo	<i>P</i> -value			
	LDP		SDP		LDP		SDP				Cab	Photo x Cab	Day x Cab	Day x Photo
	Control	Cab	Control	Cab	Control	Cab	Control	Cab						
Basal PRL <sup>2</sup> concentration (ng/mL)	115.2	15.5	117.4	17.1	136.0	78.7	124.8	55.7	10.17	0.29	< 0.001	0.67	< 0.05	0.19
PRL maximal concentration (ng/mL)	178.1	20.7	208.2	22.3	213.7	100.9	209.8	90.6	12.15	0.61	< 0.001	0.31	< 0.01	0.19
PRL delta <sup>3</sup> (ng/mL)	62.9	5.2	90.8	5.2	77.7	22.2	85.0	35.0	11.64	0.15	< 0.001	0.50	0.26	0.81
PRL AUC <sup>4</sup> (ng/mL x 45 min)	879	38	1,200	34	925	-14	1,633	196	291.4	0.14	< 0.001	0.32	0.66	0.47

<sup>1</sup>Cows were submitted to photoperiod treatments for 20 d. They received one injection of Cab or saline on d10. Blood samples were collected around milking on d12 and d19. No interaction between Photoperiod, Cab and Day of sampling was observed ( $P > 0.10$ )

<sup>2</sup>The basal concentration corresponded to the average plasma concentration of PRL at 5 and 2 min prior to milking-unit attachment.

<sup>3</sup>The PRL delta corresponded to the differences between the maximal and basal concentrations.

<sup>4</sup>Area under the curve (AUC) from the beginning of milking to 45 min after the beginning of milking, after subtracting the basal concentration.



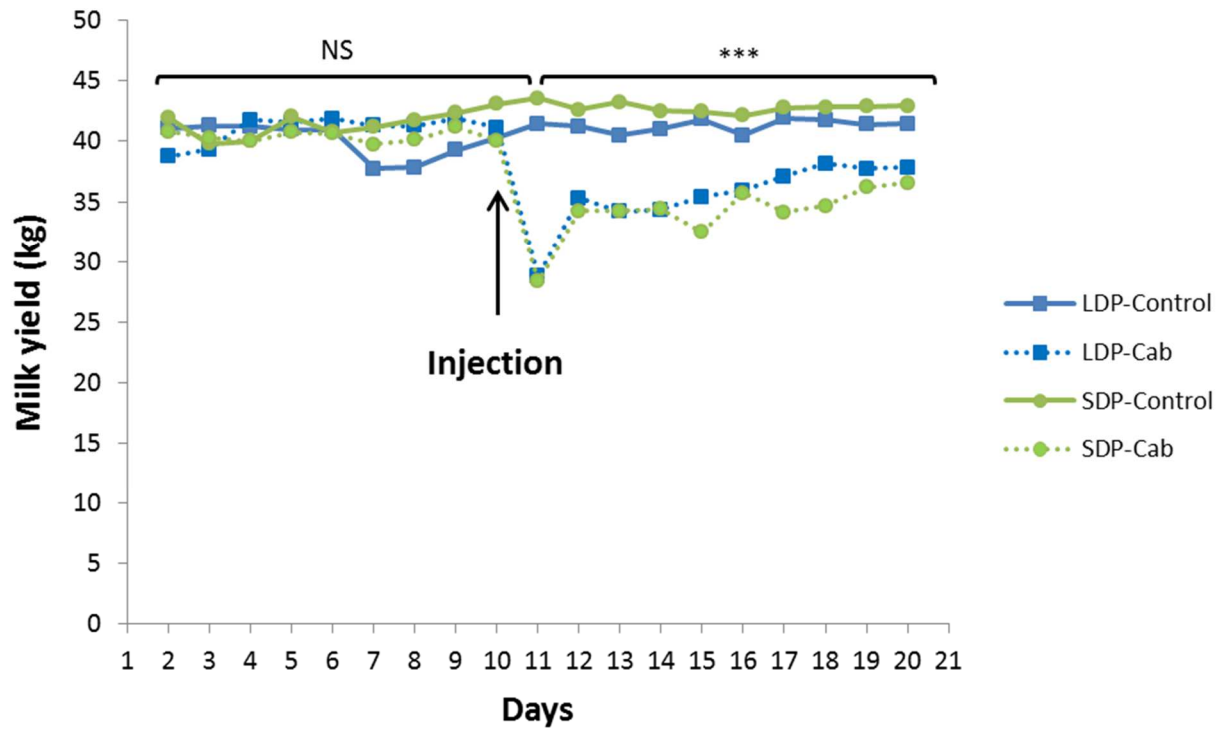
The data for PRL concentrations around milking from d12 and d 19 were analyzed separately using the same statistical model. Data were analyzed by analysis of variance using the SAS Mixed procedure with repeated statements (SAS Institute Inc.). Time was used as the repeated parameter, and Cow was used as the subject for repeated measures. The effects of time, photoperiod (SDP vs. LDP), pharmacological treatment (Cab vs. Control), and the interactions between day, photoperiod and pharmacological treatment were tested. The basal concentration of PRL was used as the covariate. All the data were expressed as the means  $\pm$  SEM. The statistical significance threshold was set at  $P < 0.05$  and trend was set at  $0.05 < P \leq 0.10$ .

## RESULTS

The interaction between photoperiod and Cab treatment did not affected the measured parameters; hence, the effects of both photoperiod and Cab are presented separately.

### ***Prolactin and IGF-I Responses to Treatments***

There was no significant effect of photoperiod on PRL concentrations before milking (basal concentrations) or milking-induced surge of PRL (**Figure 1 and Table 1**). In contrast, there was a Cab treatment effect on all parameters describing PRL release and an interaction between sampling day and Cab treatment for basal and maximal concentrations (**Table 1**). On d12 (i.e., 2 d after Cab injection), Cab treatment drastically decreased basal concentrations of PRL (16.3 vs.  $116.3 \pm 7.19$  ng/mL,  $P < 0.001$ ), maximal concentrations of PRL (21.5 vs.  $193.1 \pm 8.59$ ,  $P < 0.001$ ), PRL delta (5.2 vs.  $76.8 \pm 8.23$  ng/mL,  $P < 0.001$ ) and PRL AUC (35.8 vs.  $1039.3 \pm 206.04$  ng/mL x 45 min,  $P < 0.01$ ) in comparison with control treatment. Cab treatment therefore strongly inhibited the milking-induced surge of PRL (**Figure 1**). On d19, basal and maximal concentrations of PRL in cows treated with Cab were greater than on d12 ( $P < 0.05$ ; **Table 1**). Nevertheless, Cab treatment still induced a significant inhibition of the milking induced release of PRL, illustrated by lower maximal concentrations ( $95.7$  vs.  $211.7 \pm 8.59$  ng/mL,  $P < 0.001$ ), delta of concentrations ( $28.6$  vs.



**Figure 2** : Milk yield from dairy cows submitted to the long-day photoperiod (LDP) or short-day photoperiod (SDP) and injected with the vehicle (Control) or Cabergoline (Cab).

Cows were submitted to photoperiod treatments for 20 d. They received one injection of Cab or vehicle on d10 (arrow). \*\*\*  $P < 0.001$  for Cab effect across Photoperiod treatment.

81.3 ± 8.22 ng/mL,  $P < 0.001$ ) and AUC (90.8 vs. 1278.6 ± 206.04 ng/mL x 45 min,  $P < 0.001$ ) in Cab treated cows compared with Control cows (**Table 1**).

Plasma concentrations of IGF-I measured before milking averaged 101.8 ± 7.84 ng/mL. They were influenced neither by photoperiod ( $P = 0.97$ ) nor by Cab treatment ( $P = 0.55$ ).

### ***Milk Yield and Composition***

There was no significant effect of photoperiod on milk yield (**Figure 2**) and composition (**Table 2**). In contrast, milk yield was strongly affected by Cab treatment (**Figure 2**). Daily milk yield decreased on d11, which was the day after the Cab injection and remained lower than in Control cows until the end of the period (d20,  $P < 0.001$ ). From the day after Cab injection until d20, milk yield averaged 34.8 ± 0.35 kg/d in cows treated by Cab and 42.1 ± 0.35 kg/d in Control cows ( $P < 0.001$ ), representing a 17% decrease in milk yield in response to Cab.

Cab treatment tended to increase fat and reduce lactose content in milk ( $P = 0.09$  and  $P = 0.10$ , respectively, **Table 2**) and did not influence significantly protein content. Nevertheless, Cab treatment decreased fat, protein, and lactose yield in milk by 5.8, 7.2, and 10.8%, respectively (**Table 2**). The SCC was not influenced by treatments ( $P > 0.10$ , Table 2).

### ***Exfoliation of Mammary Epithelial Cells***

On d13 and d20 (i.e., 13 and 20 d after the photoperiod treatment started and 3 and 10 d after Cab was injected), the concentration of MEC in milk and the rate of MEC exfoliation was influenced neither by photoperiod nor by Cab treatment ( $P > 0.10$ , **Table 3**). The percentage of viable or apoptotic MEC in milk did not differ between groups. The percentage of MEC related to the total number of cells in milk was similar in the different treatments (**Table 3**).

**Table 2 :** Composition of milk from dairy cows submitted to the long-day photoperiod (LDP) or short-day photoperiod (SDP) and injected with the vehicle (Control) or Cabergoline (Cab)<sup>1</sup>.

Items	LDP		SDP		SEM	P-value		
	Control	Cab	Control	Cab		Photoperiod	Cab	Photoperiod x Cab
Milk fat content (g/kg)	32.3	35.5	33.0	34.9	1.54	0.98	0.09	0.66
Milk protein content (g/kg)	26.5	28.5	26.7	28.1	1.11	0.92	0.13	0.85
Milk lactose content (g/kg)	48.8	48.1	49.5	48.8	0.43	0.14	0.10	0.97
Fat yield (g/d)	1407	1364	1451	1329	27.1	0.87	< 0.01	0.14
Protein yield (g/d)	1158	1095	1179	1074	16.3	0.97	< 0.001	0.20
Lactose yield (g/d)	1960	1803	2062	1784	48.4	0.39	< 0.001	0.21
SCC (10 <sup>3</sup> cell/mL)	44.2	49.0	37.3	63.1	12.3	0.77	0.22	0.28

<sup>1</sup> Cows were submitted to photoperiod treatments for 20 d. They received one injection of Cab or vehicle on d10. Milk was collected on d13 and d20 for milk composition analysis.

**Table 3 :** Concentration, number and viability of mammary epithelial cells in milk of dairy cows submitted to the long-day photoperiod (LDP) or short-day photoperiod (SDP) and injected with the vehicle (Control) or Cabergoline (Cab)<sup>1</sup>.

Items	LDP		SDP		SEM	P-value		
	Control	Cab	Control	Cab		Photoperiod	Cab	Photoperiod x Cab
Milk MEC concentration (10 <sup>3</sup> cells/mL)	11.0	8.7	8.5	11.3	2.48	0.98	0.91	0.31
Log <sub>10</sub> Milk MEC number (per d)	8.4	8.3	8.4	8.4	0.12	0.94	0.73	0.60
Milk MEC viability (%)	60.3	61.2	59.9	59.2	2.29	0.60	0.96	0.72
Apoptotic MEC (%)	38.3	36.7	34.9	36.9	2.07	0.46	0.92	0.38
Percentage of MEC in milk cells (%)	21.4	15.8	19.7	17.5	0.03	0.99	0.14	0.51

<sup>1</sup> Cows were submitted to photoperiod treatments for 20 d. They received one injection of Cab or vehicle on d10. Milk was collected on d13 and d20 for the determination of milk MEC concentration, number, and viability.

<sup>2</sup> The milk MEC number was determined by multiplying the milk MEC concentration by the milk yield on d13 and d20. The data were not normally distributed; therefore, log<sub>10</sub> transformation was performed before analysis.

### **Indicators of Mammary Epithelium Integrity**

On d12 and d19, the leakage of lactose at milking and the basal concentration of lactose were not influenced by photoperiod or Cab treatment ( $P > 0.10$ , **Table 4**).

Concentrations of  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  in milk and the  $\text{Na}^+:\text{K}^+$  ratio did not differ between groups ( $P > 0.10$ , **Table 5**) but the casein:whey protein ratio in milk was reduced by 7.7% by the Cab treatment (on average 3.96 in Cab-treated cows vs.  $4.29 \pm 0.125$  in Control cows;  $P < 0.01$ , **Table 5**).

### **Gene Expression**

There was no significant effect of photoperiod on the gene expression ( $P > 0.10$ , **Table 6**). Cab treatment, however, decreased the expression of  $\kappa\text{-CN}$  and  $\alpha\text{-LA}$  ( $P < 0.01$  and  $P < 0.05$ , respectively) and tended to decrease the expression of *ABCG2* ( $P = 0.06$ , **Table 6**).

## **DISCUSSION**

Contrary to our expectations, in the present study the photoperiod treatment failed to affect milk yield after 3 wk of light exposure. The 3-wk photoperiod treatment would have induced milk yield variations since Peters et al. (1978) reported that supplemental lighting (16 h of light exposure) compared with natural photoperiod increased milk yield by 1.7 kg only 10 d after the beginning of light exposure. The galactopoietic response of dairy cows to LDP during established lactation is, however, gradual and typically significant after 3 to 4 wk of light exposure (Dahl and Petitclerc, 2003). The lack of photoperiod effect on milk yield in our study might therefore be due to the short duration of the photoperiod treatment. Photoperiod had also no effect on the composition of milk or on the expression of genes involved in milk synthesis. This finding is in agreement with previous studies showing that milk composition is generally unaffected by photoperiod (Dahl et al., 1997; Miller et al., 1999; Dahl et al., 2000). In the present study, photoperiod did not affect concentrations of the galactopoietic factors IGF-I nor PRL (basal concentration and the surge at milking) contrasting with what is usually observed during photoperiod treatment. We also evaluated the variations of two determining factors of milk yield (i.e. the metabolic activity of MEC and the rate of exfoliation) in response to the manipulation of the photoperiod. The metabolic

**Table 4 :** Characteristics of plasma lactose at milking in dairy cows submitted to the long-day photoperiod (LDP) or short-day photoperiod (SDP) and injected with the vehicle (Control) or Cabergoline (Cab)<sup>1</sup>.

Items	LDP		SDP		SEM	P-value		
	Control	Cab	Control	Cab		Photoperiod	Cab	Photoperiod x Cab
Basal lactose concentration (mg/L)	31.6	33.9	32.1	33.1	3.65	0.97	0.65	0.86
Lactose maximal concentration (mg/L)	37.3	39.4	38.3	38.9	3.72	0.96	0.72	0.84
Lactose delta (mg/L)	5.7	5.5	6.1	5.8	0.78	0.71	0.75	0.94
Lactose AUC (mg/L x 45min)	60.3	89.8	121.8	98.3	25.39	0.17	0.91	0.30

<sup>1</sup>Cows were submitted to photoperiod treatments for 20 d. They received one injection of Cab or saline on d10. Blood samples were collected around milking on d12 and d19 for the determination of plasma lactose concentration.

**Table 5 :** Concentration of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>:K<sup>+</sup> ratio and casein:whey protein ratio in milk of dairy cows submitted to the long-day photoperiod (LDP) or short-day photoperiod (SDP) and injected with the vehicle (Control) or Cabergoline (Cab)<sup>1</sup>.

Items	LDP		LDP		SEM	P-value		
	Control	Cab	Control	Cab		Photoperiod	Cab	Photoperiod x Cab
Milk Na <sup>+</sup> (mg/kg)	494	509	488	519	16.8	0.92	0.17	0.63
Milk K <sup>+</sup> concentration (mg/kg)	1743	1730	1742.18	1683	35.4	0.51	0.31	0.52
Milk Na <sup>+</sup> :K <sup>+</sup> ratio	0.29	0.30	0.28	0.31	0.014	0.66	0.13	0.44
Milk casein:whey protein ratio	4.21	4.04	4.38	3.88	0.126	0.94	< 0.01	0.19

<sup>1</sup>Cows were submitted to photoperiod treatments for 20 d. They received one injection of Cab or vehicle on d10. Milk was collected on d13 and d20 for the determination of milk MEC concentration, number, and viability.

activity of MEC was not affected by the photoperiod treatment. The rate of MEC exfoliation also did not vary in response to the photoperiod treatment. These results are consistent with the absence of milk yield variation. The absence of variation in the MEC exfoliation rate is, however, not in agreement with a previous study showing that the MEC exfoliation rate decreased in response to LDP (Boutinaud et al., 2014). Finally in our study, photoperiod did not affect mammary epithelium integrity, which was estimated by the  $\text{Na}^+:\text{K}^+$  and casein:whey ratio in milk as well as the lactose leakage at milking (i.e. the basal and maximal concentrations, the delta and the AUC of lactose in plasma). This effect is not in agreement with the disruption of mammary epithelium integrity previously observed in SDP compared with LDP (Boutinaud et al., 2014) but is consistent with the absence of variation in the MEC exfoliation rate. Since photoperiod treatment affected neither milk yield nor PRL secretion and MEC exfoliation rate, we cannot conclude regarding the potential role of PRL as a mediator of the effect of photoperiod on the MEC exfoliation process.

Consistently with the known effect of the inhibition of PRL secretion on milk yield (Lacasse et al., 2016), administering Cab to lactating dairy cows induced a strong reduction in milk yield (i.e. -33%) the day after the injection. Thereafter, milk production of Cab-treated cows remained lower until the end of the period (i.e. 10 d after the injection). The decrease in milk yield in Cab-treated cows was associated with a decrease in the basal concentration of PRL. This is consistent with previous studies showing that a single injection of Cab at dry-off was effective in reducing basal plasma concentrations of PRL from the day of the injection until 8 d (Boutinaud et al., 2016) to 15 d (Bach et al., 2015) after the injection. To our knowledge, the effect of Cab on the milking-induced release of PRL had never been investigated. In the present study, the single Cab injection decreased all variables describing the surge of PRL at milking (maximal concentration, delta and AUC). A strong effect was observed 2 d after the injection since no milking-induced release of PRL was observed. The inhibition of Cab on PRL secretion at milking was less strong but still effective 9 d after the injection.

It is known that PRL regulate milk yield by affecting both the metabolic activity of MEC and the number of these cells in the mammary tissue (Lacasse et al., 2016). The metabolic activity of MEC was affected by Cab, as indicating by the decrease in the yield of fat, protein, and lactose. These effects are consistent with the down-regulation of  $\kappa\text{-CN}$  and  $\alpha\text{-LA}$  gene expression (two genes that are implicated in the synthesis of milk) in MEC purified

**Table 6 :** Abundance of mRNA quantified by real-time PCR in purified milk mammary epithelial cells (MEC) of dairy cows submitted to the long-day photoperiod (LDP) or short-day photoperiod (SDP) and injected with the vehicle (Control) or Cabergoline (Cab)<sup>1</sup>.

Items	LDP		SDP		SEM	Photoperiod	P-value	
	Tem	Cab	Tem	Cab			Cab	Photoperiod x Cab
<i>κ-CN</i>	7.9	7.5	7.9	7.1	0.22	0.35	< 0.01	0.55
<i>α-LA</i>	5.7	5.0	5.8	5.0	0.33	0.97	< 0.05	0.84
<i>CASP3</i>	3.1	3.2	3.2	3.2	0.06	0.44	0.26	0.34
<i>BAX</i>	3.3	3.3	3.2	3.3	0.05	0.26	0.40	0.48
<i>PRLR</i>	3.1	3.0	3.5	3.0	0.21	0.38	0.27	0.46
<i>ABCG2</i>	2.9	2.8	2.9	2.7	0.09	0.60	0.06	0.83
<i>ELF5</i>	4.7	4.3	4.3	4.1	0.21	0.13	0.17	0.69
<i>MMP2</i>	2.2	2.3	2.2	2.4	0.40	0.81	0.75	0.94

<sup>1</sup>Cows were submitted to photoperiod treatments for 20 d. They received one injection of Cab or vehicle on d10. Milk was collected on d13 and d20 for the purification of milk MEC and the analysis of gene expression of  $\kappa$ -casein (*κ-CN*),  $\alpha$ S1-casein (*CSN1S1*),  $\alpha$ -lactalbumin (*α-LA*), the proapoptotic proteins caspase 3 (*CASP3*) and Bcl-2-associated X (*BAX*), the transcription factor E74-like factor 5 (*ELF5*), PRL receptor long isoform (*PRLR*), ATP binding cassette subfamily G member 2 (*ABCG2*), the matrix metalloproteinase-2 (*MMP2*).



from milk. Similarly, it has been reported that the decrease in milk yield induced by the inhibition of PRL secretion was associated by a decrease in the MEC metabolic activity in mammary biopsies (Boutinaud et al., 2012) or in MEC purified from milk (Lollivier et al., 2015). No variation in the MEC exfoliation rate in response to Cab was observed in our study, showing that the MEC exfoliation process therefore did not participate in the decrease in milk yield in response to Cab. This result is inconsistent with the role of PRL in the regulation of the MEC exfoliation rate reported during lactation (Lollivier et al., 2015) and at drying-off (Boutinaud et al., 2017). This result is, however, consistent with the fact that Cab affected neither variables describing the lactose leakage at milking (basal and maximal concentrations, delta, and AUC) nor the Na<sup>+</sup>:K<sup>+</sup> ratio in milk, suggesting that the mammary epithelium integrity was not modified by the Cab treatment. The casein:whey ratio in milk was also used as an indicator of the mammary epithelium integrity and was decreased by Cab. This decrease could suggest a mammary epithelium disruption but could also be attributed to the decreased metabolic activity of MEC. Finally, since PRL is also known to stimulate cell proliferation (Boutinaud et al., 2012; Lollivier et al., 2015), the decrease in milk yield in response to Cab could be due to a decreased rate of cell proliferation in the mammary tissue.

## CONCLUSION

The 3-wk photoperiod treatment had no effect on milk production. The lack of variation in milk yield could be due to the short duration of the photoperiod treatment but is consistent with the absence of variation in the metabolic activity of MEC, the MEC exfoliation rate and the concentrations of IGF-I and PRL in plasma. The Cab treatment strongly reduced milk production as of the day following until 10 d after the injection. This reduced milk production in response to the Cab treatment was associated with a decrease in the metabolic activity of MEC and no variation in the MEC exfoliation rate.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors are very grateful to Jacques Lassalas and Philippe Lamberton and all the staff of the Physiology team of the INRA experimental farm of Méjusse (UMR PEGASE,



Le Rheu, France) for their helpful assistance in taking care of the cows and in sampling: Daniel Chevrel, André Cozien, Jean-Luc Harel, Jean-Yves Thébault, and Maryvonne Texier. The authors also thank Margaux Veron, Perrine Debournoux, Nicole Huchet, Maryline Lemarchand, Colette Mustière, Sabrina Philau, Jacques Portanguen and Sandra Wiart (INRA UMR PEGASE, St Gilles, France) for their help in analyzing samples. Finally, the authors wish to thank Ceva Santé Animale (Libourne, France) which kindly provided Cabergoline. Lucile Herve was supported by a PhD studentship funded by Région Bretagne and Agrocampus-Ouest (Rennes, France).

### **REFERENCES**

L'ensemble des références du manuscrit sont disponibles dans la partie « Références bibliographiques ».



### **Partie 3 - Effet d'un traitement à l'hormone de croissance bovine**

La bGH est connue pour engendrer une augmentation de la production laitière chez la vache laitière. Cette augmentation de production laitière est principalement due à une réorientation des nutriments vers la glande mammaire pour la fonction de lactation. Elle résulte aussi d'une augmentation de l'activité métabolique des CEM et de leur nombre dans la glande mammaire. L'augmentation du nombre de CEM résulte quant à elle d'un taux de prolifération plus élevé mais pourrait aussi en partie être la conséquence d'une diminution du taux d'exfoliation.

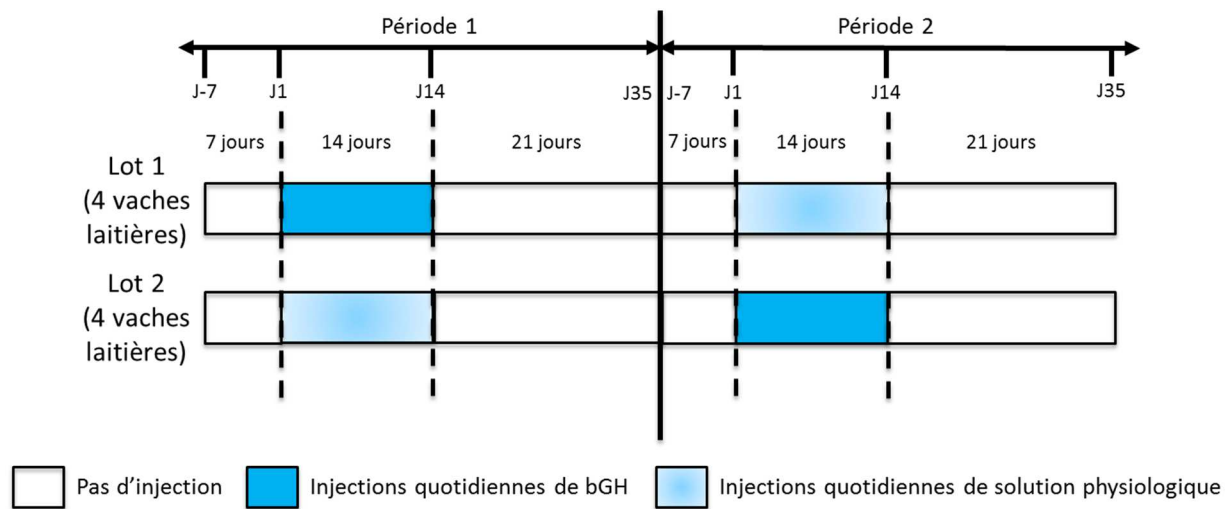
Cette 3<sup>ème</sup> partie se base sur les résultats de l'essai « **bGH** » et a pour objectif de déterminer si l'augmentation de la production laitière en réponse à un traitement à la bGH est associée à une diminution du taux d'exfoliation des CEM.

Ces travaux ont été réalisés au cours d'un séjour de 3 mois au Centre de recherche et de développement sur le bovin laitier et le porc (Agriculture et Agroalimentaire Canada, Sherbrooke, Canada) dans le cadre d'une collaboration entre l'équipe de Pierre Lacasse et de l'équipe Physiologie de la Lactation de l'UMR PEGASE. Ce séjour a été rendu possible grâce à l'obtention d'une bourse de mobilité sortante des doctorants du Collège Doctoral International de l'Université Européenne de Bretagne.



## RÉSUMÉ

Un traitement à l'hormone de croissance bovine (bGH) est connu, chez la vache laitière, pour engendrer une augmentation de la production laitière. Cette augmentation de la production laitière résulte d'une augmentation de l'activité métabolique des cellules épithéliales mammaires (CEM). L'augmentation de la production laitière est aussi due à une augmentation du nombre de CEM dans la glande mammaire, elle-même provenant d'un taux de prolifération plus élevé chez les vaches recevant de la bGH. Un moindre taux d'exfoliation pourrait aussi participer à l'augmentation de la production laitière en réponse à un traitement à la bGH. L'objectif de cette étude était d'étudier l'effet d'un traitement à la bGH sur le taux d'exfoliation des CEM. Huit vaches laitières Prim'Holstein ont été soumises à 2 traitements hormonaux selon un schéma expérimental en inversion de 2 périodes de 6 semaines : bGH (injection s. c. quotidienne de 25 mg de bGH) ou témoin (injection quotidienne de solution physiologique). Lors de la 1<sup>ère</sup> semaine, les vaches n'ont pas reçu d'injection. Lors de la 2<sup>ème</sup> et la 3<sup>ème</sup> semaine, les vaches ont été soumises aux traitements hormonaux. Enfin, les vaches n'ont pas reçu d'injection les 3 semaines suivantes. La production laitière a été mesurée quotidiennement. Des échantillons de lait ont été collectés avant le début, pendant et après la fin du traitement hormonal afin de déterminer le taux d'exfoliation par cytométrie de flux. Le traitement à la bGH a engendré une augmentation de la production laitière mais n'a pas eu d'effet sur le taux d'exfoliation. Après la fin du traitement hormonal, la production des vaches ayant reçu les injections de bGH a diminué pour retrouver le niveau de production des vaches témoins. Cette diminution de production laitière a été associée à une augmentation de 66 % du taux d'exfoliation. En conclusion, le processus d'exfoliation ne participerait pas à l'augmentation de la production laitière en réponse au traitement à la bGH mais pourrait participer à la diminution du nombre de CEM dans le tissu mammaire et de la production laitière après la fin du traitement hormonal.



**Figure 1 :** Schéma expérimental de l'essai « bGH ».

Huit vaches laitières ont été séparées en 2 lots et soumises à 2 traitements hormonaux selon un schéma expérimental en inversion de 2 périodes de 42 jours chacune. La 1<sup>ère</sup> période a débuté par une semaine (J-7 à J-1) lors de laquelle aucune vache n'a reçu d'injection. Puis, lors de la semaine suivante (J1 à J14), les vaches du 1<sup>er</sup> lot ont reçu une injection quotidienne de 25 mg d'hormone de croissance bovine (bGH) tandis que les vaches du 2<sup>nd</sup> lot ont reçu une injection quotidienne de solution physiologique. Durant les 3 dernières semaines de la 1<sup>ère</sup> période, aucune vache n'a reçu d'injection. La 2<sup>ème</sup> période était identique à la 1<sup>ère</sup> à la seule différence que les traitements hormonaux ont été inversés.



## INTRODUCTION

Chez la vache laitière, un traitement à l'hormone de croissance bovine (**bGH**) engendre une augmentation de la production laitière. Cette augmentation de la production laitière est en partie expliquée par l'effet stimulateur de la bGH sur les deux déterminants de la production laitière, à savoir l'activité métabolique des cellules épithéliales mammaire (**CEM**, Boutinaud et al., 2002, 2003) et le nombre de CEM dans la glande mammaire. L'augmentation du nombre de CEM dans la glande mammaire est indiquée par l'augmentation du poids des mamelles et du nombre d'alvéoles mammaires, ainsi que par l'augmentation de la quantité d'ADN dans le tissu mammaire (Knight et al., 1990; Baldi et al., 2002; Boutinaud et al., 2003). Cet effet résulterait d'une augmentation du taux de prolifération cellulaire (Capuco et al., 2001). Il a récemment été montré que le processus d'exfoliation participait, avec l'équilibre entre la prolifération et la mort cellulaire, à la régulation du nombre de CEM dans la glande mammaire et donc aux variations de production laitière (Herve et al., 2016). L'augmentation de la production laitière observée chez des vaches laitières recevant un traitement à la bGH pourrait aussi être expliquée par un taux d'exfoliation moins élevé chez ces animaux. L'objectif de cette étude est donc d'étudier l'effet d'un traitement à la bGH sur le taux d'exfoliation des CEM dans le lait chez la vache laitière et de déterminer s'il y a un lien entre le taux d'exfoliation et la production laitière en réponse à un traitement à la bGH.

## MATERIEL ET METHODES

### *Animaux et schéma expérimental*

L'essai a été mené à la ferme expérimentale du Centre de recherche et de développement sur le bovin laitier et le porc (Agriculture et Agroalimentaire Canada, Sherbrooke, Canada). Huit vaches laitières Prim'Holstein ont été séparées en 2 lots de 4 animaux et ont été soumises à 2 traitements hormonaux selon un schéma expérimental en inversion de 2 périodes de 6 semaines (**Figure 1**). Lors de la 1<sup>ère</sup> semaine (J-7 à J-1) aucune vache n'a reçu d'injection. Les traitements hormonaux ont débuté lors du J1. Le premier lot de vaches a alors reçu une injection s. c. quotidienne de 25 mg de bGH (traitement bGH) pendant 14 jours (J1 à J14) tandis que dans le même temps, les vaches du 2<sup>nd</sup> lot ont reçu une injection quotidienne de solution physiologique (traitement témoin). Les 3 semaines



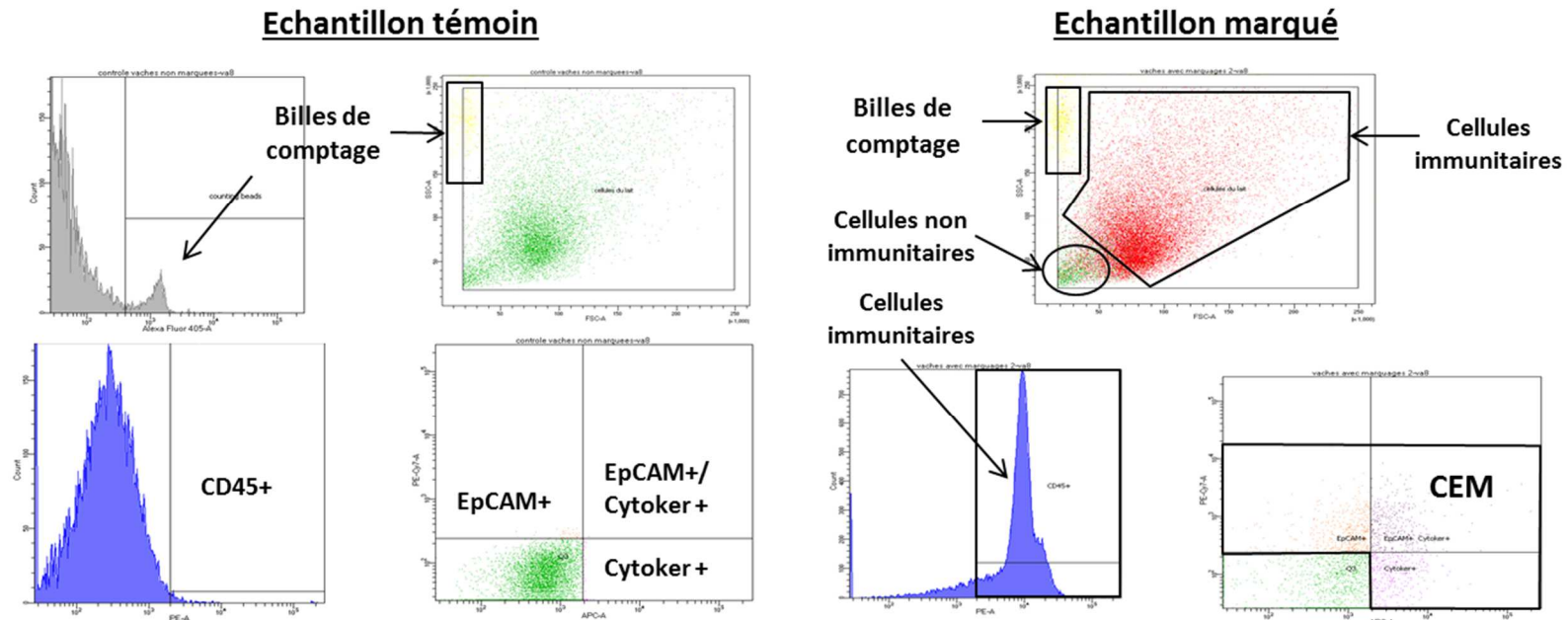
suivantes (J15 à J35) correspondaient à une période sans traitement lors de laquelle aucune vache n'a reçu d'injection. Puis, lors de la deuxième période, les traitements étaient identiques mais les traitements hormonaux ont été inversés ; les vaches du 1<sup>er</sup> lot recevant une injection quotidienne de solution physiologique et les vaches du 2<sup>nd</sup> lot recevant une injection quotidienne de bGH pendant les 14 jours de traitement. Les vaches ont été traitées 2 fois/jour à 8h00 et 20h00 et la production laitière de chaque vache a été mesurée quotidiennement.

### ***Analyse de la composition du lait***

Des échantillons de lait ont été prélevés avant le début (J-1), pendant (J2, J4, J7, J9 et J11) et après la fin (J15, J22, J29, J35) des traitements hormonaux lors de chacune des 2 périodes. Ces échantillons de lait ont permis d'analyser le TB, le TP et la concentration de lactose (Valacta, Sainte-Anne-de-Bellevue, QC, Canada).

### ***Identification et dénombrement des différents types de cellules somatiques du lait***

Des échantillons de lait (20 mL) ont été prélevés pendant (J2, J4, J7 et J11) et après la fin des traitements hormonaux (J15, J22, J29) lors de chacune des 2 périodes afin d'identifier et de dénombrer les cellules somatiques du lait par cytométrie de flux. Les échantillons de lait ont dans un premier temps été dilués au ½ dans du tampon phosphate (phosphate-buffered saline, **PBS**) puis centrifugés à 1000 x *g* et à température ambiante pendant 15 min. Après élimination de la crème et du lait écrémé, le culot de cellules somatiques a été lavé dans 15 mL de PBS contenant 1 % d'albumine sérique bovine (Bovine Serum Albumin, **BSA**) et 2 % de sérum de chèvre (Normal Goat Serum, **NGS**) puis centrifugé à 500 x *g* et à 4°C pendant 10 min à 2 reprises. La suspension cellulaire a ensuite été incubée avec 10 µL d'anticorps anti-CD45 de bovin (clone CACTB51A, Washington State University monoclonal antibody center, Pullman, WA, USA) et 5 µL d'anticorps anti-epithelial cell adhesion molecule (**EpCAM**, clone 9C4, Cedarlane Laboratories, Burlington, ON, Canada) humain couplé au fluorochrome PE/Cy7 à 4°C et à l'abri de la lumière pendant 20 min. Après un lavage dans du PBS-1 % BSA-2 % NGS, la suspension cellulaire a été incubée avec 200 µL d'anticorps secondaire anti-IgG2a de souris couplé au fluorochrome PE (Southern Biotech, Birmingham,



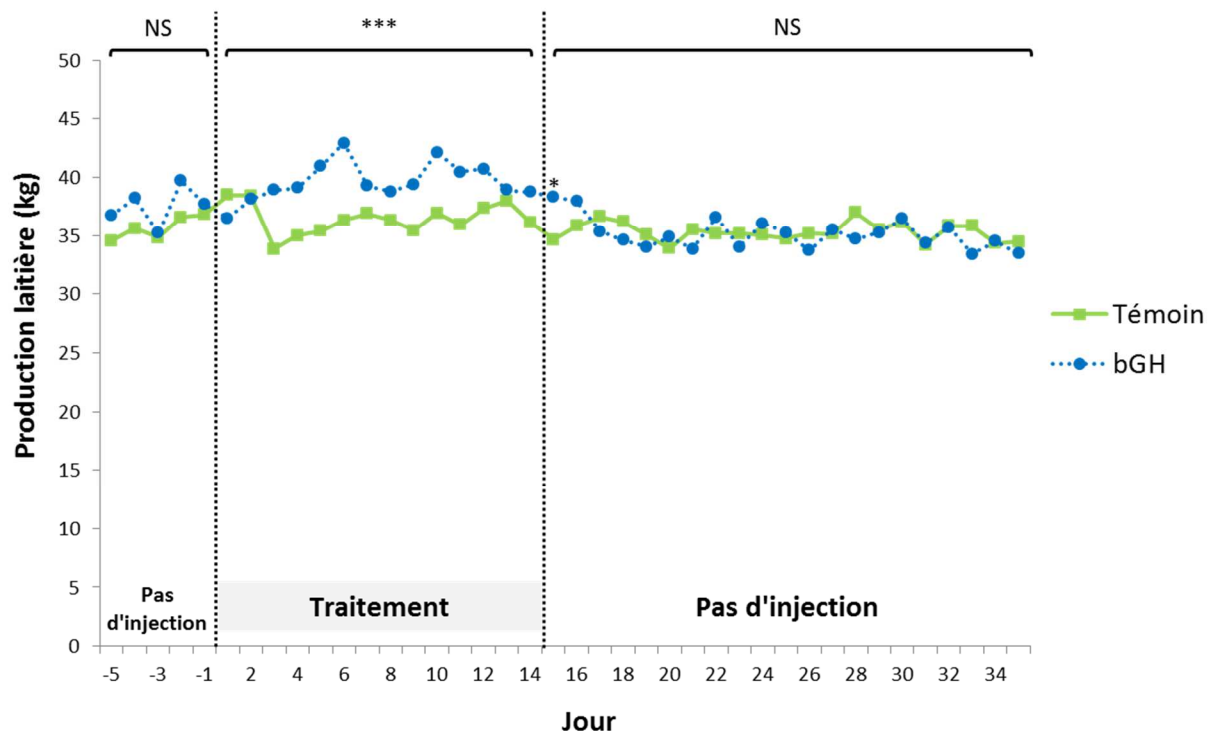
**Figure 2 :** Représentation schématique de la méthode d'identification et de dénombrement des différents types de cellules somatiques du lait par cytométrie de flux.

Les cellules somatiques ont été collectées à partir du lait frais puis ont été marquées avec un anticorps primaire anti-CD45 et un anticorps secondaire anti-IgG2a de souris couplé au fluorochrome PE, un anticorps anti-EpCAM couplé au fluorochrome PE/Cy7 et un anticorps anti-cytokératines 4, 5, 6, 8, 10, 13 et 18 couplé au fluorochrome Alexafluor 647. Les cellules marquées avec l'anticorps anti-CD45 (CD45+) correspondent aux cellules immunitaires alors que les cellules marquées avec l'anticorps anti-EpCAM (EpCAM+), avec l'anticorps anti-cytokératines (Cytoker+) ou avec les deux anticorps (EpCAM+/Cytoker+) correspondent aux cellules épithéliales mammaires (CEM).

AL, USA) à 4°C et à l'abri de la lumière pendant 20 min. Après un nouveau lavage dans du PBS-1 % BSA-2 % NGS, la suspension cellulaire a été incubée dans 200 µL de paraformaldéhyde 4 % à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 30 min afin de fixer les cellules somatiques, puis incubée dans 200 µL de PBS-1 % BSA-2 % NGS contenant 1 % de Triton à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 30 min afin de perméabiliser les cellules somatiques. Enfin, après un lavage dans du PBS-1 % BSA-2 % NGS- 1% Triton, les cellules ont été incubées avec 2,5 µL d'anticorps anti-cytokératines 4, 5, 6, 8, 10, 13 et 18 (clone C-11, Biolegend, San Diego, CA, USA) couplé au fluorochrome Alexafluor 647. Pour chaque échantillon, un témoin négatif a été réalisé en procédant selon le même protocole à l'exception qu'aucun anticorps n'a été ajouté. Après un dernier lavage et l'ajout de 10 µL de billes de comptage (CountBrite Absolute counting beads, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), l'identification et le dénombrement des cellules somatiques du lait ont été réalisés à l'aide d'un cytomètre de flux (BD FACSCANTO II, BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Le forward scatter, le side scatter et les intensités de fluorescence ont été enregistrés. Les données ont été analysées à l'aide du logiciel BD FACSDiva (BD Biosciences) et le nombre de chaque type cellulaire a été déterminé après soustraction de la fluorescence de l'échantillon témoin négatif (**Figure 2**), permettant d'estimer la concentration en CEM dans le lait puis le taux d'exfoliation prenant en compte la quantité de lait produit par jour. Les cellules marquées avec l'anticorps anti-CD45 (CD45+) correspondent aux cellules immunitaires alors que les cellules marquées avec l'anticorps anti-EpCAM (EpCAM+), avec l'anticorps anti-cytokératines (Cytoker+) ou avec les deux anticorps (EpCAM+/Cytoker+) correspondent aux cellules épithéliales mammaires (CEM).

### ***Analyses statistiques***

Les données ont été analysées par analyse de variance en utilisant la procédure MIXED pour données répétées de SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Le jour de prélèvement a été défini comme le paramètre répété et la vache comme l'individu répété. Les effets du jour et du traitement hormonal ainsi que l'interaction jour x traitement ont été testés. Les données obtenues avant le début du traitement hormonal (J-1) ont été utilisées en covariable.



**Figure 3 :** Production laitière de vaches laitières (n=8) avant, pendant et après un traitement à l'hormone de croissance bovine (bGH) de 14 jours.

Pendant les 7 premiers jours, aucune vache n'a reçu d'injection. Puis, les vaches ont reçu des injections quotidiennes de bGH ou de solution physiologique pendant 14 jours. Enfin, aucune vache n'a reçu d'injection les 21 jours suivants.

Les données présentées correspondent aux moyennes estimées par le modèle statistique. Les moyennes statistiquement différentes sont indiquées par \* pour  $P < 0,05$  et par \*\*\* pour  $P < 0,001$ . Les moyennes statistiquement identiques sont indiquées par NS.

**Tableau 1 :** Composition du lait de vaches laitières (n=8) pendant et après un traitement à l'hormone de croissance bovine (bGH) de 14 jours.

		Traitement		SEM	P-value
		Témoin	bGH		Traitement
Taux butyreux (g/kg)	Pendant	40,3	41,4	0,05	0,23
	Après	41,0	42,0	0,09	0,43
Taux protéique (g/kg)	Pendant	34,7	34,2	0,02	0,18
	Après	34,7	35,3	0,02	0,11
Concentration en lactose (g/kg)	Pendant	4,5	4,6	0,01	0,58
	Après	4,5	4,6	0,02	0,88

## RESULTATS

### ***Production laitière et composition du lait***

La production laitière des vaches traitées à la bGH a été plus élevée que celle des vaches témoins à partir de 3 jours après le début du traitement hormonal ( $P < 0,001$ ). En moyenne pendant la période de traitement hormonal, les vaches traitées à la bGH ont produit 3,2 kg de lait de plus par jour que les vaches témoins, ce qui représente une augmentation de la production laitière de 9 % ( $P < 0,001$ , **Figure 3**). Puis, seulement 2 jours après la fin du traitement, la production laitière des vaches traitées à la bGH était identique à la production laitière des vaches témoins. Le traitement à la bGH n'a affecté la composition du lait ni pendant ni après la fin du traitement hormonal (**Tableau 1**).

### ***Cellules somatiques dans le lait***

Le traitement à la bGH n'a affecté ni la concentration ni le nombre des différents types de cellules dans le lait à l'exception d'une tendance à augmenter le nombre de cellules CD45+ dans le lait ( $P = 0,08$ , **Tableau 2**).

