



HAL
open science

Rôle des sécrétions ovariennes sur la fonction mammaire chez les ruminants

Frederic Dessauge

► **To cite this version:**

Frederic Dessauge. Rôle des sécrétions ovariennes sur la fonction mammaire chez les ruminants. Sciences du Vivant [q-bio]. Université de Rennes 1, 2013. tel-02807245

HAL Id: tel-02807245

<https://hal.inrae.fr/tel-02807245>

Submitted on 6 Jun 2020

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

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

HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES

Discipline : **Sciences de la Vie**

Présentée et soutenue publiquement par :

Frédéric DESSAUGE

Le 18 avril 2013

JURY

Joëlle	DUPONT	Directeur de Recherche	INRA Nouzilly
Christine	DUVAUX-PONTER	Professeur AgroParisTech	INRA Grignon
Patrice	HUMBLOT	Directeur de Recherche	Uppsala
Eve	DEVINOY	Directeur de Recherche	INRA Jouy-en-Josas
Franck	CHESNEL	Chargé de Recherche	CNRS Rennes
Philippe	CHEMINEAU	Directeur de Recherche	INRA Nouzilly

Sommaire

1. **Dossier scientifique** : page 7
 - 1.1. **Curriculum Vitae** : page 7
 - 1.1.1. Etat civil
 - 1.1.2. Situation Professionnelle et Activités de recherche
 - 1.1.3. Enseignements suivis et Diplômes
 - 1.1.4. Formations
 - 1.1.5. Approches expérimentales
 - 1.1.6. Séjours à l'étranger et Activités pédagogiques :
 - 1.2. **Activités d'enseignement** : page 11
 - 1.2.1. Activités d'encadrement (> 6 mois)
 - 1.2.2. Autres activités d'encadrement (< 6 mois)
 - 1.2.3. Contribution à l'évaluation de personnes
 - 1.3. **Liste des publications** : page 13
 - 1.3.1. Articles dans des revues à comité de lecture
 - 1.3.2. Publications dans des revues professionnelles
 - 1.3.3. Liste des communications à des colloques ou conférences
 - 1.3.4. Liste des ouvrages
 - 1.3.5. Liste des brevets/inventions
2. **Etat de l'art** : page 20
 - 2.1. **La glande mammaire** : page 20
 - 2.1.1. Anatomie et développement
 - 2.1.2. De l'embryogenèse à la puberté
 - 2.1.3. La glande mammaire adulte : un organe cyclique
 - 2.2. **Synthèse du lait** : page 27
 - 2.2.1. La cellule épithéliale mammaire
 - 2.2.2. Activités de synthèse et de sécrétion
 - 2.3. **Facteurs déterminant la quantité de lait produite** : page 28
 - 2.3.1. Balance prolifération/apoptose
 - 2.3.2. Remodelage tissulaire
 - 2.4. **Régulation hormonale de la lactation** : page 34
 - 2.4.1. Initiation de la lactation ou lactogénèse
 - 2.4.2. Maintien de la lactation ou galactopoïèse
 - 2.4.3. Arrêt de la lactation ou tarissement
 - 2.5. **Approches expérimentales pour l'étude anatomo-physiologique de la glande mammaire** : page 41
 - 2.5.1. Approche *in vivo*
 - 2.5.2. Approches *in vitro/ex vivo*

3. Contexte : page 45

- 3.1. Description du positionnement et chronologie
- 3.2. Contexte socio-économique
- 3.3. Contexte scientifique

4. Activités scientifiques : page 51

4.1. Etude du développement mammaire chez le jeune : page 51

- 4.1.1. L'ovariectomie comme modèle d'étude des déterminants du développement mammaire (2006-2011)
- 4.1.2. Effets de différents niveaux d'alimentation sur le développement de la glande mammaire et sur les performances laitières chez la chèvre (2010-2013)
- 4.1.3. Effets de différentes stratégies d'élevage de la génisse sur les performances de croissance et sur la glande mammaire (2010-2014)

4.2. Rôle des stéroïdes ovariens sur le développement de la mammaire au cours de la lactation et sur la persistance de la lactation (2009-2012): page 60

4.2.1. Principaux résultats la deuxième étude « *in vivo* » : page 65

- 4.2.1.1. L'ovariectomie limite le déclin de la production laitière après le pic de lactation
- 4.2.1.2. L'ovariectomie réduit les taux de stéroïdes ovariens circulants
- 4.2.1.3. L'ovariectomie limite la régression du parenchyme mammaire
- 4.2.1.4. L'ovariectomie modifie l'équilibre de la balance prolifération/apoptose
- 4.2.1.5. L'ovariectomie limite le remodelage tissulaire mais n'influence pas les marqueurs d'involution
- 4.2.1.6. L'ovariectomie diminue la réceptivité aux stéroïdes ovariens dans le parenchyme et le tissu adipeux mammaire

4.2.2. Principaux résultats de l'étude « *in vitro* » : page 71

- 4.2.2.1. L'œstradiol diminue la prolifération et augmente l'apoptose des cellules épithéliales mammaires bovines MAC-T
- 4.2.2.2. L'œstradiol stimule l'expression de protéines cibles
- 4.2.2.3. Effet de l'œstradiol sur l'induction de l'apoptose des cellules MAC-T
- 4.2.2.4. Le traitement par l'œstradiol a induit une activation des voies de signalisation impliquées par les caspases

4.2.3. Discussion générale : page 75

- 4.2.3.1. Les stéroïdes ovariens influencent la balance prolifération/apoptose des CEM
- 4.2.3.2. L'ovariectomie modifie les interactions des CEM avec les autres cellules et la matrice extracellulaire
- 4.2.3.3. Implication des stéroïdes ovariens dans la modulation de la persistance de la lactation
- 4.2.3.4. Intérêts zootechniques de la modulation des niveaux d'œstradiol et de progestérone

4.3. Collaborations : page 88

- 4.3.1. Etude sur la restriction alimentaire chez la vache laitière
- 4.3.2. Etude confidentielle pour CEVA Santé Animale (2010-2011)

- 4.3.3. Projet européen « Roquefort'in » : 2010-2013
- 4.3.4. Projet ANR « Epigrani » : 2010-2013
- 4.3.5. Collaboration avec la chambre d'agriculture d'Ile et Vilaine et de Saône et Loire

5. Perspectives de recherche: page 92

5.1. Développement mammaire chez la chevrette:

- 5.1.1. Développement mammaire et stéroïdes ovariens
- 5.1.2. Développement mammaire et niveaux alimentaires

5.2. Stéroïdes ovariens et glande mammaire en lactation:

- 5.2.1. Projets « *in vivo* »
- 5.2.2. Projets « *in vitro* » :
 - 5.2.2.1. Phénotypage des cellules mammaires
 - 5.2.2.2. Immortalisation de cellules épithéliales mammaires
 - 5.2.2.3. Effet des stéroïdes ovariens sur la cellule épithéliale +/- différenciée
 - 5.2.2.4. Mise en place d'un modèle de co-culture
 - 5.2.2.5. Effet de l'ovariectomie sur la cellule épithéliale mammaire

6. Références bibliographiques : page 99

Liste des abréviations

3 β -HSD : 3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase
17 β -HSD : 17 β -hydroxystéroïde déshydrogénase
ACTH : hormone adrénocorticotropique
ADN : acide désoxyribonucléique
APAF1 : Apoptotic Peptidase Activating Factor 1
ARN : acide ribonucléique
ARN pol : ARN polymérase
Bcl-2 : B-cell lymphoma 2
BDNI : base de données nationale d'identification
BH-3 : Bcl-2-homology domain-3
BMP : bone morphogenic protein
BrdU : Bromodésoxyuridine
CEM : cellule épithéliale mammaire
CPT : camptothecin
CREEA : comité rennais d'éthique en matière d'expérimentation animale
CytC : cytochrome c
DAPI : 4',6'-diamidino-2-phénylindole
DHEA : déhydroépiandrostérone
E₂ : œstradiol
EGF : epidermal growth factor
ER : récepteur aux œstrogènes
ERH : élément de réponse à l'hormone
FGF : fibroblast growth factor
FSH : folliculo-stimulating hormone
GH : growth hormone (hormone de croissance)
GHIH : growth hormone inhibiting hormone
GHRH : growth hormone releasing hormone
GnRH : gonadotropin releasing hormone
GT : galactosyl transferase
HGF : hepatocyte growth factor
IgA, G, M : immunoglobulines A, G, M
IGF : insulin-like growth factor