Après la fin du traitement hormonal, le nombre de cellules CD45+ a eu tendance à être plus élevé chez les vaches ayant reçu les injections de bGH ( $P = 0,07$ , **Tableau 2**). Les injections de bGH ont aussi induit une augmentation de la concentration en cellules Cytoker+ après la fin du traitement hormonal ( $P < 0,05$ , **Tableau 2**), entraînant une augmentation de 66 % du nombre de cellules Cytoker+ ( $P < 0,05$ , **Tableau 2**). Cependant, aucune variation de la concentration ou du nombre de cellules EpCAM+ et EpCAM+/Cytoker+ n'a été observé ( $P > 0,10$ , **Tableau 2**).

## DISCUSSION

Dans la glande mammaire de vache laitière, les CEM représentent le type cellulaire majoritaire. Parmi ces cellules épithéliales, sont retrouvées des cellules souches bipotentes (capables de se différencier en CEM ou en cellule myoépithéliale), des cellules progénitrices luminales et des CEM différenciées (Rauner et Barash, 2012). Ces 3 types cellulaires sont aussi retrouvés dans le lait, notamment chez la femme (Hassiotou et Hartmann, 2014). Dans

**Tableau 2 :** Concentration et nombre des différents types de cellules somatiques dans le lait de vaches laitières (n=8) pendant et après un traitement à l'hormone de croissance bovine (bGH) de 14 jours.

		Traitement		SEM	P-value
		Témoin	bGH		Traitement
Concentration en cellules CD45+ (cellules/mL)	Pendant	52 959	195 392	83680	0,27
	Après	42 504	68 674	14742	0,25
Concentration en cellules EpCAM+ (cellules/mL)	Pendant	8 593	5 316	4232,1	0,6
	Après	4 278	3 996	311,3	0,54
Concentration en cellules Cytoker+ (cellules/mL)	Pendant	4 652	6 814	1270,6	0,27
	Après	402	755	93,6	< 0,05
Concentration en cellules EpCAM+/Cytoker+ (cellules/mL)	Pendant	1 335	1 314	190,8	0,94
	Après	820	1 111	154,7	0,23
Concentration en CEM (cellules/mL)	Pendant	14 580	13 445	4888,2	0,87
	Après	5 501	5 862	350,5	0,49
Nombre de cellules CD45+ (Log <sub>10</sub> /jour)	Pendant	9,0	9,4	0,16	0,08
	Après	8,9	9,3	0,12	0,07
Nombre de cellules EpCAM+ (Log <sub>10</sub> /jour)	Pendant	8,1	8,0	0,12	0,59
	Après	8,1	8,1	0,04	0,96
Nombre de cellules Cytoker+ (Log <sub>10</sub> /jour)	Pendant	7,9	8,1	0,08	0,18
	Après	7,1	7,3	0,06	< 0,05
Nombre de cellules EpCAM+/Cytoker+ (Log <sub>10</sub> /jour)	Pendant	7,6	7,7	0,06	0,22
	Après	7,4	7,4	0,08	0,56
Nombre de CEM (Log <sub>10</sub> /jour)	Pendant	8,5	8,6	0,10	0,64
	Après	8,2	8,3	0,03	0,33
Pourcentage de CEM (%)	Pendant	20,9	13,4	3,02	0,13
	Après	17,0	8,4	2,51	0,05



cette étude, nous avons identifié les CEM exfoliées dans le lait par cytométrie de flux à l'aide de 2 anticorps, à savoir un anticorps anti-EpCAM et un anticorps anti-cytokératines 4, 5, 6, 8, 10, 13 et 18. La protéine EpCAM est exprimée sur les cellules progénitrices. De plus, la perte de l'expression de EpCAM s'est révélée être corrélée avec une baisse de l'activité progénitrice (Stingl et al., 2001). Perruchot et al. (2016) ont alors émis l'hypothèse que les CEM différenciées et matures n'expriment pas la protéine EpCAM. Au contraire, les CEM différenciées et matures présentent des cytokératines, protéines du cytosquelette, et notamment les cytokératines 8 et 18 qui leur sont spécifiques (Péchoux et al., 1999; Shehata et al., 2012; Hassiotou et Hartmann, 2014). Le lignage des CEM bovines n'est pas totalement établi et constitue un domaine de recherche en plein essor. Nous avons malgré tout fait l'hypothèse que notre technique d'identification des CEM par cytométrie de flux permettait d'identifier les CEM progénitrices (cellules EpCAM+), les CEM en cours de différenciation (cellules EpCAM+/Cytoker+) et les CEM différenciées et matures (cellules Cytoker+) afin d'estimer le taux d'exfoliation des CEM en réponse à un traitement à la bGH.

Conformément aux résultats de nombreuses études dans lesquelles l'effet galactopoïétique de la bGH a été décrit chez les ruminants laitiers (Bauman, 1999; Baldi et al., 2002; Boutinaud et al., 2002, 2003), dans notre étude le traitement à la bGH a bien induit une augmentation de la production laitière. En effet, pendant la période de traitement hormonal, les vaches ayant reçu les injections de bGH ont produit en moyenne 9 % de lait en plus par jour. La composition du lait était identique chez les vaches traitées à la bGH et chez les vaches témoins, ce qui est cohérent avec les résultats d'études précédentes qui ont montré que la composition du lait n'était pas modifiée en réponse à un traitement à la bGH (Bauman, 1992; Laurent et al., 1992; Bauman, 1999). Contrairement à notre hypothèse, le traitement à la bGH n'a pas eu d'effet sur le taux d'exfoliation des CEM. Ce résultat montre que le processus d'exfoliation ne participe pas à l'augmentation du nombre de CEM dans le tissu mammaire et de la production laitière en réponse à un traitement à la bGH. Cette augmentation du nombre de CEM résulterait seulement d'une augmentation du taux de prolifération puisque la bGH est connue pour son action proliférative (Capuco et al., 2001). Cependant, il est intéressant de noter que seulement 2 jours après la fin du traitement, la production laitière des vaches ayant reçu les injections de bGH a diminué pour retrouver un niveau identique à celui des vaches témoins. Cette diminution de production laitière a été



associée à une augmentation du taux d'exfoliation des CEM différenciées et matures (les cellules Cytoker+) de 66 %. Le processus d'exfoliation pourrait donc participer à la diminution du nombre de CEM dans le tissu mammaire et de la production laitière après la fin d'un traitement à la bGH.

### **CONCLUSION**

Les résultats de cette étude montrent que l'augmentation de la production laitière en réponse à un traitement à la bGH n'est pas associée à une diminution du taux d'exfoliation des CEM. Cependant, après la fin du traitement à la bGH, le retour à un niveau de production laitière identique à celui des vaches témoins, résulterait en partie de la perte de CEM via le processus d'exfoliation chez les vaches ayant été précédemment traitées.

### **REMERCIEMENTS**

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une mobilité doctorale, rendu possible grâce à l'appui financier de l'Université Européenne de Bretagne (Rennes, France). Je remercie Pierre Lacasse et Izabella Thompson pour m'avoir donné la possibilité de travailler sur ce projet. Je remercie enfin Frédéric Beaudoin pour son aide lors de la mise au point et la réalisation de la technique d'identification et de dénombrement des CEM du lait par cytométrie de flux. Ces travaux ont reçu le soutien financier d'Agriculture et Agroalimentaire Canada (Ottawa, ON, Canada), du Conseil de Recherche en Science Naturel et Génie du Canada (Ottawa, ON, Canada) et des Producteurs Laitiers du Canada (Ottawa, ON, Canada).

### **REFERENCES**

L'ensemble des références du manuscrit sont disponibles dans la partie « Références bibliographiques ».



# Discussion



L'objectif de cette thèse était dans un premier temps d'identifier les mécanismes biologiques impliqués dans la régulation du processus d'exfoliation. Nous avons émis l'hypothèse que les hormones libérées à la traite, à savoir l'OT, la PRL et le cortisol pouvaient participer à la régulation de ce processus en modulant l'intégrité de l'épithélium mammaire. En effet, l'OT libérée à la traite induit la contraction des cellules myoépithéliales, qui pourrait à son tour induire une perte d'intégrité de l'épithélium et stimuler l'exfoliation des CEM. La PRL et le cortisol pourraient au contraire réduire la perméabilité de l'épithélium mammaire et limiter l'effet stimulateur de l'OT sur l'exfoliation des CEM. Afin de répondre à ce premier objectif, deux essais in vivo ont été menés (essais « **Suivi au cours de la traite** » et « **Rôle de l'OT** »). L'intégrité de l'épithélium mammaire a aussi été évaluée dans l'ensemble des essais de cette thèse.

Le deuxième objectif de la thèse était d'étudier le rôle du processus d'exfoliation dans la régulation du nombre de CEM dans la glande mammaire et son influence sur la production laitière chez la vache laitière. Nous avons émis l'hypothèse que le processus d'exfoliation participait, avec l'équilibre entre la prolifération cellulaire et l'apoptose, à la régulation du nombre de CEM et donc de la production laitière. D'après notre synthèse des données disponibles (Herve et al., 2016), les variations du taux d'exfoliation seraient opposées aux variations de production laitière, le taux d'exfoliation augmentant lorsque la production laitière diminue et inversement. Pour répondre à ce deuxième objectif, nous avons étudié l'effet de 5 facteurs susceptibles d'engendrer une variation de production laitière (une ration à base d'herbe, la restriction alimentaire, la photopériode, l'inhibition de la PRL et le traitement à la bGH) sur le taux d'exfoliation des CEM au travers de 4 essais (essais « **Nature du fourrage / Restriction 75 %** », « **Restriction 80 %** », « **Photopériode x Cabergoline** » et « **bGH** »).

Une première partie de la discussion sera consacrée aux limites méthodologiques liées à l'estimation du taux d'exfoliation. La deuxième partie traitera des mécanismes biologiques impliqués dans la régulation du processus d'exfoliation en discutant dans un premier temps de la régulation hormonale de ce processus puis, dans un deuxième temps, du lien entre exfoliation et intégrité de l'épithélium mammaire. La troisième partie sera dédiée à la mise en perspective des résultats nouvellement obtenus au cours de cette thèse concernant le rôle du processus d'exfoliation dans la régulation du nombre de CEM dans la





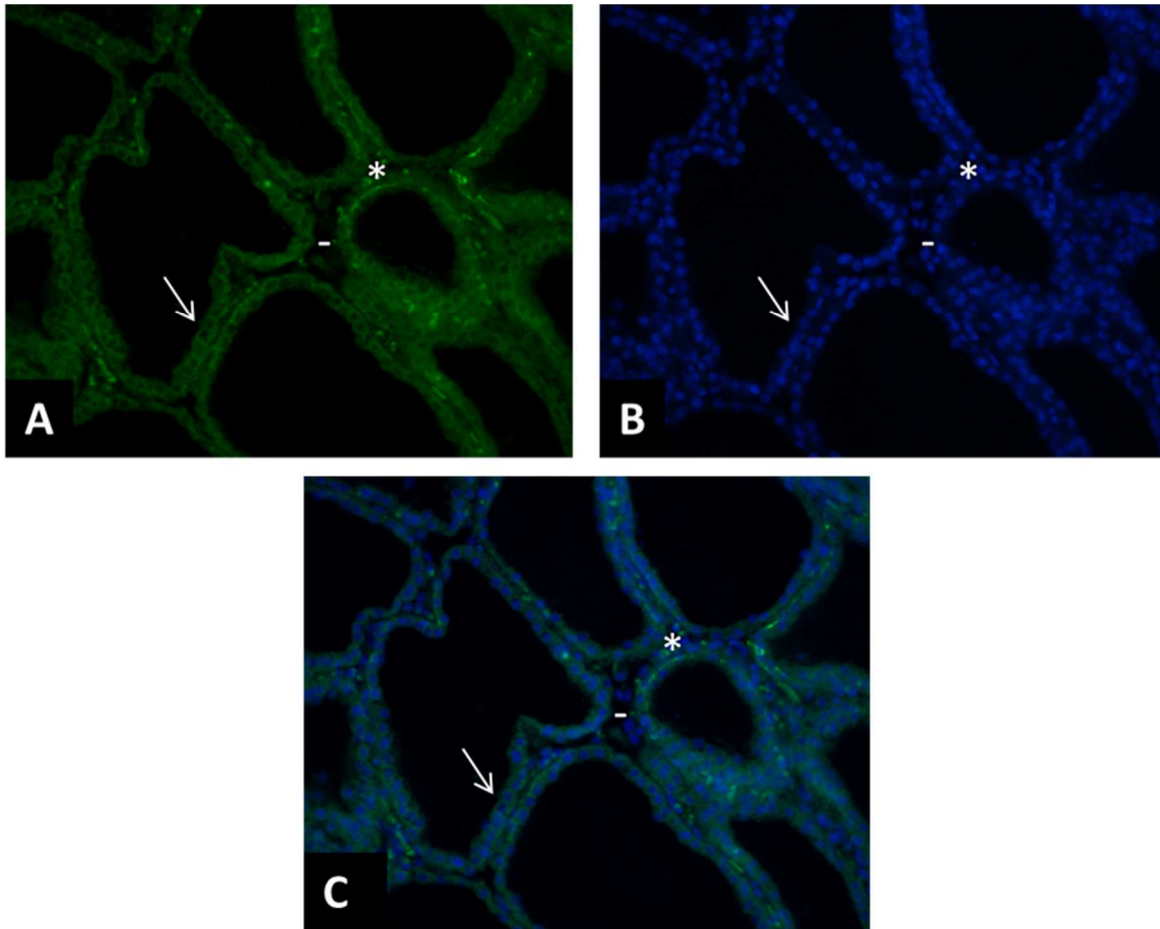
glande mammaire et son influence sur la production laitière. Enfin, l'utilisation potentielle du taux d'exfoliation comme marqueur phénotypique de la persistance de la lactation sera discutée dans une dernière partie.

## **1. Limites méthodologiques de l'estimation du taux d'exfoliation**

### **1.1. Les techniques d'estimation du taux d'exfoliation**

Au cours de cette thèse, afin d'étudier le processus d'exfoliation des CEM, il a été nécessaire d'estimer le taux d'exfoliation et donc de mesurer la concentration en CEM dans le lait. Pour cela, deux méthodes différentes ont été utilisées. La méthode de purification des CEM du lait par immuno-séparation magnétique a été utilisée dans les essais réalisés à l'INRA et la méthode d'identification et de dénombrement des CEM du lait par cytométrie de flux a été utilisée dans l'étude réalisée à Agriculture et Agroalimentaire Canada. Dans la technique d'immuno-séparation magnétique, les cellules somatiques sont incubées avec des billes magnétiques couplées à un anticorps dirigé contre les cytokératines 1, 5, 10 et 14. Les cellules liées au complexe bille/anticorps sont purifiées en plaçant les échantillons sur un portoir magnétique et en aspirant le surnageant contenant les cellules immunitaires. La concentration en CEM dans le lait est ensuite déterminée à l'aide d'un compteur automatique de cellules. Dans la technique d'identification et de dénombrement des CEM du lait par cytométrie de flux, les cellules somatiques sont incubées avec un anticorps dirigé contre la protéine EpCAM et un anticorps dirigé contre les cytokératines 4, 5, 6, 8, 10, 13 et 18. La concentration en CEM dans le lait est ensuite mesurée par cytométrie de flux à l'aide de billes de comptage.

Avec la technique d'immuno-séparation magnétique, il n'est possible d'utiliser qu'un seul anticorps pour identifier les CEM. Il est donc nécessaire que cet anticorps soit choisi pour être spécifique de ces cellules. Dans la plupart des études dans lesquelles les CEM ont été purifiées à partir du lait de vache par immuno-séparation magnétique, l'anticorps utilisé était dirigé contre la cytokératine 8 (Boutinaud et al., 2008, 2012, Sigl et al., 2012, 2014; Wang et al., 2014), une protéine du cytosquelette spécifique des CEM (Hassiotou et Hartmann, 2014). Au cours de cette thèse, du fait d'un arrêt de la commercialisation de cet anticorps, nous avons utilisé un anticorps dirigé contre les cytokératines 1, 5, 10 et 14. La cytokératine 1 est exprimée dans des tissus comme l'épiderme mais son expression n'a pas



**Figure 1** : Photographie de coupe de glande mammaire de vache laitière en lactation marquée à l'aide de l'anticorps anti-cytokératines 1, 5, 10 et 14 (photo A), de 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI, photo B) ou double marqué (photo C) analysée par microscopie optique (Boutinaud et al., 2015).

L'anticorps marque les cellules épithéliales mammaires (↘) mais un marquage de cellules dans la partie basale de l'épithélium mammaire pouvant correspondre à des cellules myoépithéliales a aussi été observé (\*). La majorité des cellules stromales ne sont pas marquées par l'anticorps (-).

été mise en évidence dans la glande mammaire (Moll et al., 1982). La cytokératine 5 est spécifique des cellules souches et progénitrices (Hassiotou et Hartmann, 2014) et les cytokératines 10 et 14 sont spécifiques des cellules myoépithéliales (Hassiotou et Hartmann, 2014). Ceci laisserait à penser que l'anticorps que nous avons utilisé n'est pas approprié pour purifier spécifiquement les CEM. Cependant, cet anticorps a été utilisé dans différentes études pour analyser l'expression de gènes impliqués dans la synthèse des constituants du lait et a montré des résultats cohérents avec l'expression de ces mêmes gènes dans les biopsies mammaires. Ces résultats suggèrent que cet anticorps permet bien de purifier les CEM. De plus, à l'aide d'un marquage immunohistochimique sur des coupes de tissu mammaire de vache laitière en lactation, Boutinaud et al. (2015) ont montré que cet anticorps marquait les CEM (**Figure 1**). Un marquage de cellules qui correspondraient à des cellules myoépithéliales dans la partie basale de l'épithélium mammaire a aussi été observé. Cependant, la majorité des cellules stromales n'étant pas marquée, nous considérons que cet anticorps est approprié pour la purification des CEM du lait. Dans la technique par cytométrie de flux, nous avons marqué les cellules avec deux anticorps. Ceci nous a ainsi permis d'identifier différents types de CEM présentes dans le lait, les cellules progénitrices et les cellules différenciées et matures. En effet, l'anticorps dirigé contre la protéine EpCAM est spécifique des cellules progénitrices. Le deuxième anticorps est dirigé contre plusieurs cytokératines dont les cytokératines 8 et 18 qui sont spécifiques des CEM matures (Hassiotou et Hartmann, 2014).

La technique d'immuno-séparation magnétique nécessite un échantillon de lait d'un volume important (1,8 kg) ce qui en fait une méthode très longue à réaliser. En effet, plus le volume de lait de l'échantillon est important, plus le nombre de centrifugations est élevé. De plus, cette technique doit être réalisée sur un échantillon de lait frais, le plus rapidement possible, afin de limiter la mort cellulaire qui se produit après le prélèvement. Cela a pour conséquence de limiter à 10 le nombre d'échantillons qu'il est possible de traiter par jour et de limiter le nombre de mesures sur une même vache. C'est pourquoi dans les différents essais dans lesquels cette technique a été utilisée, le taux d'exfoliation a été estimé 1 fois (essai « **Nature du fourrage / Restriction 75 %** »), 2 fois (essai « **Photopériode x Cabergoline** »), ou 3 fois (essai « **Restriction 80 %** ») par vache alors que la production laitière a été mesurée quotidiennement. Dans la technique par cytométrie de flux, la



quantité de lait utilisée est bien moindre (20 mL), ce qui nous a permis d'estimer le taux d'exfoliation 5 fois par vache pendant le traitement à la bGH (dans l'essai « bGH »). Cette différence de volume de lait par échantillon réside dans le fait que la technique d'immuno-séparation magnétique permet de déterminer la concentration en CEM dans le lait mais aussi de purifier les CEM afin de réaliser des analyses complémentaires telles que la mesure des pourcentages des CEM viables et apoptotiques et l'analyse des transcrits mammaires. En effet, les CEM purifiées sont une source d'ARNm pour l'étude du fonctionnement de la glande mammaire (Boutinaud et al., 2015). Bien que la technique d'immuno-séparation magnétique demande beaucoup de temps, elle présente l'avantage considérable de nous avoir permis d'étudier l'activité métabolique des CEM de façon non invasive et en dynamique grâce à des prélèvements de lait répétés et rapprochés dans le temps. Ces prélèvements n'endommagent pas le tissu mammaire, ne perturbent pas le fonctionnement de la glande mammaire et nous ont notamment permis de mettre en évidence que l'inhibition de la PRL par l'injection de cabergoline induit une diminution de l'activité métabolique des CEM. Ce type d'étude en dynamique est limité lorsque les biopsies mammaires sont utilisées comme source de transcrits mammaires. Contrairement à la technique d'immuno-séparation magnétique, l'analyse par cytométrie de flux permet seulement de mesurer la concentration cellulaire et d'estimer le taux d'exfoliation des CEM. Il serait cependant possible, avec cette technique, d'identifier, de trier et de collecter les différents types de CEM en utilisant un cytomètre de type FACS (Fluorescence-activated cell sorting) afin de réaliser ces analyses complémentaires sur les CEM. Plusieurs techniques de cytométrie ont aussi été mises au point afin d'identifier les différents types de cellules immunitaires dans le lait (Li et al., 2015; Lanctôt et al., 2017). Il serait possible de combiner les anticorps utilisés dans les différentes techniques de cytométrie afin de caractériser simultanément tous les types de cellules somatiques (immunitaires et épithéliales). Cette technique pourrait alors permettre d'étudier à la fois l'influx de cellules immunitaires et la perte de CEM par exfoliation lors d'une mammite ou au cours de l'involution mammaire.

***Les deux techniques utilisées au cours de cette thèse permettent d'estimer le taux d'exfoliation des CEM mais chacune présente des avantages et des inconvénients. La méthode d'immunoséparation magnétique permet de purifier les CEM et de réaliser des analyses complémentaires telles que l'analyse de l'expression des gènes. La méthode par***



*cytométrie de flux, plus rapide et nécessitant un échantillon de lait moins important, pourrait être utilisée à plus grande échelle pour le phénotypage du taux d'exfoliation en élevage.*

## **1.2. Le taux d'exfoliation, un paramètre très variable**

Au travers des essais menés au cours de cette thèse, nous avons étudié le taux d'exfoliation de vaches laitières qui se trouvaient toutes au même stade de lactation, c'est-à-dire après le pic de lactation (à 76 jours de lactation en moyenne). Le taux d'exfoliation de ces vaches laitières était en moyenne de 235 millions de CEM exfoliées par jour, mais variait de 14 à 1380 millions. Nous avons donc observé que le taux d'exfoliation est un paramètre présentant une forte variabilité interindividuelle. Cette forte variabilité interindividuelle pourrait masquer les effets et expliquer des différences entre essais, et notamment la différence d'effet de la restriction alimentaire sur le taux d'exfoliation dans les essais « **Nature du fourrage / Restriction 75 %** » et « **Restriction 80 %** ». Dans le premier essai, au cours duquel le taux d'exfoliation a été mesuré une seule fois au bout de 15 jours de restriction, la restriction alimentaire a engendré une diminution de la production laitière sans variation du taux d'exfoliation. Dans le deuxième essai, le taux d'exfoliation a été mesuré à trois reprises (5, 9 et 27 jours après le début de la restriction). Si nous analysons les données jour par jour, la restriction alimentaire n'a pas d'effet significatif sur l'exfoliation aux jours 5 et 27 et tend à augmenter l'exfoliation au jour 9. Néanmoins, lorsque l'analyse statistique des données des 3 jours est réalisée en mesures répétées, l'effet global sur la période de restriction est significatif. Grâce aux prélèvements répétés, nous avons donc pu mettre en évidence que la diminution de la production laitière en réponse aux 4 semaines de restriction alimentaire était accompagnée d'une augmentation du taux d'exfoliation.

*Le taux d'exfoliation présentant une forte variabilité interindividuelle, il est nécessaire d'avoir un nombre de vaches élevé et/ou de multiplier les mesures sur une même vache lors de l'étude du processus d'exfoliation.*





## 2. Les mécanismes biologiques impliqués dans la régulation du processus d'exfoliation

### 2.1. L'exfoliation est sous contrôle des hormones libérées à la traite

Dans cette thèse, nous avons étudié la régulation du processus d'exfoliation au moment de la traite (Partie Résultats – Chapitre 1) dans le but d'étudier le lien entre les décharges hormonales induites par la traite, l'intégrité de l'épithélium mammaire et l'exfoliation des CEM. Dans ce but, nous avons réalisé un suivi des décharges hormonales (OT, PRL et cortisol), de l'intégrité de l'épithélium mammaire et du taux d'exfoliation tout au long de la traite. Nous avons aussi étudié plus spécifiquement le rôle de l'OT dans la régulation de l'exfoliation en inhibant ou en induisant la contraction des cellules myoépithéliales, en injectant à des vaches laitières un antagoniste des récepteurs de l'OT (l'atosiban) ou une dose supra physiologique d'OT exogène. Le rôle de la PRL a aussi été étudié dans le cadre de l'inhibition de la sécrétion de la PRL par l'injection de cabergoline (Partie Résultats – Chapitre 2 – Partie 2).

#### ***L'ocytocine.***

Grâce au suivi du taux d'exfoliation au cours de la traite et à l'inhibition de l'action de l'OT, nous avons pu mettre en évidence qu'une partie des CEM était exfoliée dans le lait citernal (13 % dans l'essai « **Suivi au cours de la traite** » et 26 % dans l'essai « **Rôle de l'OT** »). Ces CEM pourraient avoir été exfoliées de l'épithélium lors de la traite précédente et s'être accumulées dans la citerne ou avoir été exfoliées entre 2 traites consécutives en l'absence de contraction des cellules myoépithéliales. Cependant, comme nous l'avons observé dans l'essai « **Suivi au cours de la traite** », la majorité des CEM exfoliées sont retrouvées dans le lait alvéolaire (en moyenne 87 %). Nous avons alors émis deux hypothèses quant aux mécanismes qui conduisent à la présence de ces CEM dans le lait alvéolaire. Notre première hypothèse est que les CEM sont exfoliées entre 2 traites consécutives, piégées dans la lumière alvéolaire, et récoltées avec le lait alvéolaire lors du réflexe d'éjection du lait. Dans le cas de cette première hypothèse, le processus d'exfoliation serait comparable au mécanisme d'éjection des globules gras. En effet, principalement en raison de la taille des CEM, la contraction des cellules myoépithéliales pourrait être nécessaire à leur transfert de la lumière alvéolaire à la citerne via les canaux mammaires. Nielsen et al. (2005) ont aussi émis l'hypothèse que les cellules somatiques (dont les CEM)



avaient des propriétés hydrophobes et donc qu'elles seraient éjectées de la lumière alvéolaire en même temps que les globules gras suite à la contraction des cellules myoépithéliales. Notre deuxième hypothèse est que les CEM collectées dans le lait alvéolaire se détachent de l'épithélium au moment de la traite en conséquence des forces mécaniques exercées sur l'épithélium et de la perte d'intégrité de l'épithélium mammaire, ces deux phénomènes étant induits par la libération d'OT à la traite. Cette hypothèse est appuyée par l'augmentation de la concentration en lactose plasmatique et du ratio  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  dans le lait au cours de la traite, montrant pour la première fois que la traite induit une perte d'intégrité de l'épithélium mammaire. Cette perte d'intégrité au moment de la traite est concomitante à l'exfoliation des CEM dans le lait alvéolaire. Cependant, au-delà de la concomitance des phénomènes, nous n'avons pas pu établir de corrélation entre la décharge d'OT, l'intégrité de l'épithélium mammaire et le taux d'exfoliation au cours de la traite. Néanmoins, une dose supra physiologique d'OT exogène est connue pour induire une perte d'intégrité de l'épithélium (Linzell et al., 1975; Allen, 1990; Werner-Misof et al., 2007; Wall et al., 2016). Cette perte d'intégrité d'épithélium en réponse à l'OT a été accompagnée, dans l'essai « **Rôle de l'OT** », d'une augmentation de l'exfoliation. De plus, lorsque l'injection d'OT est réalisée après une traite standard, non seulement plus de CEM sont exfoliées mais une plus grande proportion de ces CEM exfoliées est viable. Cela démontrerait que des CEM peuvent se détacher de l'épithélium en conséquence directe de la contraction des cellules myoépithéliales induites par l'OT et plaide en faveur de l'hypothèse d'une exfoliation massive induite au moment de la traite. Au contraire, en l'absence de l'action de l'OT, lors de la traite après l'injection d'atosiban, la perte d'intégrité n'est pas observée et le nombre de CEM exfoliées est moindre.

*Tous ces résultats montrent que l'OT est responsable d'une perte d'intégrité de l'épithélium au cours de la traite et qu'elle participe à la régulation du processus d'exfoliation par l'intermédiaire de la contraction des cellules myoépithéliales et de la modulation de l'intégrité de l'épithélium mammaire.*

Afin de confirmer que les CEM se détachent de l'épithélium suite à la contraction des cellules myoépithéliales et à la perte d'intégrité de l'épithélium induites par l'OT, il serait possible de réaliser une étude *ex vivo* sur des explants de tissu mammaire. En effet, nous pourrions incuber les explants de tissu mammaire avec de l'OT et observer l'exfoliation des



CEM par microscopie. L'étude de l'expression des gènes des protéines constitutives des jonctions serrées serait un moyen d'estimer l'intégrité de l'épithélium mammaire.

### ***La prolactine.***

Lors du suivi des décharges hormonales et du taux d'exfoliation au cours de la traite, la présence de CEM dans le lait a été observée simultanément à la décharge de PRL. Cette décharge de PRL pourrait participer à la régulation de l'exfoliation des CEM, étant donné que la PRL participe à la régulation de l'intégrité de l'épithélium mammaire. En effet, la PRL est connue pour stimuler la formation des jonctions serrées *in vitro* (Stelwagen et al., 1999) et pour diminuer la perméabilité de l'épithélium mammaire (Linzell et al., 1975; Flint et Gardner, 1994). Cependant, aucune corrélation entre la décharge de PRL, l'intégrité de l'épithélium et le taux d'exfoliation n'a été établie dans l'essai « **Suivi au cours de la traite** », ce qui suggère que la PRL ne participerait pas à la régulation du processus d'exfoliation des CEM au moment de la traite. L'effet de l'inhibition de la PRL sur l'exfoliation a été recherché utilisant des agonistes de la dopamine. Dans notre étude (essai « **Photopériode x Cabergoline** »), l'inhibition de la sécrétion de la PRL par la cabergoline n'a pas eu d'effet sur le taux d'exfoliation des CEM. Ce résultat est contradictoire avec celui de Lollivier et al. (2015) montrant que l'inhibition de la PRL par la quinagolide augmente le taux d'exfoliation. Dans cette thèse, nous avons utilisé une injection unique de cabergoline pour inhiber la sécrétion de PRL. La cabergoline avait déjà été utilisée pour inhiber la sécrétion de PRL au moment du tarissement, et il avait été rapporté qu'une seule injection de cabergoline était efficace pour inhiber la concentration basale de PRL (Bach et al., 2015; Boutinaud et al., 2016). Cet inhibiteur de la sécrétion de PRL n'avait jamais été testé au cours de la lactation chez la vache laitière. D'après nos résultats, une unique injection de cabergoline est en effet efficace pour diminuer la concentration basale de PRL au cours de la lactation. De plus, nous avons montré pour la première fois que la cabergoline inhibe la décharge de PRL au moment de la traite et ce jusqu'à 9 jours après l'injection. Ces deux agonistes de la dopamine semblent tous les deux inhiber la sécrétion de PRL, ce qui n'explique pas leurs effets différents sur l'exfoliation. De plus, une augmentation de l'exfoliation après traitement par la cabergoline a été montrée à un autre stade physiologique, le tarissement (Boutinaud et



al., 2017). Des études complémentaires sont nécessaires afin déterminer le rôle de la PRL dans la régulation du processus d'exfoliation.

### ***Le cortisol.***

Lors de l'essai « **Suivi au cours de la traite** », nous avons montré que la perte d'intégrité de l'épithélium mammaire induite par la traite est transitoire puisque la concentration en lactose plasmatique retrouve un niveau identique au niveau basal (avant le début de la traite) 25 min après la fin de la traite. Nous avons aussi observé que le pic de concentration de cortisol avait lieu après la fin de la traite. Etant donné que le cortisol est une hormone clé dans la régulation de l'intégrité de l'épithélium mammaire puisqu'il est nécessaire à la formation et au maintien des jonctions serrées (Zettl et al., 1992; Singer et al., 1994; Stelwagen et al., 1998), il pourrait participer à la restauration de l'intégrité de l'épithélium et ainsi limiter l'exfoliation après la fin de la traite. La corrélation négative entre la décharge de cortisol induite par la traite et le taux d'exfoliation des CEM conforte l'hypothèse du rôle inhibiteur du cortisol sur l'exfoliation des CEM.

***Les résultats de cette thèse suggèrent que le cortisol pourrait limiter l'exfoliation des CEM en restaurant l'intégrité de l'épithélium mammaire après la traite.***

Afin de confirmer le rôle du cortisol dans la régulation du processus d'exfoliation, il serait intéressant d'inhiber la sécrétion de cortisol au moment de la traite avec un inhibiteur tel que la métyrapone et au contraire d'amplifier l'effet du cortisol grâce à l'injection de cortisol exogène ou l'utilisation d'un analogue des glucocorticoïdes tel que la dexaméthasone, connue pour diminuer la perméabilité de l'épithélium mammaire (Zettl et al., 1992), et de mesurer le taux d'exfoliation en réponse à ces traitements. Si le rôle du cortisol est confirmé, le nombre de CEM exfoliées dans le lait devrait être augmenté lors de l'inhibition de la sécrétion du cortisol et au contraire diminué lors de l'injection de cortisol exogène ou de dexaméthasone.

## **2.2. L'exfoliation est-elle sous contrôle d'autres hormones ?**

La régulation hormonale de la fonction de lactation implique d'autres hormones, sécrétées ou non au moment de la traite, telles que l'IGF-I, l'insuline et la GH. Ces hormones,



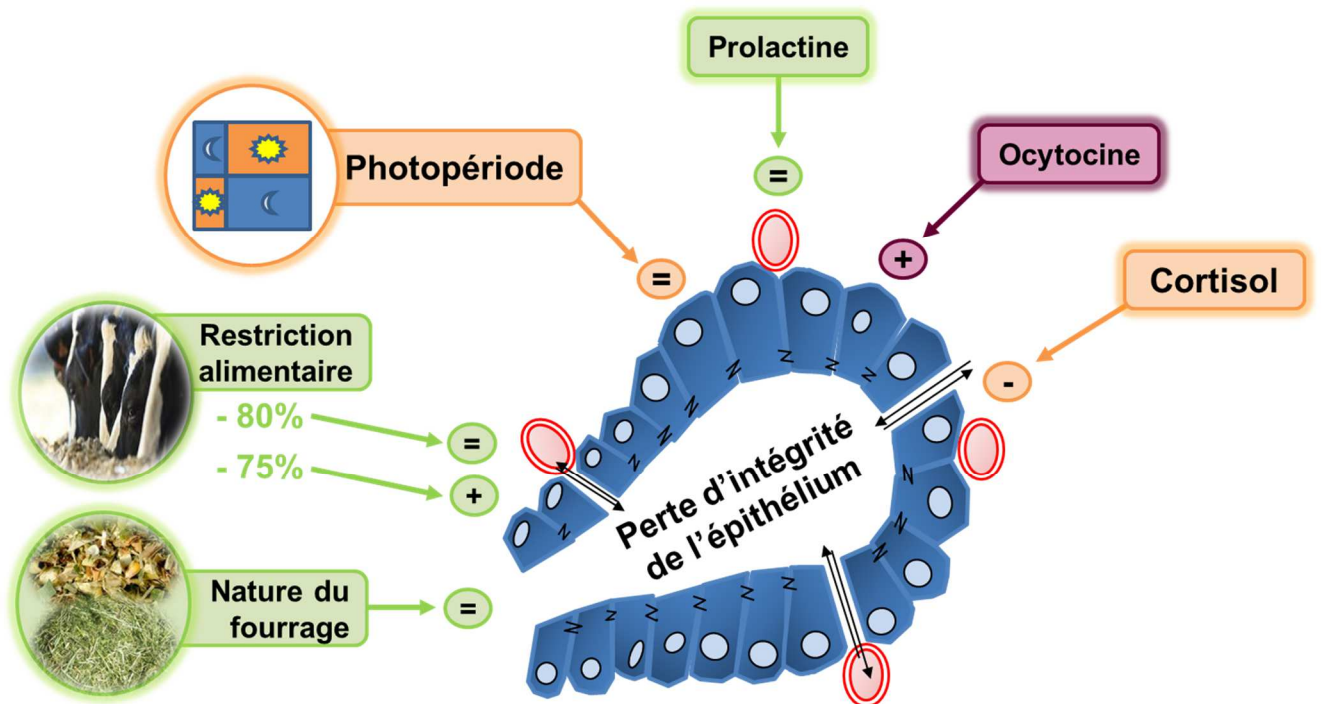


connues pour participer à la régulation du nombre de CEM dans le tissu mammaire en modulant l'équilibre entre la prolifération cellulaire et l'apoptose, pourraient participer à la régulation du processus d'exfoliation.

En réponse à une restriction alimentaire dans l'essai « **Restriction 80 %** », le taux d'exfoliation a augmenté. Cette augmentation du taux d'exfoliation a été accompagnée d'une diminution des concentrations plasmatiques d'IGF-I et d'insuline chez les vaches restreintes. Etant donné que l'IGF-I joue un rôle de facteur de survie sur les CEM (Flint et Knight, 1997) et que l'IGF-I et l'insuline sont toutes les deux connues pour stimuler la prolifération des CEM (Turkington, 1970; Shamay et al., 1988; Baumrucker et Stemberger, 1989), nous avons suggéré que la diminution des concentrations d'IGF-I et d'insuline pourrait favoriser l'exfoliation des CEM.

Dans l'essai « **bGH** », pendant la période de traitement hormonal, les injections de bGH n'ont pas affecté le taux d'exfoliation des CEM. Un traitement à la bGH est connu pour stimuler la synthèse d'IGF-I (Bauman, 1999). L'augmentation des concentrations de GH et d'IGF-I en réponse aux injections de bGH exogène ne semble donc pas participer à la régulation du processus d'exfoliation. Cependant, après la fin du traitement hormonal, le taux d'exfoliation des CEM a augmenté de 66 % chez les vaches ayant précédemment reçu les injections de bGH. Suite à l'arrêt du traitement à la bGH, la sécrétion d'IGF-I diminuerait ce qui pourrait favoriser l'exfoliation des CEM. Les dosages des concentrations d'IGF-I sont actuellement en cours de réalisation et permettront d'étudier si l'augmentation de l'exfoliation après la fin du traitement à la bGH est associée à une diminution de la concentration en IGF-I. Cependant, des études complémentaires sont nécessaires afin de déterminer les rôles de la GH et de l'IGF-I dans la régulation du processus d'exfoliation. Etant donné que nous avons montré que la majorité des CEM était exfoliée au moment de la traite et qu'il a été rapporté que la traite induit un pic de sécrétion de GH chez la chèvre (Hart et Linzell, 1977), il serait intéressant d'étudier le rôle de la GH dans la régulation du processus d'exfoliation au moment de la traite en manipulant la sécrétion de GH à l'aide d'un traitement inhibiteur de la sécrétion de la GH et d'un traitement par de la GH exogène.

*Ces observations suggèrent que le processus d'exfoliation n'est pas seulement sous le contrôle hormonal de l'OT et du cortisol et qu'il pourrait être régulé par des hormones telles que l'insuline, l'IGF-I et la GH.*



**Figure 2** : Résumé des différents facteurs étudiés au cours des différents essais menés au cours de cette thèse sur l'intégrité de l'épithélium mammaire.

### 2.3. Lien entre exfoliation des CEM et intégrité de l'épithélium mammaire

#### *L'intégrité de l'épithélium mammaire est-elle modulée en réponse à différents facteurs ?*

Dans les différents essais de cette thèse, nous avons estimé l'intégrité de l'épithélium mammaire à l'aide d'indicateurs et analysé si les différents facteurs que nous avons choisi d'étudier modulaient cette intégrité.

Comme indiqué dans la partie « L'exfoliation est sous contrôle des hormones libérées à la traite », lors des essais « **Suivi au cours de la traite** » et « **Rôle de l'OT** », nous avons mis en évidence pour la première fois que la traite induit une perte d'intégrité de l'épithélium et que l'OT est responsable de cette perte d'intégrité (**Figure 2**). La perte d'intégrité de l'épithélium au moment de la traite pourrait participer au renouvellement des cellules immunitaires dans la lumière alvéolaire. En effet, les cellules immunitaires présentes dans le lait et participant à la protection de la glande mammaire contre les agents pathogènes (Paape et al., 2002) sont évacuées au moment de la traite et doivent alors être renouvelées pour assurer cette protection. Un afflux de cellules immunitaires à la fin de la traite permet ce renouvellement (Paape et al., 2002; Olde Riekerink et al., 2007). Plusieurs hypothèses ont été émises concernant le mécanisme grâce auquel les cellules immunitaires traversent l'épithélium mammaire pour atteindre la lumière alvéolaire. Les cellules immunitaires pourraient passer par diapédèse (passage à travers l'épithélium intact via une ouverture momentanée des jonctions serrées) ou par des « trous » laissés dans l'épithélium par des CEM dégénérantes ou des CEM exfoliées (Akers et Nickerson, 2011). Le passage des cellules immunitaires dans le lait semble donc nécessiter une perméabilité de l'épithélium mammaire. La perte d'intégrité au moment de la traite pourrait permettre le passage des cellules immunitaires entre les CEM par les jonctions serrées ouvertes. Comme nous l'avons suggéré, après la fin de la traite, l'intégrité de l'épithélium mammaire est restaurée, probablement grâce à l'action du cortisol sur les jonctions serrées. Après le renouvellement des cellules immunitaires, la restauration de l'intégrité de l'épithélium mammaire permet à ce dernier de reformer une barrière entre le milieu intérieur et la lumière alvéolaire, ce qui limiterait l'entrée de pathogènes dans le tissu mammaire et serait donc nécessaire à la protection de la glande mammaire. La restauration de l'intégrité de l'épithélium est aussi primordiale pour permettre à la glande mammaire de produire du lait. En effet, les jonctions



serrées déterminent la polarité et l'organisation intracellulaire des CEM permettant d'orienter la synthèse du lait vers la lumière alvéolaire.

Dans l'essai « **Nature du fourrage / Restriction 75 %** », la nature du fourrage dans la ration n'a pas eu d'effet sur l'intégrité de l'épithélium mammaire (estimée par les ratios  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  et caséines/protéines solubles dans le lait, **Figure 2**). En réponse à la restriction alimentaire, nous avons observé une perte d'intégrité de l'épithélium indiquée par l'augmentation du ratio  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  dans le lait (**Figure 2**). Au contraire, dans l'essai « **Restriction 80 %** », la restriction alimentaire n'a pas eu d'effet sur l'intégrité de l'épithélium (estimée par le ratio  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  dans le lait et la concentration basale de lactose plasmatique, **Figure 2**). La restriction alimentaire a donc eu un effet différent sur l'intégrité de l'épithélium dans ces 2 essais, cette divergence pouvant être due à la différence d'intensité ou de durée de la restriction.

Enfin, dans l'essai « **Photopériode x Cabergoline** », la concentration plasmatique de lactose (mesurée avant, pendant et après la traite) et le ratio  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  dans le lait n'ont pas varié en réponse au traitement lumineux indiquant que, dans notre essai, la photopériode n'a pas eu d'effet sur l'intégrité de l'épithélium (**Figure 2**). Cette absence d'effet est contradictoire avec Boutinaud et al. (2014), qui avaient mis en évidence une perte d'intégrité de l'épithélium chez des vaches laitières soumises à des jours courts après 13 jours de traitement lumineux.

Dans ce même essai « **Photopériode x Cabergoline** », l'inhibition de la prolactine par l'injection de cabergoline n'a pas eu d'effet sur la concentration de lactose plasmatique mesurée avant, pendant et après la traite et sur le ratio  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  dans le lait suggérant que l'intégrité de l'épithélium n'est pas affectée par l'inhibition de la PRL (**Figure 2**). Au contraire, la diminution du ratio caséines/protéines solubles chez les vaches ayant reçu la cabergoline suggère une perte d'intégrité de l'épithélium. Une perte d'intégrité de l'épithélium a déjà été rapportée en réponse à l'inhibition de la PRL par des injections de quinagolide (Lollivier et al., 2015).

Ces résultats contradictoires suivant les essais peuvent venir des différences de traitements entre les essais (intensité et durée de la restriction alimentaire, durée du traitement lumineux) mais aussi du fait que l'intégrité de l'épithélium mammaire ne peut pas être directement mesurée mais seulement évaluée par le dosage d'indicateurs indirects



tels que les ratios  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  et caséines/protéines solubles dans le lait et le lactose plasmatique. Suivant le modèle expérimental étudié, tous les marqueurs ne sont pas fiables, la diminution du ratio caséines/protéines solubles ou du lactose plasmatique pouvant par exemple être attribuée à une perte d'intégrité de l'épithélium ou une diminution de l'activité métabolique des CEM.

### ***L'exfoliation des CEM est-elle associée à une perte d'intégrité de l'épithélium ?***

Sur la base de nombreuses études rapportant que le taux d'exfoliation augmentait concomitamment à une perte d'intégrité de l'épithélium, nous avons formulé l'hypothèse qu'il existait un lien entre intégrité de l'épithélium mammaire et exfoliation. Nous avons donc étudié, dans les différents essais menés au cours de cette thèse, si l'augmentation de l'exfoliation avait lieu simultanément à une perte d'intégrité.

L'inhibition de la PRL et la photopériode n'ont eu d'effet ni sur l'exfoliation des CEM ni sur l'intégrité de l'épithélium mammaire, ce qui ne nous permet pas de conclure sur le lien entre l'intégrité de l'épithélium mammaire et l'exfoliation des CEM.

En réponse à la restriction alimentaire, dans l'essai « **Nature du fourrage / Restriction 75 %** », la perte d'intégrité n'a pas été associée à une augmentation du taux d'exfoliation. Au contraire, dans l'essai « **Restriction 80 %** », l'augmentation du taux d'exfoliation n'a pas été accompagnée, chez les vaches restreintes, d'une perte d'intégrité de l'épithélium. Ces observations s'opposent à l'hypothèse d'un lien entre intégrité de l'épithélium et exfoliation. L'exfoliation des CEM et la perte d'intégrité de l'épithélium ayant principalement lieu au moment de la traite, il serait intéressant d'analyser l'effet de la restriction alimentaire sur l'intégrité de l'épithélium tout au long de la traite. Cela pourrait être fait en dosant la concentration en lactose plasmatique en cinétique, comme cela a été fait dans les essais « **Suivi au cours de la traite** », « **Rôle de l'OT** » et « **Photopériode x Cabergoline** ». Pour limiter la lourdeur expérimentale liée à cette cinétique, il serait aussi possible d'estimer la perte d'intégrité de l'épithélium au cours de la traite par seulement deux mesures de la concentration plasmatique de lactose, avant et après la traite. De tels échantillons ont été collectés lors des essais « **Nature du fourrage / Restriction 75 %** » et « **Restriction 80 %** » et sont en cours d'analyse et permettront de confirmer ou d'infirmer le lien entre exfoliation et intégrité de l'épithélium dans le cas d'une restriction alimentaire.





Enfin, comme indiqué dans la partie « L'exfoliation est sous contrôle des hormones libérées à la traite » de cette discussion, l'exfoliation observée au cours de la traite ou suite à l'injection d'OT est associée à une perte d'intégrité de l'épithélium mammaire appuyant notre hypothèse d'un lien entre intégrité de l'épithélium et exfoliation.

***Le lien entre exfoliation des CEM et perte d'intégrité de l'épithélium n'a pas été systématiquement observé mais semble exister au moment de la traite et de l'injection d'OT.***

#### ***Exfoliation des CEM et perte d'intégrité de l'épithélium : cause ou conséquence ?***

L'analyse de la bibliographie réalisée au début de ma thèse nous a amenées à faire l'hypothèse que lorsqu'il existe, le lien entre exfoliation des CEM et perte d'intégrité de l'épithélium peut être interprété de 2 façons : l'exfoliation de CEM viables et de CEM apoptotiques pourrait être la conséquence de la perte d'intégrité, ou au contraire, pourrait être la cause de la perte de l'intégrité de l'épithélium mammaire (Herve et al., 2016).

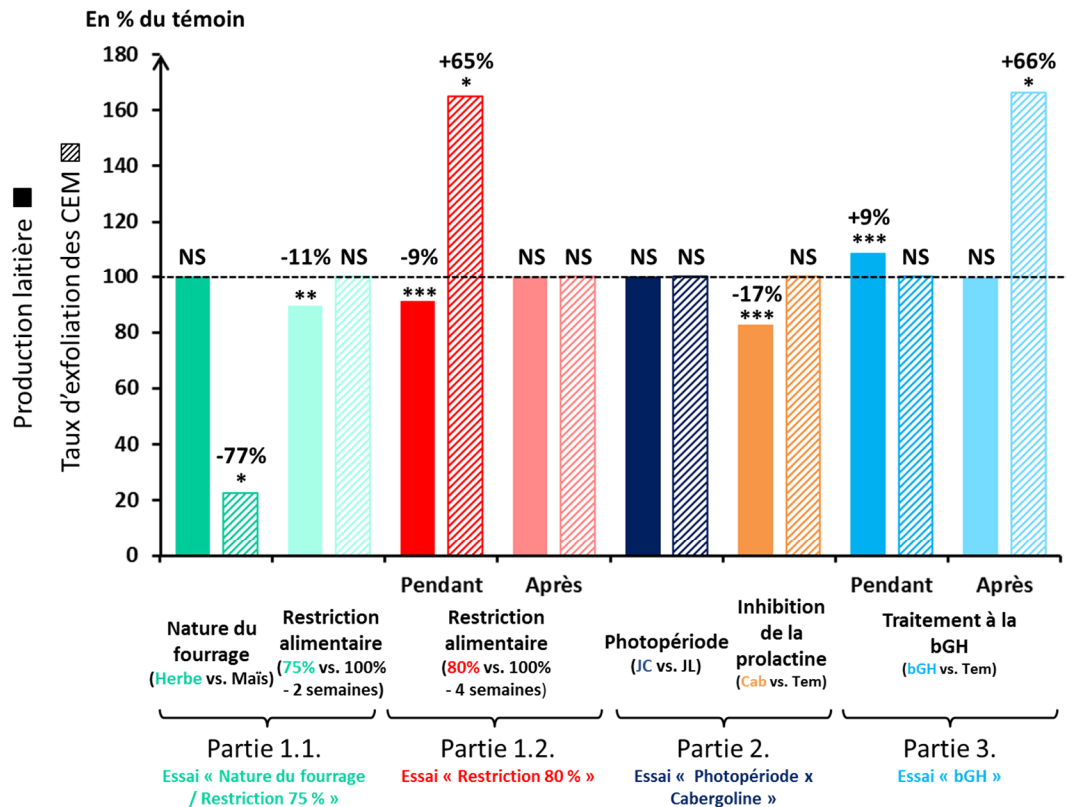
Les hormones libérées à la traite sont connues pour participer à la régulation de l'intégrité de l'épithélium, l'OT induisant une perte d'intégrité et, au contraire, la PRL et le cortisol participant au maintien de l'intégrité (Nguyen et Neville, 1998). Dans le cas de l'exfoliation au moment de la traite, la perte d'intégrité de l'épithélium pourrait donc plutôt être la cause de l'exfoliation des CEM. D'après nos résultats, comparativement à ce qu'il est observé en réponse à l'OT endogène lors d'une traite standard, l'injection d'une dose supra physiologique d'OT après une traite standard induit à la fois une perte d'intégrité de l'épithélium mammaire encore plus importante et l'exfoliation d'un plus grand nombre de CEM viables. Le fait qu'un plus grand nombre de CEM viables soient exfoliées suggère que ces CEM sont « fraîchement » exfoliées.

***La contraction des cellules myoépithéliales induite par l'OT semble provoquer simultanément la perte d'intégrité et l'exfoliation des CEM viables, ne permettant pas de statuer si l'exfoliation des CEM est la cause ou la conséquence de la perte d'intégrité.***

Il est possible d'induire expérimentalement l'ouverture des jonctions serrées, comme cela a été montré in vivo chez la chèvre grâce à l'injection de molécules chélatrices du Ca<sup>2+</sup> telles que l'EGTA<sup>1</sup> et le citrate (Neville et Peaker, 1981; Stelwagen et al., 1995; Ben Chedly et

---

<sup>1</sup> Ethylene glycol-bis-(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid



**Figure 3** : Effet des différents facteurs physiologiques, d'élevage et environnementaux étudiés au cours de cette thèse sur la production laitière (barres pleines) et sur le taux d'exfoliation des cellules épithéliales mammaires (CEM, barres hachurées). Les valeurs sont exprimées en pourcentage de la valeur des animaux témoins.

Partie 1.1. Seize vaches laitières ont été soit nourries *ad libitum* soit restreintes (à hauteur de 75 % de l'*ad libitum*) avec une ration soit à base de maïs soit à base d'herbe, selon un schéma en inversion de 2 périodes de 3 semaines chacune. Des échantillons de lait ont été récoltés 2 semaines après le début de chaque période afin d'estimer le taux d'exfoliation.

Partie 1.2. Pendant une première période de 4 semaines, 19 vaches laitières ont été soit nourries *ad libitum* soit restreintes (à hauteur de 80 % de l'*ad libitum*). Puis, toutes les vaches ont été nourries *ad libitum* pendant une période de 5 semaines. Des échantillons de lait ont été récoltés 5, 9 et 27 jours après le début de la période de restriction alimentaire et 5, 9 et 30 jours après le début de la période de retour à une alimentation *ad libitum* afin d'estimer le taux d'exfoliation.

Partie 2. Huit vaches laitières ont été soumises à 2 photopériodes (jours courts vs. jours longs) et à une injection de cabergoline (Cab, inhibiteur de la sécrétion de prolactine) ou de solution témoin (Tem) selon un carré latin de 4 périodes de 3 semaines chacune. Des échantillons de lait ont été récoltés 13 et 20 jours après le début de chaque période afin d'estimer le taux d'exfoliation.

Partie 3. Huit vaches laitières ont reçu des injections d'hormone de croissance bovine (bGH) ou de solution physiologique (Tem) pendant une première période de 14 jours. Puis, pendant les 3 semaines suivantes, aucune vache n'a reçu d'injection. Des échantillons de lait ont été récoltés pendant (J2, J4, J7, J9 et J11) et après la fin (J15, J22, J29, J35) du traitement hormonal afin d'estimer le taux d'exfoliation.

al., 2010). L'utilisation de cette technique d'induction de l'ouverture des jonctions serrées chez la vache laitière pourrait permettre d'étudier si la perte d'intégrité de l'épithélium est la cause l'exfoliation des CEM.

### **3. Le rôle du processus d'exfoliation dans la régulation du nombre de cellules épithéliales mammaires et influence sur la production laitière**

La production laitière est déterminée par deux facteurs que sont le nombre de CEM et l'activité métabolique de ces cellules (Boutinaud et al., 2004a). Le nombre de CEM dans la glande mammaire est dépendant de l'équilibre entre la prolifération cellulaire et l'apoptose (Capuco et al., 2003). Le processus d'exfoliation des CEM a été proposé comme potentiel mécanisme de régulation du nombre de CEM dans la glande mammaire puisque comme montré dans la synthèse bibliographique de cette thèse, les variations du taux d'exfoliation en réponse à différents facteurs étaient opposées aux variations de production laitière.

#### **3.1. L'exfoliation est influencée par certains facteurs d'élevage et environnementaux**

A travers les essais « **Nature du fourrage / Restriction 75 %** » et « **Restriction 80 %** », nous avons montré que l'alimentation influençait le taux d'exfoliation des CEM. Comparativement à des vaches nourries avec une ration à base de maïs, nous avons observé une diminution de 77 % du taux d'exfoliation des CEM chez les vaches nourries avec une ration à base d'herbe (**Figure 3**). Cet effet d'une alimentation à base d'herbe pourrait résulter d'un effet bénéfique des antioxydants présents dans l'herbe permettant de limiter les dommages sur le tissu mammaire causés par le stress oxydatif et ainsi limiter l'exfoliation. Dans l'essai « **Restriction 80 %** », le taux d'exfoliation des CEM a augmenté de 65 % en réponse à la restriction alimentaire. Comme discuté dans le paragraphe « L'exfoliation est-elle sous contrôle d'autres hormones ? », cette augmentation du taux d'exfoliation en réponse à la restriction alimentaire pourrait résulter des moindres concentrations plasmatiques d'insuline et d'IGF-I. Après la fin de la restriction alimentaire, le taux d'exfoliation des CEM a diminué pour revenir au niveau de celui des vaches témoins. La réalimentation s'est accompagnée d'une restauration des concentrations plasmatiques d'insuline et d'IGF-I, pouvant expliquer cette diminution du taux d'exfoliation. Cette



diminution du taux d'exfoliation après la fin de la restriction alimentaire a aussi été accompagnée d'une augmentation du pic de sécrétion de la PRL au moment de la traite. Puisque la PRL est connue pour être un facteur de survie des CEM en stimulant leur prolifération (Olazabal et al., 2000) et en inhibant leur apoptose (Accorsi et al., 2002), la PRL pourrait participer à la diminution du taux d'exfoliation après la fin de la restriction alimentaire. Cependant, comme discuté dans la partie « L'exfoliation est sous contrôle des hormones libérées à la traite », le rôle de la PRL dans la régulation du processus d'exfoliation reste à confirmer puisque des études précédentes avaient permis de suggérer que la PRL pouvait inhiber l'exfoliation (Lollivier et al., 2015; Boutinaud et al., 2017) mais que dans l'essai « **Photopériode x Cabergoline** », l'inhibition de la sécrétion de la PRL n'a pas eu d'effet sur l'exfoliation des CEM.

Dans ce même essai, la photopériode n'a pas eu d'effet sur l'exfoliation des CEM après 20 jours de traitement lumineux. Ce résultat est contradictoire avec une précédente étude montrant une augmentation du taux d'exfoliation en réponse à des jours courts après 13 jours de traitement lumineux (Boutinaud et al., 2014).

Enfin, dans l'essai « **bGH** », le traitement à la bGH n'a pas eu d'effet sur le taux d'exfoliation mais une augmentation de ce taux d'exfoliation a été observée après la fin du traitement hormonal. Comme nous l'avons suggéré dans le paragraphe « L'exfoliation est-elle sous contrôle d'autres hormones ? », cet effet pourrait résulter d'une diminution des concentrations d'IGF-I chez les vaches ayant précédemment reçu le traitement hormonal.

### 3.2. Le lien entre exfoliation et production laitière

A travers les différents essais menés au cours de cette thèse, nous avons testé l'hypothèse de l'existence d'un lien entre production laitière et taux d'exfoliation en étudiant les variations de ces deux paramètres en réponse à différents facteurs.

Dans l'essai « **Photopériode x Cabergoline** », l'absence d'effet de la photopériode sur la production laitière et sur le taux d'exfoliation des CEM (**Figure 3**) ne permet pas de tester notre hypothèse.

Dans l'essai « **Nature du fourrage / Restriction 75 %** », lors d'une alimentation avec une ration à base de d'herbe, le taux d'exfoliation a diminué sans que la production laitière



ne varie (**Figure 3**). Dans ce cas, le lien entre production laitière et exfoliation n'a donc pas été établi. Afin de comprendre pourquoi la production laitière des vaches nourries à base d'herbe n'était pas plus élevée que celle des vaches nourries avec une ration à base de maïs malgré leur moindre taux d'exfoliation, il serait nécessaire d'étudier l'effet de la nature du fourrage sur les autres mécanismes déterminant la production laitière, à savoir l'équilibre entre la prolifération cellulaire et l'apoptose ainsi que l'activité métabolique des CEM. Cela serait possible en nourrissant des vaches avec une ration à base de maïs ou une ration à base d'herbe et en collectant des échantillons de tissu mammaire afin de mesurer les taux de prolifération et d'apoptose et d'étudier l'expression des gènes impliqués dans la synthèse des constituants du lait.

Inversement, dans l'essai « **bGH** », lorsque les vaches ont reçu des injections de bGH, leur production laitière a augmenté de 9 %, conformément à l'effet galactopoïétique de la bGH largement connu chez les vaches laitières (Bauman, 1999). Il a été rapporté que l'effet galactopoïétique de la bGH résultait principalement d'une réorientation des nutriments vers la glande mammaire pour la fonction de lactation et une augmentation de l'activité métabolique des CEM (Bauman, 1999). Il a aussi été montré que la bGH induisait une augmentation du nombre de CEM dans le tissu mammaire grâce à l'augmentation du taux de prolifération (Knight et al., 1990; Capuco et al., 2001; Baldi et al., 2002). Dans notre essai, l'augmentation de la production laitière n'a pas été accompagnée de variation du taux d'exfoliation (**Figure 3**). Il semblerait donc que l'effet bénéfique de la bGH sur le nombre de CEM dans le tissu mammaire ne passe pas par une limitation de l'exfoliation des CEM et que ce processus d'exfoliation ne participe pas à l'effet galactopoïétique de la bGH. Cela suggère aussi qu'il n'y a pas de lien entre production laitière et exfoliation en réponse à un traitement à la bGH. Dans le cas de l'inhibition de la PRL par la cabergoline (dans l'essai « **Photopériode x Cabergoline** »), nous avons observé une diminution de 17 % de la production laitière. Cette diminution de production laitière s'expliquait par une diminution de l'activité métabolique des CEM comme indiqué par la diminution de l'expression des gènes  $\kappa$ -CN et  $\alpha$ -LA, deux gènes impliqués dans la synthèse des constituants du lait. Ce résultat est cohérent avec une précédente étude montrant que l'inhibition de la PRL induit une diminution de l'activité métabolique des CEM (Boutinaud et al., 2012). Il a aussi été montré que la diminution de la production laitière en réponse à l'inhibition de la PRL résultait d'une diminution du nombre de CEM dans le tissu mammaire via une augmentation





du taux d'apoptose et une diminution du taux de prolifération des CEM (Boutinaud et al., 2012) ou seulement via une augmentation du taux de prolifération (Lollivier et al., 2015). La mesure des taux de prolifération et d'apoptose nécessite la collecte de tissu mammaire par biopsie. Ce type de prélèvements ne pouvant pas être effectué de manière répétée sans endommager le tissu mammaire, nous n'avons pas réalisé ces mesures dans notre essai. Nous avons néanmoins étudié les variations du taux d'exfoliation et nous avons observé que la diminution de la production laitière en réponse à l'inhibition de la PRL n'était accompagnée d'aucune variation du taux d'exfoliation (**Figure 3**). Nous avons établi une nouvelle fois qu'il n'y avait pas de lien entre production laitière et exfoliation. Pour résumer, dans le cas du traitement à la bGH et de l'inhibition de la PRL, les variations de production laitière ont été observées sans variation du taux d'exfoliation. Dans ces deux cas, les variations de production laitière ne peuvent donc être attribuées à des variations du taux d'exfoliation.

Dans le cas d'une restriction alimentaire de 4 semaines (dans l'essai « **Restriction 80 %** »), nous avons néanmoins observé que la diminution de la production laitière était associée à une augmentation du taux d'exfoliation (**Figure 3**), suggérant que dans le cas de la restriction alimentaire, il existe un lien entre production laitière et exfoliation. Dans cet essai, nous n'avons pas pu estimer le nombre de CEM dans le tissu mammaire puisqu'une telle mesure nécessite l'abattage des animaux, la pesée des glandes mammaires et la mesure de la quantité totale d'ADN. Nous avons néanmoins observé une augmentation de la concentration en ADN dans le tissu mammaire des vaches restreintes. Une telle augmentation de la concentration en ADN a précédemment été associée à une diminution du nombre de CEM dans la glande mammaire chez des vaches restreintes (Dessaige et al., 2011). L'augmentation de la concentration en ADN dans le tissu mammaire dans notre essai suggère donc une diminution du nombre de CEM dans le tissu mammaire. L'augmentation du taux d'exfoliation serait donc bien associée à une diminution du nombre de CEM. Après la fin de la restriction alimentaire, les vaches ayant précédemment été restreintes ont retrouvé un niveau de production laitière et un taux d'exfoliation similaires aux vaches témoins. La perte de CEM par exfoliation pendant la période de restriction n'a donc pas atteint le potentiel de production des vaches. L'augmentation du pic de sécrétion de PRL au moment de la traite chez les vaches ayant précédemment été restreintes a pu stimuler la prolifération cellulaire et induire une augmentation du nombre de CEM dans la glande



mammaire permettant ainsi de limiter l'effet délétère de la perte de CEM et de retrouver une production laitière similaire à celle des vaches témoins. Cela met en évidence que la glande mammaire est un organe plastique puisqu'après avoir été soumise à un facteur engendrant une diminution du nombre de CEM par exfoliation tel que la restriction alimentaire, elle est capable de régénérer sa population cellulaire permettant l'absence d'effet rémanent sur la production laitière.

Dans l'essai « bGH », après la fin du traitement hormonal, la production laitière des vaches ayant précédemment reçu les injections de bGH a diminué pour retrouver un niveau de production identique à celui des vaches témoins. Cette diminution de production laitière a été accompagnée d'une augmentation du taux d'exfoliation des CEM différenciées et matures (**Figure 3**). Ce résultat suggère l'existence d'un lien entre production laitière et exfoliation des CEM dans le cas de la fin d'un traitement à la bGH.

Dans le cas de la restriction alimentaire et après la fin du traitement à la bGH, nous avons mis en évidence que la diminution de la production laitière était associée à une augmentation du taux d'exfoliation. Dans ces deux cas, nous avons retrouvé le lien entre production laitière et exfoliation déjà mis en évidence dans le cas de l'avancée de la lactation, de la diminution de la fréquence de traite, du tarissement ou d'une mammite (Herve et al., 2016).

*Le lien entre exfoliation et production laitière n'est pas observé de façon systématique dans les essais menés au cours de cette thèse alors qu'il avait été mis en évidence en réponse à de nombreux facteurs dans la bibliographie. Cela montre que la régulation de l'exfoliation des CEM n'est pas toujours mise en jeu lors d'une modification de la production laitière. Cependant dans certains cas, l'exfoliation participe, avec l'équilibre entre la prolifération et la mort cellulaire et l'activité métabolique des CEM, à la régulation de la production laitière. Il est donc nécessaire d'analyser tous les déterminants de la production laitière pour en comprendre les variations.*

#### **4. Le taux d'exfoliation, un marqueur phénotypique de la persistance de la lactation ?**

La production laitière d'une vache au cours d'une lactation suit une courbe caractéristique : au début de la lactation, la production laitière augmente rapidement jusqu'à atteindre un pic puis diminue progressivement avec l'avancée de la lactation.



Améliorer la persistance de la lactation, définie comme la vitesse à laquelle la production laitière décline après le pic de lactation, présente des enjeux importants aussi bien pour les éleveurs que pour la filière de transformation du lait. En effet, cela donnerait la possibilité aux éleveurs de pratiquer des lactations longues, limitant ainsi la période de risques pour la santé et la reproduction des femelles que représente le début de lactation et permettant donc d'améliorer la longévité des animaux, tout en réduisant leur temps de vie non productive. Cela permettrait également de limiter les intrants médicamenteux en limitant l'utilisation de traitements antibiotiques au tarissement et de traitements pour les vaches atteintes de maladies métaboliques telles de l'acétonémie en début de lactation. Enfin, améliorer la persistance de la lactation permettrait de stabiliser la production annuelle de lait en termes de quantité et de qualité. Boutinaud et al. (2013c) ont montré que la diminution de la production laitière avec l'avancée de la lactation était associée à une augmentation du taux d'exfoliation et ont suggéré qu'une moindre exfoliation des CEM pourrait expliquer une meilleure persistance de la lactation. Le taux d'exfoliation étant un paramètre avec une forte variabilité interindividuelle, il serait intéressant de comparer des vaches à persistance contrastées afin de vérifier si les vaches les plus persistantes ont un taux d'exfoliation plus faible. Pour cela, il faudrait suivre des vaches laitières nourries avec la même ration alimentaire durant une lactation complète afin d'identifier les vaches ayant une meilleure persistance et les vaches ayant une moins bonne persistance et réaliser des prélèvements de lait à différents temps après le pic de lactation pour déterminer leur taux d'exfoliation. Cela permettrait de vérifier l'existence d'une corrélation entre persistance et exfoliation. Dans le cas de l'existence d'une telle corrélation, suite à la détermination du taux d'exfoliation des vaches de leur troupeau, les éleveurs pourraient alors connaître leur potentiel de persistance de lactation et pourraient se servir de ce critère dans leur choix de réaliser des lactations longues ou non. Le phénotypage sur le taux d'exfoliation pourrait être réalisé grâce à la technique de cytométrie de flux puisque celle-ci est réalisable à plus grande échelle que la technique d'immunoséparation-magnétique et avec un faible volume d'échantillon de lait. Un but à long terme serait d'étudier l'héritabilité du taux d'exfoliation pour ensuite pouvoir, si ce caractère est héritable, sélectionner génétiquement les vaches laitières sur leur taux d'exfoliation afin disposer de vaches ayant une meilleure persistance et donc adaptées à des lactations longues.



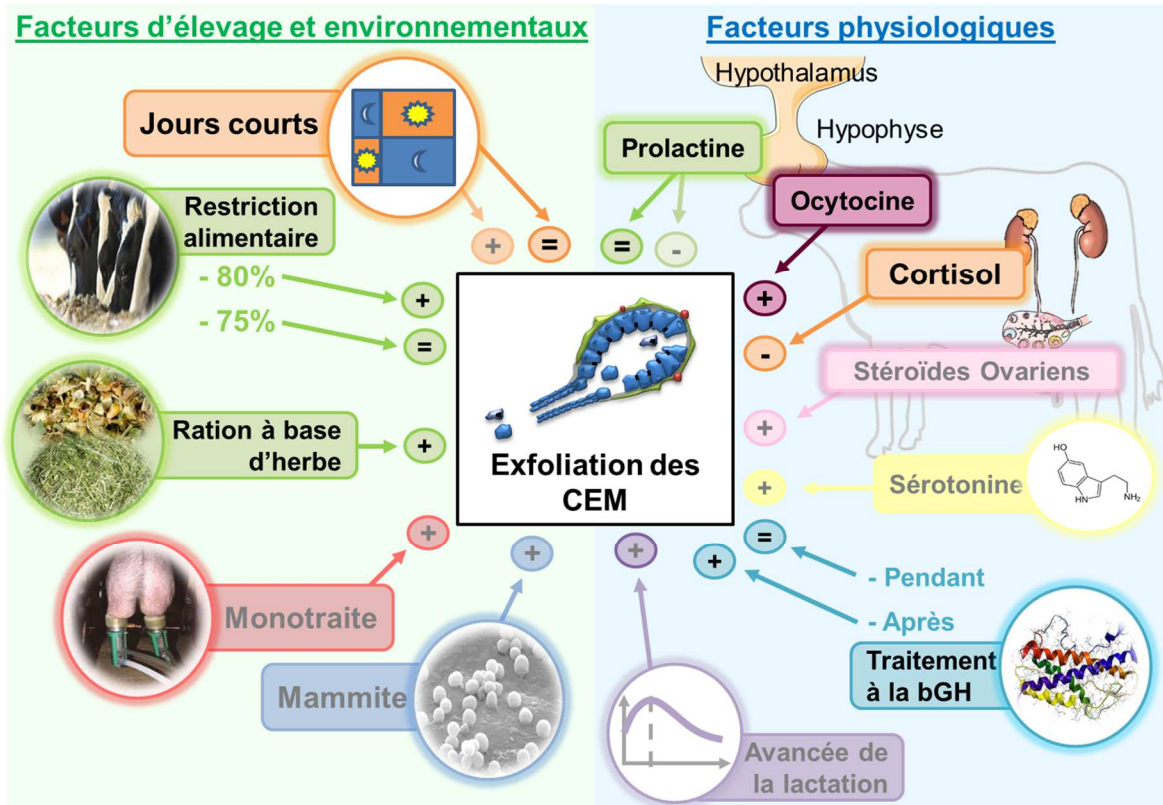
# Conclusion





Au cours de cette thèse, les mécanismes de régulation du taux d'exfoliation ont été étudiés, nous permettant de mettre en évidence la présence de CEM dans le lait citernal suggérant qu'une partie des CEM est exfoliée entre deux traites consécutives. Nous avons aussi montré que la traite stimule l'exfoliation des CEM expliquant que la majorité des CEM exfoliées soit retrouvée dans le lait alvéolaire. Cette exfoliation induite par la traite est sous contrôle hormonal et notamment de l'OT et du cortisol. L'OT induit la contraction des cellules myoépithéliales qui elle-même induit une perte d'intégrité de l'épithélium mammaire et stimule l'exfoliation des CEM par l'intermédiaire des forces mécaniques exercées sur l'épithélium. Le cortisol, au contraire, pourrait participer à la restauration de l'intégrité de l'épithélium après la traite et limiter l'exfoliation des CEM. Le processus d'exfoliation pourrait aussi être sous le contrôle de l'insuline, de l'IGF-I et de la GH connues pour être impliquées dans la fonction de lactation et pour participer à la régulation du nombre de CEM dans le tissu mammaire via la régulation des taux de prolifération et d'apoptose. La diminution des concentrations d'insuline et d'IGF-I pourrait expliquer l'augmentation du taux d'exfoliation en réponse à une restriction alimentaire. Une baisse de la concentration d'IGF-I pourrait aussi expliquer l'augmentation du taux d'exfoliation après la fin d'un traitement à la bGH. Le rôle de ces 3 hormones dans la régulation du processus d'exfoliation nécessite néanmoins d'être étudié plus précisément.

Les résultats obtenus au cours de cette thèse ont permis d'acquérir de nouvelles connaissances concernant les facteurs physiologiques, d'élevage et environnementaux régulant le processus d'exfoliation des CEM (**Figure 1**). Nous avons notamment mis en évidence que l'alimentation des vaches laitières influence l'exfoliation des CEM, une ration à base d'herbe limitant l'exfoliation et au contraire une restriction alimentaire la stimulant. La photopériode et l'inhibition de la PRL avait été mis en évidence comme des facteurs engendrant des variations de taux d'exfoliation, des vaches soumises à des jours courts ou dont la sécrétion de PRL avait été inhibée présentant un taux d'exfoliation plus élevé. Nos résultats n'ont pas confirmé ces effets puisque dans notre essai, ni la photopériode ni l'inhibition de la PRL n'ont eu d'effet sur le taux d'exfoliation. Enfin, nous avons montré qu'un traitement à la bGH n'a pas d'effet sur l'exfoliation mais que le taux d'exfoliation est plus élevé après la fin du traitement hormonal chez des vaches précédemment traitées à la bGH. Il avait été montré dans plusieurs études que les variations de production laitière



**Figure 1** : Résumé de l'effet de différents facteurs physiologiques, d'élevage et environnementaux sur le processus d'exfoliation des cellules épithéliales mammaires (CEM) dans le lait sur la base de la bibliographie (en clair) et de nos résultats (en foncé).

étaient concomitantes à des variations du taux d'exfoliation (Herve et al., 2016), suggérant que le processus d'exfoliation pourrait être un mécanisme de régulation du nombre de CEM dans la glande mammaire et donc de la production laitière. Dans nos essais, le lien entre production laitière et exfoliation a été établi dans le cas de la restriction alimentaire et après la fin d'un traitement à la bGH. Cependant, nous avons aussi montré que, contrairement à notre hypothèse, ce lien entre production laitière et taux d'exfoliation des CEM n'est pas systématique. En effet, des variations de production laitière ont été observées en l'absence de variation du taux d'exfoliation (en réponse à l'inhibition de la PRL et pendant un traitement à la bGH), ou inversement puisque une diminution du taux d'exfoliation a été observée sans variation de production laitière (lors d'une alimentation à base d'herbe). Cette thèse nous a donc permis de montrer que le processus d'exfoliation pourrait participer à la régulation de la production laitière en réponse à certains facteurs. Cependant, la production laitière est aussi régulée par l'équilibre entre la prolifération et la mort cellulaire par apoptose et l'activité métabolique des CEM. Il est donc nécessaire d'analyser ces 3 facteurs déterminants afin de comprendre les variations de production laitière.

Néanmoins, une moindre exfoliation pourrait expliquer une meilleure persistance de la lactation chez la vache laitière. Il serait intéressant d'étudier si les vaches ayant la meilleure persistance ont le taux d'exfoliation le plus faible. Si une telle corrélation existe, le taux d'exfoliation pourrait être un marqueur phénotypique de la persistance de la lactation permettant aux éleveurs de disposer d'un outil d'aide à la décision de la réalisation de lactations longues. A plus long terme, si le taux d'exfoliation s'avérait être un caractère héritable, il serait possible d'envisager sélectionner les vaches sur leur taux d'exfoliation afin de disposer de vaches ayant une meilleure persistance.



# **Références bibliographiques**



- Abdelatty, A.M., M.E. Iwaniuk, M. Garcia, K.M. Moyes, B.B. Teter, P. Delmonte, A.K.G. Kadegowda, M.A. Tony, F.F. Mohamad, et R.A. Erdman. 2017. Effect of short-term feed restriction on temporal changes in milk components and mammary lipogenic gene expression in mid-lactation Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* 100:4000–4013. doi:10.3168/jds.2016-11130.
- Accorsi, P.A., B. Pacioni, C. Pezzi, M. Forni, D.J. Flint, et E. Seren. 2002. Role of prolactin, growth hormone and insulin-like growth factor 1 in mammary gland involution in the dairy cow. *J. Dairy Sci.* 85:507–513.
- Akers, R.M., S.E. Ellis, et S.D. Berry. 2005. Ovarian and IGF-I axis control of mammary development in prepubertal heifers. *Domest. Anim. Endocrinol.* 29:259–267. doi:10.1016/j.domaniend.2005.02.037.
- Akers, R.M., et S.C. Nickerson. 2011. Mastitis and its Impact on Structure and Function in the Ruminant Mammary Gland. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 16:275–289. doi:10.1007/s10911-011-9231-3.
- Allen, J.C. 1990. Milk synthesis and secretion rates in cows with milk composition changed by oxytocin. *J. Dairy Sci.* 73:975–984.
- Andersen, J.B., N.C. Friggens, T. Larsen, M. Vestergaard, et K.L. Ingvarsen. 2004. Effect of energy density in the diet and milking frequency on plasma metabolites and hormones in early lactation dairy cows. *J. Vet. Med. Ser. A* 51:52–57.
- Andrews, Z.B. 2005. Neuroendocrine Regulation of Prolactin Secretion During Late Pregnancy: Easing the Transition into Lactation. *J. Neuroendocrinol.* 17:466–473. doi:10.1111/j.1365-2826.2005.01327.x.
- Ayadi, M., G. Caja, X. Such, et C.H. Knight. 2003. Use of ultrasonography to estimate cistern size and milk storage at different milking intervals in the udder of dairy cows. *J. Dairy Res.* 70:1–7. doi:10.1017/S0022029902005873.
- Bach, A., A. De-Prado, et A. Aris. 2015. Short communication: The effects of cabergoline administration at dry-off of lactating cows on udder engorgement, milk leakages, and lying behavior. *J. Dairy Sci.* 98:7097–7101. doi:10.3168/jds.2015-9751.
- Bachman, K.C., M.J. Hayen, D. Morse, et C.J. Wilcox. 1988. Effect of pregnancy, milk yield, and somatic cell count on bovine milk fat hydrolysis. *J. Dairy Sci.* 71:25–931.
- Baldi, A. 1999. Manipulation of milk production and quality by use of somatotropin in dairy ruminants other than cow. *Domest. Anim. Endocrinol.* 17:131–137.
- Baldi, A., S. Modina, F. Cheli, F. Gandolfi, L. Pinotti, L.B. Scesi, F. Fantuz, et V. Dell’Orto. 2002. Bovine Somatotropin Administration to Dairy Goats in Late Lactation: Effects on Mammary Gland Function, Composition and Morphology. *J. Dairy Sci.* 85:1093–1102. doi:10.3168/jds.S0022-0302(02)74170-2.





- Bauman, D.E. 1992. Bovine somatotropin: Review of an emerging animal technology. *J. Dairy Sci.* 75:3432–3451.
- Bauman, D.E. 1999. Bovine somatotropin and lactation: from basic science to commercial application. *Domest. Anim. Endocrinol.* 17:101–116.
- Baumrucker, C.R., et N.E. Erondou. 2000. Insulin-like growth factor (IGF) system in the bovine mammary gland and milk. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 5:53–64.
- Baumrucker, C.R., et B.H. Stemberger. 1989. Insulin and insulin-like growth factor-I stimulate DNA synthesis in bovine mammary tissue in vitro. *J. Anim. Sci.* 67:3503–3514.
- Ben Chedly, H., M. Boutinaud, P. Bernier-Dodier, P.-G. Marnet, et P. Lacasse. 2010. Disruption of cell junctions induces apoptosis and reduces synthetic activity in lactating goat mammary gland. *J. Dairy Sci.* 93:2938–2951. doi:10.3168/jds.2009-2678.
- Ben Chedly, H., P. Lacasse, P.-G. Marnet, et M. Boutinaud. 2013. The decrease in milk yield during once daily milking is due to regulation of synthetic activity rather than apoptosis of mammary epithelial cells in goats. *animal* 7:124–133. doi:10.1017/S1751731112001176.
- Ben Chedly, H., P. Lacasse, P.-G. Marnet, M. Komara, S. Marion, et M. Boutinaud. 2011. Use of milk epithelial cells to study regulation of cell activity and apoptosis during once-daily milking in goats. *animal* 5:572–579. doi:10.1017/S1751731110002284.
- Ben Chedly, H., P. Lacasse, P.G. Marnet, S. Wiart-Letort, L. Finot, et M. Boutinaud. 2009. Cell junction disruption after 36 h milk accumulation was associated with changes in mammary secretory tissue activity and dynamics in lactating dairy goats. *J Physiol Pharmacol* 60:105–111.
- Benić, M., B. Habrun, G. Kompes, Ž. Mihaljević, Ž. Cvetnić, M. Cergolj, et N. Maćešić. 2012. Cell content in milk from cows with *S. aureus* intramammary infection.. *Vet. Arh.* 82:411–422.
- Bergonier, D., R. de Crémoux, R. Rupp, G. Lagriffoul, et X. Berthelot. 2003. Mastitis of dairy small ruminants. *Vet. Res.* 34:689–716. doi:10.1051/vetres:2003030.
- Berning, L.M., M.J. Paape, R.H. Miller, et R.A. LeDane. 1987. Variation in N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase Activity and Somatic Cell Count Among Various Milk Fractions1. *J. Dairy Sci.* 70:1054–1060.
- Berry, S.D.K., P.M. Jobst, S.E. Ellis, R.D. Howard, A.V. Capuco, et R.M. Akers. 2003. Mammary Epithelial Proliferation and Estrogen Receptor  $\alpha$  Expression in Prepubertal Heifers: Effects of Ovariectomy and Growth Hormone. *J. Dairy Sci.* 86:2098–2105. doi:10.3168/jds.S0022-0302(03)73799-0.
- Blackburn, D.G., V. Hayssen, et C.J. Murphy. 1989. The origins of lactation and the evolution of milk: a review with new hypotheses. *Mammal Rev.* 19:1–26.



- Bole-Feysot, C., V. Goffin, M. Edery, N. Binart, et P.A. Kelly. 1998. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr. Rev.* 19:225–268.
- Bonnet, M., L. Bernard, S. Bes, et C. Leroux. 2013. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR normalisation in adipose tissue, muscle, liver and mammary gland from ruminants. *Animal* 7:1344–1353. doi:10.1017/S1751731113000475.
- Boutinaud, M., M.H. Ben Chedly, E. Delamaire, et J. Guinard-Flament. 2008. Milking and Feed Restriction Regulate Transcripts of Mammary Epithelial Cells Purified from Milk. *J. Dairy Sci.* 91:988–998. doi:10.3168/jds.2007-0587.
- Boutinaud, M., A. Boudon, J. Couedon, M. Johan, A. Narcy, et C. Hurtaud. 2014. Day length affects simultaneously mammary tight junction opening and MEC exfoliation in milk. *J. Anim. Sci.* 92 (E-Suppl. 2):202 (Abstr.).
- Boutinaud, M., L. Galio, V. Lollivier, L. Finot, S. Wiart, D. Esquerre, et E. Devinoy. 2013a. Unilateral once daily milking locally induces differential gene expression in both mammary tissue and milk epithelial cells revealing mammary remodeling. *Physiol. Genomics* 45:973–985. doi:10.1152/physiolgenomics.00059.2013.
- Boutinaud, M., J. Guinard-Flament, et H. Jammes. 2004a. The number and activity of mammary epithelial cells, determining factors for milk production. *Reprod. Nutr. Dev.* 44:499–508. doi:10.1051/rnd:2004054.
- Boutinaud, M., L. Herve, et V. Lollivier. 2015. Mammary epithelial cells isolated from milk are a valuable, non-invasive source of mammary transcripts. *Front. Genet.* 6. doi:10.3389/fgene.2015.00323.
- Boutinaud, M., N. Isaka, A. Deflandre, E. Gandemer, P.-G. Marnet, F. Dessauge, et V. Lollivier. 2013b. Prolactin-inhibitor cabergoline enhanced the mammary remodeling during drying-off in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 96(E-Suppl.1):151.
- Boutinaud, M., N. Isaka, E. Gandemer, P. Lamberton, S. Wiart, A.I. De Prado Taranilla, L.M. Sordillo, et V. Lollivier. 2017. Inhibiting prolactin by cabergoline accelerates mammary gland remodeling during the early dry period in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 100:1–12 (in press). doi:10.3168/jds.2017-12783.
- Boutinaud, M., N. Isaka, V. Lollivier, F. Dessauge, E. Gandemer, P. Lamberton, A.I. De Prado Taranilla, A. Deflandre, et L.M. Sordillo. 2016. Cabergoline inhibits prolactin secretion and accelerates involution in dairy cows after dry-off. *J. Dairy Sci.* 99:5707–5718. doi:10.3168/jds.2015-10782.
- Boutinaud, M., et H. Jammes. 2002. Potential uses of milk epithelial cells: a review. *Reprod. Nutr. Dev.* 42:133–147. doi:10.1051/rnd:2002013.



- Boutinaud, M., V. Lollivier, L. Finot, R.M. Bruckmaier, et P. Lacasse. 2012. Mammary cell activity and turnover in dairy cows treated with the prolactin-release inhibitor quinagolide and milked once daily. *J. Dairy Sci.* 95:177–187. doi:10.3168/jds.2011-4461.
- Boutinaud, M., C. Rousseau, D.H. Keisler, et H. Jammes. 2003. Growth hormone and milking frequency act differently on goat mammary gland in late lactation. *J. Dairy Sci.* 86:509–520.
- Boutinaud, M., H. Rulquin, D.H. Keisler, J. Djiane, et H. Jammes. 2002. Use of somatic cells from goat milk for dynamic studies of gene expression in the mammary gland. *J. Anim. Sci.* 80:1258–1269.
- Boutinaud, M., J.H. Shand, M.A. Park, K. Phillips, J. Beattie, D.J. Flint, et G.J. Allan. 2004b. A quantitative RT-PCR study of the mRNA expression profile of the IGF axis during mammary gland development. *J. Mol. Endocrinol.* 33:195–207.
- Boutinaud, M., L. Yart, P. Debournoux, S. Wiart, L. Finot, E. Le Guennec, P.-G. Marnet, F. Dessauge, et V. Lollivier. 2013c. Exfoliation of mammary epithelial cells in milk is linked with lactation persistency in dairy cows. Page 64th EAAP Annual Meeting, Nantes, France.
- Brownell, J. 1996. Quinagolide (Norprolac): a novel non-ergot prolactin inhibitor.. *Drugs Today* 32:1–31.
- Bruckmaier, R.M. 2001. Milk ejection during machine milking in dairy cows. *Livest. Prod. Sci.* 70:121–124.
- Bruckmaier, R.M. 2005. Normal and disturbed milk ejection in dairy cows. *Domest. Anim. Endocrinol.* 29:268–273. doi:10.1016/j.domaniend.2005.02.023.
- Bruckmaier, R.M., et J.W. Blum. 1998. Oxytocin release and milk removal in ruminants. *J. Dairy Sci.* 81:939–949.
- Bruckmaier, R.M., D. Schams, et J.W. Blum. 1993. Milk removal in familiar and unfamiliar surroundings: concentrations of oxytocin, prolactin, cortisol and  $\beta$ -endorphin. *J. Dairy Res.* 60:449. doi:10.1017/S0022029900027813.
- Bruckmaier, R.M., D. Schams, et J.W. Blum. 1994. Continuously elevated concentrations of oxytocin during milking are necessary for complete milk removal in dairy cows. *J. Dairy Res.* 61:323. doi:10.1017/S0022029900030740.
- Bruckmaier, R.M., O. Wellnitz, et J.W. Blum. 1997. Inhibition of milk ejection in cows by oxytocin receptor blockade,  $\alpha$ -adrenergic receptor stimulation and in unfamiliar surroundings. *J. Dairy Res.* 64:315–325.
- Burke, C.R., Y.J. Williams, L. Hofmann, J.K. Kay, C.V.C. Phyn, et S. Meier. 2010. Effects of an acute feed restriction at the onset of the seasonal breeding period on reproductive



- performance and milk production in pasture-grazed dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93:1116–1125. doi:10.3168/jds.2009-2562.
- Capuco, A.V., et R.M. Akers. 1999. Mammary involution in dairy animals. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 4:137–144.
- Capuco, A.V., et R.M. Akers. 2009. The origin and evolution of lactation. *J. Biol.* 8:37.
- Capuco, A.V., S.E. Ellis, S.A. Hale, E. Long, R.A. Erdman, X. Zhao, et M.J. Paape. 2003. Lactation persistency insights from mammary cell proliferation studies. *J. Anim. Sci.* 81:18–31.
- Capuco, A.V., D.L. Wood, R. Baldwin, K. Mcleod, et M.J. Paape. 2001. Mammary cell number, proliferation, and apoptosis during a bovine lactation: Relation to milk production and effect of bST. *J. Dairy Sci.* 84:2177–2187.
- Chilliard, Y., F. Bocquier, et M. Doreau. 1998. Digestive and metabolic adaptations of ruminants to undernutrition, and consequences on reproduction. *Reprod. Nutr. Dev.* 38:131–152.
- Chilliard, Y., A. Ferlay, et M. Doreau. 2001. Effect of different types of forages, animal fat or marine oils in cow's diet on milk fat secretion and composition, especially conjugated linoleic acid (CLA) and polyunsaturated fatty acids. *Livest. Prod. Sci.* 70:31–48.
- Clarke, R. 2000. Introduction and overview: sex steroids in the mammary gland. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 5:245–250.
- Cohick, W.S. 1998. Role of the insulin-like growth factors and their binding proteins in lactation. *J. Dairy Sci.* 81:1769–1777.
- Colitti, M., G. Stradaoli, et B. Stefanon. 2005. Mammary cell turnover in lactating ewes is modulated by changes of energy fuels. *Res. Vet. Sci.* 78:53–59. doi:10.1016/j.rvsc.2004.06.003.
- Collier, R.J., L.L. Hernandez, et N.D. Horseman. 2012. Serotonin as a homeostatic regulator of lactation. *Domest. Anim. Endocrinol.* 43:161–170. doi:10.1016/j.domaniend.2012.03.006.
- Couvreur, S., et C. Hurtaud. 2007. Le globule gras du lait: sécrétion, composition, fonctions et facteurs de variation. *INRA Prod Anim* 20:365–382.
- Cregan, M.D., Y. Fan, A. Appelbee, M.L. Brown, B. Klopčič, J. Koppen, L.R. Mitoulas, K.M.E. Piper, M.A. Choolani, Y.-S. Chong, et P.E. Hartmann. 2007. Identification of nestin-positive putative mammary stem cells in human breastmilk. *Cell Tissue Res.* 329:129–136. doi:10.1007/s00441-007-0390-x.
- Cross, B.A., et I.A. Silver. 1956. Milk ejection and mammary engorgement. *Proc. R. Soc. Med.* 49:978.