IGFBP : insulin-like growth factor binding protein
Int : chevrete intacte
JAM : molécules d'adhésion des jonctions
LH : luteinizing hormone
MEC : mammary epithelial cell
MMP : matrix metalloproteinase
MY : milk yield
OT : ocytocine
Ovx : vache/chevrete ovariectomisée
P₄ : progestérone
P450_{17α} : cytochrome P450_{17α}
P450_{scc} : cytochrome P450_{scc}
PGF2α : prostaglandine-F2α
PARP : poly (ADP-ribose) polymerase
PCNA : proliferating cell nuclear antigen
PL : production laitière
PR : récepteur à la progestérone
PRF : prolactin releasing factor
Prl : prolactine
PTEN : phosphatase and tensin homolog
SCC : somatic cell count
Sham : témoin chirurgical
StAR : Steroidogenic Acute Regulatory
STAT5 : Signal Transducer and Activator of Transcription 5
STC : stannocycline
SVF : serum de veau foetal
TB : taux butyreux
TGF-β : transforming growth factor β
TP : taux protéique
TRH : Thyrotropin Releasing Hormone
TUNEL : terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labelling
WAP : whey acidic protein

1. DOSSIER SCIENTIFIQUE :

1.1. Curriculum Vitae :

1.1.1. Etat civil

Frédéric DESSAUGE

Messagerie : dessauge@rennes.inra.fr

1.1.2. Situation Professionnelle et Activités de recherche

- Octobre 2009-présent : **Chargé de Recherche 1ère classe**. UMR Physiologie, Environnement et Génétique pour l'Animal et les Systèmes d'Elevage INRA - Agrocampus OUEST (Saint Gilles).
- Octobre 2005-Octobre 2009: **Chargé de Recherche 2ème classe**. UMR Production du lait INRA – Agrocampus OUEST (Saint Gilles).
- Juin 2004-Octobre 2005 : **Stage post-doctoral** : Rôle du facteur de transcription AIOLOS dans le contrôle de la lymphoprolifération et de l'apoptose. Dirigé par le Dr. Angelita REBOLLO, INSERM U543 - Laboratoire d'Immunologie Cellulaire (Pr. Debré) - Hôpital de la Pitié Salpêtrière (Paris).
- Sept. 2001-Juin 2004 : **Doctorat** : Etude des mécanismes de mort cellulaire programmée dans les cellules transformées. Dirigé par le Dr. Gordon LANGSLEY, URA CNRS 2581 - Laboratoire de Signalisation Immunoparasitaire - Institut Pasteur (Paris).
- Sept. 2000-Sept. 2001 : **Stage DEA** : Purification, caractérisation et clonage d'une protéine phosphatase 2C de l'Ovocyte de Xénope. Dirigé par le Dr. Xavier CAYLA, UMR INRA CNRS 7622 - Laboratoire de Biologie du Développement (Pr Ozon) - Université Pierre et Marie Curie (Paris).

- Avril 2000-Juillet 2000 : **Stage de Maîtrise** : Purification d'une protéine phosphatase 2C de l'Ovocyte de Xénope. Dirigé par le Dr. Xavier CAYLA, UMR INRA CNRS 7622 - Laboratoire de Biologie du Développement (Pr Ozon) - Université Pierre et Marie Curie (Paris).
- Déc.1999-Mars 2000 : **Stage de Maîtrise** : Etude de l'oestrogéno-dépendance de l'expression des messagers de la vitellogénine chez la truite arc-en-ciel. Dirigé par le Dr. François FERRIERE, UMR CNRS 6026 - Laboratoire d'Endocrinologie Moléculaire de la Reproduction (Pr Kah) - Campus de Beaulieu (Rennes).

1.1.3. Enseignements suivis et Diplômes

- 2001-2004 : Doctorat d'Immunologie à l'Université Paris 7 – Denis Diderot (soutenue le 2 juin 2004, mention très honorable avec félicitations du jury).
- 2000-2001 : DEA de Physiologie de la Reproduction à l'Université Paris 6 – Pierre et Marie Curie.
- 1999-2000 : Maîtrise de Biologie Cellulaire et Physiologie Animale à l'Université de Beaulieu – Rennes I.
- 1998-1999 : Licence de Biologie Cellulaire et Physiologie Animale à l'Université de Beaulieu – Rennes I.
- 1996-1998 : DEUG Sciences de la Vie à l'Université de Beaulieu – Rennes I.
- 1996 : Baccalauréat Scientifique spécialité Physique - Chimie au Lycée Henri Avril (Lamballe).

1.1.4. Formations

- Juin 2011 : Monitoring chirurgical du porc et chirurgie mini-invasive.
- Avril 2009 : Formation qPCR sur appareil STEPTONE Applied Biosystems.
- Avril 2009 : Formation qPCR sur appareil STEPTONE Applied Biosystems.
- Juin 2008 : Utilisation du logiciel IMAGE J
- Juin 2007 : Chirurgie expérimentale – Niveau I

- Janvier 2006 : Expérimentation animale – Niveau I
- Mars 2004 : Propriété industrielle et valorisation (par D. Bernemann).
- Mars 2003 : La cytométrie en flux et ses applications récentes (par le Dr. Kanellopoulos).
- Mars 2002 : Trafic intracellulaire dans la levure *S. cerevisiae* – Nouvelles possibilités ouvertes par la connaissance du génome (par le Dr. Haguenaer-Tsapis).

1.1.5. Approches expérimentales

- Biologie cellulaire :
 - Cytométrie en flux
 - Culture cellulaire, transfection, immunoprécipitations, ficoll
 - Fractionnement cellulaire
 - Méthodologies pour l'étude de l'apoptose
 - Immunohistochimie : marquages histologiques et immunofluorescents
 - Isolements cellulaires
- Biologie moléculaire :
 - Analyse des niveaux d'expression tissulaire et cellulaire par Northern et western blots
 - RT PCR quantitative
 - Clonage et préparation de cellules compétentes
 - Expression de protéines recombinantes
 - Séquençage
 - Electrophorèse mono-/bi-dimensionnelle
 - Western blot
 - Zymographie
- Biochimie :
 - Purification de protéines par HPLC
 - Marquage de substrats radioactifs
 - Enzymologie

- Dosages immunologiques
- Biologie animale :
 - Dissection et séparation d'organes (souris)
 - Injection de tumeurs
 - Histologie sur tissus frais
 - Biopsies mammaires
 - Ovariectomie sur ruminants
 - Prises de sang

- Informatique :
 - Logiciels de bureautique (Microsoft/Apple) et de traitements d'images
 - Logiciel d'analyse de cytométrie en flux
 - Logiciels d'analyse de séquences nucléiques et protéines
 - Logiciels statistiques (R, SAS)

1.1.6. Séjours à l'étranger

2006-2007 : Université de Clemson (South Carolina, USA) dans le laboratoire du Dr. S.E. Ellis.

1.2. Activités pédagogiques :

1.2.1. Activités d'enseignement

2012-présent : chargé d'enseignement, Ingénieurs agronomes 3^{ème} année, Ecole Supérieure d'Agronomie d'Angers (4h CM).

2006-2011 : chargé d'enseignement, Master 2 Biologie Agronomie Santé, Université de Rennes (4h CM).

2008-présent : co-responsable d'un module « Biologie expérimentale », Master 2 Biologie Agronomie Santé, Agrocampus Ouest (80h/an).

1.2.2. Activités d'encadrement (> 6 mois)

2009-2012 : Lucile Yart, Doctorante Agrocampus Ouest spécialité Biologie et Agronomie.

Rôle des stéroïdes ovariens dans la dynamique moléculaire de la glande mammaire : implications dans la persistance de la lactation chez le ruminant laitier.

2009 : Benjamin Ponchon, Master 2 Biologie Agronomie Santé, Université de Rennes. Effet d'une restriction alimentaire sur la dynamique de la glande mammaire chez la vache laitière.

2005 : Allan Rodriguez, Ingénieur ISIEE Life sciences, Paris. Fonction du facteur de transcription AIOLOS dans les leucémies lymphoïdes chroniques.

2003 : Régina Lizundia, Master 2 Immunologie, Université Paris Diderot. Rôle de la kinase CK2 dans la transformation des lymphocytes B par le parasite *Theileria parva*.

1.2.3. Autres activités d'encadrement (< 6 mois)

2012-2013 : Elise BLOIS : BTS Apprentissage (5 mois sur 2 ans).

2011 : Audrey Ravary : Master 1 (3 mois).

2011 : Joffrey Guillou : Master 1 (3 mois).

2010 : Pierre-Yves Treguer : IUT (4 mois).

1.2.4. Contribution à l'évaluation de personnes :

- Membre d'un comité de thèse 2012-2015 : Cathy Hue Beauvais (INRA GPL).
- Membre d'un comité de thèse 2010-2013 : Florence Loisel (INRA PEGASE).
- Membre d'un comité de thèse 2012-2015 : Li Na (INRA STLO).
- Rapporteur pour le Master 2 « Biologie Appliquée aux Productions et à la Santé Animale » Spécialité Recherche de 2 mémoires de fin d'études (Sarah Poirot et Aude Segaliny) (2011).
- Rapporteur pour le Master 2 « Biologie Appliquée aux Productions et à la Santé Animale » Spécialité Ingénierie Zootechniques de 2 mémoires de fin d'études (Marion Ouedraogo et Mathilde Aignel) (2009).
- Rapporteur pour le Master 2 « Biologie Spécialité Biologie, Productions animales et Qualité » d'un mémoire de fin d'études (Anaïs Le Bot) portant sur le clonage somatique chez la vache (juin 2008).

1.3. Liste des publications :

1.3.1. Articles dans des revues à comité de lecture :

2012: Role of ovarian secretions in mammary gland development and function in ruminants. Yart L, Lollivier V, Marnet PG, Dessauge F. *Journal of Animal Science*. In reviewing.

2012: Effects of ovariectomy on mammary gland in lactating cows. Yart L, Finot L, Lollivier V, Dessauge F. *Biology Of Reproduction*. In reviewing.

2012: Estradiol enhances apoptosis in bovine mammary epithelial cells *in vitro*. Yart L, Finot L, Lollivier V, Dessauge F. *Journal of Dairy Research*. Accepted

2012: Yart L, Dessauge F, Finot L, Barbey S, Marnet PG, Lollivier V. Ovariectomy improves lactation persistency in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. Jul; 95(7):3794-802

2012: Suppression of ovarian secretions before puberty strongly affects mammogenesis in the goat. Yart L, Finot L, Marnet PG, Dessauge F. *Journal of Dairy Research*. May; 79(2):157-67

2012: New developments on the galactopoietic role of prolactin in dairy ruminants. Lacasse P, Lollivier V, Dessauge F, Bruckmaier RM, Ollier S, Boutinaud M. *Domestical Animal Endocrinology*. Aug;43(2):154-60

2011: Effects of nutrient restriction on mammary cell turnover and mammary gland remodeling in lactating dairy cows. Dessauge F, Lollivier V, Ponchon B, Bruckmaier R, Finot L, Wiart S, Cutullic E, Disenhaus C, Barbey S, Boutinaud M. *Journal of Dairy Science*. Sep;94(9):4623-35

2011: Le Cozler Y., Gallard Y., Dessauge F., Peccatte J.R., Trommenschlager J.M., Delaby L. Performance and longevity of dairy heifers born during winter 1 (W1) and reared according to three growth profiles during winter 2 (W2) in a strategy based on first calving at 36 months of age. *Livestock Science* 137:244-254

2011: Finot L., Marnet P.G., Dessauge F. Reference gene selection for quantitative real-time PCR normalization: Application in the caprine mammary gland. *Small Ruminant Research*, 95:20-26

2009: Effects of ovariectomy in prepubertal goats. [Dessaugue F.](#), Finot L., Wiart S., Aubry JM., Ellis SE. *Journal of Physiology and Pharmacology* Aug 60, Suppl 2

2008: Hot topics : Prepubertal ovariectomy alters the development of myoepithelial cells in the bovine mammary gland. K., Korn N., Riggs L., Pratt SL., [Dessaugue F.](#), Akers RM., Ellis SE. *Journal of Dairy Science*, Aug;91(8):2992-5

2007: Critical function of Ikaros in controlling gene expression. Ghadiri A., Duhamel M., Fleisher A., Reimann A., [Dessaugue F.](#), Rebollo A. *FEBS Letter*, Apr 17;581(8):1605-16

2006: Identification of PP1 as a caspase-9 regulator in IL-2 deprivation induced apoptosis. [Dessaugue F.](#), Cayla X., Albar JP, Fleisher A., Ghadiri A., Duhamel M., Rebollo A. *Journal of Immunology*, Aug 15;177(4):2441-51.

2006: [Dessaugue F.](#), Guergnon J, Traincard F, Cayla X, Rebollo A, Bost PE, Langsley G, Garcia A. (2006) A PKA survival pathway inhibited by DPT-PKI, a new specific cell permeable PKA inhibitor, is induced by *T. annulata* in parasitized B-lymphocytes. *Apoptosis*. Aug;11(8):1263-73

2006: Modulating apoptosis as a target for effective therapy. Fleischer A., Ghadiri A., [Dessaugue F.](#), Duhamel M., Rebollo MP., Alvarez-Franco F., Rebollo A. *Mol Immunol*. Mar;43(8):1065-1079.

2006: Use of penetrating peptides interacting with PP1/PP2A proteins as a general approach for a drug phosphatase technology. [Dessaugue F.](#), Guergnon J, Dominguez V, Viallet J, Bonnefoy S, Yuste VJ, Mercereau-Puijalon O, Cayla X, Rebollo A, Susin SA, Bost PE, Garcia A. *Mol Pharmacol*. Apr;69(4):1115-24.

2005: Taking the Myc is bad for *Theileria*. [Dessaugue F.](#), Lizundia R., Baumgartner M., Chaussepied M., Langsley G. *Trends Parasitology*. Aug;21(8):377-85.

2005: Constitutively activated CK2 potentially plays a pivotal role in *Theileria*-induced lymphocyte transformation. [Dessaugue F.](#), Lizundia R., Langsley G. *Parasitology*.130 Suppl:S37-44.

2005: c-Myc activation by *Theileria* parasites promotes survival of infected B-lymphocytes. Dessauge F., Hilaly S., Baumgartner M., Blumen B., Werling D., Langsley G. *Oncogene. Feb 3;24(6):1075-83.*

2004: Bad-dependent rafts alteration is a consequence of an early intracellular signal triggered by interleukin-4 deprivation. Fleischer A, Ghadiri A, Dessauge F, Duhamel M, Cayla X, Garcia A, Rebollo A. *Mol Cancer Res. Dec;2(12):674-84.*

2003: Survival of lymphocytes infected by the protozoan parasite *Theileria parva* requires inactivation of a caspase-dependent pathway. Dessauge F., Guernon J., Langsley G. and García A. *Biochimie Aug;85(8):771-6.*

2003 : Mitochondrial dysfunction in CD47-mediated caspase-independent cell death : ROS production in the absence of cytochrome c and AIF release. Roue G., Bitton N., Yuste VJ, Montange T, Rubio M, Dessauge F., Delettre C., Merle-Beral H., Sarfati M. and Susin SA. *Biochimie Aug;85(8):741-6.*

2003: Serine/threonine Protein Phosphatases PP1 and PP2A are key players in Apoptosis. Garcia A., Cayla X., Guernon J., Dessauge F., Hospital, V., Rebollo M.P., Fleischer A. and Rebollo A. *Biochimie Aug; 85(8):721-6.*

2002: Thr 161 Phosphorylation of Monomeric Cdc2: Regulation by Protein Phosphatase 2C in *Xenopus* Oocyte. De Smedt V., Poulhe R., Cayla X., Dessauge F., Karaïskou A., Jesus C. and Ozon R. *JBC Aug 9 ;277 (32) :28592-600.*

1.3.2. Publications dans des revues professionnelles :

2012: Appel aux éleveurs, pour participer à l'enquête sur l'ovariectomie de la vache. Yart L, Dessauge F, Chastant S, Heliez JM, Lollivier V. *Production Laitière Moderne N°430.*

2012: Intérêt zootechnique de l'ovariectomie sur vaches laitières. Yart L, Dessauge F, Chastant S, Heliez JM, Lollivier V. *Production Laitière Moderne N°434.*

2012: Enquête en ligne sur l'utilisation de l'alimentation à volonté chez la chevre.
Dessaugé F. La chèvre.

1.3.3. Liste des communications à des colloques ou conférences :

2012 : Effets d'une alimentation hyper énergétique et protéique avant la puberté sur la croissance des chevrettes et leur production laitière. Drouet L, Duboc S, Dessaugé F. Rencontres autour des Recherches sur les Ruminants (« 3R ») – Paris (France) – Poster.

2012 : Intérêts zootechniques de la castration de la vache. Chastant S, Yart L, Dessaugé F, Guérin P, Lollivier V. Journées Nationales des GTV – Nantes (France) – Communication orale.

2012: DNA methylation and ncRNA transcription at a CSN1S1 regulatory region in the bovine mammary gland. Nguyen M., Bouet S., Boutinaud M, Dessaugé F, Charlier M, Gabory A, Galio L, Jammes H, Klopp C, Kress C, Sandra O, Pannetier M, Devinoy E. 9th International Symposium on Milk Genomics and Human Health – Wageningen (Danemark) - Communication orale.

2012: Milking frequency modifies DNA methylation at a CSN1 regulatory region in the bovine mammary gland. Nguyen M, Charlier M, Galio L, Kress C, Gabory A, Jammes H, Dessaugé F, Boutinaud M, Devinoy E. BOLFA meeting – Bratislava (Slovaquie) – Communication orale.

2012: Role of ovarian secretions in mammary gland development and function in ruminants. Yart L, Lollivier V, Marnet PG, Dessaugé F. BOLFA meeting – Bratislava (Slovaquie) - plenary invited conference.