- Crowley, W.R., et W.E. Armstrong. 1992. Neurochemical Regulation of Oxytocin Secretion in Lactation\*. *Endocr. Rev.* 13:33–65. doi:10.1210/edrv-13-1-33.
- Dahl, G.E., B.A. Buchanan, et H.A. Tucker. 2000. Photoperiodic effects on dairy cattle: a review. *J. Dairy Sci.* 83:885–893.
- Dahl, G.E., T.H. Elsasser, A.V. Capuco, R.A. Erdman, et R.R. Peters. 1997. Effects of a long daily photoperiod on milk yield and circulating concentrations of insulin-like growth factor-I. *J. Dairy Sci.* 80:2784–2789.
- Dahl, G.E., et D. Petitclerc. 2003. Management of photoperiod in the dairy herd for improved production and health. *J. Anim. Sci.* 81:11–17.
- Dahl, G.E., S. Tao, et I.M. Thompson. 2012. Lactation Biology Symposium: Effects of photoperiod on mammary gland development and lactation. *J. Anim. Sci.* 90:755–760. doi:10.2527/jas.2011-4630.
- Davis, S.R., V.C. Farr, P.J.A. Copeman, V.R. Carruthers, C.H. Knight, et K. Stelwagen. 1998. Partitioning of milk accumulation between cisternal and alveolar compartments of the bovine udder: relationship to production loss during once daily milking. *J. Dairy Res.* 65:1–8.
- Deeks, S., J. Richards, et S. Nandi. 1988. Maintenance of normal rat mammary epithelial cells by insulin and insulin-like growth factor 1. *Exp. Cell Res.* 174:448–460.
- Delamaire, E., et J. Guinard-Flament. 2006. Longer milking intervals alter mammary epithelial permeability and the udder's ability to extract nutrients. *J. Dairy Sci.* 89:2007–2016.
- Delbecchi, L., N. Miller, C. Prud'homme, D. Petitclerc, G.F. Wagner, et P. Lacasse. 2005. 17 $\beta$ -estradiol reduces milk synthesis and increases stanniocalcin gene expression in the mammary gland of lactating cows. *Livest. Prod. Sci.* 98:57–66. doi:10.1016/j.livprodsci.2005.10.010.
- Delouis, C., L.-M. Houdebine, et P. Richard. 2001. *La lactation*. Editions Ellipses.
- Dessaige, F., V. Lollivier, B. Ponchon, R. Bruckmaier, L. Finot, S. Wiart, E. Cutullic, C. Disenhaus, S. Barbey, et M. Boutinaud. 2011. Effects of nutrient restriction on mammary cell turnover and mammary gland remodeling in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 94:4623–4635. doi:10.3168/jds.2010-4012.
- Djiane, J., et P. Durand. 1977. Prolactin-progesterone antagonism in self regulation of prolactin receptors in the mammary gland. *Nature* 266:641–643.
- Djiane, J., P. Durand, et P.A. Kelly. 1977. Evolution of prolactin receptors in rabbit mammary gland during pregnancy and lactation. *Endocrinology* 100:1348–1356.
- Ebnet, K. 2008. Organization of multiprotein complexes at cell–cell junctions. *Histochem. Cell Biol.* 130:1–20. doi:10.1007/s00418-008-0418-7.



- Escudero-Esparza, A., W.G. Jiang, et T.A. Martin. 2011. The Claudin family and its role in cancer and metastasis. *Front Biosci* 16:1069–1083.
- Farquhar, M.G., et G.E. Palade. 1963. Junctional complexes in various epithelia. *J. Cell Biol.* 17:375–412.
- Farr, V.C., K. Stelwagen, L.R. Cate, A.J. Molenaar, T.B. McFadden, et S.R. Davis. 1996. An improved method for the routine biopsy of bovine mammary tissue. *J. Dairy Sci.* 79:543–549.
- Feng, Z., A. Marti, B. Jehn, H.J. Altermatt, G. Chicaiza, et R. Jaggi. 1995. Glucocorticoid and progesterone inhibit involution and programmed cell death in the mouse mammary gland.. *J. Cell Biol.* 131:1095–1103.
- Flint, D.J., et M. Gardner. 1994. Evidence that growth-hormone stimulates milk synthesis by direct action on the mammary-gland and that prolactin exerts effects on milk secretion by maintenance of mammary deoxyribonucleic-acid content and tight junction status. *Endocrinology* 135:1119–1124.
- Flint, D.J., et C.H. Knight. 1997. Interactions of prolactin and growth hormone (GH) in the regulation of mammary gland function and epithelial cell survival. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 2:41–48.
- Flint, D.J., et R.G. Vernon. 1998. Effects of food restriction on the responses of the mammary gland and adipose tissue to prolactin and growth hormone in the lactating rat. *J. Endocrinol.* 156:299–305.
- Forsyth, I.A. 1996. The insulin-like growth factor and epidermal growth factor families in mammary cell growth in ruminants: Action and interaction with hormones. *J. Dairy Sci.* 79:1085–1096.
- Freeman, M.E., B. Kanyicska, A. Lerant, et G. Nagy. 2000. Prolactin: Structure, function, and regulation of secretion. *Physiol. Rev.* 80:1523–1631.
- Ganguly, R., N.M. Mehta, N. Ganguly, et M.R. Banerjee. 1979. Glucocorticoid modulation of casein gene transcription in mouse mammary gland. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76:6466–6470.
- Gaucheron, F. 2005. The minerals of milk. *Reprod. Nutr. Dev.* 45:473–483. doi:10.1051/rnd:2005030.
- Gorewit, R.C., K. Svennersten, W.R. Butler, et K. Uvnäs-Moberg. 1992. Endocrine responses in cows milked by hand and machine. *J. Dairy Sci.* 75:443–448.
- Graf, G.C. 1969. Ejection of milk in relation to levels of oxytocin injected intramuscularly. *J. Dairy Sci.* 52:1003–1007.
- Gross, J., H.A. van Dorland, R.M. Bruckmaier, et F.J. Schwarz. 2011. Performance and metabolic profile of dairy cows during a lactational and deliberately induced negative



- energy balance with subsequent realimentation. *J. Dairy Sci.* 94:1820–1830. doi:10.3168/jds.2010-3707.
- Guinard-Flament, J., E. Delamaire, P. Lambertson, et J.L. Peyraud. 2007. Adaptations of Mammary Uptake and Nutrient Use to Once-Daily Milking and Feed Restriction in Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 90:5062–5072. doi:10.3168/jds.2007-0259.
- Hale, S.A., A.V. Capuco, et R.A. Erdman. 2003. Milk yield and mammary growth effects due to increased milking frequency during early lactation. *J. Dairy Sci.* 86:2061–2071.
- Hart, I.C., et J.L. Linzell. 1977. An analysis of specific stimuli causing the release of prolactin and growth hormone at milking in the goat. *J. Endocrinol.* 72:163–171.
- Hassiotou, F., et P.E. Hartmann. 2014. At the Dawn of a New Discovery: The Potential of Breast Milk Stem Cells. *Adv. Nutr. Int. Rev. J.* 5:770–778. doi:10.3945/an.114.006924.
- Hengartner, M.O. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407:770.
- Hernandez, L.L., J.L. Collier, A.J. Vomachka, R.J. Collier, et N.D. Horseman. 2011. Suppression of lactation and acceleration of involution in the bovine mammary gland by a selective serotonin reuptake inhibitor. *J. Endocrinol.* 209:45–54. doi:10.1530/JOE-10-0452.
- Hernandez, L.L., C.M. Stiening, J.B. Wheelock, L.H. Baumgard, A.M. Parkhurst, et R.J. Collier. 2008. Evaluation of Serotonin as a Feedback Inhibitor of Lactation in the Bovine. *J. Dairy Sci.* 91:1834–1844. doi:10.3168/jds.2007-0766.
- Herve, L., H. Quesnel, V. Lollivier, et M. Boutinaud. 2016. Regulation of cell number in the mammary gland by controlling the exfoliation process in milk in ruminants. *J. Dairy Sci.* 99:854–863. doi:10.3168/jds.2015-9964.
- Herve, L., H. Quesnel, V. Lollivier, J. Portanguen, R.M. Bruckmaier, et M. Boutinaud. 2017. Mammary epithelium disruption and mammary epithelial cell exfoliation during milking in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 100:1–11 (in press). doi:http://dx.doi.org/10.3168/jds.2017-13166.
- Hillerton, J.E., C.H. Knight, A. Turvey, S.D. Wheatley, et C.J. Wilde. 1990. Milk yield and mammary function in dairy cows milked four times daily. *J. Dairy Res.* 57:285. doi:10.1017/S0022029900026935.
- Ho, F., R.L.C. Wong, et J.W.M. Lawton. 1979. Human colostrum and breast milk cells: A Light and Electron Microscopic Study. *Acta Paediatr.* 68:389–396.
- Horseman, N.D. 1999. Prolactin and mammary gland development. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 4:79–88.
- Hovey, R.C., H.W. Davey, D.D. Mackenzie, et T.B. McFadden. 1998. Ontogeny and epithelial–stromal interactions regulate IGF expression in the ovine mammary gland. *Mol. Cell. Endocrinol.* 136:139–144.



- Hurley, W.L. 1989. Symposium: Mammary gland function during involution and the declining phase of lactation - Mammary gland function during involution. *J. Dairy Sci.* 72:1637–1646.
- Jaggi, R., A. Marti, K. Guo, Z. Feng, et R.R. Friis. 1996. Regulation of a physiological apoptosis: mouse mammary involution. *J. Dairy Sci.* 79:1074–1084.
- Jahn, G.A., N. Daniel, G. Jolivet, L. Belair, C. Bole-Feysot, P.A. Kelly, et J. Djiane. 1997. In vivo study of prolactin (PRL) intracellular signalling during lactogenesis in the rat: JAK/STAT pathway is activated by PRL in the mammary gland but not in the liver. *Biol. Reprod.* 57:894–900.
- Janjanam, J., M. Jamwal, S. Singh, S. Kumar, A.K. Panigrahi, G. Hariprasad, M.K. Jena, V. Anand, S. Kumar, J.K. Kaushik, A.K. Dang, M. Mukesh, B.P. Mishra, A. Srinivasan, V.S. Reddy, et A.K. Mohanty. 2013. Proteome analysis of functionally differentiated bovine (*Bos indicus*) mammary epithelial cells isolated from milk. *PROTEOMICS* 13:3189–3204. doi:10.1002/pmic.201300031.
- Jenness, R. 1986. Lactational performance of various mammalian species. *J. Dairy Sci.* 69:869–885.
- Kerr, J.F., A.H. Wyllie, et A.R. Currie. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26:239.
- Khan, N.A., P. Yu, M. Ali, J.W. Cone, et W.H. Hendriks. 2015. Nutritive value of maize silage in relation to dairy cow performance and milk quality: Nutritive value of maize silage. *J. Sci. Food Agric.* 95:238–252. doi:10.1002/jsfa.6703.
- King, E.B., D. Barrett, M.-C. King, et N.L. Petrakis. 1975. Cellular composition of the nipple aspirate specimen of breast fluid: I. The benign cells. *Am. J. Clin. Pathol.* 64:728–738.
- Kitchen, B.J. 1981. Bovine mastitis: milk compositional changes and related diagnostic tests. *J. Dairy Res.* 48:167. doi:10.1017/S0022029900021580.
- Knight, C.H. 2000. The importance of cell division in udder development and lactation. *Livest. Prod. Sci.* 66:169–176.
- Knight, C.H. 2001. Overview of prolactin's role in farm animal lactation. *Livest. Prod. Sci.* 70:87–93.
- Knight, C.H., P.A. Fowler, et C.J. Wilde. 1990. Galactopoietic and mammogenic effects of long-term treatment with bovine growth hormone and thrice daily milking in goats. *J. Endocrinol.* 127:129–138.
- Knight, C.H., et M. Peaker. 1982. Development of the mammary gland. *J. Reprod. Fertil.* 65:521–536.
- Knight, C.H., et M. Peaker. 1984. Mammary development and regression during lactation in goats in relation to milk secretion. *Q. J. Exp. Physiol.* 69:331–338.





- Knight, T.W., D.S. Atkinson, N.A. Haack, C.R. Palmer, et K.H. Rowland. 1993. Effects of suckling regime on lamb growth rates and milk yields of Dorset ewes. *N. Z. J. Agric. Res.* 36:215–222. doi:10.1080/00288233.1993.10417756.
- Koldovsky, O. 1980. Hormones in milk. *Life Sci.* 26:1833–1836.
- Komara, M., M. Boutinaud, H. Ben Chedly, J. Guinard-Flament, et P.G. Marnet. 2009. Once-daily milking effects in high-yielding Alpine dairy goats. *J. Dairy Sci.* 92:5447–5455. doi:10.3168/jds.2009-2179.
- Koprowski, J.A., et H.A. Tucker. 1973. Serum prolactin during various physiological states and its relationship to milk production in the bovine. *Endocrinology* 92:1480–1487.
- Kuhn, N.J., et J.L. Linzell. 1970. Measurement of the quantity of lactose passing into mammary venous plasma and lymph in goats and in a cow. *J. Dairy Res.* 37:203. doi:10.1017/S002202990001325X.
- Lacasse, P., V. Lollivier, R.M. Bruckmaier, Y.R. Boisclair, G.F. Wagner, et M. Boutinaud. 2011. Effect of the prolactin-release inhibitor quinagolide on lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 94:1302–1309. doi:10.3168/jds.2010-3649.
- Lacasse, P., V. Lollivier, F. Dessauge, R.M. Bruckmaier, S. Ollier, et M. Boutinaud. 2012. New developments on the galactopoietic role of prolactin in dairy ruminants. *Domest. Anim. Endocrinol.* 43:154–160. doi:10.1016/j.domaniend.2011.12.007.
- Lacasse, P., S. Ollier, V. Lollivier, et M. Boutinaud. 2016. New insights into the importance of prolactin in dairy ruminants. *J. Dairy Sci.* 99:864–874. doi:10.3168/jds.2015-10035.
- Lamote, I., E. Meyer, A.M. Massart-Leën, et C. Burvenich. 2004. Sex steroids and growth factors in the regulation of mammary gland proliferation, differentiation, and involution. *Steroids* 69:145–159. doi:10.1016/j.steroids.2003.12.008.
- Lanctôt, S., P. Fustier, A.R. Taherian, B. Bisakowski, X. Zhao, et P. Lacasse. 2017. Effect of intramammary infusion of chitosan hydrogels at drying-off on bovine mammary gland involution. *J. Dairy Sci.* 100:2269–2281. doi:10.3168/jds.2016-12087.
- Laurent, F., B. Vignon, D. Coomans, J. Wilkinson, et A. Bonnel. 1992. Influence of Bovine Somatotropin on the Composition and Manufacturing Properties of Milk. *J. Dairy Sci.* 75:2226–2234.
- Leitner, G., U. Merin, O. Krifucks, S. Blum, A.L. Rivas, et N. Silanikove. 2012. Effects of intramammary bacterial infection with coagulase negative staphylococci and stage of lactation on shedding of epithelial cells and infiltration of leukocytes into milk: Comparison among cows, goats and sheep. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 147:202–210. doi:10.1016/j.vetimm.2012.04.019.
- Leitner, G., E. Shoshani, O. Krifucks, M. Chaffer, et A. Saran. 2000. Milk leucocyte population patterns in bovine udder infection of different aetiology. *J. Vet. Med. Ser. B* 47:581–589.



- Li, N., R. Richoux, M.-H. Perruchot, M. Boutinaud, J.-F. Mayol, et V. Gagnaire. 2015. Flow cytometry approach to quantify the viability of milk somatic cell counts after various physico-chemical treatments. *PloS One* 10:e0146071.
- Li, P., P.S. Rudland, D.G. Fernig, L.M.B. Finch, et C.J. Wilde. 1999. Modulation of mammary development and programmed cell death by the frequency of milk removal in lactating goats. *J. Physiol.* 519:885–900.
- Lincoln, D.W., et A.C. Paisley. 1982. Neuroendocrine control of milk ejection. *J. Reprod. Fertil.* 65:571–586.
- Linzell, J.L., et M. Peaker. 1971a. Intracellular concentrations of sodium, potassium and chloride in the lactating mammary gland and their relation to the secretory mechanism. *J. Physiol.* 216:683–700.
- Linzell, J.L., et M. Peaker. 1971b. The effects of oxytocin and milk removal on milk secretion in the goat. *J. Physiol.* 216:717.
- Linzell, J.L., M. Peaker, et J.C. Taylor. 1975. The effects of prolactin and oxytocin on milk secretion and on the permeability of the mammary epithelium in the rabbit. *J. Physiol.* 253:547–563.
- Littlejohn, M.D., C.G. Walker, H.E. Ward, K.B. Lehnert, R.G. Snell, G.A. Verkerk, R.J. Spelman, D.A. Clark, et S.R. Davis. 2010. Effects of reduced frequency of milk removal on gene expression in the bovine mammary gland. *Physiol. Genomics* 41:21–32. doi:10.1152/physiolgenomics.00108.2009.
- Lollivier, V., J. Guinard-Flament, M. Ollivier-Bousquet, et P.-G. Marnet. 2002. Oxytocin and milk removal: two important sources of variation in milk production and milk quality during and between milkings. *Reprod. Nutr. Dev.* 42:173–186.
- Lollivier, V., P. Lacasse, J. Angulo Arizala, P. Lambertson, S. Wiart, J. Portanguen, R. Bruckmaier, et M. Boutinaud. 2015. In vivo inhibition followed by exogenous supplementation demonstrates galactopoietic effects of prolactin on mammary tissue and milk production in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 98:8775–8787. doi:10.3168/jds.2015-9853.
- Lollivier, V., et P.-G. Marnet. 2005. Galactopoietic effect of milking in lactating Holstein cows: Role of physiological doses of oxytocin. *Livest. Prod. Sci.* 95:131–142. doi:10.1016/j.livprodsci.2005.01.013.
- Lollivier, V., P.-G. Marnet, S. Delpal, D. Rainteau, C. Achard, A. Rabot, et M. Ollivier-Bousquet. 2006. Oxytocin stimulates secretory processes in lactating rabbit mammary epithelial cells: Oxytocin and mammary epithelial cells. *J. Physiol.* 570:125–140. doi:10.1113/jphysiol.2005.097816.



- Marnet, P.G., H. Volland, P. Pradelles, J. Grassi, et M. Beaufile. 1994. Subpicogram determination of oxytocin by an enzyme immunoassay using acetylcholinesterase as label. *J. Immunoassay* 15:35–53. doi:10.1080/15321819408009570.
- Martinet, J., et L. Houdebine. 1993. *Endocrinologie de la lactation*. Martinet J, Houdebine L (eds). INRA (edn), INSERM (edn). Versailles.
- Masedunskas, A., Y. Chen, R. Stussman, R. Weigert, et I.H. Mather. 2017. Kinetics of milk lipid droplet transport, growth, and secretion revealed by intravital imaging: lipid droplet release is intermittently stimulated by oxytocin. *Mol. Biol. Cell* 28:935–946.
- Matsuda, M., T. Imaoka, A.J. Vomachka, G.A. Gudelsky, Z. Hou, M. Mistry, J.P. Bailey, K.M. Nieport, D.J. Walther, M. Bader, et N. D. Horseman. 2004. Serotonin regulates mammary gland development via an autocrine-paracrine loop. *Dev. Cell* 6:193–203.
- McAnulty, P.A., et L.M. Burns. 2004. Evaluation of the maternal and neonatal effects of the oxytocin antagonist, atosiban, in a cross-fostering study in rats. *Reprod. Toxicol.* 19:65–70. doi:10.1016/j.reprotox.2004.06.003.
- Miller, A.R.E., E.P. Stanisiewski, R.A. Erdman, L.W. Douglass, et G.E. Dahl. 1999. Effects of long daily photoperiod and bovine somatotropin (Trobest®) on milk yield in cows. *J. Dairy Sci.* 82:1716–1722.
- Moll, R., W.W. Franke, D.L. Schiller, B. Geiger, et R. Krepler. 1982. The catalog of human cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 31:11–24.
- Mollett, T.A., R.E. Erb, E.L. Monk, et P.V. Malven. 1976. Changes in Estrogen, Progesterone, Prolactin and lactation traits associated with injection of Estradiol-17 b and Progesterone into lactating cows. *J. Anim. Sci.* 42:655–663.
- Morgante, M., S. Ranucci, M. Pauselli, C. Casoli, et E. Duranti. 1996. Total and differential cell count in milk of primiparous Comisana ewes without clinical signs of mastitis. *Small Rumin. Res.* 21:265–271.
- Murthy, G.K., et U. Rhea. 1967. Determination of major cation in milk by atomic absorption spectrophotometry. *J. Dairy Sci.* 50:313–317.
- Nagamatsu, Y., et T. Oka. 1983. The differential actions of cortisol on the synthesis and turnover of alpha-lactalbumin and casein and on accumulation of their mRNA in mouse mammary gland in organ culture. *Biochem. J.* 212:507–515.
- Negrao, J.A., P.-G. Marnet, et J. Labussière. 2001. Effect of milking frequency on oxytocin release and milk production in dairy ewes. *Small Rumin. Res.* 39:181–187.
- Negrao, J.A., M.A. Porcionato, A.M. De Passille, et J. Rushen. 2004. Cortisol in saliva and plasma of cattle after ACTH administration and milking. *J. Dairy Sci.* 87:1713–1718.
- Neville, M.C., T.B. McFadden, et I. Forsyth. Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion.



- Neville, M.C., J. Morton, et S. Umemura. 2001. Lactogenesis: the transition from pregnancy to lactation. *Pediatr. Clin. North Am.* 48:35–52.
- Neville, M.C., et M. Peaker. 1981. Ionized calcium in milk and the integrity of the mammary epithelium in the goat.. *J. Physiol.* 313:561–570.
- Nguyen, D.A., et M.C. Neville. 1998. Tight junction regulation in the mammary gland. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 3:233–246.
- Nguyen, D.A., A.F. Parlow, et M.C. Neville. 2001. Hormonal regulation of tight junction closure in the mouse mammary epithelium during the transition from pregnancy to lactation. *J. Endocrinol.* 170:347–356.
- Nielsen, N.I., T. Larsen, M. Bjerring, et K.L. Ingvarsten. 2005. Quarter health, milking interval, and sampling time during milking affect the concentration of milk constituents. *J. Dairy Sci.* 88:3186–3200.
- Nørgaard, J., A. Sørensen, M.T. Sørensen, J.B. Andersen, et K. Sejrsen. 2005. Mammary cell turnover and enzyme activity in dairy cows: Effects of milking frequency and diet energy density. *J. Dairy Sci.* 88:975–982.
- Nørgaard, J.V., M.T. Sørensen, P.K. Theil, J. Sehested, et K. Sejrsen. 2008. Effect of pregnancy and feeding level on cell turnover and expression of related genes in the mammary tissue of lactating dairy cows. *animal* 2. doi:10.1017/S1751731108001626.
- Nurse, P. 2000. A long twentieth century of the cell cycle and beyond. *Cell* 100:71–78.
- Olazabal, I., J. Munoz, S. Ogueta, E. Obregon, et J.P. Garcia-Ruiz. 2000. Prolactin (PRL)-PRL Receptor System Increases Cell Proliferation Involving JNK (c-Jun Amino Terminal Kinase) and AP-1 Activation: Inhibition by Glucocorticoids. *Mol. Endocrinol.* 14:564–575.
- Olde Riekerink, R.G.M., H.W. Barkema, W. Veenstra, F.E. Berg, H. Stryhn, et R.N. Zadoks. 2007. Somatic cell count during and between milkings. *J. Dairy Sci.* 90:3733–3741. doi:10.3168/jds.2007-0001.
- Ollivier-Bousquet, M. 1993. Les hormones du lait: provenance et rôles. *INRA Prod. Anim.* 6:253–263.
- Ontsouka, C.E., R.M. Bruckmaier, et J.W. Blum. 2003. Fractionized milk composition during removal of colostrum and mature milk. *J. Dairy Sci.* 86:2005–2011.
- Öste, R., M. Jägerstad, et I. Andersson. 1997. Vitamins in milk and milk products. Springer US, Boston, MA.
- Paape, M., J. Mehrzad, X. Zhao, J. Detilleux, et C. Burvenich. 2002. Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 7:109–121.





- Pai, V.P., et N.D. Horseman. 2011. Multiple cellular responses to serotonin contribute to epithelial homeostasis. *PLoS One* 6:e17028.
- Papanicolaou, G.N., D.G. Holmquist, G.M. Bader, et E.A. Falk. 1958. Exfoliative cytology of the human mammary gland and its value in the diagnosis of cancer and other diseases of the breast. *Cancer* 11:377–409.
- Peaker, M., et M.C. Neville. 1991. Hormones in milk: chemical signals to the offspring ?. *J. Endocrinol.* 131:1–3.
- Péchoux, C., T. Gudjonsson, L. Ronnov-Jessen, M.J. Bissell, et O.W. Petersen. 1999. Human mammary luminal epithelial cells contain progenitors to myoepithelial cells. *Dev. Biol.* 206:88–99.
- Perruchot, M.-H., M. Arévalo-Turrubiarte, F. Dufreneix, L. Finot, V. Lollivier, E. Chanut, F. Mayeur, et F. Dessauge. 2016. Mammary Epithelial Cell Hierarchy in the Dairy Cow Throughout Lactation. *Stem Cells Dev.* 25:1407–1418. doi:10.1089/scd.2016.0098.
- Peters, R.R., L.T. Chapin, R.S. Emery, et H.A. Tucker. 1981. Milk yield, feed intake, prolactin, growth hormone, and glucocorticoid response of cows to supplemented light. *J. Dairy Sci.* 64:1671–1678.
- Peters, R.R., L.T. Chapin, K.B. Leining, et H.A. Tucker. 1978. Supplemental lighting stimulates growth and lactation in cattle. *Science* 199:911–912.
- Prosser, C.G., S.R. Davis, V.C. Farr, L.G. Moore, et P.D. Gluckman. 1994. Effects of close-arterial (external pudic) infusion of insulin-like growth factor-II on milk yield and mammary blood flow in lactating goats. *J. Endocrinol.* 142:93–99.
- Prosser, C.G., I.R. Fleet, A.N. Corps, E.R. Froesch, et R.B. Heap. 1990. Increase in milk secretion and mammary blood flow by intra-arterial infusion of insulin-like growth factor-I into the mammary gland of the goat. *J. Endocrinol.* 126:437–443.
- Radcliff, R.P., B.L. McCormack, D.H. Keisler, B.A. Crooker, et M.C. Lucy. 2006. Partial feed restriction decreases growth hormone receptor 1A mRNA expression in postpartum dairy cows. *J. Dairy Sci.* 89:611–619.
- Radisky, D.C., Y. Hirai, et M.J. Bissell. 2003. Delivering the message: epimorphin and mammary epithelial morphogenesis. *Trends Cell Biol.* 13:426–434. doi:10.1016/S0962-8924(03)00146-6.
- Rauner, G., et I. Barash. 2012. Cell hierarchy and lineage commitment in the bovine mammary gland. *PLoS One* 7:e30113.
- Reed, J.C. 2000. Mechanisms of apoptosis. *Am. J. Pathol.* 157:1415–1430.
- Rémond, B., et D. Pomiès. 2005. Once-daily milking of dairy cows: a review of recent French experiments. *Anim. Res.* 54:427–442. doi:10.1051/animres:2005040.



- Rie, E.J., I.P. Rie, et G.C. Buehring. 1976. Short-term line of normal baboon mammary epithelial cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 57:607–611.
- Robinson, T.L., I.A. Sutherland, et J. Sutherland. 2007. Validation of candidate bovine reference genes for use with real-time PCR. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 115:160–165. doi:10.1016/j.vetimm.2006.09.012.
- Rosen, J.M., S.L. Wyszomiersky, et D. Hadsell. 1999. Regulation of milk protein gene expression. *Annu. Rev. Nutr.* 19:407–436.
- Ruan, W., C.B. Newman, et D.L. Kleinberg. 1992. Intact and amino-terminally shortened forms of insulin-like growth factor I induce mammary gland differentiation and development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89:10872–10876.
- Rushen, J., L. Munksgaard, P.G. Marnet, et A.M. De Passillé. 2001. Human contact and the effects of acute stress on cows at milking. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 73:1–14.
- Russo, V.M., A.W.N. Cameron, F.R. Dunshea, A.J. Tilbrook, et B.J. Leury. 2013. Artificially extending photoperiod improves milk yield in dairy goats and is most effective in late lactation. *Small Rumin. Res.* 113:179–186. doi:10.1016/j.smallrumres.2013.01.002.
- Sarikaya, H., G. Schlamberger, H.H.D. Meyer, et R.M. Bruckmaier. 2006. Leukocyte populations and mRNA expression of inflammatory factors in quarter milk fractions at different somatic cell score levels in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 89:2479–2486.
- Sarikaya, H., C. Werner-Misof, M. Atzkern, et R.M. Bruckmaier. 2005. Distribution of leucocyte populations, and milk composition, in milk fractions of healthy quarters in dairy cows. *J. Dairy Res.* 72:486. doi:10.1017/S0022029905001317.
- Schmitz, S., M.W. Pfaffl, H.H.D. Meyer, et R.M. Bruckmaier. 2004. Short-term changes of mRNA expression of various inflammatory factors and milk proteins in mammary tissue during LPS-induced mastitis. *Domest. Anim. Endocrinol.* 26:111–126. doi:10.1016/j.domaniend.2003.09.003.
- Schütz, K.E., N.R. Cox, K.A. Macdonald, J.R. Roche, G.A. Verkerk, A.R. Rogers, C.B. Tucker, L.R. Matthews, S. Meier, et J.R. Webster. 2013. Behavioral and physiological effects of a short-term feed restriction in lactating dairy cattle with different body condition scores at calving. *J. Dairy Sci.* 96:4465–4476. doi:10.3168/jds.2012-6507.
- Sciascia, Q., D. Pacheco, et S.A. McCoard. 2013. Increased milk protein synthesis in response to exogenous growth hormone is associated with changes in mechanistic (mammalian) target of rapamycin (mTOR)C1-dependent and independent cell signaling. *J. Dairy Sci.* 96:2327–2338. doi:10.3168/jds.2012-6267.
- Shamay, A., N. Cohen, M. Niwa, et A. Gertler. 1988. Effect of insulin-like growth factor I on deoxyribonucleic acid synthesis and galactopoiesis in bovine undifferentiated and lactating mammary tissue in vitro. *Endocrinology* 123:804–809.



- Shamay, A., R. Homans, Y. Fuerman, I. Levin, H. Barash, N. Silanikove, et S.J. Mabweesh. 2005. Expression of albumin in nonhepatic tissues and its synthesis by the bovine mammary gland. *J. Dairy Sci.* 88:569–576.
- Shehata, M., A. Teschendorff, G. Sharp, N. Novcic, A. Russell, S. Avril, M. Prater, P. Eirew, C. Caldas, C. Watson, et J. Stingl. 2012. Phenotypic and functional characterisation of luminal cell hierarchy of the mammary gland. *Breast Cancer Res.* 14:R134.
- Shuster, D.E., R.J. Harmon, J.A. Jackson, et R.W. Hemken. 1991. Suppression of milk production during endotoxin-induced mastitis. *J. Dairy Sci.* 74:3763–3774.
- Sigl, T., H.H.D. Meyer, et S. Wiedemann. 2012. Gene expression of six major milk protein in primary bovine mammary epithelial cells isolated from milk during the first twenty weeks of lactation. *Czech J. Anim. Sci.* 57:469–480.
- Sigl, T., H.H.D. Meyer, et S. Wiedemann. 2014. Gene expression analysis of protein synthesis pathways in bovine mammary epithelial cells purified from milk during lactation and short-term restricted feeding. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 98:84–95. doi:10.1111/jpn.12039.
- Singer, K.L., B.R. Stevenson, P.L. Woo, et G.L. Firestone. 1994. Relationship of serine/threonine phosphorylation/dephosphorylation signaling to glucocorticoid regulation of tight junction permeability and ZO-1 distribution in nontransformed mammary epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 269:16108–16115.
- Sinowatz, F., D. Schams, S. Kolle, A. Plath, D. Lincoln, et M.J. Waters. 2000. Cellular localisation of GH receptor in the bovine mammary gland during mammaryogenesis, lactation and involution. *J. Endocrinol.* 166:503–510.
- Soares, M.J., H. Müller, K.E. Orwig, T.J. Peters, et G. Dai. 1998. The uteroplacental prolactin family and pregnancy. *Biol. Reprod.* 58:273–284.
- Sorensen, A., D.D. Muir, et C.H. Knight. 2001. Thrice-daily milking throughout lactation maintains epithelial integrity and thereby improves milk protein quality. *J. Dairy Res.* 68:15–25.
- Sorg, D., A. Potzel, M. Beck, H.H.D. Meyer, E. Viturro, et H. Kliem. 2012. Effects of cell culture techniques on gene expression and cholesterol efflux in primary bovine mammary epithelial cells derived from milk and tissue. *Vitro Cell. Dev. Biol. - Anim.* 48:550–553. doi:10.1007/s11626-012-9544-6.
- Sotiropoulos, A., S. Moutoussamy, F. Renaudie, M. Clauss, C. Kayser, F. Gouilleux, P.A. Kelly, et J. Finidori. 1996. Differential activation of Stat3 and Stat5 by distinct regions of the growth hormone receptor. *Mol. Endocrinol.* 10:998–1009.
- Stefanon, B., M. Colitti, G. Gabai, C.H. Knight, et C.J. Wilde. 2002. Mammary apoptosis and lactation persistency in dairy animals. *J. Dairy Res.* 69:37–52.



- Stein, T., N. Salomonis, et B.A. Gusterson. 2007. Mammary Gland Involution as a Multi-step Process. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 12:25–35. doi:10.1007/s10911-007-9035-7.
- Stelwagen, K., S.R. Davis, V.C. Farr, C.G. Prosser, et R.A. Sherlock. 1994. Mammary epithelial cell tight junction integrity and mammary blood flow during an extended milking interval in goats. *J. Dairy Sci.* 77:426–432.
- Stelwagen, K., V.C. Farr, S.R. Davis, et C.G. Prosser. 1995. EGTA-induced disruption of epithelial cell tight junctions in the lactating caprine mammary gland. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 269:R848–R855.
- Stelwagen, K., V.C. Farr, H.A. McFadden, et S.R. Davis. 1997. Time course of milk accumulation-induced opening of mammary tight junctions and blood clearance of milk components. *Am. J. Physiol.* 273:R379–R389.
- Stelwagen, K., H. Hopster, J.T.N. Van Der Werf, et H.J. Blokhuis. 2000. Short communication: Effects of isolation stress on mammary tight junctions in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 83:48–51.
- Stelwagen, K., H.A. McFadden, et J. Demmer. 1999. Prolactin, alone or in combination with glucocorticoids, enhances tight junction formation and expression of the tight junction protein occludin in mammary cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 156:55–61.
- Stelwagen, K., et K. Singh. 2014. The Role of Tight Junctions in Mammary Gland Function. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 19:131–138. doi:10.1007/s10911-013-9309-1.
- Stelwagen, K., D.C. Van Espen, G.A. Verkerk, H.A. McFadden, et V.C. Farr. 1998. Elevated plasma cortisol reduces permeability of mammary tight junctions in the lactating bovine mammary epithelium. *J. Endocrinol.* 159:173–178.
- Stiening, C.M., J.B. Hoying, M.B. Abdallah, A.M. Hoying, R. Pandey, K. Greer, et R.J. Collier. 2008. The Effects of Endocrine and Mechanical Stimulation on Stage I Lactogenesis in Bovine Mammary Epithelial Cells. *J. Dairy Sci.* 91:1053–1066. doi:10.3168/jds.2007-0161.
- Stingl, J., C.J. Eaves, I. Zandieh, et J.T. Emerman. 2001. Characterization of bipotent mammary epithelial progenitor cells in normal adult human breast tissue. *Breast Cancer Res. Treat.* 67:93–109.
- Streuli, C.H., et A.P. Gilmore. 1999. Adhesion-mediated signaling in the regulation of mammary epithelial cell survival. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 4:183–191.
- Stull, M.A., V. Pai, A.J. Vomachka, A.M. Marshall, G.A. Jacob, et N.D. Horseman. 2007. Mammary gland homeostasis employs serotonergic regulation of epithelial tight junctions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104:16708–16713.





- Suárez-Trujillo, A., J.S. Crodian, A.M. Shamay, S.J. Mabweesh, K. Plaut, et T.M. Casey. 2016. 0853 Interactions among serotonin and circadian systems in the mammary gland. *J. Anim. Sci.* 94:410. doi:10.2527/jam2016-0853.
- Thompson, G.E. 1996. Cortisol and regulation of tight junctions in the mammary gland of the late-pregnant goat. *J. Dairy Res.* 63:305. doi:10.1017/S0022029900031794.
- Turkington, R.W. 1970. Stimulation of RNA synthesis in isolated mammary cells by insulin and prolactin bound to sepharose. *Biochem. Physiol. Res. Commun.* 41:1362–1367.
- Van Garderen, E., J.F. Swennenhuis, E. Hellmen, et J.A. Schalken. 2001. Growth hormone induces tyrosyl phosphorylation of the transcription factors Stat5a and Stat5b in CMT-U335 canine mammary tumor cells. *Domest. Anim. Endocrinol.* 20:123–135.
- Veltmaat, J.M., A.A. Mailleux, J.P. Thiery, et S. Bellusci. 2003. Mouse embryonic mammaryogenesis as a model for the molecular regulation of pattern formation. *Differentiation* 71:1–17.
- Vicari, T., J.J.G.C. van den Borne, W.J.J. Gerrits, Y. Zbinden, et J.W. Blum. 2008. Postprandial blood hormone and metabolite concentrations influenced by feeding frequency and feeding level in veal calves. *Domest. Anim. Endocrinol.* 34:74–88. doi:10.1016/j.domaniend.2006.11.002.
- Wagner, S.A., D.E. Jones, et M.D. Apley. 2009. Effect of endotoxic mastitis on epithelial cell numbers in the milk of dairy cows. *Am. J. Vet. Res.* 70:796–799.
- Wall, E.H., H.M. Crawford, S.E. Ellis, G.E. Dahl, et T.B. McFadden. 2006. Mammary response to exogenous prolactin or frequent milking during early lactation in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 89:4640–4648.
- Wall, E.H., et T.B. McFadden. 2012. Triennial lactation symposium: a local affair: how the mammary gland adapts to changes in milking frequency. *J. Anim. Sci.* 90:1695–1707.
- Wall, S.K., O. Wellnitz, L.E. Hernández-Castellano, A. Ahmadpour, et R.M. Bruckmaier. 2016. Supraphysiological oxytocin increases the transfer of immunoglobulins and other blood components to milk during lipopolysaccharide- and lipoteichoic acid-induced mastitis in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 99:9165–9173. doi:10.3168/jds.2016-11548.
- Wang, J., Q.-H. Zhang, Z.-H. Wang, et H.-M. Li. 2009. Determination of Major Bovine Milk Proteins by Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography. *Chin. J. Anal. Chem.* 37:1667–1670. doi:10.1016/S1872-2040(08)60146-2.
- Wang, T., J.-N. Lim, J.-D. Bok, J.-H. Kim, S.-K. Kang, S.-B. Lee, J.-H. Hwang, K.-H. Lee, H.-S. Kang, Y.-J. Choi, E.-J. Kim, S.-H. Choi, et H.-G. Lee. 2014. Association of protein expression in isolated milk epithelial cells and cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid proportions in milk from dairy cows: Association of protein and cis-9, trans-11 CLA in milk. *J. Sci. Food Agric.* 94:1835–1843. doi:10.1002/jsfa.6502.



- Watson, C.J. 2006. Involution: apoptosis and tissue remodelling that convert the mammary gland from milk factory to a quiescent organ. *Breast Cancer Res.* 8:203.
- Wellnitz, O., R. Bruckmaier, C. Albrecht, et J.W. Blum. 1999. Atosiban, an oxytocin receptor blocking agent: pharmacokinetics and inhibition of milk ejection in dairy cows. *J. Dairy Res.* 66:1–8.
- Werner-Misof, C., M.W. Pfaffl, H.H.D. Meyer, et R.M. Bruckmaier. 2007. Effect of chronic oxytocin-treatment on the bovine mammary gland immune system. *Vet. Med. (Praha)* 52:475–486.
- Wiat, S., H. Ben Chedly, et M. Boutinaud. 2013. Le turnover des cellules dans la glande mammaire évalué par immunohistochimie, comme indicateur de la production de lait. *Rev. Fr. Histotechnol.* 26:77–87.
- Wilde, C.J., C.V. Addey, P. Li, et D.G. Fernig. 1997. Programmed cell death in bovine mammary tissue during lactation and involution. *Exp. Physiol.* 82:943–953.
- Wilde, C.J., A.J. Henderson, C.H. Knight, D.R. Blatchford, A. Faulkner, et R.G. Vernon. 1987. Effects of long-term thrice-daily milking on mammary enzyme activity, cell population and milk yield in the goat. *J. Anim. Sci.* 64:533–539.
- Wilde, C.J., et C.H. Knight. 1990. Milk yield and mammary function in goats during and after once-daily milking. *J. Dairy Res.* 57:441. doi:10.1017/S0022029900029484.
- Wilde, C.J., C.H. Knight, et D.J. Flint. 1999. Control of Milk Secretion and Apoptosis During Mammary Involution. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 4:129–136.
- Williams, J.M., et C.W. Daniel. 1983. Mammary ductal elongation: differentiation of myoepithelium and basal lamina during branching morphogenesis. *Dev. Biol.* 97:274–290.
- Yadav, P., P. Kumar, M. Mukesh, R.S. Kataria, A. Yadav, A.K. Mohanty, et B.P. Mishra. 2015. Kinetics of lipogenic genes expression in milk purified mammary epithelial cells (MEC) across lactation and their correlation with milk and fat yield in buffalo. *Res. Vet. Sci.* 99:129–136. doi:10.1016/j.rvsc.2015.01.003.
- Yart, L. 2012. Rôle des stéroïdes ovariens dans la dynamique cellulaire et moléculaire de la glande mammaire bovine - Implications dans la persistance de la lactation. Institut Supérieur des Sciences Agronomiques, Agro-alimentaires, Horticoles et du Paysage, Rennes.
- Yart, L., F. Dessauge, L. Finot, S. Barbey, P.G. Marnet, et V. Lollivier. 2012a. Ovariectomy improves lactation persistency in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95:3794–3802. doi:10.3168/jds.2011-5195.
- Yart, L., L. Finot, P.-G. Marnet, et F. Dessauge. 2012b. Suppression of ovarian secretions before puberty strongly affects mammogenesis in the goat. *J. Dairy Res.* 79:157–167. doi:10.1017/S0022029912000106.



- Yart, L., V. Lollivier, L. Finot, J. Dupont, S. Wiart, M. Boutinaud, P.G. Marnet, et F. Dessauge. 2013. Changes in mammary secretory tissue during lactation in ovariectomized dairy cows. *Steroids* 78:973–981. doi:10.1016/j.steroids.2013.06.003.
- Yart, L., V. Lollivier, P.G. Marnet, et F. Dessauge. 2014. Role of ovarian secretions in mammary gland development and function in ruminants. *animal* 8:72–85. doi:10.1017/S1751731113001638.
- Zettl, K.S., M.D. Sjaastad, P.M. Riskin, G. Parry, T.E. Machen, et G.L. Firestone. 1992. Glucocorticoid-induced formation of tight junctions in mouse mammary epithelial cells in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89:9069–9073.



# Annexes





## Annexe 1

L. Herve, H. Quesnel, V. Lollivier, M. Boutinaud (2016). Regulation of cell number in the mammary gland by controlling the exfoliation process in milk in ruminants. *Journal of Dairy Science* 99:854–863

### Régulation du nombre de cellules dans la glande mammaire par le contrôle du processus d'exfoliation chez les ruminants

L. Herve,\*† H. Quesnel,\*† V. Lollivier,\*†‡ and M. Boutinaud\*†

\*INRA, UMR1348 PEGASE, F-35590 Saint-Gilles, France

†Agrocampus Ouest, UMR1348 PEGASE, F-35000 Rennes, France

‡ Université Européenne de Bretagne, F-35000 Rennes, France

**Résumé** – La quantité de lait produite dépend en partie du nombre de cellules épithéliales mammaires (CEM) présentes dans la glande mammaire. Il est connu depuis de nombreuses années que les variations de ce nombre de CEM dans la glande mammaire résultent de l'équilibre entre la prolifération cellulaire et l'apoptose. Un autre processus pouvant influencer le nombre de CEM dans le tissu mammaire est l'exfoliation des CEM dans le lait. Le taux d'exfoliation, défini comme le nombre de CEM exfoliées, par jour est estimé par mesure de la concentration des CEM dans le lait. Cette mesure peut se faire par microscopie en lumière blanche, par cytométrie de flux ou par purification des CEM du lait par une méthode immuno-magnétique. Différents modèles expérimentaux ont été utilisés pour induire des variations de production laitière et étudier le taux d'exfoliation des CEM. Réduire la fréquence de traite de deux fois à une fois par jour ne semble pas avoir d'effet sur l'exfoliation des CEM dans le lait de vache ou de chèvre après 7 jours de traitement mais induit une augmentation du taux d'exfoliation chez la chèvre laitière lorsque le traitement est appliqué pendant une période plus longue. Chez la vache laitière, une augmentation du taux d'exfoliation a aussi été observée lorsque les animaux ont été soumis à des jours courts en comparaison à des jours longs ou en réponse à une mammite induite par une endotoxine. D'autres modèles expérimentaux ont été mis en place pour étudier le contrôle hormonal du processus d'exfoliation et son lien avec la production laitière. La suppression des stéroïdes ovariens par ovariectomie engendre une amélioration de la persistance de la lactation et une diminution de l'exfoliation des CEM. Administrer des inhibiteurs de la sécrétion de prolactine au cours de la lactation ou au tarissement augmente l'exfoliation des CEM alors que de l'injection de prolactine exogène au cours de la lactation tend à limiter l'effet négatif des inhibiteurs de la prolactine. Ces résultats suggèrent que la prolactine pourrait réguler le processus d'exfoliation. Dans la plupart de ces études, les variations du taux d'exfoliation étaient associées à des variations de production laitière et de l'intégrité de l'épithélium. L'exfoliation des CEM pourrait donc influencer la quantité de lait produit en régulant le nombre de CEM dans le tissu mammaire.