2012: Effect of rearing intensity on growth performance and mammary tissue in Holstein yearling heifers. Lollivier V, Dessaugé F, Boutinaud M and Le Cozler Y. ADSA annual meeting - Phoenix (USA) – Poster.

2012: Estradiol enhances apoptosis in bovine mammary epithelial cells *in vitro*. Yart L, Finot L, Marnet PG, Lollivier V, Dessaugé F. ADSA annual meeting - Phoenix (USA) – Poster.

2012: Effects of high feeding level on caprine mammary gland development and milk yield potential. Aubry JM, Finot L, Yart L, Wiart S, Siroux E, Chorho M, Lassalas J, Dessaugé F. ADSA annual meeting - Phoenix (USA) – Communication orale.

2012: Effect of ovariectomy on milk yield and mammary gland activity in lactating cows. Yart L, Dessauge F, Finot L, Wiart S, Mottin A, Eveno A, Marnet PG, Lollivier V. ADSA annual meeting - Phoenix (USA) – Communication orale.

2011: Une restriction alimentaire modifie la dynamique cellulaire et le remodelage tissulaire de la glande mammaire chez la vache laitière. Dessauge F, Lollivier V, Cuttolic E, Portanguen J, Disenhaus C, Barbey S, Ponchon B, Lemosquet S. and Boutinaud M. Journées d'Animation des Crédits Incitatifs PHASE – Rennes (France) - Poster.

2011: Effects of nutrient restriction on mammary cell turnover in lactating dairy cows. Dessauge F, Lollivier V, Cuttolic E, Portanguen J, Disenhaus C, Barbey S, Ponchon B, Lemosquet S. and Boutinaud M. ISEP annual meeting – Parme (Italie) – Poster.

2011: Effect of ovariectomy on lactation persistency and mammary gland activity in dairy cows. Yart L, Dessauge F, Finot L, Barbey S, Marnet PG, Lollivier V. International congress of farm animal endocrinology – Berne (Suisse) – Communication orale.

2010: The present situation and perspectives on milking and milk production of dairy sheep in Europe, the Middle East and North America. Marnet P-G, Lagriffoul G, Morin E, Allain C, Larroque H, Rupp R, Astruc JM, Dessauge F, Boutinaud M, Lollivier V, Duvallon O, Aurel MR, Autran P, Barillet, F. International Seminar on Milking and Milk Production of Dairy Sheep - Saint Affrique (France) – Communication orale.

2010: Effects of early ovariectomy on caprine mammary gland parenchyma during prepuberty. Yart L, Finot L, Dessauge F. ADSA annual meeting – Denver (USA) – Communication orale.

2010: Effect of nutrient restriction on mammary cell activity and hormonal statement in lactating dairy cows. Dessauge F, Lollivier V, Cuttolic E, Portanguen J, Disenhaus C, Barbey S, Ponchon B and Boutinaud M. ADSA annual meeting – Denver (USA) – poster.

2010: Effet de régimes hyper-énergétiques à la pré-puberté sur le développement de la glande mammaire caprine. Dessauge F, Charlier M, Lassalas J. Journées d'Animation des Crédits Incitatifs PHASE – Tours (France) - Poster.

2010: Localisation de microARN et organisation nucléaire dans le tissu mammaire de vache et notamment les cellules progénitrices. Galio, L. ; Kress, C. ; Droineau, S. ; Boudiaf, H. ; Devinoy, E. ; Dessauge, F. ; Lollivier, V. ; Boutinaud, M. Journées d'Animation des Crédits Incitatifs PHASE – Tours (France) - Communication orale.

2009: Les lactations longues en élevage caprin : Aptitudes des chèvres à la lactation longue. Dessauge F. et Marnet PG. Colloque Caprin – Niort (France) - Communication orale.

2008: Effet de l'ovariectomie sur la différenciation de la glande mammaire chez la chevrette (communication orale). Dessauge F. Transversalité « Glande Mammaire, lait » - Jouy en Josas (France) - Communication orale.

2008: Effects of ovariectomy on prepubertal goats. Dessauge F. International Symposium for Young Scientists (ISYS) - Lublin (Pologne) - Communication orale.

2007: Effets de l'ovariectomie chez la chevrette. Dessauge F. Journée d'animation Scientifique PHASE – Tours (France) - Communication orale.

2006: Mammogenesis in goats. Dessauge F. Gordon Conference on Mammary Gland Biology – Parme (Italie) – poster.

2003: Drug Phosphatase Technology (DPT): A New General Approach For Cell Biology. Dessauge F, Garcia A, Guergnon J, Cayla X, Hospital V, Rebollo A. EUROPHOSPHATASES-EMBO-FEBS - Barcelona (Espagne) - Communication orale.

2003: c-Myc activation by *Theileria* parasites promotes survival of infected B-lymphocytes. Dessauge F, Langsley G. International symposium of Parasitology – Paris (France) - Communication orale.

2002: Survival of lymphocytes infected by the protozoan parasite *Theileria parva* requires inactivation of a caspase-dependent pathway. Dessauge F, Langsley G. International symposium of Parasitology – Paris (France) - Communication orale.

2002: CK2 alpha in survival, proliferation and Metastasis in *Theileria*-transformed B-cells. Dessauge F, Langsley G. FC Heinrich BEHR symposium – Heidelberg (Allemagne) – Communication orale.

1.3.4. Liste des ouvrages :

2012 : La fonction de lactation : régulation de la biosynthèse des constituants du lait. Leroux C, Bernard L, Dessauge F, Le Provost F, Martin P. Productions Animales.

2012 : La reproduction humaine et animale aux éditions QUAE (2012): chapitre sur la lactation. Dessauge F, Boutinaud M, Lollivier V.

1.3.5. Liste des brevets/inventions :

Dessauge F., Garcia A., Rebollo A., Cayla X., Guergnon J., Hospital V., Susin S., Langsley G. (2004) Drug Phosphatase Therapy : a new anti tumoral strategy . DI n°PL080451 – dépôt international.

Dessauge F., Garcia A., Rebollo A., Cayla X., Guergnon J., Hospital V., Susin S.A. (2002). Inhibitions de processus tumoraux ou infectieux par transfert intracellulaire de peptides mimant des sites d'interaction avec la ser/thr phosphatase PP2A. DI n°PL02 – dépôt national.

Dessauge F., Garcia A., Rebollo A., Cayla X., Rebollo A. (2002) Les sites de liaison des protéines E4orf4 et Bcl-2 avec la Protéine Phosphatase 2A : des nouvelles cibles potentiellement anti-tumorales. DI n°PL042002 – dépôt national.

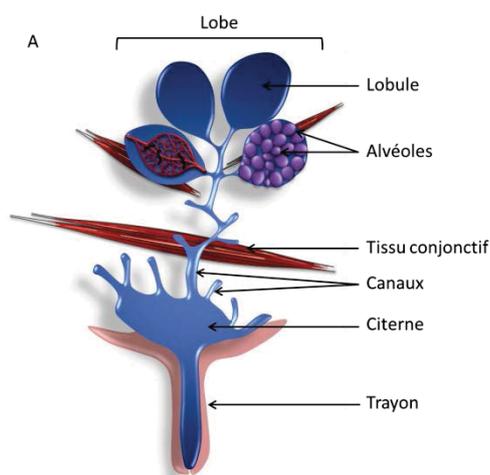
Dessauge F., Garcia A., , Susin SA. (2002). Les peptides mimant des sites d'interaction de certaines protéines avec PP2A : de nouveaux outils pour le transfert intracellulaire de bio molécules. DI n°PL05-06 – dépôt national.

2. Etat de l'art :

2.1. La glande mammaire

2.1.1. Anatomie et développement

La glande mammaire est l'organe qui produit le lait. Elle possède une organisation très particulière lui permettant d'assurer au mieux ses fonctions de synthèse et d'éjection du lait. Le tissu sécréteur est localisé dans la région la plus distale de la mamelle. Il est composé d'alvéoles regroupées en lobules, eux-mêmes regroupés en lobes. Ce tissu sécréteur est



drainé par un réseau de canaux galactophores qui débouchent, chez les ruminants, sur une citerne (**Figure 1A**). C'est dans cette citerne qu'est stocké le lait avant d'être évacué par le canal du trayon lors de la traite ou de la tétée. Les alvéoles constituent les unités fonctionnelles de la glande mammaire. Elles sont constituées d'une couche de cellules épithéliales mammaires (CEM) polarisées. A leur pôle apical, ces cellules débouchent sur la lumière

alvéolaire où est sécrété le lait. A leur pôle basal, elles entretiennent une relation étroite avec un tissu stromal composé de cellules myoépithéliales contractiles, de fibroblastes, d'adipocytes et de vaisseaux lymphatiques et sanguins (**Figure 1B**). Ces derniers permettent l'apport des nutriments nécessaires à la synthèse du lait.

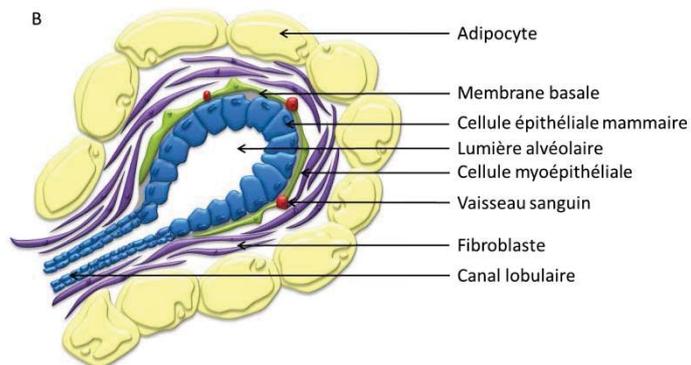


Figure 1. Anatomie de la glande mammaire de ruminants (A) et structure de l'alvéole mammaire (B). (D'après Delouis & Richard, 1991)

alvéolaire où est sécrété le lait. A leur pôle basal, elles entretiennent une relation étroite avec un tissu stromal composé de cellules myoépithéliales contractiles, de fibroblastes, d'adipocytes et de vaisseaux lymphatiques et sanguins (**Figure 1B**). Ces derniers permettent l'apport des nutriments nécessaires à la synthèse du lait.

2.1.2. De l'embryogenèse à la puberté

Les premières ébauches mammaires se forment au cours de l'embryogenèse par invagination de structures ectodermiques pour former les principaux canaux galactophores et le canal du trayon. La mise en place de ces premiers canaux se fait essentiellement sous le contrôle des glucocorticoïdes, de la prolactine (PrI) et de la GH (Veltmaat et al., 2003). Les

stéroïdes sexuels ne semblent pas impliqués dans la mammogénèse embryonnaire. Il a été montré, chez l'embryon de souris, que la glande mammaire se développait normalement en absence de ces hormones (Kratochwil, 1971). Au cours de l'embryogenèse, les stéroïdes sexuels n'interviennent que dans le dimorphisme sexuel avec l'induction de l'apoptose dans les ébauches de structures épithéliales, par les androgènes fœtaux (chez le mâle). Ce processus impliquant des récepteurs aux androgènes situés dans le stroma conduit à une séparation irréversible entre le canal du trayon et les autres canaux (Brisken & O'Malley, 2010). Chez les ruminants, à la naissance, l'arborescence des canaux galactophores rudimentaires forme une masse compacte de parenchyme reliée à la cavité citernale. Après la naissance, la glande mammaire suit un développement isométrique, en parallèle du reste de l'organisme, avant de reprendre une croissance allométrique positive quelques temps avant la puberté.

La reprise du développement allométrique positif de la glande mammaire a lieu vers l'âge de 2 à 3 mois chez la génisse (Purup et al., 1993 ; Berry et al., 2003b), et vers l'âge de 1 à 2 mois chez la chevrette (Dessaige et al., 2009 ; Yart et al., 2012a). Chez ces espèces, la masse de parenchyme mammaire est localisée au-dessus de chacun des trayons et se développe au sein du tissu adipeux. Lors de la reprise du développement allométrique, ces canaux se ramifient à partir d'arborescences épithéliales et progressent dans le stroma. Dans un second temps, les structures lobulo-alvéolaires se développent aux extrémités distales des canaux. Dans la glande mammaire en développement, les canaux et les structures lobulo-alvéolaires sont formés d'un épithélium pluristratifié entouré d'un tissu conjonctif dense. Tous ces processus de croissance et de développement sont orchestrés par l'action des hormones hypophysaires (Prl et GH) et des stéroïdes ovariens (Akers et al., 2005). Wallace (1953) a été le premier à mettre en évidence l'implication des stéroïdes ovariens dans le développement de la glande mammaire de ruminants à la puberté. Il a montré, chez la génisse, que la suppression de la source principale d'œstradiol et de progestérone par une ovariectomie effectuée avant la puberté altérait fortement la mammogénèse. Un développement normal était retrouvé lorsque les génisses recevaient une supplémentation en œstradiol. Ces observations ont été confirmées à plusieurs reprises, notamment par Purup et al. (1993) qui ont mesuré, chez des génisses ovariectomisées avant la puberté, une masse de parenchyme et une concentration en ADN (Acide désoxyribonucléique) 5 fois

inférieures à celles mesurées chez des génisses intactes. Le contrôle du développement du parenchyme mammaire par les stéroïdes ovariens passe essentiellement par une modulation de la prolifération des CEM. L'incorporation de thymidine tritiée dans les noyaux des CEM des canaux galactophores est considérablement augmentée (46 fois) 96h après l'injection d'œstradiol, mais cet effet n'est pas observé après l'injection de progestérone (Woodward et al., 1993). Plus récemment, il a été montré que la prolifération cellulaire dans la glande mammaire de génisses ovariectomisées à l'âge de 2,5 mois était 10 fois inférieure à celle de génisses intactes (Berry et al., 2003b), conduisant à une réduction de 85 – 90% du développement du parenchyme mammaire chez des génisses abattues à l'âge de 9 mois (Purup et al., 1995). L'ovariectomie de génisses prépubères a également conduit à des modifications de la distribution de plusieurs composants de la matrice extracellulaire dans la glande mammaire (Berry et al., 2003d). La matrice extracellulaire est composée principalement de laminine, de protéoglycanes, de fibronectine, de tenascine et de collagènes I et IV. Ces constituants sont synthétisés par les différents types cellulaires présents dans la glande mammaire. Cette matrice extracellulaire a un rôle essentiel dans le développement de la prolifération des CEM. *In vitro*, l'œstradiol ne peut induire la prolifération des CEM que lorsque celles-ci sont co-cultivées avec des cellules stromales ou sur une matrice extracellulaire de synthèse (Haslam & Woodward, 2001). Bien que les mécanismes impliqués dans le contrôle du développement de la glande mammaire divergent par certains aspects, le rôle primordial des stéroïdes ovariens dans la mammogenèse semble confirmé chez les bovins. Ce n'est cependant pas le cas des ovins chez lesquels la mammogenèse à la puberté se ferait de manière indépendante des sécrétions ovariennes (Ellis et al., 1998).

Les facteurs intervenant dans le développement de la glande mammaire ont, à l'échelle d'un organisme, des actions locales mais également systémiques. Les interactions entre ces hormones et leurs voies de signalisation sont complexes. Il est donc difficile de déterminer si leurs actions sur la glande mammaire sont directes ou résultent d'une stimulation d'autres organes. En revanche, ce qui est maintenant connu, c'est que le stroma et le tissu adipeux (formant ensemble le coussin graisseux de la glande mammaire) ne constituent pas uniquement une matrice inerte, mais jouent un rôle important dans la mise en place des structures épithéliales. Les premières études qui ont mis en évidence

l'importance de ce coussin graisseux mammaire concernaient la transplantation d'explants d'épithéliums mammaires murins dans différents organes (DeOme et al., 1959 ; Hoshino, 1978). Hoshino (1978) a ainsi pu observer que ces explants d'épithélium mammaire se développaient normalement après transplantation dans du tissu adipeux périrénal ou mésométrial, mais que ce n'était pas le cas après transplantation en sous-cutané dans la cavité péritonéale ou encore dans la chambre antérieure de l'œil. De plus, l'épithélium développé dans le tissu adipeux mésométrial était capable de répondre à des stimuli lactogéniques en synthétisant des protéines du lait (Hoshino, 1978). Le coussin graisseux mammaire joue donc un rôle à la fois dans la prolifération et dans la différenciation des CEM. Il constitue un site d'action pour les hormones impliquées dans le développement de la glande mammaire, notamment pour les stéroïdes ovariens et la GH, et participe à la transmission de ces messages hormonaux. En effet, Capuco et al. (2002) ont montré que les CEM en prolifération n'exprimaient pas les récepteurs aux stéroïdes ovariens, mais ces récepteurs, tout comme celui de la GH, sont exprimés dans le stroma (Akers, 1990 ; Meyer et al., 2006). La réponse du coussin graisseux à ces stimuli hormonaux se fait via la synthèse de différents facteurs de croissance tels que les Insulin Growth Factors (IGFs), les Fibroblast Growth Factors (FGFs) ou l'Hepatocyte Growth Factor (HGF) qui ont des actions mitogènes (Hovey et al., 1999). Ainsi, plusieurs études ont montré que l'administration d'œstradiol chez la génisse augmente l'expression d'IGF-I et diminue l'expression de l'IGF Binding Protein-3 (IGFBP-3) dans le coussin graisseux (Berry et al., 2001 ; Meyer et al. 2006). Cette augmentation de l'expression d'IGF-I suite à l'administration d'œstradiol s'accompagne d'une augmentation importante de la prolifération des CEM dans la glande mammaire et d'une réduction de 80% de l'expression de ER α (Estrogen Receptor) dans ces cellules (Meyer et al., 2006).