**Mots clés** : vache laitière, chèvre laitière, production laitière, cellule épithéliale mammaire, exfoliation.





## Regulation of cell number in the mammary gland by controlling the exfoliation process in milk in ruminants

L. Herve,\*† H. Quesnel,\*† V. Lollivier,\*†‡ and M. Boutinaud\*†<sup>1</sup>

\*INRA, UMR1348 PEGASE, F-35590 Saint Gilles, France

†Agrocampus Ouest, UMR1348 PEGASE, F-35000 Rennes, France

‡Université Européenne de Bretagne, F-35000 Rennes, France

### ABSTRACT

Milk yield is partly influenced by the number of mammary epithelial cells (MEC) in the mammary gland. It is well known that variations in MEC number are due to cell proliferation and apoptosis. The exfoliation of MEC from the mammary epithelium into milk is another process that might influence MEC number in the mammary tissue. The rate of MEC exfoliation can be assessed by measuring the milk MEC content through light microscopy, flow cytometry analysis, or an immuno-magnetic method for MEC purification. Various experimental models have been used to affect milk yield and study the rate of MEC exfoliation. Reducing milking frequency from twice to once daily did not seem to have any effect on MEC loss in goat and cow milk after 7 d, but increased MEC loss per day in goats when applied for a longer period. An increase in MEC exfoliation was also observed during short days as compared with long days, or in response to an endotoxin-induced mastitis in cows. Other animal models were designed to investigate the endocrine control of the exfoliation process and its link with milk production. Suppression of ovarian steroids by ovariectomy resulted in a greater persistency of lactation and a decrease in MEC exfoliation. Administering prolactin inhibitors during lactation or at dry-off enhanced MEC exfoliation, whereas exogenous prolactin during lactation tended to prevent the negative effect of prolactin inhibitors. These findings suggest that prolactin could regulate MEC exfoliation. In most of these studies, variations of MEC exfoliation were associated with variations in milk yield and changes in mammary epithelium integrity. Exfoliation of MEC could thus influence milk yield by regulating MEC number in mammary tissue.

**Key words:** dairy cow, dairy goat, milk yield, mammary epithelial cell, exfoliation

### INTRODUCTION

The mammary glands of ruminants are made up of a heterogeneous tissue containing various cell populations, including mammary epithelial cells (MEC), myoepithelial cells, fibroblasts, and adipocytes. Mammary epithelial cells are the main cells present in the lactating mammary gland and are responsible for milk synthesis. The number of MEC in the mammary gland and their secretory activity are key factors regulating milk yield. The number of mammary cells in the mammary gland varies throughout lactation, along with variations in milk yield, and is regulated by the balance between cell proliferation and apoptosis. In most species, MEC number increases during early lactation up to peak lactation. After peak lactation, the gradual decrease in milk yield is associated with a decrease in cell number in the mammary gland, due to a greater rate of apoptosis compared with proliferation (Knight and Peaker, 1984; Capuco et al., 2001). Mammary epithelial cell exfoliation can also occur through shedding from the mammary epithelium into milk during lactation. Capuco et al. (2003) suggested that this exfoliation process did not significantly participate in the declining number of mammary secretory cells after peak lactation. From our experiments, however, we estimated that on average  $390 \times 10^6$  MEC are lost each day by exfoliation in dairy cows. This loss represents 1.6% of the total MEC number in the udder (M. Boutinaud, unpublished data). Moreover, as will be shown in this review, several physiological, breeding, or environmental factors affect both milk yield and the MEC exfoliation process. Thus, this phenomenon cannot be neglected, as we suspect that the number of MEC in the mammary gland partly depends on the regulation of the exfoliation process. This review summarizes the current knowledge pertaining to MEC exfoliation into milk in ruminants, with emphasis on the factors that influence daily rates of MEC exfoliation.

Received June 15, 2015.

Accepted August 11, 2015.

<sup>1</sup>Presented as part of the Lactation Biology: Mammary Gland Biology Revisited Symposium at the ADSA-ASAS Joint Annual Meeting, Orlando, Florida, July 2015.

<sup>2</sup>Corresponding author: Marion.Boutinaud@rennes.inra.fr



## THE PROCESS OF MEC EXFOLIATION IN MILK

### MEC in Milk

Different somatic cell types including leukocytes (lymphocytes, macrophages, neutrophils, and eosinophils) and nonimmune cellular types are present in mammary secretions of all mammals, even those with healthy mammary glands. In human milk, it was shown that the nonimmune cellular types include mature and differentiated epithelial cells and myoepithelial cells, as well as mammary progenitors and stem cells. Differentiated cells originate from the ducts and alveoli of the lactating mammary gland. Stem cells are multipotent and have the ability to differentiate both main mammary epithelial lineages, namely luminal and myoepithelial cells (reviewed by Hassiotou and Hartmann, 2014).

In contrast with human milk where MEC account for more than 90% of milk somatic cells (Ho et al., 1979), MEC represent a minority of the somatic cell content in ruminant milk. The concentration and proportion of MEC in milk vary between species (Table 1). The concentration of MEC is lower in bovine than in caprine milk (Boutinaud and Jammes, 2002). In ewes, milk MEC represent less than 2 to 3% of the total somatic cells (reviewed by Bergonier et al., 2003). The presence of MEC has also recently been reported in buffalo (Yadav et al., 2015) and zebu (Janjanam et al., 2013) milk.

Some of the MEC exfoliated into milk are apoptotic cells, but on average 60 to 70% of milk MEC are viable and exhibit characteristics of fully differentiated alveolar cells (Boutinaud et al., 2013c). Moreover, exfoliated epithelial cells recovered from milk can grow in culture (Ben Chedly et al., 2010; Sorg et al., 2012). The proportion of dying and viable MEC in milk varies between species and experimental models. The MEC exfoliation process thus makes it possible to evacuate both living and dying MEC simultaneously and in various proportions. In humans, it has been hypothesized that MEC were exfoliated from the ductal or luminal layers as a

consequence of either a turnover of the secretory tissue or the pressures associated with the continued filling and emptying cycle associated with breastmilk synthesis and breastfeeding (Cregan et al., 2007). Suckling or milking induces a myoepithelial contraction in response to oxytocin release, which in turn, could participate in the exfoliation of MEC. The role of myoepithelial contraction on the MEC exfoliation process has yet to be investigated further.

### How to Assess MEC Exfoliation Rate

The rate of MEC exfoliation can be defined as the number of MEC lost in milk per day. This rate is estimated by measuring daily milk yield and milk MEC content. Mammary epithelial cell content can be determined through light microscopy, flow cytometry analysis, or an immuno-magnetic method for MEC purification. Regardless of the method chosen, to determine MEC content in milk, the milk must first be defatted and the cells must be pelleted. In the light microscopy method, cells are usually stained to observe the different cellular components (such as the nucleus, cytoplasm, or cytosolic granules) and to recognize the various cellular types (Leitner et al., 2000). For the flow cytometry procedure, cells are incubated with a selective set of monoclonal antibodies to identify each cell type (Leitner et al., 2000), or with an anti-cytokeratin antibody to specifically mark MEC in bovine milk (Wagner et al., 2009). In the immuno-magnetic method, total milk cell suspension is incubated with magnetic beads coated with a specific anti-MEC antibody directed against cytokeratin. Specifically bound cells are collected by placing the sample vials in a magnetic particle concentrator and by aspiration of the supernatant containing leukocytes. Purified milk MEC can be directly counted in a hemacytometer (Ben Chedly et al., 2011) or with a cell counter (Boutinaud et al., 2012). The latter was originally used to purify MEC from human milk (Alcorn et al., 2002) and was

**Table 1.** Concentration and percentage of mammary epithelial cells (MEC) in ruminant milk

Species	MEC percentage in milk (% of total somatic cells)	MEC concentration in milk (10 <sup>3</sup> cells/mL)	Counting method	Reference
Cow	36 ± 8	—	Light microscopy	Benic et al. (2012)
	2	—	Light microscopy	Feng et al. (2007)
	45 ± 25	—	Light microscopy	Leitner et al. (2000)
	2.7 ± 2	—	Flow cytometry	Wagner et al. (2009)
	9.3 ± 1.9	14.7 ± 4.1	Immuno-magnetic purification	Boutinaud et al. (2012)
Goat	2.2 ± 0.1	1.5 ± 0.9	Immuno-magnetic purification	Boutinaud et al. (2008)
	4.6 ± 0.6	23 ± 4	Immuno-magnetic purification	Ben Chedly et al. (2011)
	27.2 ± 1.5	11.2 ± 1.2	Light microscopy	Boutinaud and Jammes (2002)
Ewe	2–3	—	—	Bergonier et al. (2003)
	2.2 ± 1.6	1.1 ± 1.3	Light microscopy	Morgante et al. (1996)



then adapted for bovine milk (Boutinaud et al., 2008). Flow cytometry makes it possible to determine the proportion of MEC relative to total milk cells, while the light microscopy and immuno-magnetic methods allow for the direct counting of MEC, and thus the determination of MEC concentration in milk. Moreover, the immuno-magnetic method has the advantage of being based on a specific antibody used to identify MEC, in contrast with light microscopy.

## FACTORS INFLUENCING MILK YIELD AND MEC EXFOLIATION PROCESS IN RUMINANTS

### *Female Endocrine Status and Stage of Lactation*

**Advancing Lactation and Ovarian Steroids in Cows.** Pregnancy during lactation and the associated secretion of estrogens by the fetal-placental unit is known to be linked with a decline in milk yield in lactating cows (Bachman et al., 1988). Furthermore, daily administering of exogenous estradiol with progesterone (Mollett et al., 1976) or alone (Delbecchi et al., 2005) induced a marked decrease in milk yield reaching an 82% loss of milk 11 d after the first injection (Delbecchi et al., 2005). Ovarian steroids (i.e., progesterone and estrogens) therefore have a negative effect on milk yield in lactating cows. This decrease in milk yield was not associated with any variation in the expression of genes involved in the regulation of apoptosis such as *Bax* and *Bcl-2* (Delbecchi et al., 2005). On the contrary, suppression of ovarian steroids by ovariectomy at the time of peak lactation improved milk yield by 36% after 14 mo of lactation and resulted in a greater persistency of lactation with an average daily gain of 2.5 kg of milk between the 6th and the 14th month of lactation (Yart et al., 2012). Besides its effect on milk yield, ovariectomy significantly decreased the mammary concentration of Poly(ADP-ribose), a protein implicated in DNA fragmentation during the final stage of apoptosis, highlighting that ovariectomy may have reduced apoptosis (Yart et al., 2012). Regarding advancing lactation, the gradual decline of milk yield as lactation progresses was associated with the decreasing MEC number in mammary tissue (Knight and Peaker, 1984). As mentioned above, this MEC loss resulted from an apoptosis rate that was greater than the proliferation rate (Capuco et al., 2001, 2003; Stefanon et al., 2002). To investigate the effect of advancing lactation and ovarian steroids on the rate of MEC exfoliation, 7 cows were ovariectomized approximately 60 d postpartum, and 7 control cows were sham-operated. Milk MEC were purified by the immuno-magnetic method at several stages of lactation (5, 21, 37, 47, and 54 wk). In the sham-operated group, the cows produced 31.2 and 14.3 kg of milk

daily at 21 and 47 wk of lactation, respectively, which represented a 54% reduction in milk production over time. In parallel, the MEC concentration gradually rose from 3,900 to 46,300 cells/mL of milk between 21 and 47 wk of lactation, which represented a 272% increase in the exfoliation rate as lactation progressed (Table 2, Boutinaud et al., 2013c). In ovariectomized cows, in contrast, the suppression of ovarian steroids tended to increase milk yield and prevented the increased MEC loss that was observed in control cows after 47 wk of lactation (Table 2, Boutinaud et al., 2013c). In conclusion, both advancing lactation and ovarian steroids had a negative effect on milk yield and a stimulatory effect on the exfoliation process.

**Prolactin Inhibition During Lactation.** In dairy ruminants, prolactin (PRL) roles are controversial. Prolactin was long considered to have a lactogenic rather than a galactopoietic effect (Knight, 2001). Recent experiments, however, demonstrated the essential galactopoietic role of PRL in dairy cows (Lacasse et al., 2012). The effect of PRL on milk yield was studied by using PRL inhibitors, such as cabergoline and quinagolide. These molecules specifically bind the dopamine D2 receptor of the lactotroph, thereby decreasing the synthesis and release of PRL (Brownell, 1996). The effect of a long-term inhibition of PRL was investigated through daily injections of quinagolide for 9 wk (Lacasse et al., 2011; Boutinaud et al., 2012). Milk yield declined in response to the inhibition of PRL secretion and was 14% lower in quinagolide-treated cows than in control cows. The milk yield loss induced by PRL inhibition in quinagolide-treated dairy cows was partly caused by a decrease in MEC synthetic activity and by a decrease in MEC number, which resulted from a lower proliferation rate and a greater apoptosis rate in the mammary tissue (Boutinaud et al., 2012). The role of PRL on MEC exfoliation has also been studied in a short-term experiment (Lollivier et al., 2015). In this experiment, 9 Holstein dairy cows underwent 3 different treatments for a period of 5 d each. The first treatment consisted of daily i.m. injections of quinagolide, the second treatment involved daily i.m. injections of quinagolide and daily i.v. injections of bovine PRL, and the third treatment was daily i.m. injections of vehicle (control). Quinagolide treatment reduced milk yield by 10% in comparison with the control treatment. Prolactin injections in addition to quinagolide tended to increase but did not fully restore milk yield. Compared with the control treatment, the 5-d quinagolide treatment enhanced MEC loss in milk by 60% (Table 2), whereas exogenous PRL injections tended to prevent the negative effect of quinagolide by limiting the MEC exfoliation rate. Moreover, PRL injections in quinagolide-treated cows significantly increased the proportion of living MEC





in milk from 57 to 69%. These results are compliant with the *in vitro* effects of PRL on MEC. Indeed, PRL stimulates MEC proliferation *in vitro* (Olazabal et al., 2000) and protects MEC from apoptosis by suppressing the expression of an inhibitor of IGF (Accorsi et al., 2002). Together these findings suggest that in addition to its effects on MEC differentiation and apoptosis in mammary tissue, PRL participates in the regulation of MEC number in the mammary gland by regulating the exfoliation process.

**Prolactin Inhibition and Mammary Involution.** At dry-off, ceasing the milking process caused a rapid decrease in milk secretions, leading to a 90% decrease in the quantity of milk produced in 7 d (Hurley, 1989; Wilde et al., 1999). To assess the effect of PRL release inhibition on MEC exfoliation during mammary involution, 14 Holstein dairy cows were injected with a single administration of cabergoline ( $n = 7$ ) or vehicle ( $n = 7$ ) just after the last milking before the dry-off (Boutinaud et al., 2013b). Mammary secretion samples were collected using an intraductal teat cannula 6 d before dry-off (d -6) and at 1, 2, 3, 4, 8, and 14 d after dry-off for MEC purification using the immuno-magnetic method. In control cows, the MEC concentration in mammary secretions increased 15-fold between d -6 and 8. In mammary secretions from cabergoline-treated cows compared with control cows, the proportion of living MEC was decreased 3 and 4 d after dry-off and MEC concentration was 28% greater 14 d after dry-off. This experiment confirms that the remodeling of mammary tissue during involution involves the shedding of MEC into the mammary gland cistern, which itself may be regulated by PRL.

**Serotonin and Mammary Involution.** Serotonin is a hormone and a neurotransmitter known as an autocrine-paracrine regulator of milk secretion in various species (Collier et al., 2012). Serotonin is synthesized and secreted by MEC and has an essential role in the regulation of the mammary gland involution (Matsuda et al., 2004). It is also well known that the first phase of involution in rodents is characterized by a strong increase in cell death by apoptosis and shedding of dying MEC into the alveolar lumen (Watson, 2006; Stein et al., 2007). It has been shown in an immortalized human MEC line and *in vivo* in mice that serotonin increases milk stasis-induced MEC exfoliation during the first step of mammary involution (Pai and Horseman, 2011). Furthermore, serotonin has been shown to be a feedback inhibitor of lactation in dairy cows because intramammary infusion of serotonin reuptake inhibitor, which increases MEC exposure to serotonin, increased by 11% the rate of milk decline at dry-off (Hernandez et al., 2008). These findings suggest that serotonin is required for the regulation of mammary cell number, resulting in the regression of the mammary epithelium and the decrease in milk yield associated with involution by inducing both apoptosis and MEC exfoliation.

### Management Practices

**Milking Frequency.** The lactating mammary gland responds to changes in milking frequency by modulating its milk production. Reducing milking frequency from twice to once daily has been reported to have a negative effect on milk yield in dairy ruminants. Compared with twice-daily milking (TDM), once-daily

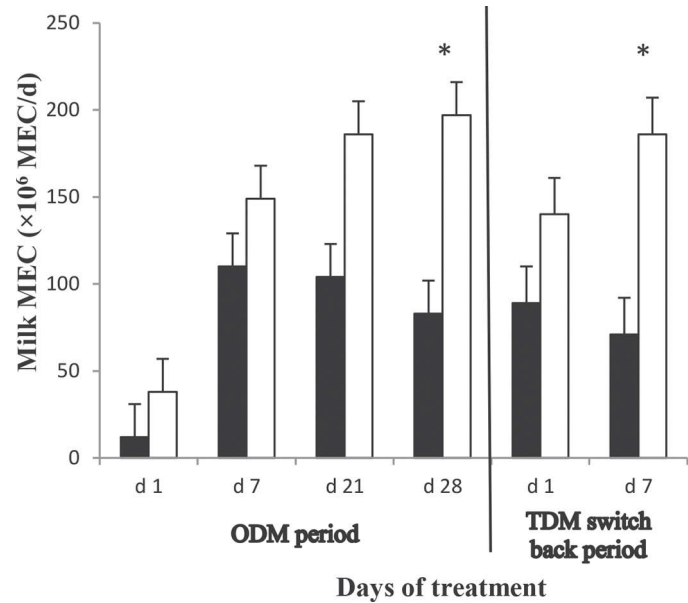
**Table 2.** Influence of various treatments on mammary epithelial cell (MEC) exfoliation process in dairy ruminants

Species	Treatment	Treatment duration (d)	Effect on the rate of MEC exfoliation		Effect on milk yield		Reference
			Variation (% of control rate of exfoliation)	P-value	Variation (% of control milk yield)	P-value	
Cow	Advancing lactation	182	+272	<0.05	-54	<0.001	Boutinaud et al. (2013c)
Cow	Ovariectomy	269	-71	<0.05	+28	<0.01	Boutinaud et al. (2013c)
Cow	Prolactin inhibition	5	+60	<0.05	-10	<0.05	Lollivier et al. (2015)
Goat	Once-daily milking	28	+137	<0.05	-22	<0.001	Ben Chedly et al. (2013)
Cow	Short-day photoperiod	13	+53	<0.05	No variation	NS	Boutinaud et al. (2014)
Cow	Feed restriction	14	No variation	NS	-14	<0.05	M. Boutinaud, unpublished data <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Five multiparous Holstein cows were subjected to a diet that provided either 98 or 70% of cow requirements and were milked twice daily during 2 wk, and then the diets were reversed for the next period. On the 14th day of each 2-wk period, milk samples (3.5 kg) were collected to isolate total milk somatic cells and purify MEC using magnetic beads coated with an anti-cytokeratin 8 antibody, which is specific to bovine MEC (as described by Boutinaud et al., 2008).



milking (ODM) reduced daily milk yield by 20 to 30% in cows (reviewed by Rémond and Pomiès, 2005), by 15 to 48% in ewes (Knight et al., 1993; Negrao et al., 2001), and by 16 to 30% in goats (Boutinaud et al., 2003; Komara et al., 2009). This decrease in milk yield in goats was associated with a decrease in MEC activity (Ben Chedly et al., 2013). Moreover, changes were clear in cell turnover in the mammary tissue with a lower proliferation rate and a greater apoptosis rate in goats after 4 wk of ODM (Li et al., 1999) or in cows after 8 d of ODM (Boutinaud et al., 2013a). The expression of genes involved in the induction of apoptotic pathways was also increased, which is consistent with the increased apoptosis rate (Littlejohn et al., 2010; Boutinaud et al., 2013a). The effect of milking frequency on MEC exfoliation was investigated in dairy cows and dairy goats. When applied for 7 d, the ODM treatment decreased milk yield but had no effect on milk MEC concentration and exfoliation rate, except for a tendency for a lower rate of MEC exfoliation in one experiment in cows (Table 3). When applied for a longer duration, the ODM treatment influenced MEC exfoliation in dairy goats. In Alpine goats milked twice daily ( $n = 6$ ) or once daily ( $n = 6$ ) during 5 wk, MEC concentration in milk after 28 d of treatment was significantly greater in the ODM compared with the TDM group (Ben Chedly et al., 2013). At that time, the daily rate of MEC exfoliation was 137% greater in the ODM group (Figure 1). After 5 wk of ODM, the dairy goats in the ODM group were switched back to TDM for the 5 following weeks (ODM-TDM group, Ben Chedly et al., 2013). The stimulatory effect of ODM on the exfoliation process was still effective after the switch back to TDM; on the seventh day, the MEC loss per day was 160% greater in the ODM-TDM group in comparison with the control TDM group (Figure 1), despite similar levels of milk production. The switch back from ODM to TDM might have quickly induced an increase of mammary cell number by stimulating cell proliferation



**Figure 1.** Rate of mammary epithelial cell (MEC) exfoliation in milk from goats milked once daily (ODM) or twice daily (TDM) during a 28-d ODM period and a 7-d TDM switchback period (Ben Chedly et al., 2013). Data are presented as means  $\pm$  standard error of the mean. Statistically different means are indicated by an asterisk for  $P < 0.05$ . Twelve alpine goats were assigned in 2 groups: a control group (■) that was milked twice daily over all the experiment and a once-daily then twice-daily milking group (ODM-TDM; □) that was milked once daily during 5 wk and switched back to TDM for the next 5 wk (as described in Ben Chedly et al., 2013). Milk samples were collected on the 1st, 7th, 21th, and 28th day of the ODM period and the 1st and 7th day of the TDM switchback period for MEC purification using magnetic beads coated with an anti-cytokeratin 8 antibody. The milk MEC concentration was measured with a Vi-CELL XR analyzer (Beckman Coulter, Roissy, France) to assess the number of milk MEC exfoliated per day.

(reviewed by Wall and McFadden, 2012) or reducing cell death, or both, which might explain the restoration of milk yield. Simultaneously, the switch back could have also induced a mammary tissue remodeling with a removal of senescent MEC via the exfoliation process.

**Table 3.** Effect of once-daily milking (ODM) for 7 d compared with twice-daily milking (TDM) on mammary epithelial cell (MEC) concentration in milk and MEC exfoliation rate

Species	Milk MEC concentration ( $10^3$ cells/mL)			MEC exfoliation rate ( $10^6$ cells/d)			Reference
	ODM	TDM	<i>P</i> -value	ODM	TDM	<i>P</i> -value	
Cow	14.2	14.2	NS	172	309	0.06	Boutinaud et al. (2012)
Cow	14.1	20.9	NS	274	469	0.15	M. Boutinaud, unpublished data <sup>1</sup>
Goat	23.4	13.2	NS	19	8	NS	Ben Chedly et al. (2011)
Goat	55.0	29.0	NS	149	110	NS	Ben Chedly et al. (2013)

<sup>1</sup>Five multiparous Holstein cows were either once-daily milked (24-h milking interval) or twice-daily milked (12-h milking interval) for 1 wk. The following week, the milking frequency was reversed. On the seventh day of each week, milk samples (3.5 kg) were collected to isolate total milk somatic cells and purify MEC using magnetic beads coated with an anti-cytokeratin 8 antibody, which is specific to bovine MEC (as described by Boutinaud et al., 2008).



Together these findings suggest that the decrease in milk yield during ODM treatment could be due to a decrease in the synthetic activity of MEC and changes in MEC turnover in the short term. In the longer term, the MEC exfoliation process may play a role in adjusting MEC number in the mammary gland in response to different milking frequencies.

**Photoperiod.** In ruminants, photoperiod highly influences lactation. Compared with a short-day photoperiod, a long-day photoperiod was associated with an increase in milk yield, from +0.5 to +3.3 kg/d, in lactating cows (reviewed by Dahl et al., 2000), along with greater circulating concentrations of the galactopoietic hormone IGF-I (Dahl et al., 2012) and basal serum concentrations of PRL (Peters et al., 1981). This galactopoietic response to long-day photoperiod was observed at all stages of lactation (Dahl and Petitclerc, 2003). In dairy goats, a long-day photoperiod corresponding to 16 h of light exposure increased milk yield by 20% at the end of the lactation (Russo et al., 2013).

To investigate the photoperiodic effect on MEC exfoliation into milk, dairy cows were exposed to a short-day or a long-day photoperiod corresponding to 8 or 16 h of light exposure, respectively, for 14 d (Boutinaud et al., 2014). In this experiment, the photoperiod had no significant effect on milk yield, likely because of the short treatment duration. Indeed, the galactopoietic response to longer days is a gradual response and was shown to be significant only after 3 to 4 wk of exposure (Dahl and Petitclerc, 2003). Contrary to milk yield, the exfoliation process was influenced by the 2 wk of light treatment exposure (Boutinaud et al., 2014). On the 13th day of treatment, the number of MEC exfoliated in milk daily was significantly greater during short rather than long days ( $239$  vs.  $156 \times 10^6$  cells/d), representing an increase of 53% in exfoliation rate (Table 2). This effect could be linked to the lower concentrations of IGF-I and PRL during short days, 2 hormones known to act as survival factors and preventing cell death by apoptosis (reviewed by Flint and Knight, 1997).

**Diet.** Diet is one of the main factors affecting milk yield in dairy ruminants. In dairy cows, a severe feed restriction from 2 wk before calving to 11 wk postpartum induced a 38% milk loss in comparison with cows fed a standard diet (Dessaige et al., 2011). This milk loss was associated with a decrease in mammary gland weight by 38%, smaller alveoli, and an increase in apoptotic rate (Dessaige et al., 2011). To our knowledge, the effect of feed restriction on MEC exfoliation has only been investigated once. Cows were subjected to a diet that provided 70% of cow requirements during 2 wk (as described by Boutinaud et al., 2008). Feed restriction reduced milk yield without affecting MEC loss in milk

(Table 2). The effect of a long-term feed restriction on MEC exfoliation needs to be investigated.

**Infection Status.** The infection status, specifically mastitis, is a major factor that increases SCC in milk, mainly due to the influx of leukocytes from blood to milk in response to IMI. For this reason, the SCC is used in dairy industry as an indicator of milk quality and udder health. The proportion of each cell type also depends on the presence or the absence of a mastitic pathogen (Morgante et al., 1996; Leitner et al., 2000). Mastitis is also known to have a temporary negative effect on milk production. In dairy cows, endotoxin-induced mastitis induced a 17% milk loss 11 h after the infusion (Shuster et al., 1991). This reduced ability of mammary glands with mastitis to synthesize and secrete milk is related to a disruption of MEC integrity, sloughing of cells, and increased apoptosis (reviewed by Akers and Nickerson, 2011). In cows with endotoxin-induced mastitis, the percentage of milk MEC measured by cytometry analysis increased from 3% of the total milk somatic cells to 42% 12 h after endotoxin administration (Wagner et al., 2009). This effect on the percentage of MEC in milk suggests that endotoxins may damage the mammary epithelium, resulting in a massive MEC exfoliation during the early phase of mastitis.

In most of the experiments described in the present review, MEC exfoliation varied together with milk yield, decreasing when milk yield increased and vice versa (Table 2). This finding supports our hypothesis that the MEC exfoliation process may participate in regulating MEC number in the mammary tissue, together with the proliferation–apoptosis balance. Current findings also suggest that variations in the exfoliation rate and in milk yield can be slightly decoupled in time. During a short-day photoperiod treatment, the MEC exfoliation rate rose before any decrease in milk yield was observed, suggesting that the change in milk yield during photoperiod manipulation could be the consequence of a change in MEC exfoliation. In contrast, during an ODM treatment, the decrease in milk yield preceded the enhancement of MEC exfoliation. This is consistent with the fact that milk yield is regulated by numerous biological mechanisms.

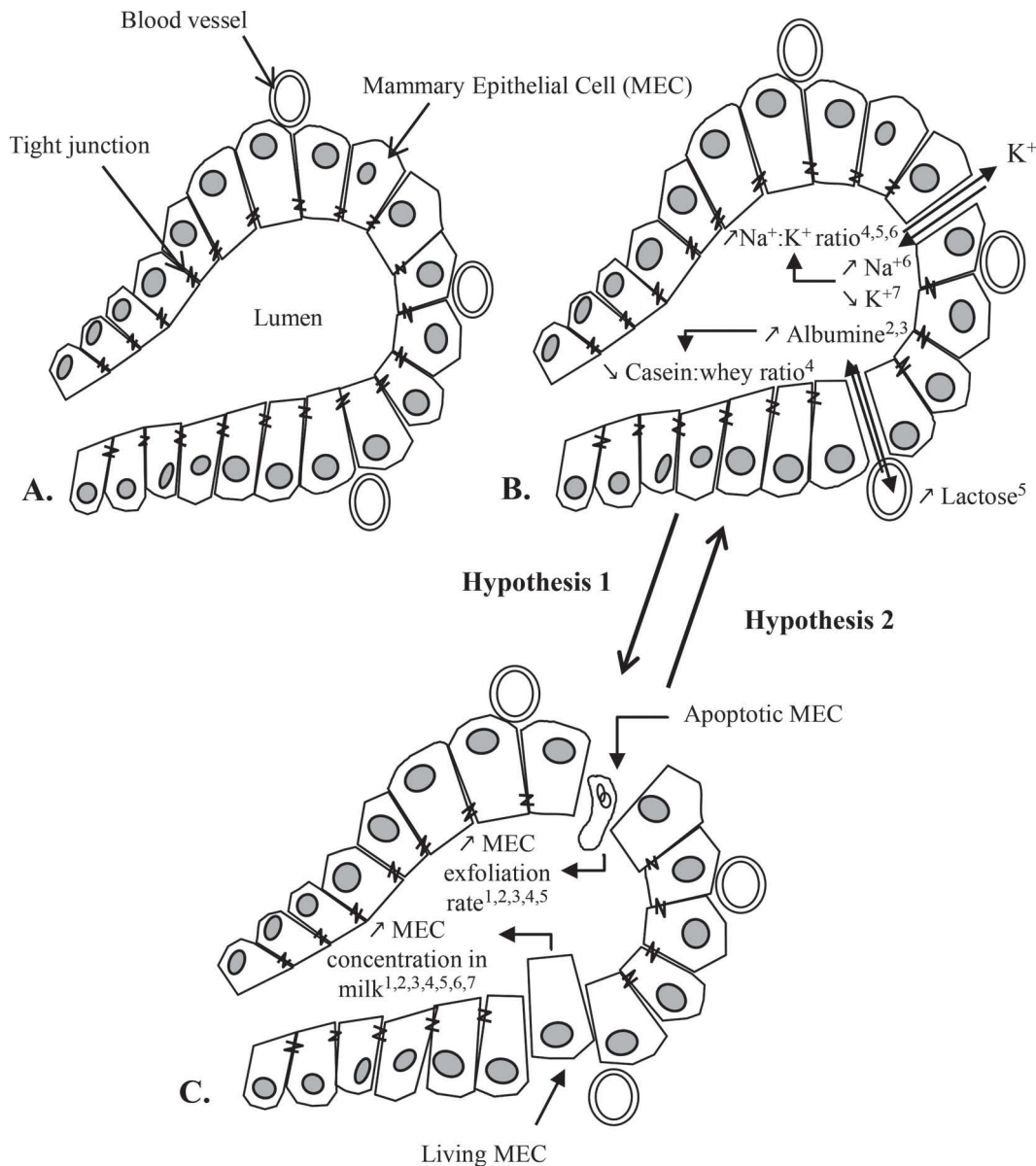
### THE LINK BETWEEN MEC EXFOLIATION AND MAMMARY EPITHELIUM INTEGRITY

The mammary epithelium is composed of a unique layer of jointed MEC. Tight junctions (TJ) are extracellular structures located in the apical domain of MEC that form a barrier between 2 adjacent secretory cells and ensure epithelium integrity (Figure 2). These TJ



are dynamic structures that can open and seal quickly in response to changing physiological stimuli (Stelwagen et al., 1997). The disruption of TJ causes a loss of mammary epithelium integrity and allows the crossing of milk components into blood and blood components into milk (Figure 2). Several markers can therefore be measured to indirectly assess mammary epithelium integrity: plasma concentrations of lactose, milk con-

centrations of Na and K (and the Na:K ratio) and albumin, and the casein:whey ratio in milk (Stelwagen et al., 1994; Ben Chedly et al., 2013). In cows and goats, the disruption of TJ results in a significant decrease in milk yield (Stelwagen et al., 1995; Ben Chedly et al., 2010) associated with a reduction of MEC synthetic activity and an increase in cell death by apoptosis in mammary tissue (Ben Chedly et al., 2010).



**Figure 2.** Schematic representation of a mammary alveolus (A) and summary of the effects of breeding and endocrine factors on the mammary epithelium integrity (B) and on the exfoliation process (C). The factors affecting the mammary epithelium integrity (B) and the exfoliation process (C) are (1) prolactin inhibition during lactation (Lollivier et al., 2015); (2) control versus ovariectomy (Yart et al., 2012; Boutinaud et al., 2013c); (3) advancing lactation (Yart et al., 2012; Boutinaud et al., 2013c); (4) twice-daily milking versus once-daily milking (Ben Chedly et al., 2013); (5) short-day versus long-day photoperiod (Boutinaud et al., 2014); (6) mammary involution (Boutinaud et al., 2013b); and (7) prolactin inhibition during mammary involution (Boutinaud et al., 2013b). Mechanisms underlying the link between mammary epithelial cell (MEC) exfoliation and mammary epithelium integrity remain to be deciphered. Mammary epithelial cell exfoliation could be a consequence of (hypothesis 1) or a cause for the disruption of epithelium integrity (hypothesis 2).





Variations in mammary epithelium integrity have been observed concomitantly to changes in MEC exfoliation in response to different endocrine, breeding, or environmental factors. First, several markers cited above indicated that ODM treatment caused a TJ disruption (Stelwagen et al., 1994; Ben Chedly et al., 2013). In goats, the 28-d ODM treatment induced a decrease in the casein:whey ratio in milk, suggesting a TJ opening, which was concomitant with the increase in the exfoliation rate (Ben Chedly et al., 2013). After the switch back from ODM to TDM for 14 d, the mammary epithelium was still disrupted as indicated by a lower casein:whey ratio, which could explain the fact that the stimulatory effect of ODM on MEC exfoliation process was still effective (Ben Chedly et al., 2013). The exfoliation rate and epithelium integrity were also affected by the endocrine status of the female. The increased MEC exfoliation rate as lactation progresses was associated with more disrupted TJ, whereas the lower MEC exfoliation rate in response to ovariectomy was associated with closed TJ (Boutinaud et al., 2013c). These results were compliant with the fact that progesterone was shown to inhibit TJ closure in rodents (Nguyen et al., 2001). At dry-off, the enhancement of MEC concentration in mammary secretions was concomitant with an opening of TJ, indicated by an increase in albumin concentrations and in the Na:K ratio in milk (Boutinaud et al., 2013b). Furthermore, the lower MEC concentration in mammary secretions from cabergoline-treated cows compared with control cows was associated with a tendency toward an increase in TJ opening, supported by a decreased Na:K ratio. Serotonin, known to increase milk stasis-induced MEC exfoliation during involution in rodents, is also known to disrupt TJ in different MEC lines including bovine and in vivo in dairy cows (Stull et al., 2007; Hernandez et al., 2011). Finally, in comparison with long days, short days were associated with more disrupted TJ, concomitantly with the higher MEC exfoliation rate (Boutinaud et al., 2014).

The concomitant increase in MEC exfoliation and in the disruption of mammary epithelium integrity may be interpreted in 2 ways. The exfoliation of living and dying MEC could be a consequence of an induction of the TJ opening (Figure 2; hypothesis 1). Mammary epithelial cells disconnected from each other may be shed from the epithelium into milk. This could be the case when the exfoliation process is modified by changes in the endocrine status, because multiple hormones—such as glucocorticoids, PRL, progesterone, serotonin, and oxytocin—are known to influence mammary epithelium integrity (Nguyen and Neville, 1998; Stelwagen et al., 1999; Werner-Misof et al., 2007). The second hypothesis (Figure 2) is that MEC exfoliation could be the cause of alterations in epithelium integrity. Mammary epithelial cell shedding may leave gaps in the epithelium that alter its integrity. It is likely that the 2 mechanisms occur simultaneously. In between milking, the shedding of MEC from the basement membrane into the lumen could occur as a result of cell death induction or be induced by anchorage-dependent detaching of cells from the surrounding extracellular matrix after disruption of epithelium integrity. During milking, MEC shedding could be reinforced by myoepithelial cell contraction.

lial cell shedding may leave gaps in the epithelium that alter its integrity. It is likely that the 2 mechanisms occur simultaneously. In between milking, the shedding of MEC from the basement membrane into the lumen could occur as a result of cell death induction or be induced by anchorage-dependent detaching of cells from the surrounding extracellular matrix after disruption of epithelium integrity. During milking, MEC shedding could be reinforced by myoepithelial cell contraction.

## CONCLUSIONS

The presence of MEC in milk proves that some MEC are shed from the mammary epithelium. The MEC exfoliation rate has been shown to vary in response to different physiological, breeding, and environmental factors. Most variations in the MEC exfoliation rate in response to these factors were associated with opposite variations in milk yield. This supports the fact that, in addition to changes in the proliferation–apoptosis balance, the exfoliation of MEC from the epithelium into milk is another process that could influence MEC number in mammary tissue. Finally, some evidence exists that the exfoliation rate is linked with mammary epithelium integrity and could be a cause for—or a consequence of—a tight junction opening. Special attention should be paid to the mechanisms regulating MEC exfoliation, especially the proportion of living and dying MEC in milk.

## REFERENCES

- Accorsi, P. A., B. Pacioni, C. Pezzi, M. Forni, D. J. Flint, and E. Seren. 2002. Role of prolactin, growth hormone and insulin-like growth factor 1 in mammary gland involution in the dairy cow. *J. Dairy Sci.* 85:507–513.
- Akers, R. M., and S. C. Nickerson. 2011. Mastitis and its Impact on Structure and Function in the Ruminant Mammary Gland. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 16:275–289. <http://dx.doi.org/10.1007/s10911-011-9231-3>.
- Alcorn, J., X. Lu, J. A. Moscow, and P. J. McNamara. 2002. Transporter gene expression in lactating and nonlactating human mammary epithelial cells using real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 303:487–496. <http://dx.doi.org/10.1124/jpet.102.038315>.
- Bachman, K. C., M. J. Hayen, D. Morse, and C. J. Wilcox. 1988. Effect of pregnancy, milk yield, and somatic cell count on bovine milk fat hydrolysis. *J. Dairy Sci.* 71:925–931.
- Ben Chedly, H., M. Boutinaud, P. Bernier-Dodier, P.-G. Marnet, and P. Lacasse. 2010. Disruption of cell junctions induces apoptosis and reduces synthetic activity in lactating goat mammary gland. *J. Dairy Sci.* 93:2938–2951. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2009-2678>.
- Ben Chedly, H., P. Lacasse, P.-G. Marnet, and M. Boutinaud. 2013. The decrease in milk yield during once daily milking is due to regulation of synthetic activity rather than apoptosis of mammary epithelial cells in goats. *Animal* 7:124–133. <http://dx.doi.org/10.1017/S1751731112001176>.
- Ben Chedly, H., P. Lacasse, P.-G. Marnet, M. Komara, S. Marion, and M. Boutinaud. 2011. Use of milk epithelial cells to study regulation



- of cell activity and apoptosis during once-daily milking in goats. *Animal* 5:572–579. <http://dx.doi.org/10.1017/S1751731110002284>.
- Benić, M., B. Habrun, G. Kompes, Ž. Mihaljević, Ž. Cvetnić, M. Cergolj, and N. Mačević. 2012. Cell content in milk from cows with *S. aureus* intramammary infection. *Veterinarski Arhiv* 82:411–422.
- Bergonier, D., R. de Crémoux, R. Rupp, G. Lagriffoul, and X. Berthelot. 2003. Mastitis of dairy small ruminants. *Vet. Res.* 34:689–716. <http://dx.doi.org/10.1051/vetres:2003030>.
- Boutinaud, M., M. H. Ben Chedly, E. Delamaire, and J. Guinard-Flament. 2008. Milking and feed restriction regulate transcripts of mammary epithelial cells purified from milk. *J. Dairy Sci.* 91:988–998. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2007-0587>.
- Boutinaud, M., A. Boudon, J. Couedon, M. Johan, A. Narcy, and C. Hurtaud. 2014. Daylength affects simultaneously mammary epithelium integrity and mammary epithelial cell exfoliation in milk. *J. Anim. Sci.* 92(E-Suppl. 2):202. (Abstr.)
- Boutinaud, M., L. Galio, V. Lollivier, L. Finot, S. Wiart, D. Esquerre, and E. Devinoy. 2013a. Unilateral once daily milking locally induces differential gene expression in both mammary tissue and milk epithelial cells revealing mammary remodeling. *Physiol. Genomics* 45:973–985. <http://dx.doi.org/10.1152/physiolgenomics.00059.2013>.
- Boutinaud, M., N. Isaka, A. Deflandre, E. Gandemer, P.-G. Marnet, F. Dessauge, and V. Lollivier. 2013b. Prolactin-inhibitor cabergoline enhanced the mammary remodeling during drying-off in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 96(E-Suppl. 1):151.
- Boutinaud, M., and H. Jammes. 2002. Potential uses of milk epithelial cells: A review. *Reprod. Nutr. Dev.* 42:133–147. <http://dx.doi.org/10.1051/rnd:2002013>.
- Boutinaud, M., V. Lollivier, L. Finot, R. M. Bruckmaier, and P. Lacasse. 2012. Mammary cell activity and turnover in dairy cows treated with the prolactin-release inhibitor quinagolide and milked once daily. *J. Dairy Sci.* 95:177–187. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2011-4461>.
- Boutinaud, M., C. Rousseau, D. H. Keisler, and H. Jammes. 2003. Growth hormone and milking frequency act differently on goat mammary gland in late lactation. *J. Dairy Sci.* 86:509–520.
- Boutinaud, M., L. Yart, P. Debournoux, S. Wiart, L. Finot, E. Le Guennec, P.-G. Marnet, F. Dessauge, and V. Lollivier. 2013c. Exfoliation of mammary epithelial cells in milk is linked with lactation persistency in dairy cows. Page 503 in Book Abstr. 64th Annu. Meet. Eur. Fed. Anim. Sci., Nantes, France. Wageningen Acad. Publ., Wageningen, the Netherlands.
- Brownell, J. 1996. Quinagolide (Norprolac): A novel non-ergot prolactin inhibitor. *Drugs Today (Barc)* 32:1–31.
- Capuco, A. V., S. E. Ellis, S. A. Hale, E. Long, R. A. Erdman, X. Zhao, and M. J. Paape. 2003. Lactation persistency insights from mammary cell proliferation studies. *J. Anim. Sci.* 81:18–31.
- Capuco, A. V., D. L. Wood, R. Baldwin, K. McLeod, and M. J. Paape. 2001. Mammary cell number, proliferation, and apoptosis during a bovine lactation: Relation to milk production and effect of bST. *J. Dairy Sci.* 84:2177–2187.
- Collier, R. J., L. L. Hernandez, and N. D. Horseman. 2012. Serotonin as a homeostatic regulator of lactation. *Domest. Anim. Endocrinol.* 43:161–170. <http://dx.doi.org/10.1016/j.domaniend.2012.03.006>.
- Cregan, M. D., Y. Fan, A. Appelbee, M. L. Brown, B. Klopčič, J. Koppen, L. R. Mitoulas, K. M. E. Piper, M. A. Choolani, Y.-S. Chong, and P. E. Hartmann. 2007. Identification of nestin-positive putative mammary stem cells in human breastmilk. *Cell Tissue Res.* 329:129–136. <http://dx.doi.org/10.1007/s00441-007-0390-x>.
- Dahl, G. E., B. A. Buchanan, and H. A. Tucker. 2000. Photoperiodic effects on dairy cattle: A review. *J. Dairy Sci.* 83:885–893.
- Dahl, G. E., and D. Petitclerc. 2003. Management of photoperiod in the dairy herd for improved production and health. *J. Anim. Sci.* 81:11–17.
- Dahl, G. E., S. Tao, and I. M. Thompson. 2012. Lactation Biology Symposium: Effects of photoperiod on mammary gland development and lactation. *J. Anim. Sci.* 90:755–760. <http://dx.doi.org/10.2527/jas.2011-4630>.
- Delbecchi, L., N. Miller, C. Prud'homme, D. Petitclerc, G. F. Wagner, and P. Lacasse. 2005. 17 $\beta$ -estradiol reduces milk synthesis and increases stanniocalcin gene expression in the mammary gland of lactating cows. *Livest. Prod. Sci.* 98:57–66. <http://dx.doi.org/10.1016/j.livprodsci.2005.10.010>.
- Dessauge, F., V. Lollivier, B. Ponchon, R. Bruckmaier, L. Finot, S. Wiart, E. Cutullic, C. Disenhaus, S. Barbey, and M. Boutinaud. 2011. Effects of nutrient restriction on mammary cell turnover and mammary gland remodeling in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 94:4623–4635. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2010-4012>.
- Feng, S., A. M. Salter, T. Parr, and P. C. Garnsworthy. 2007. Extraction and quantitative analysis of stearyl-coenzyme A desaturase mRNA from dairy cow milk somatic cells. *J. Dairy Sci.* 90:4128–4136.
- Flint, D. J., and C. H. Knight. 1997. Interactions of prolactin and growth hormone (GH) in the regulation of mammary gland function and epithelial cell survival. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 2:41–48.
- Hassiotou, F., and P. E. Hartmann. 2014. At the dawn of a new discovery: The potential of breast milk stem cells. *Adv. Nutr.* 5:770–778. <http://dx.doi.org/10.3945/an.114.006924>.
- Hernandez, L. L., J. L. Collier, A. J. Vomachka, R. J. Collier, and N. D. Horseman. 2011. Suppression of lactation and acceleration of involution in the bovine mammary gland by a selective serotonin reuptake inhibitor. *J. Endocrinol.* 209:45–54. <http://dx.doi.org/10.1530/JOE-10-0452>.
- Hernandez, L. L., C. M. Stiening, J. B. Wheelock, L. H. Baumgard, A. M. Parkhurst, and R. J. Collier. 2008. Evaluation of serotonin as a feedback inhibitor of lactation in the bovine. *J. Dairy Sci.* 91:1834–1844. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2007-0766>.
- Ho, F., R. L. C. Wong, and J. W. M. Lawton. 1979. Human colostrum and breast milk cells: A light and electron microscopic study. *Acta Paediatr. Scand.* 68:389–396.
- Hurley, W. L. 1989. Symposium: Mammary gland function during involution and the declining phase of lactation—Mammary gland function during involution. *J. Dairy Sci.* 72:1637–1646.
- Janjanam, J., M. Jamwal, S. Singh, S. Kumar, A. K. Panigrahi, G. Hariprasad, M. K. Jena, V. Anand, S. Kumar, J. K. Kaushik, A. K. Dang, M. Mukesh, B. P. Mishra, A. Srinivasan, V. S. Reddy, and A. K. Mohanty. 2013. Proteome analysis of functionally differentiated bovine (*Bos indicus*) mammary epithelial cells isolated from milk. *Proteomics* 13:3189–3204. <http://dx.doi.org/10.1002/pmic.201300031>.
- Knight, C. H. 2001. Overview of prolactin's role in farm animal lactation. *Livest. Prod. Sci.* 70:87–93.
- Knight, C. H., and M. Peaker. 1984. Mammary development and regression during lactation in goats in relation to milk secretion. *Q. J. Exp. Physiol.* 69:331–338.
- Knight, T. W., D. S. Atkinson, N. A. Haack, C. R. Palmer, and K. H. Rowland. 1993. Effects of suckling regime on lamb growth rates and milk yields of Dorset ewes. *N. Z. J. Agric. Res.* 36:215–222. <http://dx.doi.org/10.1080/00288233.1993.10417756>.
- Komara, M., M. Boutinaud, H. Ben Chedly, J. Guinard-Flament, and P. G. Marnet. 2009. Once-daily milking effects in high-yielding Alpine dairy goats. *J. Dairy Sci.* 92:5447–5455. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2009-2179>.
- Lacasse, P., V. Lollivier, R. M. Bruckmaier, Y. R. Boisclair, G. F. Wagner, and M. Boutinaud. 2011. Effect of the prolactin-release inhibitor quinagolide on lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 94:1302–1309. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2010-3649>.
- Lacasse, P., V. Lollivier, F. Dessauge, R. M. Bruckmaier, S. Ollier, and M. Boutinaud. 2012. New developments on the galactopoietic role of prolactin in dairy ruminants. *Domest. Anim. Endocrinol.* 43:154–160. <http://dx.doi.org/10.1016/j.domaniend.2011.12.007>.
- Leitner, G., E. Shoshani, O. Krifucks, M. Chaffer, and A. Saran. 2000. Milk leucocyte population patterns in bovine udder infection of different aetiology. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 47:581–589.
- Li, P., P. S. Rudland, D. G. Fernig, L. M. B. Finch, and C. J. Wilde. 1999. Modulation of mammary development and programmed cell death by the frequency of milk removal in lactating goats. *J. Physiol.* 519:885–900.



- Littlejohn, M. D., C. G. Walker, H. E. Ward, K. B. Lehnert, R. G. Snell, G. A. Verkerk, R. J. Spelman, D. A. Clark, and S. R. Davis. 2010. Effects of reduced frequency of milk removal on gene expression in the bovine mammary gland. *Physiol. Genomics* 41:21–32. <http://dx.doi.org/10.1152/physiolgenomics.00108.2009>.
- Lollivier, V., P. Lacasse, J. Angulo Arizala, P. Lambertson, S. Wiart, J. Portanguen, R. Bruckmaier, and M. Boutinaud. 2015. In vivo inhibition followed by exogenous supplementation demonstrates galactopoietic effects of prolactin on mammary tissue and milk production in dairy cows. *J. Dairy Sci.* Accepted.
- Matsuda, M., T. Imaoka, A. J. Vomachka, G. A. Gudelsky, Z. Hou, M. Mistry, J. P. Bailey, K. M. Nieport, D. J. Walther, and M. Bader. 2004. Serotonin regulates mammary gland development via an autocrine-paracrine loop. *Dev. Cell* 6:193–203.
- Mollett, T. A., R. E. Erb, E. L. Monk, and P. V. Malven. 1976. Changes in estrogen, progesterone, prolactin and lactation traits associated with injection of estradiol-17 b and progesterone into lactating cows. *J. Anim. Sci.* 42:655–663.
- Morgante, M., S. Ranucci, M. Pauselli, C. Casoli, and E. Duranti. 1996. Total and differential cell count in milk of primiparous Comisana ewes without clinical signs of mastitis. *Small Rumin. Res.* 21:265–271.
- Negrao, J. A., P.-G. Marnet, and J. Labussière. 2001. Effect of milking frequency on oxytocin release and milk production in dairy ewes. *Small Rumin. Res.* 39:181–187.
- Nguyen, D. A., and M. C. Neville. 1998. Tight junction regulation in the mammary gland. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 3:233–246.
- Nguyen, D. A., A. F. Parlow, and M. C. Neville. 2001. Hormonal regulation of tight junction closure in the mouse mammary epithelium during the transition from pregnancy to lactation. *J. Endocrinol.* 170:347–356.
- Olazabal, I., J. Munoz, S. Ogueta, E. Obregon, and J. P. Garcia-Ruiz. 2000. Prolactin (PRL)-PRL receptor system increases cell proliferation involving JNK (c-Jun amino terminal kinase) and AP-1 activation: Inhibition by glucocorticoids. *Mol. Endocrinol.* 14:564–575.
- Pai, V. P., and N. D. Horseman. 2011. Multiple cellular responses to serotonin contribute to epithelial homeostasis. *PLoS ONE* 6:e17028.
- Peters, R. R., L. T. Chapin, R. S. Emery, and H. A. Tucker. 1981. Milk yield, feed intake, prolactin, growth hormone, and glucocorticoid response of cows to supplemented light. *J. Dairy Sci.* 64:1671–1678.
- Rémond, B., and D. Pomès. 2005. Once-daily milking of dairy cows: A review of recent French experiments. *Anim. Res.* 54:427–442. <http://dx.doi.org/10.1051/animres:2005040>.
- Russo, V. M., A. W. N. Cameron, F. R. Dunshea, A. J. Tilbrook, and B. J. Leury. 2013. Artificially extending photoperiod improves milk yield in dairy goats and is most effective in late lactation. *Small Rumin. Res.* 113:179–186. <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2013.01.002>.
- Shuster, D. E., R. J. Harmon, J. A. Jackson, and R. W. Hemken. 1991. Suppression of milk production during endotoxin-induced mastitis. *J. Dairy Sci.* 74:3763–3774.
- Sorg, D., A. Potzel, M. Beck, H. H. D. Meyer, E. Viturro, and H. Kliem. 2012. Effects of cell culture techniques on gene expression and cholesterol efflux in primary bovine mammary epithelial cells derived from milk and tissue. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 48:550–553. <http://dx.doi.org/10.1007/s11626-012-9544-6>.
- Stefanon, B., M. Colitti, G. Gabai, C. H. Knight, and C. J. Wilde. 2002. Mammary apoptosis and lactation persistency in dairy animals. *J. Dairy Res.* 69:37–52.
- Stein, T., N. Salomonis, and B. A. Gusterson. 2007. Mammary gland involution as a multi-step process. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 12:25–35. <http://dx.doi.org/10.1007/s10911-007-9035-7>.
- Stelwagen, K., S. R. Davis, V. C. Farr, C. G. Prosser, and R. A. Sherlock. 1994. Mammary epithelial cell tight junction integrity and mammary blood flow during an extended milking interval in goats. *J. Dairy Sci.* 77:426–432.
- Stelwagen, K., V. C. Farr, S. R. Davis, and C. G. Prosser. 1995. EGTA-induced disruption of epithelial cell tight junctions in the lactating caprine mammary gland. *Am. J. Physiol.* 269:R848–R855.
- Stelwagen, K., V. C. Farr, H. A. McFadden, and S. R. Davis. 1997. Time course of milk accumulation-induced opening of mammary tight junctions and blood clearance of milk components. *Am. J. Physiol.* 273:R379–R386.
- Stelwagen, K., H. A. McFadden, and J. Demmer. 1999. Prolactin, alone or in combination with glucocorticoids, enhances tight junction formation and expression of the tight junction protein occludin in mammary cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 156:55–61.
- Stull, M. A., V. Pai, A. J. Vomachka, A. M. Marshall, G. A. Jacob, and N. D. Horseman. 2007. Mammary gland homeostasis employs serotonergic regulation of epithelial tight junctions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104:16708–16713.
- Wagner, S. A., D. E. Jones, and M. D. Apley. 2009. Effect of endotoxic mastitis on epithelial cell numbers in the milk of dairy cows. *Am. J. Vet. Res.* 70:796–799.
- Wall, E. H., and T. B. McFadden. 2012. Triennial lactation symposium: a local affair: How the mammary gland adapts to changes in milking frequency. *J. Anim. Sci.* 90:1695–1707.
- Watson, C. J. 2006. Involution: Apoptosis and tissue remodelling that convert the mammary gland from milk factory to a quiescent organ. *Breast Cancer Res.* 8:203.
- Werner-Misof, C., M. W. Pfaffl, H. H. D. Meyer, and R. M. Bruckmaier. 2007. Effect of chronic oxytocin-treatment on the bovine mammary gland immune system. *Vet. Med. (Praha)* 52:475–486.
- Wilde, C. J., C. Knight, and D. J. Flint. 1999. Control of milk secretion and apoptosis during mammary involution. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 4:129–136.
- Yadav, P., P. Kumar, M. Mukesh, R. S. Kataria, A. Yadav, A. K. Mohanty, and B. P. Mishra. 2015. Kinetics of lipogenic genes expression in milk purified mammary epithelial cells (MEC) across lactation and their correlation with milk and fat yield in buffalo. *Res. Vet. Sci.* 99:129–136. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.01.003>.
- Yart, L., F. Dessauge, L. Finot, S. Barbey, P. G. Marnet, and V. Lollivier. 2012. Ovariectomy improves lactation persistency in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95:3794–3802. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2011-5195>.



## Annexe 2

L. Herve, V. Lollivier, H. Quesnel, M. Boutinaud (2015). Regulation of cell number in the mammary gland via the control of the exfoliation process in milk in ruminants. ADSA-ASAS Joint Annual Meeting, 12-16 July 2015, Orlando, USA.

### **Regulation of cell number in the mammary gland via the control of the exfoliation process in milk in ruminants.**

Lucile Hervé<sup>1,2</sup>, Vanessa Lollivier<sup>1,2</sup>, Hélène Quesnel<sup>1,2</sup>, and Marion Boutinaud\*<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>INRA UMR1348, Saint Gilles, France

<sup>2</sup>Agrocampus Ouest UMR1348, Rennes, France.

Milk yield is partly influenced by the number of mammary epithelial cells (MEC) in the mammary gland. It is well known that MEC number varies due to cell proliferation and apoptosis. The exfoliation of MEC from the mammary epithelium into milk is another process which might influence MEC number in the mammary tissue. Yet, little is known about the control of MEC exfoliation process. The rate of MEC exfoliation can be assessed by measuring the milk MEC content through flow cytometry analysis or through an immunomagnetic method for MEC purification. Various experimental models were used to affect milk yield and study the rate of MEC exfoliation. Reducing milking frequency from twice to once daily increased MEC loss per day in goat but not in cow milk. An increased daily rate of MEC exfoliation was also observed during short days as compared with long days or in response to an endotoxin-induced mastitis in cows. Other animal models were designed to investigate the endocrine control of the exfoliation process and its link with milk production. Suppression of ovarian steroids by ovariectomy resulted in a greater persistency of lactation and a decrease in MEC exfoliation. Administering prolactin inhibitors enhanced MEC loss while exogenous prolactin tended to prevent this negative effect of prolactin inhibitors. These findings suggest that prolactin could regulate MEC exfoliation. In most of these studies, variations of MEC exfoliation were associated with variations in milk yield and changes in mammary epithelium integrity. Exfoliation of MEC could be a process that regulates MEC number in the mammary tissue, and thereby could influence milk yield and lactation persistency.

**Key Words:** cow, lactation, mammary epithelial cell





## Annexe 3

**L. Herve**, V. Lollivier, H. Quesnel, M. Boutinaud (2016). Les cellules épithéliales mammaires dans le lait comme indicateur du turnover cellulaire dans la mamelle. XVe Journées de l'animation transversale Glande mammaire, Lait, 17 et 18 novembre 2016, Theix, France.

### **Les cellules épithéliales mammaires dans le lait comme indicateur du turnover cellulaire dans la mamelle**

*L. Herve<sup>1</sup>, V. Lollivier<sup>1</sup>, H. Quesnel<sup>1</sup>, M. Boutinaud<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>UMR1348 INRA/Agrocampus Ouest, Physiologie, Environnement et Génétique pour l'Animal et les Systèmes d'Élevage, Saint-Gilles, France

Des cellules épithéliales mammaires (CEM) sont retrouvées dans le lait suite à leur exfoliation, c'est-à-dire leur décrochage de l'épithélium mammaire et leur évacuation dans le lait au cours de la lactation. Chez les ruminants, la quantité de lait produit dépend en partie du nombre de CEM présentes dans la glande mammaire. Il est connu depuis longtemps que les variations du nombre de CEM dans la mamelle dépendent de l'équilibre entre la prolifération cellulaire et l'apoptose. L'exfoliation des CEM pourrait aussi participer à la régulation du nombre de CEM dans le tissu mammaire. Le taux d'exfoliation peut être évalué en mesurant la concentration en CEM dans le lait par une analyse de cytométrie en flux ou par purification des CEM du lait par une méthode d'immunoséparation magnétique. Il a été montré que de nombreux facteurs de variation de la production laitière engendrent aussi des variations du taux d'exfoliation des CEM. Le passage en monotraite, connu pour induire une diminution de la production laitière, augmente le taux d'exfoliation des CEM chez la chèvre. Une diminution de la production laitière et une augmentation concomitante du taux d'exfoliation des CEM ont également été observées lorsque des vaches ont été soumises à des jours courts par rapport à des longs jours, à une restriction alimentaire ou en réponse à une mammite. Le statut hormonal influence aussi le processus d'exfoliation des CEM. Chez la vache laitière, la suppression des stéroïdes ovariens par ovariectomie améliore la persistance de la lactation et induit une diminution du taux d'exfoliation des CEM. Un traitement de 2 semaines à l'hormone de croissance bovine induit une augmentation de la production laitière mais n'a pas d'effet sur le taux d'exfoliation des CEM. En revanche, après le traitement, le retour de la production de lait à son niveau initial est associé à une augmentation du taux d'exfoliation. Enfin, l'inhibition de la sécrétion de prolactine au cours de la lactation ou lors du tarissement provoque une diminution de la production laitière et une augmentation de l'exfoliation des CEM alors que des injections de prolactine exogène tendent à réduire l'effet négatif des inhibiteurs de la sécrétion de la prolactine. Dans la plupart de ces études, nous montrons également que l'augmentation du taux d'exfoliation des CEM est associée à une perte d'intégrité de l'épithélium mammaire. L'exfoliation des CEM pourrait donc être un processus participant à la régulation du turnover des CEM dans le tissu mammaire, et qui ainsi pourrait influencer la production laitière et la persistance de la lactation.



## Annexe 4

M. Boutinaud, L. Herve, V. Lollivier (2015). Mammary epithelial cells isolated from milk are a valuable, non-invasive source of mammary transcripts. *Frontiers in Genetics* 6:323

### **Les cellules épithéliales mammaires isolées à partir du lait constituent une source non-invasive de transcrits mammaires.**

Marion Boutinaud<sup>1,2</sup>, Lucile Herve<sup>1,2</sup> and Vanessa Lollivier<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> UMR 1348 PEGASE, Institut National de la Recherche Agronomique, Saint Gilles, France

<sup>2</sup> UMR 1348 PEGASE, AGROCAMPUS OUEST, Rennes, France

<sup>3</sup> Université Européenne de Bretagne, Rennes, France

**Résumé** - Le lait est produit dans la glande mammaire par les cellules épithéliales mammaires (CEM). Le lait contient des CEM qui sont progressivement exfoliées au cours de la lactation. Isoler des CEM du lait par une méthode d'immunoséparation magnétique pourrait être une méthode non-invasive permettant d'étudier les régulations transcriptomiques dans la glande mammaire des ruminants. Cette revue a pour objectif de décrire la méthode permettant d'isoler les CEM à partir du lait, de donner un aperçu des études ayant utilisé cette méthode pour analyser l'expression des gènes par qRT-PCR et d'évaluer la validité de cette méthode en analysant et comparant les résultats de différentes études. Dans de nombreuses études menées chez la chèvre et chez la vache, des réductions de l'expression de l'ARNm de l'alpha-lactalbumine lors de la monotraite et de l'ARNm de *SCL2A1* lors d'une restriction alimentaire ont été observées. L'effet de la monotraite sur l'expression de l'ARNm de l'alpha-lactalbumine est similaire dans les CEM isolées à partir du lait ou dans les biopsies mammaires. De plus, il a été montré que l'expression des ARNm de l'alpha-lactalbumine et de *BAX* diminuait avec l'avancée de la lactation chez les vaches laitières et les bufflonnes. La pertinence de l'utilisation des CEM isolées à partir du lait comme source de transcrits mammaires pour analyser l'expression des gènes est aussi prouvée grâce à la concordance entre les variations de l'expression des gènes et les variations de production laitière et de composition du lait en réponse à différents facteurs comme l'inhibition de la prolactine et la photopériode. Cependant, les ARNm des CEM du lait sont particulièrement sensibles la dégradation. Cela pourrait expliquer les différences observées entre l'expression des gènes analysées dans les CEM du lait et les biopsies mammaires dans deux études dans lesquelles l'expression des gènes a été analysée par qRT-PCR et séquençage. Pour conclure, lorsque la qualité de l'ARNm est conservée, les CEM isolées à partir du lait constituent une source non-invasive d'ARNm mammaires permettant d'étudier différents facteurs influençant la production laitière et la composition du lait (monotraite, niveau d'alimentation, statut endocrinien, modulation de la photopériode et stade de lactation).

**Mots clés** : lactation, glande mammaire, ruminants, ARN, cellules épithéliales mammaires du lait





# Mammary epithelial cells isolated from milk are a valuable, non-invasive source of mammary transcripts

Marion Boutinaud<sup>1,2\*</sup>, Lucile Herve<sup>1,2</sup> and Vanessa Lollivier<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> UMR 1348 PEGASE, Institut National de la Recherche Agronomique, Saint Gilles, France, <sup>2</sup> UMR 1348 PEGASE, AGROCAMPUS OUEST, Rennes, France, <sup>3</sup> Université Européenne de Bretagne, Rennes, France

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Alessandra Crisà,  
Consiglio per la Ricerca in Agricoltura  
e l'analisi dell'economia agraria, Italy

### Reviewed by:

Gonzalo Rincon,  
University of California, Davis, USA  
Kieran G. Meade,  
Teagasc, Ireland  
Massimo Bionaz,  
Oregon State University, USA

### \*Correspondence:

Marion Boutinaud  
marion.boutinaud@rennes.inra.fr

### Specialty section:

This article was submitted to  
Livestock Genomics,  
a section of the journal  
Frontiers in Genetics

**Received:** 01 June 2015

**Accepted:** 12 October 2015

**Published:** 28 October 2015

### Citation:

Boutinaud M, Herve L and Lollivier V  
(2015) Mammary epithelial cells  
isolated from milk are a valuable,  
non-invasive source of mammary  
transcripts. *Front. Genet.* 6:323.  
doi: 10.3389/fgene.2015.00323

Milk is produced in the udder by mammary epithelial cells (MEC). Milk contains MEC, which are gradually exfoliated from the epithelium during lactation. Isolation of MEC from milk using immunomagnetic separation may be a useful non-invasive method to investigate transcriptional regulations in ruminants' udder. This review aims to describe the process of isolating MEC from milk, to provide an overview on the studies that use this method to analyze gene expression by qRT PCR and to evaluate the validity of this method by analyzing and comparing the results between studies. In several goat and cow studies, consistent reductions in alpha-lactalbumin mRNA levels during once-daily milking (ODM) and in *SLC2A1* mRNA level during feed restriction are observed. The effect of ODM on alpha-lactalbumin mRNA level was similarly observed in milk isolated MEC and mammary biopsy. Moreover, we and others showed decreasing alpha-lactalbumin and increasing *BAX* mRNA levels with advanced stages of lactation in dairy cows and buffalo. The relevance of using the milk-isolated MEC method to analyze mammary gene expression is proven, as the transcript variations were also consistent with milk yield and composition variations under the effect of different factors such as prolactin inhibition or photoperiod. However, the RNA from milk-isolated MEC is particularly sensitive to degradation. This could explain the differences obtained between milk-isolated MEC and mammary biopsy in two studies where gene expression was compared using qRT-PCR or RNA Sequencing analyses. As a conclusion, when the RNA quality is conserved, MEC isolated from milk are a valuable, non-invasive source of mammary mRNA to study various factors that impact milk yield and composition (ODM, feeding level, endocrine status, photoperiod modulation, and stage of lactation).

**Keywords:** lactation, mammary gland, ruminant, RNA, milk mammary epithelial cells

## INTRODUCTION

In the mammary tissue, transcriptomic regulations drive the process of lactation (Bionaz et al., 2012). Controlling the expression of genes involved in milk synthesis, cell turnover, or hormone response in the mammary tissue is determinant for milk production in ruminants. Moreover, the immune response to mammary infections such as mastitis has also been shown to depend on transcriptional regulations in the mammary tissue (Whelehan et al., 2011). However, studying



transcriptomic regulations responsible for changes in milk yield and composition or in the immune response entails the collection of mammary epithelial cells (MEC). Thus, MEC must be harvested from the mammary gland. The classic method is collection of mammary tissue by biopsy. However, this requires the performance of a surgical procedure (local anesthesia, skin incision with a scalpel, extraction of mammary tissue using a rotating blade, pressure to the udder to control hemorrhage and closure of the wound with a skin stapler). This procedure does not allow easy and repetitive sampling without damaging the mammary tissue. From an ethical point of view, but also based on scientific considerations, it is important to find alternative procedures to surgical ones whenever possible, also avoiding the carry-over effect of sampling that may be observed in mammary biopsies. Previous studies show that milk mostly contains immune system cells (lymphocyte, macrophage, neutrophils), but also viable MEC (Boutinaud and Jammes, 2002). The development of an immunomagnetic method enables the isolation of MEC from human milk somatic cells (Alcorn et al., 2002). This method has been adapted to ruminant milk (Boutinaud et al., 2008). This review aims to demonstrate that milk-purified MEC cells can be a valuable, non-invasive source of mammary transcripts.

## THE METHODOLOGY FOR USING MEC FROM MILK TO ANALYZE MAMMARY GENE EXPRESSION

### The Process of MEC Isolation from Milk

Milk contains several cell types; most of which are immune system cells, and a minority of MEC. The first step of MEC isolation from milk for RNA studies is low-speed centrifugation ( $<2,800 \times g$ ) in a conical flask to pellet the cells at the bottom of the flask. Since MEC concentration in milk is low, sufficient volumes of milk must be centrifuged in order to obtain enough RNA for gene expression analyses. Goat milk contains a higher concentration of MEC than bovine milk (Boutinaud and Jammes, 2002). Thus, 1.8–3.6 kg of bovine milk (Boutinaud et al., 2008, 2012, 2014; Krappmann et al., 2012; Sigl et al., 2014), 0.9–1.6 kg of caprine milk (Ben Chedly et al., 2011, 2013) and 1 kg of buffalo milk (Yadav et al., 2014) were used to extract purified MEC from milk in order to analyze mammary transcripts. During the second step of MEC isolation, an immunomagnetic separation technique is used to isolate the MEC from the total milk somatic cells and to remove the leukocytes. After several washings, total milk cell suspension is either directly incubated with magnetic beads coated with a specific antibody (Boutinaud et al., 2008) or indirectly, first incubated with the antibody and then with the magnetic beads (Sigl et al., 2012). After incubation on a rotary mixer at 4°C, the antibody-bound cells are then collected by placing the vials into a magnetic particle concentrator, thus the immune cells are discarded. After this step, the cell viability of milk-purified MEC suspensions were assessed using trypan blue staining showing that the majority of milk MEC are viable with an average of 62–77% and 83%

cell viability in twice daily milked dairy cows (Boutinaud et al., 2012; Lollivier et al., 2015) and goats (Ben Chedly et al., 2013), respectively. The last step is centrifugation, used to pellet the purified MEC, followed by RNA extraction performed using various methods.

### Checking the RNA Quality is Crucial before Using MEC from Milk for Transcript Analysis

Mammary epithelial cells from milk are shed from the mammary epithelium. As such, they are no longer in contact with the extracellular matrix known to provide survival signals to MEC in the mammary tissue (Katz and Streuli, 2007). Moreover, they are not connected to each other by tight junctions. In addition, the induction of tight junction disruption is known to cause gene expression changes and cell apoptosis in mammary tissue (Ben Chedly et al., 2010). Even though MEC from milk are disconnected from their original environment, they are not completely dead, as they can still be cultivated (Ben Chedly et al., 2010; Sorg et al., 2012). Outside of their natural environment, milk-purified MEC can be fragile. Moreover, milk contains ribonuclease (Dalaly et al., 1980), thus their RNA may be susceptible to degradation. Despite all this, in most studies, the RNA quality of milk-purified MEC is acceptable for gene expression analyses as assessed using the RNA Integrity Number (RIN) generated by Agilent 2100 expert software (Schroeder et al., 2006) with RIN above 8. However, poor RNA quality in milk-purified MEC could partially explain the absence of concordance between gene expression in the mammary tissue and in milk-purified MEC in two studies. In a study where cows were fed with a diet rich in plant oil and docosahexaenoic acid-rich algae (DHA)-, the RNA quality of milk-purified MEC samples did not reach full satisfactory quality (Angulo et al., 2012). The lipid and DHA-rich algae supplementations resulted in a tendency to reduce the RNA quality (RIN  $< 7$ ) in milk-purified MEC. In this study, there was a joint down-regulation of mammary lipogenic enzyme gene expression (stearoyl-CoA desaturase, *SCD1*, FA synthase, *FASN*, and sterol regulatory element binding transcription factor 1, *SREBF1*) in the mammary tissue, and a lack of effect in milk-purified MEC. Similarly in another study, gene expression in milk-purified MEC was compared to total milk somatic cells, biopsy, laser-microdissected MEC and milk fat globules using RNA Sequencing (Cánovas et al., 2014). Unfortunately in that study, the RNA quality of milk-purified samples ( $n = 3$ ) was not optimal (RIN = 6) with a large proportion of low molecular weight RNA. This could be due to the specificity of this study with a milk storing time of 3-h before performing MEC purification. The RNA Sequencing analysis showed a high correlation of gene expression between milk somatic cells, mammary biopsy, laser-microdissected MEC and milk fat globule samples, while peculiarities were observed with milk-purified MEC, such as surprising, relatively low levels of  $\beta$ -lactoglobulin (*BLG*),  $\alpha$ -lactalbumin (*LALBA*) and *GLYCAM-1* (Cánovas et al., 2014). The particularly poor RNA quality of these milk-purified MEC samples may partly explain the discrepancies with the other sources of mammary RNA. These





two studies suggest that RNA from milk-isolated MEC is sensitive to degradation. Since, according to Fleige and Pfaffl (2006), the analysis of RNA levels is greatly influenced by the RNA's integrity, we suggest that it is crucial to consider the RNA quality before using these cells as a source of mammary transcripts.

## The Importance of MEC Purification in Quantifying Mammary Gene Expression

The importance of using a purification steps to collect MEC is questionable. Indeed, compared with total milk somatic cells as a source of mammary transcripts, less RNA is obtained using milk-purified MEC. The small amount of RNA recovery is not a problem using qRT-PCR, but requires amplification before transcriptomic analysis, such as RNA Sequencing analyses and an amplification step can introduce bias across samples with overexpression of some genes (Vallandingham et al., 2013). Moreover, purification is a time consuming step, as such it can have a negative influence on RNA quality. Thus, avoiding this step, while using total milk somatic cells, would be better to preserve RNA quality. However, purification does not always have the same impact on RNA quality depending on the studies. In contrast with a recent study (Cánovas et al., 2014), the quality of RNA was better in milk-purified MEC than in total milk somatic cells (RIN 8.0 vs. 4.1,  $P < 0.05$ ; Boutinaud et al., 2008).

The use of the purification method also provides advantages over the use of somatic cells for the quantification of gene expression. Firstly, the use of total milk somatic cells as a source of mammary RNA may be arguable for some genes of interest that are not solely expressed in MEC and also expressed in leukocytes. Likewise for genes involved in apoptosis pathways, most of them are not solely specific of MEC. It is for example the case for *BAX* which is expressed in all types of cells, especially in leukocytes, known to undergo spontaneous apoptosis (Paape et al., 2000). Although, more and more studies reported the use of milk somatic cells to analyze the expression of genes involved in milk synthesis in cows (Murrieta et al., 2006; Feng et al., 2007; Wickramasinghe et al., 2012), goats (Tudisco et al., 2014), sheep (Mura et al., 2013), and yaks (Bai et al., 2013) using northern blot, RT PCR analyses, or RNA sequencing, milk somatic cells were not considered as suitable for measuring milk protein expression in lactating ruminant (Sciascia et al., 2012). The use of total milk somatic cells may also be problematic with the real time RT-PCR technique for analyzing gene expression due to the need for a suitable reference gene (Dheda et al., 2005). Total milk cells are a mixed cell population and therefore subjected to change in subpopulation fractions. As an example the proportion of epithelial cells among total somatic cells varies from one sample to another (Boutinaud and Jammes, 2002). The changes in the subpopulation fraction potentially affect the choice of the most suitable reference gene. Accordingly, several studies reported the necessity of finding a suitable reference gene for studying gene expression in milk somatic cells in various species such as goats (Modesto et al., 2013; Jarczak et al., 2014), zebu (Varshney et al., 2012), or yaks (Bai et al., 2014). The variation in the subpopulation fraction can also be a problem when using a technique such as RNA Sequencing as it takes

into account all the genes expressed in a given sample. If the proportion of MEC varies, it will impact the number of genes expressed. Even in milk-purified MEC, the reference gene is a matter of debate. In one study, cytokeratin (*KRT18*) has been used as a reference gene (Krappmann et al., 2012). However, since no correlation of expression between udder- and milk-purified MEC samples was observed, the authors concluded that this method is not adequate to reflect metabolic processes. The use of *KRT18* as the reference gene is not necessary when MEC are already purified. The choice of the reference gene must be evaluated based on the stability of the expression under the conditions of the experiment as previously carried out with milk-purified MEC (Yadav et al., 2012). However, the conventional use of a single gene for normalization leads to relatively large errors and the use of the geometric mean of multiple carefully selected housekeeping genes is necessary (Vandesompele et al., 2002). Thus, compared with using somatic cells as a source of mammary transcripts, the use of milk-purified MEC shows several advantages (analyzing non-epithelial specific gene and avoiding variations due to the proportion of MEC among milk somatic cells) for gene quantification using RT-PCR, but also RNA Sequencing analyses. Despite these arguments in favor to the use of a purification step, the results obtained in the RNAseq study showing a higher correlation of gene expression with mammary biopsy for milk somatic cells than for milk-purified MEC (Cánovas et al., 2014) discredits this method. The fact that quality of RNA of milk-purified MEC was not optimal is not sufficient to explain such differences. The low amount of RNA obtained with milk-purified MEC may have generated more bias after the amplification step used in that study. Nevertheless, other broadband transcriptomic analysis with higher number of samples must to be investigated in order to compare gene expression between milk somatic cell and milk-purified MEC and to clearly validate the use of milk-purified MEC as a source of mammary transcript.

## The Use of a Proper Antibody

In the first study reporting this technique, an antibody specific to cell surface antigen, epithelial membrane antigen (EMA), was used to purify MEC from human milk (Alcorn et al., 2002). In ruminants, in most studies the antibody used to purify MEC is directed against cytokeratin 8 which is specific to alveolar MEC (Table 1). Some more recent studies used the clone 34 $\beta$ E12, which was first shown to be reactive against keratin proteins 1, 5, 10, and 14. These cytokeratins are mostly expressed in myoepithelial cells, suggesting that this antibody is not appropriate to purify MEC from milk. However, this antibody strongly reacts with Lobular lesions in breast (Lobular Intraepithelial Neoplasia, LIN; Bratthauer et al., 2002). And none of the individual clonal antibody directed against this individual cytokeratin (cytokeratin 1, 5, 10, and 14) reacted with the cells of LIN (Bratthauer et al., 2003). The antibody against cytokeratin 19 was the closest to demonstrating the reactivity seen with clone 34 $\beta$ E12 (Bratthauer et al., 2003). Cytokeratin 19 is well known to be specific of luminal MEC (Bartek et al., 1990). In non-neoplastic mammary tissue clone 34 $\beta$ E12 stains the cytoplasm of myoepithelial cells as well as luminal ductal epithelium (Dairkee



**TABLE 1 | Antibody used to purify mammary epithelial cells from milk cell suspension using magnetic beads in ruminants.**

Molecule	Clone	Manufacturer	Species	Reference
Anti-cytokeratin 8	Clone K8.13	Sigma–Aldrich Chimie, Lyon, France	Cow	Boutinaud et al., 2008
			Cow	Boutinaud et al., 2012
			Goat	Ben Chedly et al., 2011
			Goat	Ben Chedly et al., 2013
			Cow	Boutinaud et al., 2013a
			Buffalo	Yadav et al., 2012
			Buffalo	Yadav et al., 2014
Anti-cytokeratin 8	C5301	Sigma–Aldrich Chimie, Lyon, France	Cow	Wang et al., 2014
Anti-cytokeratin 8	Clone C-43	EXBIO, Prague, Czech Republic	Cow	Sigl et al., 2012
			Cow	Sigl et al., 2014
Anti-cytokeratin 1, 5, 10, and 14	Clone 34βE12	Dako, Trappes, France	Cow	Angulo et al., 2012,
			Cow	Lollivier et al., 2015
			Cow	Boutinaud et al., 2013b
			Cow	Boutinaud et al., 2014
			Cow	Cánovas et al., 2014

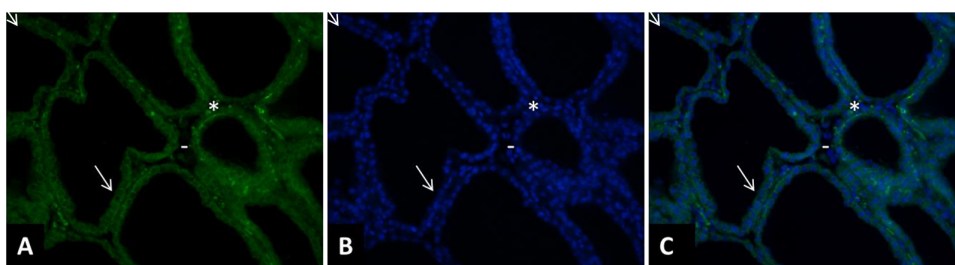
et al., 1988; Esposito et al., 2007). Since most of the literature about clone 34βE12 concerns human mammary tissue and non-lactating tissue, we performed a staining with this antibody in bovine lactating mammary tissue and observed that the alveolar MEC are stained with the antibody (**Figure 1**). The clone 34βE12 stained clearly luminal MEC but strong staining is also observed in the stroma part in some cells close to the luminal layer that may correspond to myoepithelial cells. However, most of the cells in the stroma are not stained by the antibody. From the **Figure 1**, we can conclude that, together with anti-cytokeratin 8 antibodies, clone 34βE12 antibody is also appropriated for MEC purification.

### The Efficiency of MEC Purification

In order to verify the efficiency of the purification method, gene expression for several cytokeratins was analyzed in milk-purified MEC. Enriching MEC from whole milk somatic cells has been

shown to be effective, as indicated by the higher levels of *KRT8* or *KRT18* mRNA in milk-purified MEC than in milk somatic cells (Boutinaud et al., 2008; Wang et al., 2014) and in mammary tissue (Krappmann et al., 2012). Moreover, milk-purified MEC samples were barely contaminated with immune cells, as they showed low mRNA abundance of specific leukocyte markers (Wang et al., 2014). In contrast in one bovine experiment, an over expression of CD68 in milk-purified MEC suggested a contamination with macrophages (Cánovas et al., 2014).

The reliability of the purification method can be evaluated in studies where different antibodies were used to specifically select the MEC (**Table 1**). The effect of feed restriction in dairy cows was analyzed in two studies using two different antibodies directed against cytokeratin 8 and in these both studies the effect of feed restriction was similar (Boutinaud et al., 2008; Sigl et al., 2014). Furthermore, the effect of Quinagolide, a prolactin-release inhibitor, was similar regardless of the anti-cytokeratin antibody



**FIGURE 1 | Immunohistology of a cow mammary tissue during lactation (DIM = 77) stained with clone 34βE12 anti-cytokeratin antibody.** The mammary tissue sample was fixed in 4% paraformaldehyde for 2 h and paraffin-embedded. The tissue sections (5 μm thickness) were deparaffinized in three changes of a xylene bath and rehydrated in a graded ethanol–water bath series (100% ethanol, 90% ethanol, 70% ethanol, and distilled water). After rehydration, and several TBS washes, the tissue sections were permeabilized by 5 min microwave exposure in sodium citrate 10 mM. The tissue sections were pre-incubated for 10 min in TBS with 10% normal goat serum (NGS) and then incubated for 2 h with a monoclonal mouse –anti-cytokeratin antibody (clone 34βE12, 1:100, Dako, Trappes, France). After several TBS washes, the sections were incubated with an anti-mouse secondary antibody (1:400, Alexa Fluor 153 568 Goat anti-Mouse IgG, A11031, Invitrogen Life Technology, Berlin, Germany) for 30 min (**A,C**). After being washed in TBS, the sections were incubated for 3 min with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Sigma–Aldrich) at a concentration of 0.33 μg/mL (**B,C**). All slides were mounted with VECTASHIELD (Valbiotech, Paris, France) and examined under fluorescence using a Nikon Eclipse E400 microscope (Nikon France, Le Pallet, France). The images were captured with a DXM 1200 digital still camera (Nikon France, magnification, 200×; area, 0.14 mm<sup>2</sup> per microscopic field) were examined for each staining. The clone 34βE12 stained clearly luminal MEC (↖) but strong staining is also observed in the stroma part in some cells close to the luminal layer that may correspond to myoepithelial cells (\*). However, most of the cells in the stroma are not stained by the antibody (-).



used: anti-cytokeratin 8 (Boutinaud et al., 2012) or anti-cytokeratin 1, 5, 10, and 14 (Lollivier et al., 2015). In addition, the effect of the lactation stage was concordant in two bovine studies (Sigl et al., 2012; Boutinaud et al., 2013b) as well as one bovine study and one buffalo study (Boutinaud et al., 2013b; Yadav et al., 2014) where different antibodies were used (Table 1). Finally, the agreement of these different studies suggests that the immunomagnetic method of MEC purification is reliable.

## FACTORS KNOWN TO GOVERN TRANSCRIPT VARIATION IN MILK-PURIFIED MEC

### The Effects of Feed Restriction

One of the initial factors of variation in mammary transcripts that has been studied using milk-purified MEC is the effect of feed restriction. In a first experiment, five Holstein dairy cows were submitted to an experimental design, which was a  $2 \times 2$  factorial arrangement of two milking frequencies and two feeding levels. The experiment was divided into two main 3-week periods, during which cows were fed either 98 or 70% of their needs. Milk MEC were isolated after 2–3 weeks of feed restriction treatment. Short term feed restriction causes a decrease in milk yield (–13%) in comparison with the 98% feeding level treatment. This effect was accompanied by a decrease (–53%) in the transcript levels of *SLC2A1* (Boutinaud et al., 2008), one of the main transmembrane transporters of glucose in mammary gland (Zhao, 2014). This effect could in part explain the lower glucose uptake by the mammary gland during feed restriction. As a consequence of low glucose levels available for lactose synthesis, and since lactose is the major osmotic agent in milk, reduced lactose secretion may in part be responsible for the decrease in milk yield during feed restriction (Boutinaud et al., 2008).

The effect of short term feed restriction has been studied at different stages of lactation in Holstein–Friesian dairy cows (during early or mid-lactation). A reduction of *SLC2A1* mRNA level with feed restriction was observed in both lactation stages (Sigl et al., 2014). A similar reduction in *SLC2A1* with feed restriction is observed to that observed previously (Boutinaud et al., 2008). In contrast, the effects on milk protein mRNA levels and on a key regulator of milk protein synthesis were observed to be different according to the stage of lactation. Only in early lactation, the expressions of  $\kappa$ -casein (*CSN3*), *LALBA* and one transcription factor gene, E74-like factor 5 (*ELF5*), increased during short term feed restriction (Sigl et al., 2014). The absence of variation of these milk protein genes in a later stage of lactation is concordant with previously published results (Boutinaud et al., 2008). Thus, similar variations in mammary transcripts from milk-isolated MEC were observed under the effect of feed restriction in two bovine studies.

### The Effects of Once-daily Milking

One of the main factors of variation in mammary transcripts that has been studied using milk-purified MEC is the effect of

once-daily milking (ODM) in comparison with a more common milking frequency, which is twice-daily milking (TDM). The practice of ODM resulted in a 7–50% decrease in milk yield depending on the species and breeds, but also on the duration and stage/timing of ODM (Marnet and Komara, 2008). Multiple studies investigated the effect of ODM on mammary transcripts using milk MEC collection in order to understand the cellular regulations involved in the reduction of milk yield during ODM.

The first studies were interested in analyzing the effect of ODM on several transcripts involved in milk protein and lactose synthesis. In the first experiment, milk MEC were collected from five cows submitted to a  $2 \times 2$  factorial arrangement of two milking frequencies (ODM and TDM) and two feeding levels (98 or 70% of needs, Boutinaud et al., 2008). In cows that received the 98% feeding level, ODM decreased milk yield (–19%), milk protein (–17%), and milk lactose (–22%). These decreases during ODM were accompanied by reductions in *LALBA* and *CSN3* mRNA levels by –73 and –86%, respectively (Table 2). The effect of ODM on milk protein transcripts in milk-purified MEC was also studied in two others trials, where cows were unilaterally milked once-daily. In these two experiments, the loss of milk yield was high, with a reduction from –41% to –31% of milk produced in one udder half in comparison with the contralateral one. In both studies, a consistent reduction in *LALBA* mRNA levels with a similar range (on average –75%) was observed during ODM compared with TDM (Table 2).

The effect of ODM was also studied using milk-purified MEC in three trials in goats. As for cows, ODM decreased milk yield and induced significant reductions in *LALBA* mRNA levels between –88% and –75%. For one of the goat experiments, the effect of ODM on *CSN3* mRNA levels was significant (–43%), whereas for the two others, only tendencies were observed. These results suggest that *LALBA* transcript has a key role in determining the milk yield during ODM. Indeed, *LALBA* gene, which encodes the coenzyme of lactose synthase, could help explain the lower milk production levels during ODM, given that lactose is a major osmotic agent.

In parallel with the analysis of the transcripts involved in milk protein and lactose synthesis, the effect of ODM on the expression of *BAX*, a gene coding for a pro-apoptotic factor was also investigated using milk-purified MEC. In most of the studies, one in cows and two in goats, ODM induced greater *BAX* RNA levels in milk-purified MEC (Table 2). We can hypothesize that the higher *BAX* mRNA level during ODM in milk-purified MEC could result of an induction of cell apoptosis in the mammary tissue after 24 h of milk accumulation in the mammary gland. A higher gene expression of *BAX* in milk MEC could also result from MEC remaining in the gland cistern for long periods, due to 24 h milk accumulation. However, our hypothesis is that most milk MEC cell are freshly exfoliated after myoepithelial cell contraction during milking. Further investigations on the characterization of MEC exfoliation in milk will give us more information about the use of *BAX* in milk-purified MEC as an indicator of the apoptotic process in the mammary tissue during ODM.