2.1.3. La glande mammaire adulte : un organe cyclique

Le développement de la glande mammaire chez l'adulte est un processus fascinant dans le sens où, au cours de la vie de l'animal, la glande mammaire va subir de nombreux changements en terme de taille, de structure, de composition et d'activité. Ces cycles de développement sont directement calqués sur les cycles de reproduction. Un cycle de développement, initié par une gestation, est divisé en 4 phases en partie recouvrantes :

mammogénèse terminale (croissance lobulo-alvéolaire), lactogénèse, galactopoïèse et involution (**Figure 2**).

Bien que la mammogénèse chez le jeune soit déterminante pour les lactations futures, cette phase concerne essentiellement la mise en place du réseau de canaux mammaires. La grande majorité du développement lobulo-alvéolaire a lieu pendant la première gestation et représente la mise en place de 60 à 94% du tissu sécréteur selon l'espèce considérée

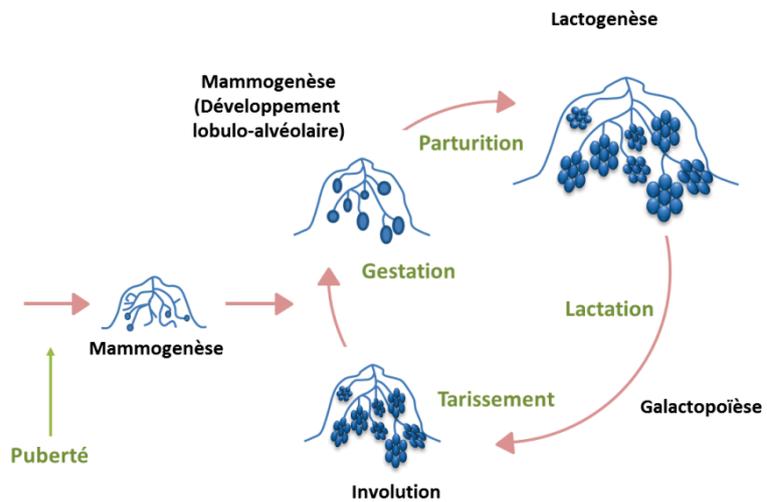


Figure 2. Représentation schématique d'un cycle de développement/régression du tissu sécréteur dans la glande mammaire chez la femme. (D'après Martinet & Houdebine, 1993)

(Knight & Peaker, 1982). En parallèle de la mise en place des structures lobulo-alvéolaires, le réseau de canaux poursuit son développement en augmentant en taille et en complexité. Pendant la gestation, la croissance de la glande mammaire conduit à une augmentation de la proportion de parenchyme aux dépens du coussin graisseux, et ce, jusqu'à ce que la densité alvéolaire soit telle que les lobes et les lobules ne soient plus séparés que par des septums de tissu conjonctif. Cette phase de mammogénèse se fait sous l'action des stéroïdes sexuels (œstrogènes et progestérone) sécrétés par les ovaires et par le système fœto-placentaire, combinée à celle des hormones hypophysaires (Prl et GH). Les implications des différentes glandes endocrines dans le développement de la glande mammaire au cours de la gestation ont été mises en évidence relativement précocement par l'ablation de ces glandes. Ainsi, Denamur & Martinet (1961) ont montré qu'une hypophysectomie chez la brebis gestante n'avait que peu d'incidence sur le développement de la glande mammaire. Chez la ratte et la souris, une ovariectomie ou une fœtectomy n'altèrent pas non plus la mammogénèse, alors que le retrait du placenta au cours de la gestation entraîne un arrêt de ce processus (Desjardins et al., 1968). A l'inverse, l'administration d'extraits de placenta associés à des

hormones stéroïdes chez des rattes vierges ovariectomisées et hypophysectomisées induit un développement des glandes mammaires (Ray et al., 1955).

Les œstrogènes et la progestérone sécrétés pendant la gestation ont un effet prolifératif sur les CEM (Clarke, 2000). Ainsi, chez la ratte, la quantité d'ADN total dans le tissu mammaire (reflétant le nombre de cellules) augmente de 200 à 300% au cours d'une gestation (Knight & Peaker, 1982). Des études menées sur des souris dont les gènes codant pour les récepteurs aux œstrogènes ont été invalidés (souris ER-KO) ont permis de montrer que les œstrogènes agissaient principalement sur le développement des canaux, tandis que la progestérone avait un rôle essentiel dans le développement lobulo-alvéolaire (Atwood et al., 2000 ; Aupperlee et al., 2007). Cependant les œstrogènes contrôlent indirectement le développement lobulo-alvéolaire dans la mesure où l'expression des différentes formes de PR (Progesterone Receptor) est sous contrôle des œstrogènes (Petz et al., 2004). Par ailleurs, pendant la gestation, les cellules exprimant PR sont très rares (Brisken et al., 2000) et chez la femme, 96% des CEM exprimant PR expriment également ER α et sont non prolifératives (Anderson et al., 1998). Ces résultats suggèrent que l'action proliférative de la progestérone sur les CEM se ferait par une voie paracrine entre cellules épithéliales.

A la fin de la gestation, l'augmentation du volume mammaire est essentiellement due à une hypertrophie des CEM en place et à une expansion des alvéoles. Les CEM subissent une différenciation physique et biochimique et acquièrent la capacité de synthétiser les différents constituants du lait sous l'action des hormones galactopoïétiques hypophysaires : la Prl et la GH.

Un cycle de lactation s'achève par l'involution de la glande mammaire. Cette phase correspond à la régression graduelle du tissu sécréteur pour retourner à un état de développement légèrement plus avancé qu'avant le début de la première gestation. L'involution débute suite au sevrage du jeune ou à l'arrêt de la traite qui induisent une réduction de la sécrétion des hormones galactopoïétiques ainsi que l'accumulation du lait dans la mamelle, ou stase lactée (Lamote et al., 2004). Chez la vache comme chez la chèvre, la phase la plus précoce d'involution est réversible. A un stade plus avancé, le phénomène de mort cellulaire programmée (ou apoptose) s'amplifie et la matrice extracellulaire est dégradée par les métalloprotéases pour aboutir à une perte de la quasi-totalité des CEM

(Stefanon et al., 2002). Schams et al. (2003) ont mis en évidence un changement dans la régulation de l'expression des ER et des PR dans la glande mammaire bovine au cours de l'involution. Chez l'adulte, l'expression de ces récepteurs est maximale 2 à 4 semaines après le début de l'involution, ce qui suggère que les œstrogènes et la progestérone seraient impliqués dans la régulation des mécanismes de l'involution. Plusieurs études se sont intéressées à l'effet de l'administration d'œstradiol chez des vaches en milieu ou en fin de lactation. Il a ainsi pu être observé que l'administration d'œstradiol induisait systématiquement une baisse importante de la PL (**Figure 3**, Mollett et al., 1976 ; Athie et al., 1996 ; Delbecchi et al., 2005). Cette baisse de PL était associée à une régression du volume mammaire (Mollett et al., 1976), à une augmentation de la stanniocalcine dans le lait (Delbecchi et al., 2005) et à une modification de la composition du lait (Athie et al., 1996),

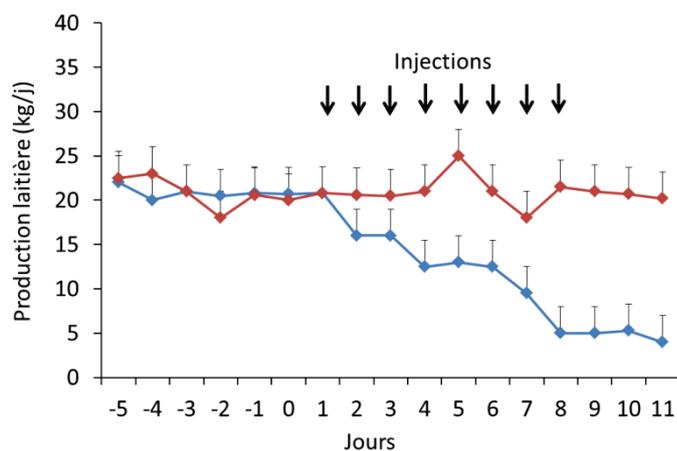


Figure 3. Evolution de la production laitière quotidienne chez des vaches Holstein en fin de lactation ayant reçu une injection d'œstradiol par jour pendant 8 jours (15 mg/vache, n = 4, courbe bleue) ou une injection d'éthanol 95% par jour pendant 8 jours (n = 4, courbe rouge). La flèche représente le moment de l'injection. Le traitement à l'œstradiol a diminué significativement la production laitière ($P < 0,05$). (D'après Delbecchi et al., 2005)

caractéristiques de l'involution mammaire.