**TABLE 2 | Effect of once-daily milking (ODM) compared to twice-daily milking (TDM) on milk yields and on two milk protein and BAX mRNA levels in milk-purified mammary epithelial cells (MEC) or mammary biopsy in cows and goats.**

Species	Treatment duration	n	Milk yield during TDM kg/d	Delta yield ODM/TDM					Delta mRNA level ODM/TDM					Reference
				Milk	Fat	Protein	Lactose	Lactose content	LALBA	CSN3	BAX			
Cow	1 week	10	12.4 <sup>1</sup>	-19%***	-13%*	-17%***	-22%***	-2.3% <sup>†</sup>	-73%**	-86%***	762%*	Boutinaud et al., 2008		
	1 week	4	19.1 <sup>1</sup>	-41%***	-33%**	-38%***	-46%***	-	-76%*	-61% <sup>†</sup>	NS	Boutinaud et al., 2012		
	1 week	5	17.6 <sup>1</sup>	-31%***	-25%**	-30%***	-32%***	-4.2% <sup>†</sup>	-74%*	-49% <sup>†</sup>	-	Boutinaud et al., 2014		
Goat	5 weeks	8	3.1	-17%***	-22%***	-17%**	-18%***	NS	-88%*	-40% <sup>†</sup>	189%*	Ben Chedly et al., 2011		
Goat	5 weeks	6	3.5	-23%***	-20%*	-16%**	-23%	NS	-75%*	-66% <sup>†</sup>	186%*	Ben Chedly et al., 2013		
Goat	3 weeks	10	2.5	-19%***	-26%***	-12%*	-	-	-75%***	-43%*	-	Unpublished data		
<b>In milk purified MEC</b>														
<b>In mammary biopsies</b>														
Cow	1 week	5							-100% <sup>†</sup>	-98% <sup>†</sup>	-	Boutinaud et al., 2014		
Goat	5 weeks	6							-29%*	NS	NS	Ben Chedly et al., 2013		
Goat	3 weeks	10							-27%*	-27%***	-	Unpublished data		

\*\*\*P < 0.001; \*\*P < 0.01; \*P < 0.05; and <sup>†</sup>P < 0.10.  
<sup>1</sup>Milk Yields in udder half.

The effect of ODM using milk-purified MEC has been further studied, comparing its effect on mammary biopsy. The effects of ODM on mammary transcripts in milk-purified MEC were compared with those in mammary biopsies using real time RT-PCR analyses. In several goat and cow studies, we observed a consistent reduction in *LALBA* mRNA levels during ODM between milk-purified MEC and mammary biopsies (Table 2). Similarly to what is observed in milk-purified MEC, *CSN3* mRNA levels in the mammary tissue sampled by biopsy were not always significantly affected during ODM but followed a tendency for reduction in two studies out of three (P < 0.10, Table 1). In one of the cow studies, a larger panel of transcripts was compared between mammary biopsy and milk-purified MEC (Boutinaud et al., 2013a). In this study, the effect of ODM was analyzed in five Holstein cows subjected to unilateral ODM and TDM for 8 days. Similar down-regulations were observed in both milk-purified MEC and mammary tissue, regarding five transcripts, (*FABP3*, a fatty acid transporter; *ABCG2*, a carrier-associated secretion of xenobiotics; *SLC34A2*, a solute carrier and *RNASE1* and *RNASE5*, antimicrobial agents. Similarly in both mammary tissue and milk-purified MEC non-significant effect of ODM was observed for both *SCD* and *CSN3* transcripts. In addition, nucleobindin 2 (*NUCB2*) which is involved in cell proliferation and migration in human MEC (Suzuki et al., 2012), was similarly down-regulated in both mammary tissue and milk-purified MEC. However, the comparison of mRNA variations after ODM between milk-purified MEC and mammary biopsies also showed discrepancies. Three of the transcripts that were significantly down-regulated in mammary tissue (microarray analyses) were clearly not modified by ODM in milk-purified MEC (*PLIN2*, *CD36*, and *LPL*, P > 0.6). Although these RNA correspond to three proteins that are expressed in epithelial cells and have important function for milk fat synthesis (Bionaz and Looor, 2008), they are not epithelial cell-specific, but can also be expressed in other cells contained in mammary tissue. Given that *CD36* and *PLIN2* are involved in phagocytosis, their expressions in mammary tissue may be located in monocytes or macrophages, and are therefore not related to a reduction in milk fat synthesis, but rather to increased levels of apoptosis in this tissue, as a feedback effect after 8 days of unilateral ODM. Moreover, most of the transcripts upregulated in the mammary tissue involved in cell remodeling (cellular growth and proliferation, cell movement, and cell death) were stable in milk-purified MEC. For some transcripts, this can be explained by the fact that they belong to a category linked to non-epithelial mammary tissue, transcripts which - in theory - are not detected in milk-purified MEC and are weakly expressed in milk-purified MEC samples (such as *ITGB6*, the *IGFBP4* components of inflammatory system or the *COL1A1* component of connective tissue). However, *IGFBP-5* which is known to be expressed in MEC (Boutinaud et al., 2004) was upregulated in mammary tissue and did not vary in milk-purified MEC during ODM. The absence of *IGFBP-5* up-regulation in milk-purified MEC during ODM is all the more surprising since *IGFBP5* is known to be involved in apoptosis in mammary gland (Boutinaud et al., 2004). The comparison between mammary tissue and milk-purified





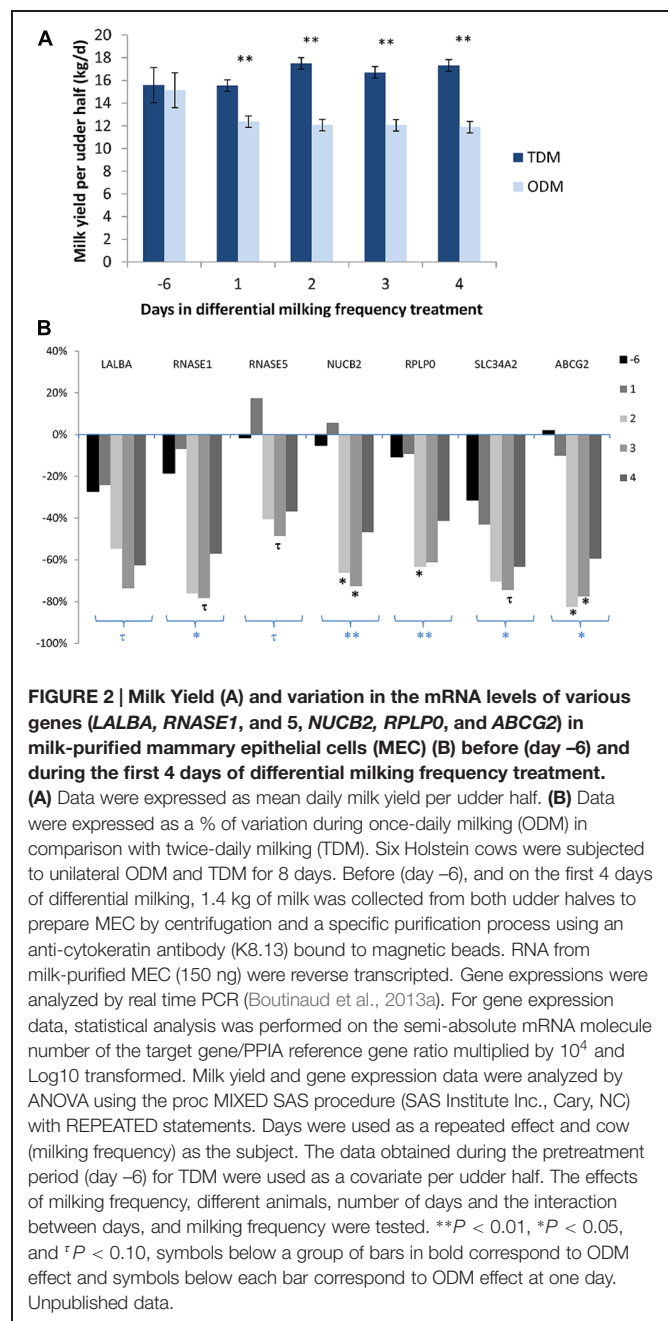
MEC must be further studied using broadband transcriptomic analysis.

The effect of ODM on mammary transcripts using milk MEC has also been studied in a short term kinetic experiment. Daily collection of milk during the first 4 days of unilateral ODM in six Holstein dairy cows made it possible to assess the pattern of expression for several genes, previously shown to be down-regulated during unilateral ODM in milk-purified MEC after 8 days of treatment (Boutinaud et al., 2013a). Milk yield was reduced from D1 (−20%) and this decrease stabilized at −30% from D2 to D4 (Figure 2A). Taking into account the unilateral milking effect for the 4 days of treatment, ODM induced down-regulation of gene expression for five transcripts (*RNASE1*, *SLC34A2*, *NUCB2*, *RPLP0*, and *ABCG2*) and a tendency for down-regulation for *LALBA* and *RNASE5* (Figure 2B). While milk yield was reduced from the first day, the effect on gene expression in milk-purified MEC was observed from the second day on three transcripts (*NUCB2*, *RPLP0*, and *ABCG2*), and these effects were still strong on the third day of differential milking. For three transcripts (*RNASE1* and 5 and *SLC34A2*), a tendency for down-regulation was observed on the third day of differential milking. In this study, one of the earliest and the strongest effect was observed for *ABCG2*, suggesting a pivotal role of *ABCG2* for controlling milk secretion during ODM. This effect is in agreement with the rapid down-regulation of *ABCG2* during mammary involution (Farke et al., 2008; Wu et al., 2014).

## The Effects of the Lactation Stage

The changes in transcripts according to the stage of lactation have been studied using milk-purified MEC in several species. Firstly, milk was collected from 24 multiparous Holstein-Friesian cows during 20 weeks of lactation to analyze the gene expression pattern of the six major milk protein mRNA (*CSN1S1*, *CSN1S2*, *CSN2*, *CSN3*, *LALBA*, and *LGB*, Sigl et al., 2012). Their expression was shown to peak during the first 2 weeks of lactation and decreased as lactation progressed. Accordingly, *LALBA* mRNA in milk-purified MEC from Holstein dairy cows was shown to decrease with the advanced stages of lactation (−80% between 21 and 52 weeks of lactation, Boutinaud et al., 2013b). The decrease in *LALBA* mRNA levels was associated with a 57% reduction in milk yield and a 15% reduction in lactose content (Boutinaud et al., 2013b). As during feed restriction, the decrease in the expression of major milk protein transcripts throughout the advanced stages of lactation was associated with the decrease of a key regulator of milk protein biosynthesis, namely *ELF5* (Sigl et al., 2014).

In contrast to milk protein transcripts, *BAX* and *BCL2* transcripts were shown to rise as lactation progressed in milk-purified MEC of Holstein dairy cows (Boutinaud et al., 2013b). Accordingly in buffalo, an abrupt rise in *BAX* and *BCL2* transcripts was observed in milk-purified MEC during late lactation (Yadav et al., 2014). The effect of lactation stage has also been studied on the expression profiles of the lipogenic genes using milk-purified MEC in buffalo, which is one of the species among dairy animals with the richest fat content (Yadav



et al., 2015). Interestingly, the expression of most of these genes was increased as the lactation progressed with the highest level at peak lactation and declined thereafter (3-Hydroxybutyrate dehydrogenase, Lipin1, Acetyl-coA synthetase short-chain family member 2), showing significant positive correlation with milk yield and a negative one with fat yield. In contrast, Acetyl-coA carboxylase alpha showed high expression during early lactation and a negative correlation with milk yield and a positive one with fat yield. Thus, genes involved in milk fat synthesis might be important regulators of milk and fat yields in buffalo.



## The Effects of Prolactin-release Inhibitor Treatment

Milk-purified MEC have been used to study the regulation of mammary transcripts in cows treated with an inhibitor of prolactin-release. Quinagolide is a dopamine agonist that inhibits the release of prolactin at milking (Lacasse et al., 2012). Quinagolide has been shown to induce a decrease in milk yield when injected to dairy cows (Lacasse et al., 2012). The effects of a Quinagolide treatment on mammary transcripts in milk-purified MEC have been studied in two cow experiments, one long term (9 weeks of treatment) and one short-term (5 days of treatment). In the long term experiment, the Holstein dairy cows were separated into two groups, one group ( $n = 5$ ) received a daily injection of 1 mg Quinagolide and the control group ( $n = 4$ ) received a daily injection of water for 9 weeks. Quinagolide administering resulted in a reduction in milk (-11.6%), lactose (-15.3%) and protein (-17.6%) yields. These decreases were associated with decreases in *LALBA* (-88%) and *CSN3* (-89%) gene expression in milk-purified MEC (Boutinaud et al., 2012). Quinagolide injections also induced a lower expression of long isoform prolactin receptor gene than in the control cows, suggesting a reduction in PRL sensitivity. In the short term experiment, nine Holstein dairy cows were assigned randomly to treatments during three periods of 5 days: (1) twice-daily, i.m. injections of 1 mg of Quinagolide; (2) injections of Quinagolide + twice-daily, i.v. injections of bovine recombinant prolactin at 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  BW; (3) twice-daily injections of the vehicles as controls. Similarly to long term treatment, Quinagolide administering resulted in similar reductions in milk yields and in *LALBA* (-70%) and *CSN3* (-63%) mRNA levels. When prolactin was injected into Quinagolide treated cows, the mRNA levels of these genes were intermediate in comparison with those in control animals or Quinagolide treated cows, supporting the thought that prolactin positively promotes milk yield by regulating the expression of genes encoding milk proteins.

## The Effects of the Photoperiod

An experiment was carried out to identify the role undertaken by the regulation of genes for the control of milk calcium content under the influence of various photoperiods. It has recently been shown that milk calcium content decreases with long days (Boudon et al., 2013). Many proteins expressed in MEC are involved in the secretion of calcium into milk. Some of them are involved in calcium transport across cell membranes and others are known to bind to calcium or to play a role in the compartmentalization of calcium into Golgi or Endoplasmic Reticulum. The expression of several of these proteins has been studied using eight Holstein dairy cows that received 2-day length treatments (8 h of light/day for short days and 16 h/day for long days) in a Latin square design. After 11 days of light treatment provided by solarium lights (UVA and UVB), milk MEC were isolated by purification using anti-cytokeratin 1, 5, 10, and 14 antibodies bound to magnetic beads. The analysis of the milk's composition showed

that total and colloidal calcium contents in milk were lower during long days than during short days ( $P < 0.05$ ). The gene expression analysis in milk-purified MEC showed that lower milk calcium content was associated with lower mRNA levels for *PMCA1*, a calcium transporter involved in transporting calcium across cell membranes ( $P < 0.05$ , Boutinaud et al., 2014). Concomitantly, the expression of two genes involved in calcium compartmentalization into Golgi (Secretory Pathway  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase, *SPCA1*, and Inositol1,4,5, triphosphate receptor, *ITPR1*) were down-regulated during long days compared with short days ( $P < 0.05$ ). The lower expression of these three calcium transporters in MEC could be responsible for lowering the milk calcium content during long days.

## The Relevance of Using the Milk-isolated MEC Method

When mammary transcript variations resulting from different factor (ODM, feed restriction, advancing lactation) were analyzed using the milk-isolated MEC method, similar effects were found between studies. Concerning feed restriction, a consistent reduction in *SLC2A1* mRNA was observed in two studies in cows. Likewise, consistent reductions in *LALBA* mRNA levels were observed during ODM in several studies in both cows and goats. In addition, the effect of the stage of lactation had consistently reduced *LALBA* RNA levels, while increasing *BAX* RNA levels in cows and buffalo. Lastly, the reduction in *LALBA* and *CSN3* after Quinagolide injection was observed in two studies.

The relevance of using milk-isolated MEC method has been demonstrated thanks to the transcript variations, which were consistent with milk yield and composition. In most of the studies, the decrease in milk, lactose, protein, and casein yields were associated with a reduction in *LALBA* and *CSN3* gene expression in milk-purified MEC. This is the case during ODM in both bovine (Boutinaud et al., 2012, 2013a) and caprine species (Ben Chedly et al., 2011, 2013), during Quinagolide treatment (Boutinaud et al., 2012; Lollivier et al., 2015) and with advanced stages of lactation (Boutinaud et al., 2013b). The transcript variations in milk-purified MEC were also consistent with milk composition variations, as suggested, with the effect of photoperiod on the calcium transporters.

The opportunity of using milk MEC isolation allows repetitive sampling without damaging the mammary tissue. It is possible to determine gene expression profiles in the very same animal over the course of an experiment or a lactation period. Thus, milk MEC collection has been shown to enable kinetic studies. For example, the early effect of ODM could be investigated during the first 4 days of ODM application by daily collection of milk samples. Thus, we highlight a pivotal role of *ABCG2* during the first days of ODM application. Similarly, the pattern of some gene expression has been studied over the course of one lactation period in the same animal.

The purification of MEC from total milk cells has the advantage of making it possible to obtain epithelial cells only. In contrast to milk-isolated MEC, mammary tissue contains other types of cells (myoepithelial cells, endothelial cells, adipocytes,



and fibroblasts). Despite the fact that mammary tissue essentially contains MEC, after RNA extraction, the presence of RNA from other types of cells may dilute the mammary transcripts of interest. For example, in the study where cows were injected daily with Quinagolide for 9 weeks, a reduction in milk protein mRNA was observed in mammary tissue after 4 weeks of treatment and was no longer significant after 8 weeks of treatment. After 9 weeks of treatment, the effect of Quinagolide on milk production was still present. Conversely to what was observed in mammary tissue after 8 weeks, lower levels of *LALBA* and *CSN3* mRNA were still observed in the milk-isolated MEC from the Quinagolide-treated cows in comparison with the controls after 9 weeks of treatment. Analyzing mammary transcripts in milk-purified MEC would be a more sensitive method for detecting low gene expression changes, as the purification step makes it possible to obtain MEC only. Results regarding the effect of ODM suggest the same idea. The effect of ODM on *LALBA* gene expression in cows is less significant in mammary biopsies than in milk-purified MEC (Table 1). Similarly, the percentage of *LALBA* gene expression variation in mammary biopsy is lower than in milk-purified MEC in two studies in goats (Table 2). MEC in milk may be more representative of a late secretory status, and may represent cells that are in full secretion whereas MEC of different status are present in biopsies. However, overall higher changes in gene expression with milk-purified MEC compared than with mammary tissue, might be due to a more pronounced senescence, MEC being shed into milk when they become senescent.

One of the limitations of using milk-isolated MEC to analyze mammary gene expression is that a big volume of milk is needed (1.8–3.6 kg of bovine milk) and it limits the number of samples processed at one time. Moreover the fact that the purification of MEC from milk has to be done on fresh milk is another limitation of the methodology. Even though the proteome profile of milk-purified MEC has been recently studied in zebu (Janjanam et al., 2013), the amount of MEC collected limit the number of different types of analysis that can be done on the same sample. In contrast, mammary biopsy allows performing, in addition to RNA analysis, protein, and immunohistochemical analyses. Moreover milk production also depends on extra-epithelial elements such as the vascular function and angiogenesis that can't be considered using a method with which only MEC are collected. In addition to these technical limitations, the lack of knowledge about milk-isolated MEC identity may limit the use of this method in replacement of other types of mammary cell collection method. Indeed, even if the majority of milk isolated cells are alive, some others are apoptotic MEC shed into milk due to a turnover of the secretory tissue (Herve et al., 2015). Besides that, milk should contain both ductal and secretory MEC, the content in secretory MEC being probably higher than for ductal MEC as a consequence of physical pressure in the alveolus associated with the continued filling and emptying cycle associated with milk synthesis and myoepithelial contraction during milking. This is supported by the proteome analysis of MEC isolated from zebu milk that showed the expression profile of proteins involved in lactation process suggesting that most these cells are metabolically active and secretory cells (Janjanam et al., 2013). From our knowledge, until now, no cell culture

was performed after MEC immuno-purification from milk. In contrast MEC was cultivated directly after somatic cells isolation from milk by centrifugation (Ben Chedly et al., 2010; Sorg et al., 2012). Additional studies via culture of milk-purified MEC could contribute to better characterize these cells, on for example the phosphorylation status and on protein levels as suggested by Sigl et al. (2012) and as performed in human after mammary biopsy (Gudjonsson et al., 2002). Few is known about the epigenetical status of milk-isolated MEC, except that their global DNA methylation was found quite variable between samples (on average  $67 \pm 8\%$ ) and lower than peripheral blood mononuclear cell (Gasselín et al., 2015). Thus a better characterization of the different types of MEC present in milk has yet to be investigated further.

## CONCLUSION

The isolation of MEC from milk has been shown to have several purposes. It is a means of assessing regulation of transcription by kinetic studies. One of the interests of using milk-purified MEC compared with using total milk somatic cells is the possibility to study genes not specifically expressed in MEC. Moreover, the use of milk MEC purified by immunomagnetic separation may also be more accurate to analyze mammary transcript levels than mammary biopsy. The fact that consistent transcript variations with milk yield and composition variations were observed, and that consistent effects of milking frequency, feed restriction, stage of lactation, and Quinagolide treatment shows evidence of the relevance and the efficiency of using purified MEC for ruminants. However, RNA from milk-isolated MEC is sensitive to degradation. This could explain the differences obtained between milk-isolated MEC and mammary biopsy in two studies. As a conclusion, when RNA quality is conserved, MEC isolated from milk are a valuable, non-invasive source of mammary mRNA which can be used to study various factors of milk yield and composition variations (ODM, feeding level, endocrine status, photoperiod modulation, and stage of lactation). Although other promising methods of recovering and analyzing mammary transcripts such as using milk fat globules have been developed (Maningat et al., 2007, 2009; Brenaut et al., 2012), the use of purified MEC is still advantageous as it can determine the level of exfoliation of MEC from the mammary tissue, indicating the regulation of mammary cell number and the long term effect on milk yield as recently reviewed (Herve et al., 2015). Finally, such a method of cell isolation would provide a promising opportunity to further understand the involvement of microRNA, small non-coding RNA, in the lactation process (Mobuchon et al., 2015; Wicik et al., 2015) and, for example, their role in the regulation of mammary host defense (Lawless et al., 2013; Jin et al., 2014).

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

Contributions to the conception of the review: MB, LH, and VL.  
Acquisition, analysis, and interpretation of unpublished data for the review: MB.  
Drafting the work: MB, LH, and VL.



## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank H. Ben Chedly, E. Delamaire, L. Yart, F. Dessauge, J. Guinard Flament, A. Boudon, C. Hurtaud, P.-G. Marnet, E. Devinoy, L. Galio, L. Bernard, P. Martin, P. Lacasse, R. Bruckmaier, J. Medrano, A. Canovas, and J. Angulo

Arizala for their collaboration. The authors are very grateful to the staff of the experimental farm INRA (UMR1348, IEPL, Le Rheu, France) for their helpful assistance in taking care of the animals, and to S. Marion, L. Finot, P. Debournoux, and S. Wiart INRA (UMR1348, Saint Gilles, France) for their technical assistance.

## REFERENCES

- Alcorn, J., Lu, X., Moscow, J. A., and McNamara, P. J. (2002). Transporter gene expression in lactating and nonlactating human mammary epithelial cells using real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 303, 487–496. doi: 10.1124/jpet.102.038315
- Angulo, J., Mahecha, L., Nuernberg, K., Nuernberg, G., Dannenberger, D., Olivera, M., et al. (2012). Effects of polyunsaturated fatty acids from plant oils and algae on milk fat yield and composition are associated with mammary lipogenic and SREBF1 gene expression. *Animal* 6, 1961–1972. doi: 10.1017/S1751731112000845
- Bai, W. L., Yin, R. H., Jiang, W. Q., Ajayi, O. O., Zhao, S. J., Luo, G. B., et al. (2013). Molecular analysis of  $\alpha$ S1-,  $\beta$ -,  $\alpha$ S2- and  $\kappa$ -casein transcripts reveals differential translational efficiency in yak lactating mammary gland. *Livest. Sci.* 152, 74–78. doi: 10.1016/j.livsci.2012.12.008
- Bai, W. L., Yin, R. H., Zhao, S. J., Jiang, W. Q., Yin, R. L., Ma, Z. J., et al. (2014). Technical note: selection of suitable reference genes for studying gene expression in milk somatic cell of yak (*Bos grunniens*) during the lactation cycle. *J. Dairy Sci.* 97, 902–910. doi: 10.3168/jds.2012-6437
- Bartek, J., Bartkova, J., and Taylor-Papadimitriou, J. (1990). Keratin 19 expression in the adult and developing human mammary gland. *Histochem. J.* 22, 537–544. doi: 10.1007/BF01005976
- Ben Chedly, H., Boutinaud, M., Bernier-Dodier, P., Marnet, P. G., and Lacasse, P. (2010). Disruption of cell junctions induces apoptosis and reduces synthetic activity in lactating goat mammary gland. *J. Dairy Sci.* 93, 2938–2951. doi: 10.3168/jds.2009-2678
- Ben Chedly, H., Lacasse, P., Marnet, P. G., and Boutinaud, M. (2013). The decrease in milk yield during once daily milking is due to regulation of synthetic activity rather than apoptosis of mammary epithelial cells in goats. *Animal* 7, 124–133. doi: 10.1017/S1751731112001176
- Ben Chedly, H., Lacasse, P., Marnet, P. G., Komara, M., Marion, S., and Boutinaud, M. (2011). Use of milk epithelial cells to study regulation of cell activity and apoptosis during once-daily milking in goats. *Animal* 5, 572–579. doi: 10.1017/S1751731110002284
- Bionaz, M., and Looor, J. J. (2008). Gene networks driving bovine milk fat synthesis during the lactation cycle. *BMC Genomics* 9:366. doi: 10.1186/1471-2164-9-366
- Bionaz, M., Periasamy, K., Rodriguez-Zas, S. L., Hurley, W. L., and Looor, J. J. (2012). A novel dynamic, impact approach (DIA) for functional analysis of time-course omics studies: validation using the bovine mammary transcriptome. *PLoS ONE* 7:e32455. doi: 10.1371/journal.pone.0032455
- Boudon, A., Johan, M., Narcy, A., and Hurtaud, C. (2013). Dietary anion-cation difference and day length affect milk calcium content. *J. Anim. Sci.* 91(E-Suppl. 2), 458.
- Boutinaud, M., Ben Chedly, M. H., Delamaire, E., and Guinard-Flament, J. (2008). Milking and feed, restriction regulate transcripts of mammary epithelial cells purified from milk. *J. Dairy Sci.* 91, 988–998. doi: 10.3168/jds.2007-0587
- Boutinaud, M., Boudon, A., Couedon, J., Johan, M., Lambertson, P., Narcy, A., et al. (2014). Dietary anion-cation difference and day length differently affect milk calcium secretion pathways. *J. Anim. Sci.* 92(Suppl. 2), 202.
- Boutinaud, M., Galio, L., Lollivier, V., Finot, L., Wiart, S., Esquerré, D., et al. (2013a). Unilateral once daily milking locally induces differential gene expression in both mammary tissue and milk epithelial cells revealing mammary remodeling. *Physiol. Genomics* 16, 973–985. doi: 10.1152/physiolgenomics.00059.2013
- Boutinaud, M., Yart, L., Debournoux, P., Wiart, S., Finot, L., Le Guennec, E., et al. (2013b). “Exfoliation of mammary epithelial cells in milk is linked with lactation persistency in dairy cows,” in *Proceedings of the 64th EAAP Annual Meeting 26-30 Aug 2013*, Nantes.
- Boutinaud, M., and Jammes, H. (2002). Potential uses of milk epithelial cells: a review. *Reprod. Nutr. Dev.* 42, 133–147. doi: 10.1051/rnd:2002013
- Boutinaud, M., Lollivier, V., Finot, L., Bruckmaier, R. M., and Lacasse, P. (2012). Mammary cell activity and turnover in dairy cows treated with the prolactin-release inhibitor quinagolide and milked once daily. *J. Dairy Sci.* 95, 177–187. doi: 10.3168/jds.2011-4461
- Boutinaud, M., Shand, J. H., Park, M. A., Phillips, K., Beattie, J., Flint, D. J., et al. (2004). A quantitative RT-PCR study of the mRNA expression profile of the IGF axis during mammary gland development. *J. Mol. Endocrinol.* 33, 195–207. doi: 10.1677/jme.0.0330195
- Brathauer, G. L., Miettinen, M., and Tavassoli, F. A. (2003). Cytokeratin immunoreactivity in lobular intraepithelial neoplasia. *J. Histochem. Cytochem.* 51, 1527–1531. doi: 10.1177/002215540305101112
- Brathauer, G. L., Moinfar, F., Stamatakos, M. D., Mezzetti, T. P., Shekitka, K. M., Man, Y. G., et al. (2002). Combined E-cadherin and high molecular weight cytokeratin immunoprofile differentiates lobular, ductal, and hybrid mammary intraepithelial neoplasias. *Hum. Pathol.* 33, 620–627. doi: 10.1053/hupa.2002.124789
- Brenaut, P., Bangera, R., Bevilacqua, C., Rebours, E., Cebo, C., and Martin, P. (2012). Validation of RNA isolated from milk fat globules to profile mammary epithelial cell expression during lactation and transcriptional response to a bacterial infection. *J. Dairy Sci.* 95, 6130–6144. doi: 10.3168/jds.2012-5604
- Cánovas, A., Rincón, G., Bevilacqua, C., Islas-Trejo, A., Brenaut, P., Hovey, R. C., et al. (2014). Comparison of five different RNA sources to examine the lactating bovine mammary gland transcriptome using RNA-Sequencing. *Sci. Rep.* 8:5297. doi: 10.1038/srep05297
- Dairkee, S. H., Puett, L., and Hackett, A. J. (1988). Expression of basal and luminal epithelium-specific keratins in normal, benign, and malignant breast tissue. *J. Natl. Cancer Inst.* 80, 691–695. doi: 10.1093/jnci/80.9.691
- Dalaly, B. K., Eitenmiller, R. R., Friend, B. A., and Shahani, K. M. (1980). Human milk ribonuclease. *Biochim. Biophys. Acta* 615, 381–391. doi: 10.1016/0005-2744(80)90505-7
- Dheda, K., Huggett, J. F., Chang, J. S., Kim, L. U., Bustin, S. A., Johnson, M. A., et al. (2005). The implications of using an inappropriate reference gene for real-time reverse transcription PCR data normalization. *Anal. Biochem.* 344, 141–143. doi: 10.1016/j.ab.2005.05.022
- Esposito, N. N., Chivukula, M., and Dabbs, D. J. (2007). The ductal phenotypic expression of the E-cadherin/catenin complex in tubulolobular carcinoma of the breast: an immunohistochemical and clinicopathologic study. *Mod. Pathol.* 20, 130–138. doi: 10.1038/modpathol.3800721
- Farke, C., Meyer, H. H. D., Bruckmaier, R. M., and Albrecht, C. (2008). Differential expression of ABC transporters and their regulatory genes during lactation and dry period in bovine mammary tissue. *J. Dairy Res.* 75, 406–414. doi: 10.1017/S002202990800335X
- Feng, S., Salter, A. M., Parr, T., and Garnsworthy, P. C. (2007). Extraction and quantitative analysis of stearoyl-coenzyme A desaturase mRNA from dairy cow milk somatic cells. *J. Dairy Sci.* 90, 4128–4136. doi: 10.3168/jds.2006-830
- Fleige, S., and Pfaffl, M. W. (2006). RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol. Aspects Med.* 27, 126–139. doi: 10.1016/j.mam.2005.12.003
- Gasselin, M., Prezelin, A., Boutinaud, M., Debournoux, P., Neveux, A., Mottin, A., et al. (2015). “Global DNA methylation in bovine peripheral blood mononuclear cells and in milk somatic cells,” in *Proceedings of the Book of Abstracts of the 66th Annual Meeting of the European Federation of Animal Science (EAAP), Warsaw, POL (2015-08-31 - 2015-09-03)* (Wageningen, NLD: Wageningen Academic Publishers), 282.
- Gudjonsson, T., Villadsen, R., Nielsen, H. L., Rønnow-Jessen, L., Bissell, M. J., and Petersen, O. W. (2002). Isolation, immortalization, and characterization





- of a human breast epithelial cell line with stem cell properties. *Genes Dev.* 16, 693–706. doi: 10.1101/gad.952602
- Herve, L., Quesnel, H., Lollivier, V., and Boutinaud, M. (2015). Regulation of cell number in the mammary gland by controlling the exfoliation process in milk in ruminants. *J. Dairy Sci.* [Epub ahead of print].
- Janjanam, J., Jamwal, M., Singh, S., Kumar, S., Panigrahi, A. K., Hariprasad, G., et al. (2013). Proteome analysis of functionally differentiated bovine (*Bos indicus*) mammary epithelial cells isolated from milk. *Proteomics* 13, 3189–3204. doi: 10.1002/pmic.201300031
- Jarczak, J., Kaba, J., and Bagnicka, E. (2014). The validation of housekeeping genes as a reference in quantitative Real Time PCR analysis: application in the milk somatic cells and frozen whole blood of goats infected with caprine arthritis encephalitis virus. *Gene* 549, 280–285. doi: 10.1016/j.gene.2014.07.063
- Jin, W., Ibeagha-Awemu, E. M., Liang, G., Beaudoin, F., Zhao, X., and Guanle, L. (2014). Transcriptome microRNA profiling of bovine mammary epithelial cells challenged with *Escherichia coli* or *Staphylococcus aureus* bacteria reveals pathogen directed microRNA expression profiles. *BMC Genomics* 15:181. doi: 10.1186/1471-2164-15-181
- Katz, E., and Streuli, C. H. (2007). The extracellular matrix as an adhesion checkpoint for mammary epithelial function. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 39, 715–726. doi: 10.1016/j.biocel.2006.11.004
- Krappmann, K., Weikard, R., and Kühn, C. (2012). Evaluation of a replacement method for mammary gland biopsies by comparing gene expression in udder tissue and mammary epithelial cells isolated from milk. *Res. Vet. Sci.* 93, 970–974. doi: 10.1016/j.rvsc.2011.12.021
- Lacasse, P., Lollivier, V., Dessauge, F., Bruckmaier, R. M., Ollier, S., and Boutinaud, M. (2012). New developments on the galactopoietic role of prolactin in dairy ruminants. *Domest. Anim. Endocrinol.* 43, 154–160. doi: 10.1016/j.domaniend.2011.12.007
- Lawless, N., Foroushani, A. B., McCabe, M. S., O'Farrelly, C., and Lynn, D. J. (2013). Next generation sequencing reveals the expression of a unique miRNA profile in response to a gram-positive bacterial infection. *PLoS ONE* 8:e57543. doi: 10.1371/journal.pone.0057543
- Lollivier, V., Lacasse, P., Angulo Arizala, J., Lambertson, P., Wiart, S., Portanguen, J., et al. (2015). In vivo inhibition followed by exogenous supplementation demonstrates galactopoietic effects of prolactin on mammary tissue and milk production in dairy cows. *J. Dairy Sci.* doi: 10.3168/jds.2015-9853 [Epub ahead of print].
- Maningat, P. D., Sen, P., Rijnkels, M., Sunehag, A. L., Hadsell, D. L., Bray, M., et al. (2009). Gene expression in the human mammary epithelium during lactation: the milk fat globule transcriptome. *Physiol. Genomics* 37, 12–22. doi: 10.1152/physiolgenomics.90341.2008
- Maningat, P. D., Sen, P., Sunehag, A. L., Hadsell, D. L., and Haymond, M. W. (2007). Regulation of gene expression in human mammary epithelium: effect of breast pumping. *J. Endocrinol.* 195, 503–511. doi: 10.1677/JOE-07-0394
- Marnet, P. G., and Komara, M. (2008). Management systems with extended milking intervals in ruminants: regulation of production and quality of milk. *J. Anim. Sci.* 86(13 Suppl.), 47–56. doi: 10.2527/jas.2007-0285
- Mobuchon, L., Marthey, S., Boussaha, M., Le Guillou, S., Leroux, C., and Le Provost, F. (2015). Annotation of the goat genome using next generation sequencing of microRNA expressed by the lactating mammary gland: comparison of three approaches. *BMC Genomics* 16:285. doi: 10.1186/s12864-015-1471-y
- Modesto, P., Peletto, S., Pisoni, G., Cremonesi, P., Castiglioni, B., Colussi, S., et al. (2013). Evaluation of internal reference genes for quantitative expression analysis by real-time reverse transcription-PCR in somatic cells from goat milk. *J. Dairy Sci.* 96, 7932–7944. doi: 10.3168/jds.2012-6383
- Mura, M. C., Daga, C., Bodano, S., Paludo, M., Luridiana, S., Pazzola, M., et al. (2013). Development of a RNA extraction method from milk for gene expression study in the mammary gland of sheep. *Mol. Biol. Rep.* 40, 2169–2173. doi: 10.1007/s11033-012-2276-6
- Murrieta, C. M., Hess, B. W., Scholljegerdes, E. J., Engle, T. E., Hossner, K. L., Moss, G. E., et al. (2006). Evaluation of milk somatic cells as a source of mRNA for study of lipogenesis in the mammary gland of lactating beef cows supplemented with dietary high-linoleate safflower seeds. *J. Anim. Sci.* 84, 2399–2405. doi: 10.2527/jas.2005-677
- Paape, M. J., Shafer-Weaver, K., Capuco, A. V., Van Oostveldt, K., and Burvenich, C. (2000). Immune surveillance of mammary tissue by phagocytic cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 480, 259–277. doi: 10.1007/0-306-4832-8\_31
- Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., et al. (2006). The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol. Biol.* 7:3. doi: 10.1186/1471-2199-7-3
- Sciascia, Q., Pacheco, D., Senna Salerno, M., Blair, H. T., and McCoard, S. A. (2012). Milk somatic cells are not suitable biomarkers of lactating ruminant mammary gland function. *Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod.* 72, 14–18.
- Sigl, T., Meyer, H. H. D., and Wiedemann, S. (2012). Gene expression of six major milk proteins in primary bovine mammary epithelial cells isolated from milk during the first twenty weeks of lactation. *Czech J. Anim. Sci.* 57, 469–480.
- Sigl, T., Meyer, H. H., and Wiedemann, S. (2014). Gene expression analysis of protein synthesis pathways in bovine mammary epithelial cells purified from milk during lactation and short-term restricted feeding. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 98, 84–95. doi: 10.1111/jpn.12039
- Sorg, D., Potzel, A., Beck, M., Meyer, H. H., Vitorro, E., and Kliem, H. (2012). Effects of cell culture techniques on gene expression and cholesterol efflux in primary bovine mammary epithelial cells derived from milk and tissue. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 48, 550–553. doi: 10.1007/s11626-012-9544-6
- Suzuki, S., Takagi, K., Miki, Y., Onodera, Y., Akahira, J., Ebata, A., et al. (2012). Nucleobindin 2 in human breast carcinoma as a potent prognostic factor. *Cancer Sci.* 103, 136–143. doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.02119.x
- Tudisco, R., Grossi, M., Calabrò, S., Cutrignelli, M. I., Musco, N., Addi, L., et al. (2014). Influence of pasture on goat milk fatty acids and Stearoyl-CoA desaturase expression in milk somatic cells. *Small Rum. Res.* 122, 38–43. doi: 10.1016/j.smallrumres.2014.07.016
- Vallandingham, J., Fleharty, B., Peak, A., Staehling, K., Perera, A., Li, H., et al. (2013). Evaluation of Whole Transcriptome Amplification Methods by RNA-Seq. *J. Biomol. Tech.* 24(Suppl.), S57–S58.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., et al. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3:RESEARCH0034. doi: 10.1186/gb-2002-3-7-research0034
- Varshney, N., Mohanty, A. K., Kumar, S., Kaushik, J. K., Dang, A. K., Mukesh, M., et al. (2012). Selection of suitable reference genes for quantitative gene expression studies in milk somatic cells of lactating cows (*Bos indicus*). *J. Dairy Sci.* 95, 2935–2945. doi: 10.3168/jds.2011-4442
- Wang, T., Lim, J. N., Bok, J. D., Kim, J. H., Kang, S. K., Lee, S. B., et al. (2014). Association of protein expression in isolated milk epithelial cells and cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid proportions in milk from dairy cows. *J. Sci. Food. Agric.* 94, 1835–1843. doi: 10.1002/jsfa.6502
- Whelehan, C. J., Meade, K. G., Eckersall, P. D., Young, F. J., and O'Farrelly, C. (2011). Experimental *Staphylococcus aureus* infection of the mammary gland induces region-specific changes in innate immune gene expression. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 140, 181–189. doi: 10.1016/j.vetimm.2010.1.013
- Wicik, Z., Gajewska, M., Majewska, A., Walkiewicz, D., Osińska, E., and Motyl, T. (2015). Characterization of microRNA profile in mammary tissue of dairy and beef breed heifers. *J. Anim. Breed. Genet.* doi: 10.1111/jbgs.12172 [Epub ahead of print].
- Wickramasinghe, S., Rincon, G., Islas-Trejo, A., and Medrano, J. F. (2012). Transcriptional profiling of bovine milk using RNA sequencing. *BMC Genomics* 13:45. doi: 10.1186/1471-2164-13-45
- Wu, A. M., Yang, M., Dalvi, P., Turinsky, A. L., Wang, W., Butcher, D., et al. (2014). Role of STAT5 and epigenetics in lactation-associated upregulation of multidrug transporter ABCG2 in the mammary gland. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 307, E596–E610. doi: 10.1152/ajpendo.00323.2014
- Yadav, P., Kumar, P., Mukesh, M., Kataria, R. S., Yadav, A., Mohanty, A. K., et al. (2015). Kinetics of lipogenic genes expression in milk purified mammary epithelial cells (MEC) across lactation and their correlation with milk and fat yield in buffalo. *Res. Vet. Sci.* 99, 129–136. doi: 10.1016/j.rvsc.2015.0.1003
- Yadav, P., Singh, D. D., Mukesh, M., Kataria, R. S., Yadav, A., Mohanty, A. K., et al. (2012). Identification of suitable housekeeping genes for expression analysis in



- mammary epithelial cells of buffaloes (*Bubalus bubalis*) during lactation cycle. *Livest. Sci.* 147, 72–76. doi: 10.1016/j.livsci.2012.04.004
- Yadav, P., Singh, D. D., Mukesh, M., Kataria, R. S., Yadav, A., Mohanty, A. K., et al. (2014). Expression profiling of glucose transporter 1 (GLUT1) and apoptotic genes (BAX and BCL2) in milk enriched mammary epithelial cells (MEC) in riverine buffalo during lactation. *Anim. Biotechnol.* 25, 151–159. doi: 10.1080/10495398.2013.836530
- Zhao, F. Q. (2014). Biology of glucose transport in the mammary gland. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 19, 3–17. doi: 10.1007/s10911-013-9310-8

**Conflict of Interest Statement:** 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.

Copyright © 2015 Boutinaud, Herve and Lollivier. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



## Annexe 5

M. Boutinaud, **L. Herve**, P. Debournoux, S. Wiart, V. Lollivier (2015). Les cellules épithéliales du lait comme alternative aux biopsies mammaires, Colloque OPAL & FRANCOPA « Place des méthodes de remplacement en expérimentation biologique », 4 novembre 2015, Paris, France.

### **Les cellules épithéliales du lait, une alternative aux biopsies mammaires chez les ruminants laitiers.**

Marion Boutinaud<sup>12</sup>, Lucile Hervé<sup>12</sup>, Perrine Debournoux<sup>12</sup>, Sandra Wiart<sup>12</sup>, Vanessa Lollivier<sup>123</sup>

<sup>1</sup>INRA UMR1348 PEGASE, F-35590 Saint-Gilles, France

<sup>2</sup>INRA Agrocampus Ouest, UMR1348 PEGASE, F-35000 Rennes, France




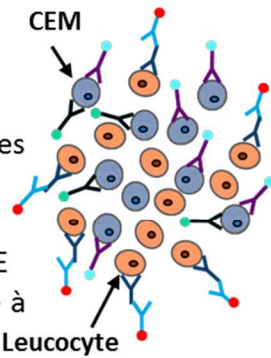
<sup>3</sup>Université européenne de Bretagne, F-35000 Rennes, France

Le lait est produit dans la mamelle par les cellules épithéliales mammaires (CEM). L'étude de la fonction de lactation requiert de récolter du matériel biologique. La méthode classique de collecte de tissu mammaire correspond à une intervention chirurgicale par biopsie qui ne permet pas un échantillonnage simple et répété, sans endommager le tissu mammaire. En revanche, le lait contient des CEM progressivement exfoliées de l'épithélium au cours de la lactation. Le développement d'une méthode de purification des CEM à partir du lait par séparation immuno-magnétique (Boutinaud et al., 2008) permet une collecte non-invasive de matériel cellulaire. Les CEM purifiées pourraient constituer une alternative aux biopsies pour l'étude des transcrits mammaires chez les ruminants laitiers. La pertinence de l'utilisation des CEM du lait a été montrée du fait de la cohérence entre les variations des niveaux d'expression des transcrits mammaires dans les CEM du lait et les variations de production et de composition du lait chez la vache et la chèvre. En comparant nos données à celles obtenues par biopsies mammaires, nous avons montré que les CEM purifiées du lait représentent une source de transcrits mammaires pertinente pour étudier la synthèse du lait. Néanmoins, les transcrits extraits de ces cellules sont particulièrement sensibles à la dégradation. En conclusion, les CEM isolées à partir de lait sont une source pertinente et non invasive d'ARN mammaires qui peut être utilisée pour étudier l'effet de différents facteurs d'élevage (monotraite, alimentation, statut endocrinien, photopériode, stade de lactation) sur la production et la composition du lait.

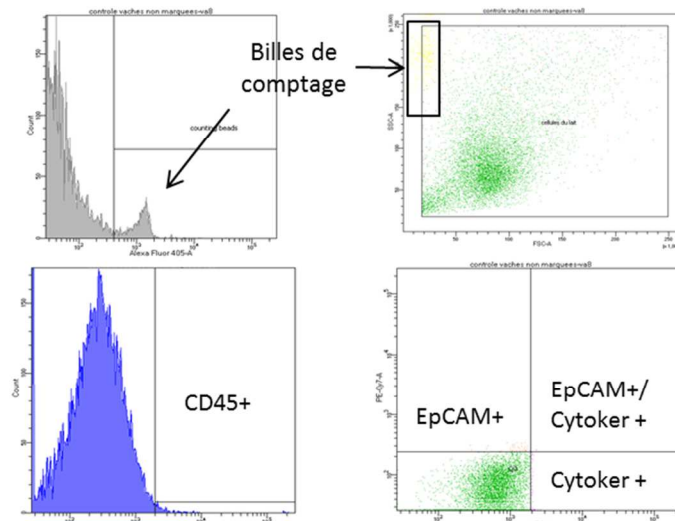


## Annexe 6 : Comparaison des techniques de détermination du taux d'exfoliation

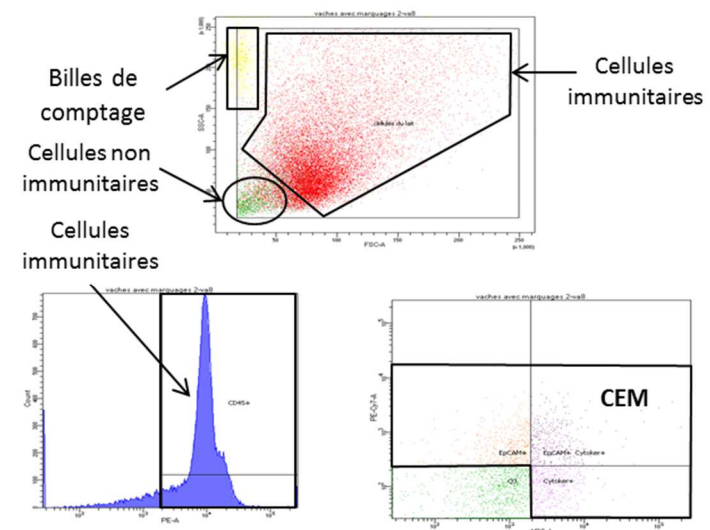
### Identification et de dénombrement des CEM du lait par cytométrie de flux

- 1 Collecte des échantillons de lait à la traite (20 mL) 
- 2 Dilution au 1/2 avec du PBS
- 3  Centrifugation  
1000 g – 15 min – T° ambiante
- 4 Élimination de la crème et du lait écrémé
- 5 2 lavages avec du PBS/BSA/NGS  
Centrifugation 500 g – 10 min – 4°C 
- 6 Récupération du culot de cellules somatiques du lait
- 7 Marquage des cellules avec des anticorps spécifiques couplés à des fluorochromes :
  - Ac anti-CD45 + Ac secondaire anti-mouse IgG2a couplé à PE
  - Anticorps anti-EpCAM couplé à PE/Cy7
- 8 Fixation des cellules au paraformaldéhyde  
Perméabilisation des cellules au Triton
- 9 Marquage avec un Ac anti-cytokératine 4, 5, 6, 8, 10, 13 et 18 couplé à Alexafluor 647
- 10 Ajout de billes de comptage CountBright

- 11 Analyse au cytomètre de flux  
- Échantillon témoin = non marqué :





- Échantillon marqué :

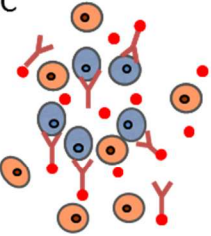
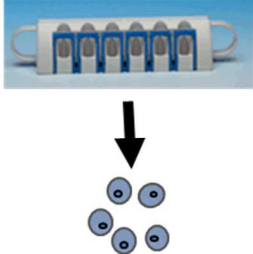






## Purification des CEM du lait par immuno-séparation magnétique

- 1 Collecte des échantillons de lait à la traite (1,8 L) 
- 2  Centrifugation 1500 g – 15 min – 4°C
- 3 Elimination de la crème et du lait écrémé
- 4 1<sup>er</sup> lavage avec du PBS  Centrifugation 1000 g – 10 min – 4°C
- 5 Filtration de la suspension cellulaire
- 6 2<sup>ème</sup> lavage avec du PBS  Centrifugation 1000 g – 10 min – 4°C

- 7 Marquage des cellules avec un AC anti-cytokératine 1, 5, 10 et 14 couplé à des billes magnétiques 
- 8 Récupération des CEM à l'aide d'un portoir magnétique et par aspiration du surnageant 
- 9 Comptage et analyse de la viabilité cellulaire

COMPARAISON	Cytométrie de flux	Immunoséparation magnétique
Échantillon	20 mL	1,8 L
Rapidité	+	-
Marquage	Plusieurs types cellulaires	1 seul type cellulaire
Anticorps utilisé pour marquer les CEM	- EpCAM - Cytokératine 4, 5, 6, 8, 10, 13 et 18	Cytokératine 1, 5, 10, 14
Analyses possibles	Dénombrement	Dénombrement Analyse de l'expression des gènes Analyse de la viabilité et de la mort cellulaire



## **Annexe 7**

**L. Herve**, V. Lollivier, P. Lamberton, S. Wiart, S. Philau, H. Quesnel, M. Boutinaud (2016). Caractérisation du processus d'exfoliation des cellules épithéliales mammaires au cours de la traite chez la vache laitière. Rencontres autour des Recherches sur les Ruminants, Paris, France.



# Caractérisation du processus d'exfoliation des cellules épithéliales mammaires au cours de la traite chez la vache laitière

## Characterizing the mammary epithelial cell exfoliation process during milking in dairy cows

HERVE L. (1), LOLLIVIER V. (1), LAMBERTON P. (1), WIART S. (1), MUSTIERE C. (1), PHILAU S. (1), QUESNEL H. (1), BOUTINAUD M. (1)

(1) UMR 1348 PEGASE, Agrocampus Ouest, INRA, 35590 Saint-Gilles, France

### INTRODUCTION

La quantité de lait produit dépend du nombre de cellules sécrétrices, appelées cellules épithéliales mammaires (CEM), présentes dans la mamelle. Une partie des CEM est éliminée de l'épithélium par exfoliation dans le lait. Chez la vache laitière, ce processus d'exfoliation participe à la régulation du nombre de CEM dans la mamelle et aux variations de quantité de lait produit (Herve et al., 2016). Les mécanismes régulant le processus d'exfoliation ne sont pas connus. Nous pouvons toutefois supposer que la pression mécanique exercée sur l'épithélium mammaire par la contraction des cellules myoépithéliales au moment de la traite est un facteur favorisant l'exfoliation des CEM dans le lait. L'objectif de cette étude était de caractériser l'exfoliation des CEM au cours de la traite chez la vache laitière.

### 1. MATERIEL ET METHODES

Neuf vaches laitières Prim'Holstein ( $57 \pm 5$  jours de lactation) ont été utilisées dans cette étude. Pour chaque vache, des échantillons de lait ont été prélevés toutes les minutes lors d'une traite du matin afin de réaliser un comptage des cellules somatiques (CCS). Les échantillons prélevés au début (après 1 et 2 min de traite), au milieu et à la fin de la traite ont été utilisés afin de purifier les CEM du lait par une méthode d'immunoséparation magnétique (Boutinaud et al., 2008). Un comptage des CEM purifiées a été réalisé. Du sang a également été prélevé en cinétique au cours de la traite pour évaluer l'intégrité de l'épithélium mammaire par la mesure de la concentration plasmatique de lactose. La durée de traite étant différente pour chaque vache ( $10 \pm 0,7$  min), les données de production et de CCS des 3 premières minutes et des 3 dernières minutes de traites ont été gardées alors que les données des minutes intermédiaires ont été moyennées, permettant d'obtenir une évolution en 7 temps. L'analyse des données a été réalisée avec la procédure ProcMixed pour mesures répétées du logiciel SAS®.

### 2. RESULTATS

La quantité de lait produit par minute a augmenté jusqu'à la 3ème minute de traite, puis a diminué jusqu'à la fin de la traite ( $P < 0,001$ , Tableau 1). À la fin de la traite, le CCS a augmenté ( $P < 0,01$ ), tandis que le pourcentage de CEM parmi les cellules somatiques a diminué ( $P < 0,05$ ). Le nombre de CEM exfoliées dans le lait n'a pas varié significativement jusqu'au milieu de la traite et a diminué à la fin de la traite ( $P < 0,01$ , Tableau 1).

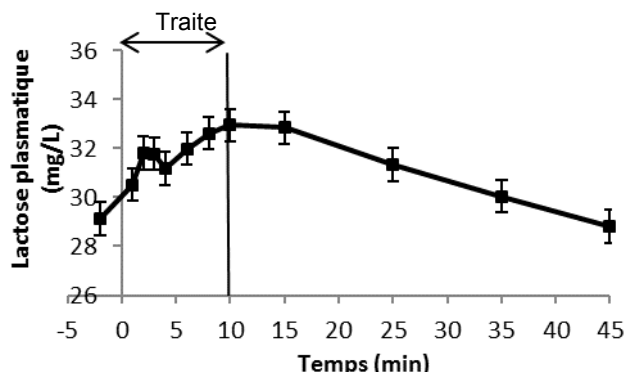


Figure 1 : Evolution de la concentration en lactose plasmatique avant, pendant et après la traite.

La concentration en lactose plasmatique a augmenté tout au long de la traite et a progressivement diminué après la fin de la traite ( $P < 0,001$ , Figure 1).

### 3. DISCUSSION

L'augmentation du CCS et la diminution du pourcentage de CEM parmi les cellules somatiques totales en fin de traite suggèrent un afflux de cellules immunitaires, déjà observé chez la vache laitière (Paape et al., 2002). La présence de CEM dans le lait dès la première minute de traite indique que des CEM ont été exfoliées avant que la traite ne commence. L'augmentation de la concentration plasmatique de lactose pendant la traite reflète une perte de l'intégrité de l'épithélium mammaire.

### CONCLUSION

Des CEM sont exfoliées pendant mais aussi avant la traite. Le processus d'exfoliation pendant la traite est associé à une perte de l'intégrité de l'épithélium mammaire. Ce processus pourrait être régulé par les hormones libérées au cours de la traite (ocytocine et prolactine), également connues pour réguler la persistance de lactation. Des études en cours nous permettront de mieux comprendre le lien entre exfoliation des CEM et persistance de la lactation.

Les auteurs remercient l'équipe « Physio » de la ferme expérimentale de Méjusseaume (IEPL, Le Rheu). Cette expérimentation a été cofinancée par l'association GALA.

Boutinaud M., Ben Chedly M.H., Delamaire E. Guinard-Flament J., 2008. J. Dairy Sci., 91, 988-998

Herve L., Quesnel H., Lollivier V., Boutinaud M., 2016. J. Dairy Sci., 99, 854-863

Paape M., Mehrzad J., Zhao X., Detilleux J, Burvenich C., 2003. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 7, 109-121

Tableau 1 : Evolution de la production laitière et de la composition en cellules somatiques et en CEM du lait au cours de la traite.

	Temps de traite							SEM	P	
	1	2	3	4	5	6	7		Temps	Co temps
Production laitière (kg/min)	2,9 <sup>a</sup>	3,6 <sup>ac</sup>	3,9 <sup>bc</sup>	3,3 <sup>ac</sup>	1,2 <sup>d</sup>	0,5 <sup>de</sup>	0,3 <sup>e</sup>	0,28	<0,001	<0,01
CCS (10 <sup>3</sup> CEM/mL)	138 <sup>ac</sup>	32 <sup>b</sup>	43 <sup>ab</sup>	131 <sup>abc</sup>	135 <sup>abc</sup>	181 <sup>cd</sup>	254 <sup>d</sup>	59,4	<0,01	0,95
Nombre CEM (log <sub>10</sub> )	7,1 <sup>a</sup>	6,9 <sup>a</sup>			7,0 <sup>a</sup>		6,7 <sup>b</sup>	0,15	<0,01	0,14
% CEM	26,3 <sup>ab</sup>	32,4 <sup>a</sup>			21,1 <sup>bc</sup>		14,1 <sup>cd</sup>	4,86	<0,05	0,43

Lettres a, b, c, d, e et f pour des moyennes significativement différentes ( $P < 0,05$ ).



## Introduction

Les cellules épithéliales mammaires (CEM) sont les unités de production de lait dans la glande mammaire. Une partie des CEM est éliminée de l'épithélium par exfoliation mais, les mécanismes régulant ce processus d'exfoliation ne sont pas connus.

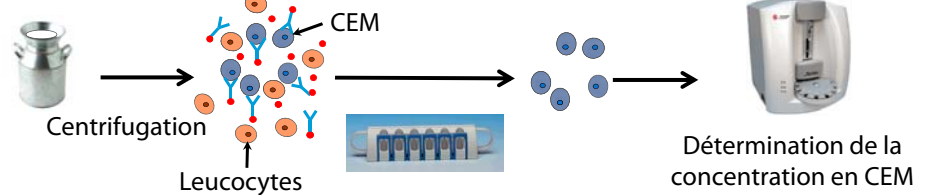


**Hypothèse :** La pression mécanique exercée par la contraction des cellules myoépithéliales au moment de la traite favoriserait l'exfoliation des CEM dans le lait.

## Animaux, matériels et méthodes



- ✓ 9 vaches laitières Prim'Holstein multipares.
- ✓ Prélèvements de lait toutes les minutes au cours de la traite pour mesurer la production laitière et compter les cellules somatiques.
- Évolution en 7 points : 3 premières minutes, moyenne des minutes intermédiaires, 3 dernières minutes.
- ✓ Échantillons de lait prélevés au début (après 1 et 2 min), au milieu et à la fin de la traite pour purifier les CEM par une méthode d'immunoséparation magnétique.



- ✓ Évaluation de l'intégrité de l'épithélium mammaire par mesure de la concentration plasmatique de lactose avant, pendant et après la traite.

## Résultats

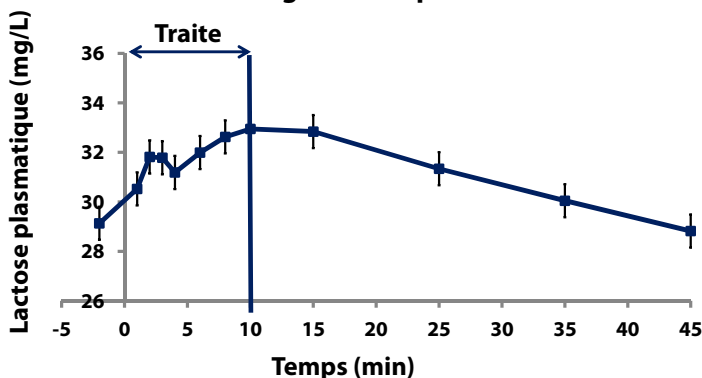
### Production laitière

	Temps de traite							sem	p
	1	2	3	4	5	6	7		
Production laitière (kg/min)	2,9 <sup>a</sup>	3,6 <sup>ac</sup>	3,9 <sup>bc</sup>	3,3 <sup>ac</sup>	1,2 <sup>d</sup>	0,5 <sup>de</sup>	0,3 <sup>e</sup>	0,28	<0,001

Lettres a, b, c, d et e pour des moyennes significativement différentes ( $P < 0,05$ )

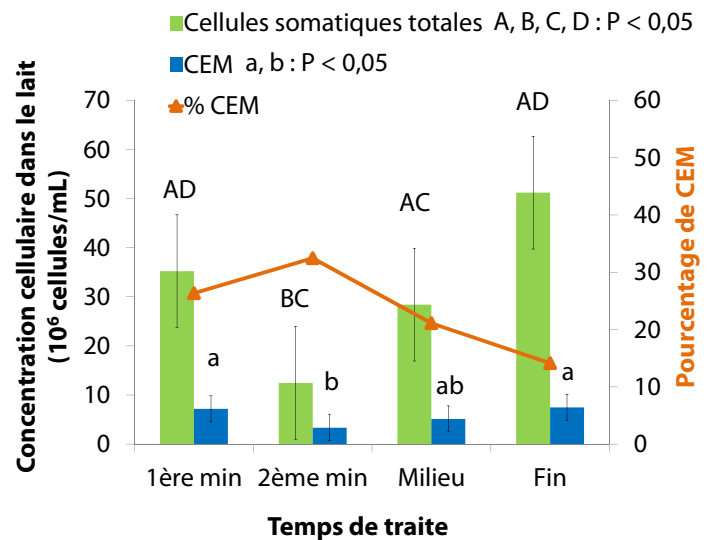
- ✓ Augmentation de la production laitière jusqu'à la 3ème minute de traite puis diminution progressive jusqu'à la fin de la traite.

### Évaluation de l'intégrité de l'épithélium mammaire



- ✓ Augmentation de la concentration en lactose plasmatique au cours de la traite ( $P < 0,01$ ) suggérant une perte de l'intégrité de l'épithélium mammaire.

### Concentration cellulaire dans le lait



- ✓ Présence de CEM dans le lait dès la 1ère min de traite suggérant que des CEM sont exfoliées avant le début de la traite.
- ✓ Augmentation du nombre de cellules somatiques ( $P < 0,01$ ) et diminution du pourcentage de CEM parmi les cellules somatiques ( $P < 0,05$ ) en fin de traite suggérant un afflux de cellules immunitaires dans le lait.

## Conclusions

Des CEM sont exfoliées pendant mais aussi avant la traite. Le processus d'exfoliation observé au cours de la traite est associé à une perte de l'intégrité de l'épithélium mammaire.

Ce processus pourrait être régulé par des hormones libérées à la traite (ocytocine et prolactine), également connues pour réguler la persistance de la lactation. Des études en cours permettront de mieux comprendre le lien entre exfoliation et persistance de la lactation.

Les auteurs remercient l'équipe "Physio" de la ferme expérimentale de Mejusseume (IEPL, Le Rheu, UMR PEGASE). Cette expérimentation a reçu un soutien financier de l'association GALA et du méta-programme GISA.

Lucile.herve@inra.fr





## Annexe 8

**L. Herve**, V. Lollivier, P. Lamberton, S. Wiart, S. Philau, H. Quesnel, M. Boutinaud (2016). Characterizing the mammary epithelial cell exfoliation process during milking in dairy cows. 67th Annual Meeting of the European Federation of Animal Science, 29 Aug-2 Sept 2016, Belfast, United Kingdom.

### **Characterizing the mammary epithelial cell exfoliation process during milking in dairy cows**

L. Herve<sup>1,2</sup>, V. Lollivier<sup>1,2</sup>, P. Lamberton<sup>1,2</sup>, S. Wiart<sup>1,2</sup>, S. Philau<sup>1,2</sup>, H. Quesnel<sup>1,2</sup>, M. Boutinaud<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>INRA, UMR1348 PEGASE, F 35590 Saint-Gilles, France

<sup>2</sup>Agrocampus Ouest, UMR1348 PEGASE, F 35000 Rennes, France

The presence of mammary epithelial cells (MEC) in milk indicates that some MEC are shed from the mammary epithelium. The MEC exfoliation process in dairy cows likely participates in the regulation of MEC number in the udder and thus in milk yield variations. The mechanisms that regulate the exfoliation process are not known. However, we can hypothesize that milking, through its mechanical pressure on the mammary epithelium, is a special time for exfoliation of the MEC. In order to characterize MEC exfoliation during milking, 9 multiparous cows were milked and milk samples were collected each minute for composition analysis. The samples collected at the beginning (after 1 and 2 min), in the middle and at the end of milking were used for MEC purification using an immune-magnetic method. Tight junction opening was assessed by plasma lactose concentration and Na:K ratio in milk. Data were analyzed using the mixed procedure of SAS. Milk flow increased until the 3<sup>rd</sup> minute and then decreased as the milking progressed ( $P < 0.001$ ). Milk composition changed during the course of milking: the milk fat content increased ( $P < 0.001$ ) while the milk protein content decreased ( $P < 0.001$ ). At the end of milking, the somatic cell count increased ( $P < 0.001$ ) whereas the percentage of MEC in total somatic cells decreased ( $P < 0.05$ ), suggesting an influx of immune cells. The concentration of MEC in milk decreased between the 1<sup>st</sup> and the 2<sup>nd</sup> minute of milking suggesting that the milk of the 1<sup>st</sup> minute of milking contained MEC which were exfoliated before milking started. The milk MEC concentration then increased from the 2<sup>nd</sup> minute to the end of milking. A decrease in the Na:K ratio in milk ( $P < 0.01$ ) and an increase in plasma lactose concentration ( $P < 0.01$ ) during milking indicated a disruption of mammary epithelium integrity. The results of this study show that MEC are exfoliated before milking but also during milking. The exfoliation process during milking is concomitant with the disruption of mammary epithelium integrity.



## Introduction

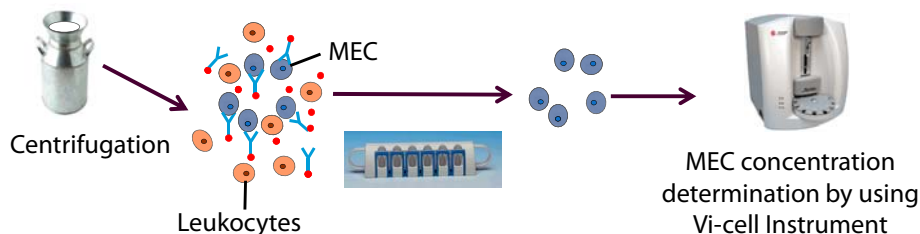
Some mammary epithelial cells (MEC) are shed from the mammary epithelium into milk. The MEC exfoliation process participates in the regulation of MEC number in the udder and thus in milk yield variations. We hypothesized that milking, through its mechanical pressure on the mammary epithelium, could be a special time for MEC exfoliation into milk.

The aim of this study was to determine the rate of MEC exfoliation during milking in dairy cows.

## Animals, Materials and Methods

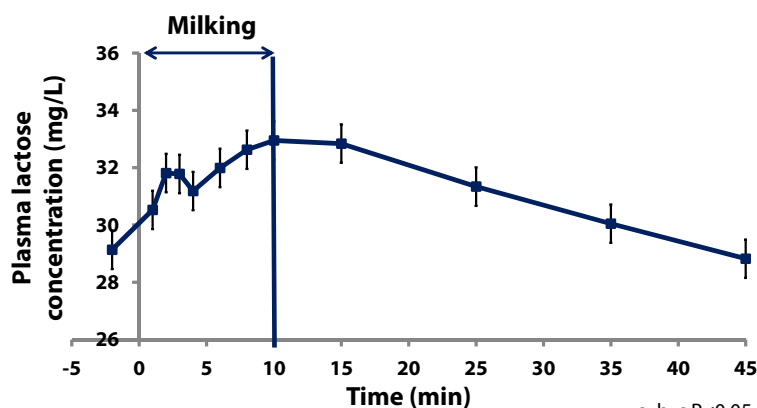
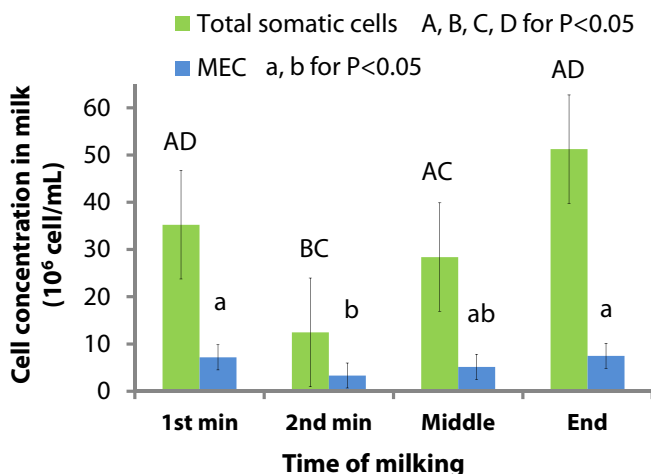
✓ Nine multiparous Holstein dairy cows.

✓ Samples collected at the beginning (after 1 and 2 min), in the middle and at the end of milking used for MEC purification using an immunomagnetic method.



✓ Tight junction opening monitored by assessing Na<sup>+</sup>:K<sup>+</sup> ratio in milk and plasma lactose concentration before, during and after milking.

## Results



	Time of milking							sem	p-value
	1	2	3	4	5	6	7		
Na:K ratio	0.21 <sup>abc</sup>	0.19 <sup>a</sup>	0.18 <sup>a</sup>	0.21 <sup>ab</sup>	0.23 <sup>bc</sup>	0.25 <sup>c</sup>	0.24 <sup>bc</sup>	0.02	<0.01

	Time of milking				sem	p-value
	1 <sup>st</sup> min	2 <sup>nd</sup> min	Middle	End		
Milk yield (kg)	2.9 <sup>a</sup>	3.6 <sup>a</sup>	1.2 <sup>b</sup>	0.3 <sup>c</sup>	0.28	<0.001
% of MEC in total milk somatic cells	26.3 <sup>ab</sup>	32.4 <sup>a</sup>	21.1 <sup>bc</sup>	14.1 <sup>cd</sup>	4.9	<0.05

Na<sup>+</sup>:K<sup>+</sup> ratio in milk (P<0.01) and plasma lactose concentration increased during milking (P<0.01) suggesting a disruption of mammary epithelium integrity.

## Conclusions

- ✓ Decrease in milk yield at the end of milking.
- ✓ Presence of MEC in the milk from the 1st milking minute indicating MEC exfoliation before the beginning of milking.
- ✓ Increase in total milk somatic cells concentration (P<0.01) and decrease in the percentage of MEC in total somatic cells (P<0.05) suggesting an influx of immune cells at the end of milking.

MEC are exfoliated before milking and also during milking. The exfoliation process during milking is concomitant with the disruption of mammary epithelium integrity.

This process could be regulated by hormones released at milking (oxytocin and prolactin). The role of oxytocin and prolactin in regulating MEC exfoliation will be investigated further.

The authors thank the team of the INRA experimental farm of Mejeusseume for taking care of the cows and assisting with the animal experimentation.



## Annexe 9

**L. Herve**, H. Quesnel, S. Wiart, P. Lamberton, C. Mustière, V. Lollivier, M. Boutinaud (2016). Myoepithelial cell contraction participates in mammary epithelial cell exfoliation in cow milk. 67th Annual Meeting of the European Federation of Animal Science, 29 Aug-2 Sept 2016, Belfast, United Kingdom.

### **Myoepithelial cell contraction participates in mammary epithelial cell exfoliation in cow milk**

L. Herve<sup>12</sup>, H. Quesnel<sup>12</sup>, S. Wiart<sup>12</sup>, P. Lamberton<sup>12</sup>, C. Mustière<sup>12</sup>, V. Lollivier<sup>12</sup>, M. Boutinaud<sup>12</sup>

<sup>1</sup>INRA, UMR1348 PEGASE, F 35590 Saint Gilles, France

<sup>2</sup>Agrocampus Ouest, UMR1348 PEGASE, F 35000 Rennes, France

A varying proportion of mammary epithelial cells (MEC) is exfoliated through shedding from the mammary epithelium into milk, which might influence MEC number in the udder and thus milk yield. We hypothesized that myoepithelial cell contraction induced by oxytocin (OT) release at milking might stimulate MEC exfoliation through mechanical forces. Therefore, to investigate the role of myoepithelial cell contraction in MEC exfoliation, we inhibited or induced myoepithelial cell contraction by injecting the OT receptor antagonist Atosiban (Ato) or exogenous OT, respectively. Eight multiparous cows were assigned to 2 treatments during 2 milkings according to a crossover experimental design of 2 periods: 1) Control + OT and 2) Ato + OT. For the Control + OT treatment, cows were first milked to recover standard milk and then received an i.v. injection of OT (5 IU) to collect residual milk through a second milking. For the Ato + OT treatment, cows were injected with Ato (50 µg/kg of BW), milked to recover the cisternal milk, and then received 5 IU of OT before a milking to collect the alveolar milk. For each type of collected milk, MEC were purified using an immuno-magnetic method and the percentage of apoptotic MEC was assessed by flow cytometry. Tight junction opening was assessed by plasma lactose concentration determination. Data were analyzed using an ANOVA procedure. Inhibiting myoepithelial cell contraction by Ato injection induced a decrease in MEC number in milk ( $P < 0.01$ ). In contrast, OT injection after standard milking increased the concentration of MEC in milk ( $P < 0.05$ ) and decreased the percentage of apoptotic MEC in milk ( $P < 0.01$ ) while OT injection during Ato + OT treatment increased the number of MEC in milk ( $P < 0.01$ ). During the milking after the Ato injection, plasma lactose concentration was on average lower than during standard milking whereas in both treatments, OT injections increased the lactose concentration in plasma ( $P < 0.001$ ). These results together showed that myoepithelial cell contraction associated with a loss of mammary epithelium integrity stimulates MEC exfoliation into milk.



## Annexe 10

**L. Herve**, M. Veron, E. Vanbergue, H. Quesnel, C. Hurtaud, M. Boutinaud (2017). Effect of feed restriction and nature of forage on the mammary exfoliation rate in dairy cows. ASAS-CSAS Annual Meeting, BOLFA symposium: The Biology of Lactation - From Genes to Cells to Milk, 8 July 2017, Baltimore, USA.

### **Effect of feed restriction and nature of forage on the mammary exfoliation rate in dairy cows**

L. Herve, M. Veron, E. Vanbergue, H. Quesnel, C. Hurtaud, M. Boutinaud  
*UMR 1348 PEGASE, Agrocampus Ouest, INRA, 35590 Saint-Gilles, France*

Diet, in term of quantity and quality, is one of the main factors that affect milk yield and composition in dairy cows. The mammary epithelial cell (MEC) exfoliation process, together with the cell proliferation/apoptosis balance, participates in regulating the MEC number in the mammary gland and thus milk yield. Few is known about the effect of diet in the regulation of MEC number in the mammary tissue. This trial was aimed to investigate the effect of feeding level and nature of forage on the MEC exfoliation rate. Sixteen multiparous dairy cows producing  $37.0 \pm 0.68$  kg at  $99 \pm 4.6$  DIM were divided into 4 groups of 4 cows each according to their diet. After a pre-experimental period of 3 weeks, cows were fed either 100% or 75% of their ad libitum dry matter intake with diets based on corn silage or conserved grass for 3 weeks (Period 1). The feeding level was then reversed for the 3 following weeks (Period 2). Milk samples were collected at the end of the pre-experimental period and 15 days after the beginning of each period for milk MEC purification using an immuno-magnetic method to assess the daily MEC exfoliation rate. The percentage of apoptotic MEC in milk was determined by flow cytometry after Annexin V/Propidium iodide labelling. Mammary epithelium integrity was assessed by milk Na:K ratio determination. Data were analyzed using the mixed procedure of SAS. After 15 days of treatment, feed-restriction decreased milk yield by 10% ( $P < 0.05$ ) without affecting the MEC exfoliation rate. The Na:K ratio was greater with feed-restriction suggesting a loss of mammary epithelium integrity ( $P < 0.05$ ). The nature of forage affected neither milk yield nor mammary epithelium integrity but the daily MEC exfoliation rate was greater in cows fed with corn silage based diet ( $P < 0.01$ ). When cows were fed 100%, the percentage of apoptotic cells among exfoliated MEC was lower with corn silage based diet than with conserved grass based diet ( $P < 0.05$ ). These results show that the MEC exfoliation rate was not affected by a 15-d feed restriction whereas it was affected by the nature of forage. MEC exfoliation rates did not vary along with variations of milk yield. The effect of the duration of feed restriction on the MEC exfoliation rate and the effect of the nature of forage on the cell proliferation/apoptosis balance need to be investigated further.

**Key words:** Dairy cow, Diet, Mammary epithelial cell exfoliation



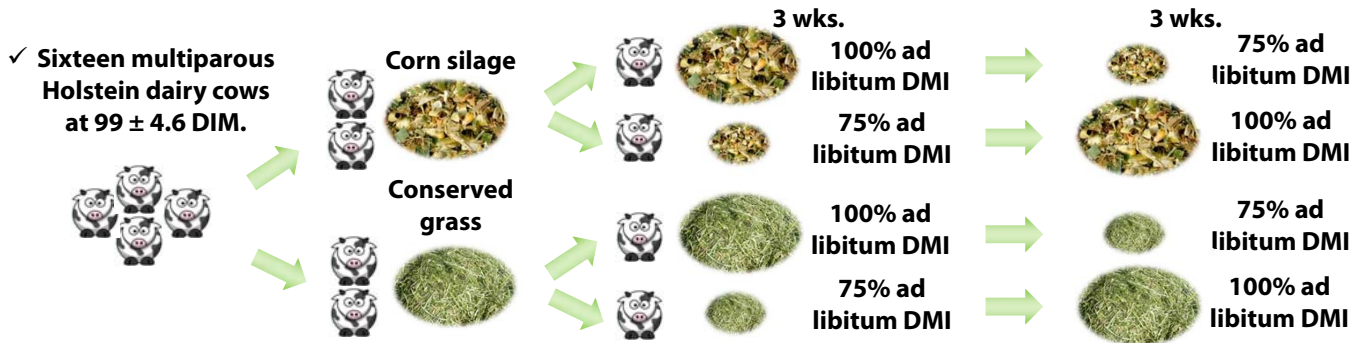


## Introduction

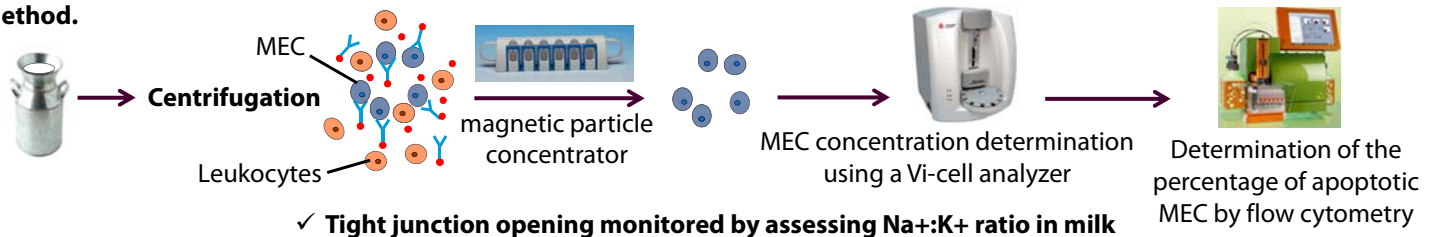
Diet, in term of quantity and quality, is one of the main factors that affect milk yield and composition in dairy cows. The mammary epithelial cells (MEC) exfoliation process participates in regulating the MEC number in the mammary gland and thus milk yield.

The aim of this study was to investigate the effect of feeding level and nature of forage on the MEC exfoliation rate.

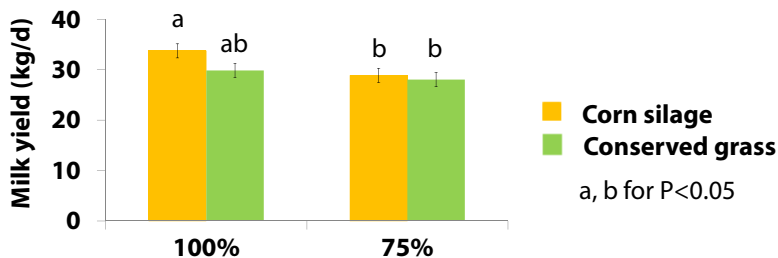
## Animals, Materials and Methods



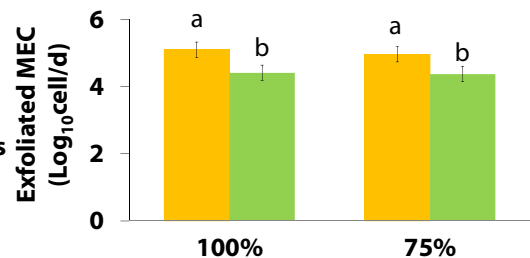
✓ Milk samples collected 15 d after the beginning of each period used for MEC purification using an immunomagnetic method.



## Results



Feed restriction decreased milk yield by 10% ( $P < 0.05$ ).  
The nature of forage did not affect milk yield.



Feed restriction did not affect the MEC exfoliation rate  
Exfoliation rate was greater in cows fed with corn silage based diet ( $P < 0.01$ ).

	Corn silage		Conserved grass		SEM	Feed-restriction (FR)	Nature of forage (NF)	FR x NF
	100%	75%	100%	75%				
Apoptotic MEC (%)	22.0	24.9	37.1	28.9	3.07	0.02	0.28	0.03
$\text{Na}^+:\text{K}^+$ ratio	0.21	0.22	0.21	0.22	0.01	0.02	0.97	0.75

The percentage of apoptotic cells among exfoliated MEC was lower with corn silage based diet in cows fed 100% ( $P = 0.03$ ).  
The  $\text{Na}:\text{K}$  ratio was greater with feed-restriction suggesting a loss of mammary epithelium integrity ( $P < 0.05$ ).

## Conclusions

The MEC exfoliation rate was not affected by a 15-d feed restriction whereas it was affected by the nature of forage. MEC exfoliation rates did not vary along with variations of milk yield. The effect of the duration of feed restriction on the MEC exfoliation rate and the effect of the nature of forage on the cell proliferation/apoptosis balance need to be investigated further.

The authors thank the team of the INRA experimental farm of Mejuste for taking care of the cows and assisting with the animal experimentation. Lucile Herve was supported by a PhD studentship funded by Région Bretagne and Agrocampus-Ouest (Rennes, FRANCE).



## Annexe 11

**L. Herve**, M. Veron, P. Lamberton, S. Wiart, P. Debournoux, S. Philau, C. Mustière, H. Quesnel, M. Boutinaud (2017). Feed restriction increases mammary epithelial cell exfoliation rate in dairy cows. ASAS-CSAS Annual Meeting & Trade Show, 8-12 July 2017, Baltimore, USA.

### **Feed restriction increases mammary epithelial cell exfoliation rate in dairy cows**

L. Herve, M. Veron, P. Lamberton, S. Wiart, P. Debournoux, S. Philau, C. Mustière, H. Quesnel, M. Boutinaud  
*UMR 1348 PEGASE, Agrocampus Ouest, INRA, 35590 Saint-Gilles, France*

In dairy cows, feed restriction is known to decrease milk yield by reducing the number of mammary epithelial cells (MEC) in the udder, due to an increased rate of MEC apoptosis. The exfoliation of MEC from the mammary epithelium into milk is another process that could participate in regulating MEC number. We hypothesized that the decreased number of MEC in the udder of feed-restricted cows might also result from an increase in MEC exfoliation rate. Nineteen Holstein dairy cows producing  $40 \pm 0.7$  kg at  $80 \pm 4$  DIM were divided into two groups, control (n=9) and feed-restricted (n=10). Ad libitum dry-matter intake was recorded during a pre-experimental period of 2 weeks. For 29 days (Period 1), cows were fed either 100% or 80% of their dry-matter intake measured during the pre-experimental period. Then, all cows were fed ad libitum for 35 days (Period 2). Feed intake and milk production were recorded daily. Blood and milk samples were collected once during the pre-experimental period and 5, 9 and 27 days after the beginning of periods 1 and 2. MEC were purified from milk samples using an immuno-magnetic method. Lipid mobilization was assessed by plasma NEFA concentration. Mammary epithelium integrity was assessed by plasma lactose concentration, milk Na and Na:K ratio. Mammary tissue samples were collected by biopsy at the end of each period in order to analyze the rate of cell proliferation and apoptosis. Data were analyzed using the mixed procedure of SAS. Compared with control feeding, feed restriction induced a decrease in dry-matter intake by 20% ( $P < 0.001$ ), an increase in plasma concentration of NEFA ( $P < 0.001$ ) and a 3 kg/d milk yield loss ( $P < 0.001$ ) but had no effect on the rate of proliferation and apoptosis in the mammary tissue. Daily MEC exfoliation rate was 65% greater in feed-restricted cows compared with control cows ( $P < 0.05$ ). Feed restriction had no effect on plasma lactose concentration and milk Na:K ratio but increased milk Na concentration, not allowing concluding about the integrity of the mammary epithelium. In period 2, when all cows returned to ad libitum feeding, no significant difference was observed on dry-matter intake, milk yield, MEC exfoliation rate and mammary epithelium integrity between feed-restricted and control cows. These results show that the exfoliation process could play a role in regulating the number of MEC in the udder of dairy cows during a feed restriction without carryover effect on their milk production.

**Key words:** Dairy cow, Feed-restriction, Mammary epithelial cell exfoliation



## **ABSTRACT**

**The exfoliation process: regulatory mechanisms, role in regulating the number of cells in the mammary gland and in milk yield variations.**

Milk is synthesized by mammary epithelial cells (MEC). Milk yield is determined by the number of MEC in the mammary gland and the metabolic activity of these cells. It is well known that MEC number depends on the balance between cell proliferation and apoptosis. The MEC exfoliation process, defined as the shedding of MEC from the mammary epithelium into milk, is another process that might participate in the regulation of MEC number in the udder and thus in milk yield variations. The aims of this thesis were to identify the mechanisms that regulate the exfoliation process and to study the potential role of this process in regulating the number of MEC and milk yield. Our results showed that some MEC are exfoliated between milkings. Most of the MEC are, however, exfoliated during milking as a consequence of the myoepithelial cell contraction and the disruption of mammary epithelium integrity, both of which are caused by milking-induced oxytocin release. Cortisol may play a role in limiting MEC exfoliation by restoring mammary epithelium integrity after milking. We showed that the exfoliation process participates in regulating milk yield during feed restriction and after a treatment with bovine growth hormone but did not participate in regulating milk yield when forage in the ration was changed, when prolactin secretion was inhibited, or during a treatment with bovine growth hormone. These results suggest that the MEC exfoliation process likely participates in regulating milk yield but not systematically.

**Key words:** dairy cow, mammary epithelial cell, exfoliation, oxytocin, prolactin, cortisol.



## RÉSUMÉ

### **L'exfoliation des cellules épithéliales mammaires : mécanismes de régulation, rôle dans la détermination du nombre de cellules dans la glande mammaire et influence sur la production laitière**

Le lait est produit par les cellules épithéliales mammaires (CEM). La quantité de lait produit est déterminée par le nombre de CEM et leur activité métabolique. Le nombre de CEM dépend de l'équilibre entre la prolifération cellulaire et l'apoptose. Le processus d'exfoliation, défini comme le décrochage des CEM de l'épithélium mammaire et leur évacuation dans le lait, a été proposé comme participant aussi à la régulation du nombre de CEM. Les objectifs de cette thèse étaient d'identifier les mécanismes biologiques impliqués dans la régulation de ce processus et d'étudier son rôle dans la régulation du nombre de CEM et son influence sur la production laitière. Nos résultats montrent qu'une partie des CEM est exfoliée entre deux traite consécutives. Cependant, la majorité des CEM sont exfoliées au moment de la traite suite à la contraction des cellules myoépithéliales et à la perte d'intégrité de l'épithélium induites par la décharge d'ocytocine. Le cortisol, au contraire, participerait à la restauration de l'intégrité de l'épithélium mammaire après la fin de la traite et limiterait l'exfoliation. Nous avons montré que les variations du taux d'exfoliation étaient opposées aux variations de production laitière dans le cas d'une restriction alimentaire et après la fin d'un traitement à l'hormone de croissance mais pas dans le cas d'un changement de fourrage, de l'inhibition de la prolactine et pendant un traitement à l'hormone de croissance. Le processus d'exfoliation des CEM participe donc à la régulation de la production laitière mais pas de façon systématique.

**Mots-clés :** vache laitière, cellule épithéliale mammaire, exfoliation, ocytocine, prolactine, cortisol.







# RÉSUMÉ ABSTRACT

**L'exfoliation des cellules épithéliales mammaires : mécanismes de régulation, rôle dans la détermination du nombre de cellules dans la glande mammaire et influence sur la production laitière.**

Le lait est produit par les cellules épithéliales mammaires (CEM). La quantité de lait produit est déterminée par le nombre de CEM et leur activité métabolique. Le nombre de CEM dépend de l'équilibre entre la prolifération cellulaire et l'apoptose. Le processus d'exfoliation, défini comme le décrochage des CEM de l'épithélium mammaire et leur évacuation dans le lait, a été proposé comme participant aussi à la régulation du nombre de CEM. Les objectifs de cette thèse étaient d'identifier les mécanismes biologiques impliqués dans la régulation de ce processus et d'étudier son rôle dans la régulation du nombre de CEM et son influence sur la production laitière. Nos résultats montrent qu'une partie des CEM est exfoliée entre deux traites consécutives. Cependant, la majorité des CEM sont exfoliées au moment de la traite suite à la contraction des cellules myoépithéliales et à la perte d'intégrité de l'épithélium induites par la décharge d'ocytocine. Le cortisol, au contraire, participerait à la restauration de l'intégrité de l'épithélium mammaire après la fin de la traite et limiterait l'exfoliation. Nous avons montré que les variations du taux d'exfoliation étaient opposées aux variations de production laitière dans le cas d'une restriction alimentaire et après la fin d'un traitement à l'hormone de croissance mais pas dans le cas d'un changement de fourrage, de l'inhibition de la prolactine et pendant un traitement à l'hormone de croissance. Le processus d'exfoliation des CEM participe donc à la régulation de la production laitière mais pas de façon systématique.

**Mots-clés :** vache laitière, cellule épithéliale mammaire, exfoliation, ocytocine, prolactine, cortisol

**The exfoliation process: regulatory mechanisms, role in regulating the number of cells in the mammary gland and in milk yield variations.**

Milk is synthesized by mammary epithelial cells (MEC). Milk yield is determined by the number of MEC in the mammary gland and the metabolic activity of these cells. It is well known that MEC number depends on the balance between cell proliferation and apoptosis. The MEC exfoliation process, defined as the shedding of MEC from the mammary epithelium into milk, is another process that might participate in the regulation of MEC number in the udder and thus in milk yield variations. The aims of this thesis were to identify the mechanisms that regulate the exfoliation process and to study the potential role of this process in regulating the number of MEC and milk yield. Our results showed that some MEC are exfoliated between milkings. Most of the MEC are, however, exfoliated during milking as a consequence of the myoepithelial cell contraction and the disruption of mammary epithelium integrity, both of which are caused by milking-induced oxytocin release. Cortisol may play a role in limiting MEC exfoliation by restoring mammary epithelium integrity after milking. We showed that the exfoliation process participates in regulating milk yield during feed restriction and after a treatment with bovine growth hormone but did not participate in regulating milk yield when forage in the ration was changed, when prolactin secretion was inhibited, or during a treatment with bovine growth hormone. These results suggest that the MEC exfoliation process likely participates in regulating milk yield but not systematically.

**Keywords:** dairy cow, mammary epithelial cell, exfoliation, oxytocin, prolactin, cortisol



AGROCAMPUS OUEST • Institut supérieur des sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage  
65 rue de Saint-Brieuc – CS84215 – F-35042 Rennes Cedex  
Tél. : 02 23 48 50 00  
[www.agrocampus-ouest.fr](http://www.agrocampus-ouest.fr)