Cette phase d'involution est nécessaire avant de débiter une nouvelle lactation. En effet, chez la vache, sans cette phase d'involution, la production laitière (PL) est nettement inférieure à la normale lors de la lactation suivante (Capuco et al., 2003), ce qui suggère que les CEM ont une durée de vie limitée et que la glande mammaire possède une forte capacité à se régénérer. Cette mammogenèse *de novo* est

primordiale pour son bon fonctionnement. La régénération du tissu sécréteur lors de chaque nouvelle gestation se fait par le recrutement de cellules souches pluripotentes présentes dans la glande mammaire.

2.2. Synthèse du lait

2.2.1. La cellule épithéliale mammaire

Les différents constituants du lait sont synthétisés par un type cellulaire spécialisé : les CEM (**Figure 4**). Ces cellules sont organisées en épithélium monostratifié qui tapisse les alvéoles de la glande mammaire. Chacune des cellules synthétise tous les constituants du lait. Ce sont des cellules polarisées qui acquièrent au cours de la gestation la capacité à synthétiser du lait, via des transformations physiques et biochimiques.

En début de gestation, les CEM s'organisent autour de la lumière alvéolaire, leur pôle basal étant ancré à la membrane basale formée par la matrice extracellulaire. A ce stade, le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi sont peu réticulés, les mitochondries sont rares, et les vésicules de sécrétions exceptionnelles ; signes d'inactivité des CEM. Au fur et à mesure que la gestation progresse, les CEM se dotent d'une organisation caractéristique de cellules sécrétrices : le cytoplasme augmente en volume, les mitochondries sont nombreuses, l'appareil de Golgi se rapproche du noyau et devient de plus en plus réticulé, des vésicules de sécrétion protéique et des gouttelettes lipidiques font leur apparition. Au moment de la parturition, la quasi-totalité des CEM sont matures et fonctionnelles. Le noyau qui était jusque-là dans la partie médiane de la cellule migre vers le pôle basal afin de laisser la place aux nombreuses citernes du réticulum endoplasmique et aux mitochondries abondantes. Le cytoplasme atteint alors son volume maximal et contient de nombreuses vésicules de sécrétions et gouttelettes lipidiques prêtes à passer dans la lumière alvéolaire située du côté apical des CEM (Martinet & Houdebine, 1993).

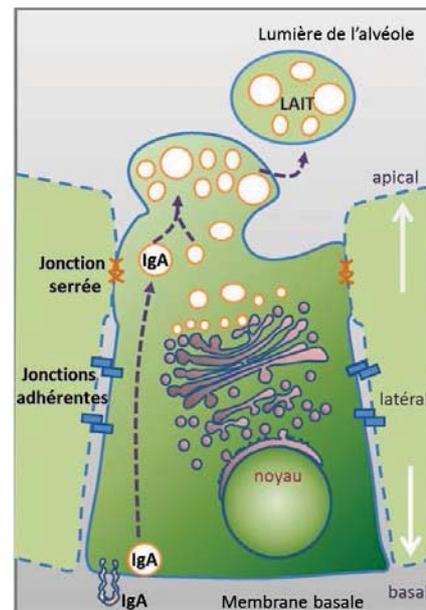


Figure 4. Représentation schématique d'une cellule épithéliale mammaire. (Ig : Immunoglobuline).

La cohésion et l'étanchéité de l'épithélium sécréteur formé par les CEM sont assurées par des structures protéiques maintenant le contact entre les cellules. Plusieurs types de structures participent au maintien de l'intégrité épithéliale, parmi lesquelles les jonctions

serrées (formées par des protéines des familles des occludines, des claudines et des molécules d'adhésion des jonctions (ou JAM)), les jonctions d'adhérence (composées par des protéines des familles des cadhérines et des caténines), les gap communicantes et les desmosomes. Elles permettent l'établissement d'une barrière entre l'espace interstitiel et le compartiment alvéolaire, régulant ainsi le transfert d'éléments dans le lait. Une modification de la stabilité de ces structures altère donc l'étanchéité de cette barrière ; il en résulte une modification de la composition du lait (Ben Chedly, 2009). C'est notamment par l'ouverture des jonctions serrées que débute le processus d'involution mammaire, caractérisé par une modification de la composition du lait en protéines (Hurley, 1989).

2.2.2. Activités de synthèse et de sécrétion

Le lait est composé essentiellement d'eau, de protéines, de sucres, de lipides, de sels minéraux et de vitamines. La majeure partie des constituants du lait est directement synthétisée par les CEM à partir d'éléments apportés par la circulation sanguine, mais certains constituants tels que l'eau, les vitamines, les sels minéraux et quelques protéines (e.g. les immunoglobulines) passent directement dans le lait, sans être modifiés.

2.3. Facteurs déterminant la quantité de lait produite

La quantité de lait produite par la glande mammaire à un moment donné dépend de l'activité de synthèse des CEM, mais aussi et surtout du nombre de CEM et de l'organisation du tissu sécréteur (Stefanon et al., 2002). Le nombre de CEM est déterminé par des modulations de la balance prolifération/apoptose. L'intensité du remodelage tissulaire qui permet une réorganisation du tissu sécréteur peut être mesurée au travers de l'activité protéasique d'enzymes dégradant la matrice extracellulaire, les MMP (Métalloprotéinases).

2.3.1. Balance prolifération/apoptose

Dans la glande mammaire en lactation, le renouvellement des CEM est assuré continuellement par deux phénomènes que sont la prolifération cellulaire et la mort cellulaire programmée (ou apoptose). C'est de cet équilibre entre ces deux phénomènes, plus couramment appelé «

balance prolifération/apoptose », que dépend le nombre de CEM

actives.

L'équilibre de la balance prolifération/apoptose évolue au cours d'une lactation (Figure 5), ce qui engendre des variations de PL. En début de lactation, le taux de prolifération cellulaire est supérieur au taux d'apoptose : le nombre de CEM et la PL augmentent. Après le pic de lactation, l'équilibre de cette balance s'inverse, le taux d'apoptose devient supérieur au taux de prolifération cellulaire : le nombre de CEM et la taille des alvéoles diminuent ; il en résulte une baisse de la PL. Capuco et al. (2001) ont estimé que dans la glande mammaire bovine en lactation, le taux moyen de prolifération était de 0,3% et le taux moyen d'apoptose de 0,56% par jour, ce qui correspond à un renouvellement d'environ 50% des cellules au cours d'une lactation. Ainsi, sur la totalité de la lactation, c'est le phénomène d'apoptose qui prédomine sur la prolifération cellulaire, ce qui se traduit globalement par une perte de CEM.

L'apoptose des CEM est le phénomène principal observé dans la glande mammaire en lactation, mais surtout au cours de son involution. Une cellule apoptotique subit de nombreuses modifications physiques et biochimiques conduisant à une condensation puis une fragmentation de l'ADN, associé à des changements majeurs au niveau des organites et de la membrane plasmique. Motyl et al. (2006) ont proposé trois niveaux de régulation de l'apoptose dans la glande mammaire : une régulation intrinsèque ou intracellulaire mettant en jeu l'intégrité des mitochondries ; une régulation extrinsèque ou intra-mammaire

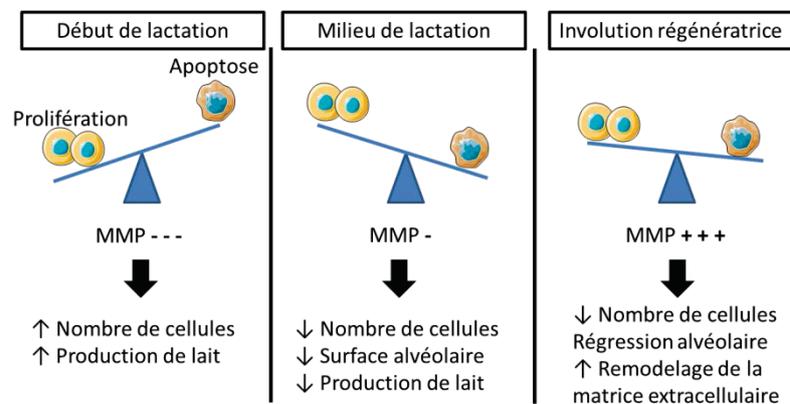


Figure 5. Evolution de la balance prolifération/apoptose et de l'activité des MMP (Métalloprotéinases) au cours d'une lactation. (D'après Stefanon et al., 2002)

impliquant des communications autocrine et paracrine via des récepteurs de mort cellulaire ; et enfin une régulation systémique notamment via des sécrétions hormonales ou différents facteurs d'élevage. Nous nous restreindrons dans cette partie aux deux premiers niveaux de régulation, le troisième sera abordé dans le chapitre 4.

La voie extrinsèque met en jeu divers facteurs pro- et anti-apoptotiques tels que TGF- β et IGF-I. Le facteur IGF-I est connu dans la glande mammaire pour son action mitogène, mais il joue également un rôle dans la survie des CEM. En effet, l'addition d'IGF-I au milieu de culture de CEM bovines réduit considérablement l'apoptose (Zarzynska & Motyl, 2005). Le facteur TGF- β est quant à lui un facteur pro-apoptotique. Son expression ainsi que celle de son récepteur augmentent dans la glande mammaire en involution chez plusieurs espèces dont les bovins (Plath et al., 1997). Dans les CEM bovines en culture, l'augmentation de l'expression de TGF- β est stimulée par l'œstradiol et la progestérone (Zarzynska et al., 2005) et est associée à une augmentation de l'expression de plusieurs facteurs intrinsèques (Zarzynska et al., 2007). Ainsi, l'augmentation de facteurs pro-apoptotiques (e.g. TGF- β) et la diminution de facteurs anti-apoptotiques (ou facteurs de survie, e.g. IGF-I) dans la glande mammaire agissent en synergie pour constituer ce que nous appellerons un stimulus

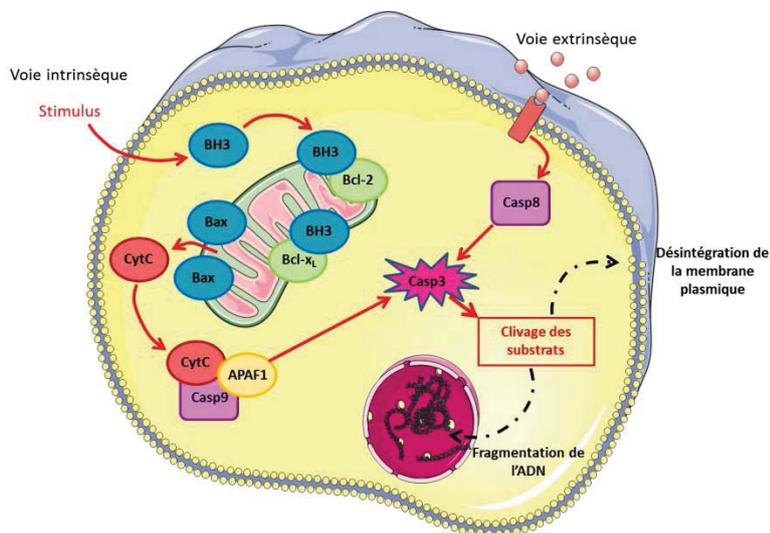


Figure 6. Représentation schématique des mécanismes apoptotiques de la voie intrinsèque, mettant en jeu l'intégrité des mitochondries, et de la voie extrinsèque impliquant des récepteurs de mort cellulaire. Bcl-2 : B-Cell lymphoma 2 ; BH3 : protéines de la famille Bcl-2 Homology domain-3 ; CytC : cytochrome c ; APAF1 : Apoptotic Peptidase Activating Factor 1 ; Casp3 : Caspase 3 ; Casp8 : Caspase 8 ; Casp9 : Caspase 9.

apoptotique. Ce stimulus apoptotique déclenche différentes voies de signalisation (**Figure 6**) qui conduisent à l'altération des membranes mitochondriales.

En effet, les protéines de la famille Bcl-2-homology domain-3 (BH-3) sont activées suite à des cascades de phosphorylations et déphosphorylations. Ces protéines forment alors une liaison préférentielle avec les

protéines de la famille de Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-xL, ...) situées sur les membranes des mitochondries. Suite à cette liaison, les protéines de la famille de Bcl-2 libèrent Bax et Bak qui vont former des pores dans les membranes externes des mitochondries et permettre ainsi la libération du cytochrome c dans le cytoplasme. Une fois dans le cytoplasme, le cytochrome c s'associe avec APAF-1 (Apoptotic Peptidase Activating Factor 1) et la caspase 9 pour former un complexe protéique appelé apoptosome. L'apoptosome est la voie majeure permettant l'activation, par clivage, de la caspase 3, enzyme centrale des principales voies apoptotiques. Cependant, le clivage de la caspase 3 peut également se faire via d'autres voies de signalisation n'impliquant pas les mitochondries ni l'apoptosome, c'est le cas par exemple de la caspase 8 qui, après activation par un récepteur de mort cellulaire, ira directement cliver la caspase 3. L'activation de la caspase 3 entraîne le clivage direct ou indirect de nombreuses autres protéines pour aboutir à une fragmentation de l'ADN et une dégénérescence de la cellule, caractérisée par la formation de corps apoptotiques (Green & Streuli, 2004).

Bien que la prolifération des CEM dans la glande mammaire en lactation soit limitée, les CEM conservent leur capacité proliférative dans la mesure où la prolifération cellulaire peut être augmentée par certains traitements ou facteurs d'élevage (cf. chapitre 4.II). Une augmentation de la fréquence de traite en début de lactation induit une augmentation de la PL en lien avec une augmentation de la prolifération cellulaire (Hale et al., 2003). Cette stimulation de la prolifération cellulaire en réponse à des facteurs externes serait due à la présence de cellules épithéliales souches ou progénitrices dans la glande mammaire. En 2002, Ellis & Capuco ont identifié dans la glande mammaire bovine, une population de cellules épithéliales ayant une forte capacité proliférative. A ce jour, encore aucun marqueur spécifique des cellules souches épithéliales mammaires n'a pu être identifié, chez aucune espèce. Cependant, des colorations histologiques permettent de discerner différentes populations de cellules épithéliales, en se basant sur l'intensité de la coloration du cytoplasme. Trois populations cellulaires ont ainsi pu être identifiées dans la glande mammaire bovine en développement : des cellules claires, foncées et intermédiaires (Ellis & Capuco, 2002). Les différences d'intensité de coloration sont dues à l'accumulation de protéines dans le cytoplasme des cellules, en lien avec le développement des organites et du cytosquelette au cours de la différenciation. C'est l'administration de BrdU

(Bromodésoxyuridine), un analogue de la thymidine qui s'insère dans l'ADN au cours de la phase de réplication dans les cellules en prolifération, effectuée avant le prélèvement de tissu mammaire, qui a permis d'estimer le taux de prolifération pour chacune des trois populations cellulaires. Ainsi, la population de cellules claires est la moins représentée dans la glande mammaire (10% des cellules épithéliales), mais c'est au sein de cette population que le taux de prolifération est le plus important (50%). Les cellules intermédiaires représentent 60% des cellules épithéliales dans la glande mammaire de génisses et ont également une capacité proliférative élevée : 40% de ces cellules prolifèrent. Les autres cellules épithéliales présentes dans la glande mammaire bovine en développement sont les cellules foncées ; elles ont une capacité proliférative restreinte puisque seulement 10% de ces cellules prolifèrent (Ellis & Capuco, 2002). Capuco et al., (2003) ont émis l'hypothèse que

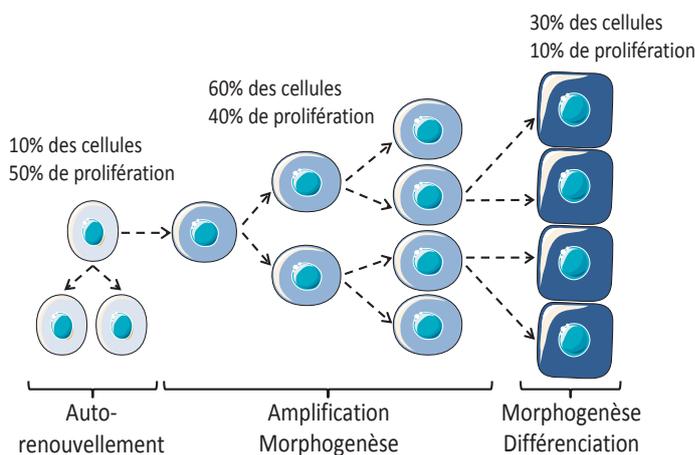


Figure 7. Hypothèse proposée par Capuco et al. (2003) sur le lien entre l'intensité de coloration du cytoplasme, le taux de prolifération et le degré de différenciation des cellules épithéliales dans la glande mammaire de génisse. (D'après Capuco et al., 2003)

les cellules claires, présentes en faible quantité mais hautement prolifératrices, représenteraient une population stock de cellules souches épithéliales qui, par divisions asymétriques, donneraient d'une part naissance aux cellules intermédiaires ou progénitrices, et d'autre part participeraient au renouvellement du stock de cellules souches. Les cellules intermédiaires, qui sont les plus représentées mais avec des capacités prolifératives moindres, auraient quant à elles un

rôle amplificateur de l'expansion de la population de cellules progénitrices. Enfin, les cellules foncées, qui ont une capacité proliférative restreinte, proviendraient de la différenciation des cellules progénitrices (**Figure 7**).

Une étude récente a mis en évidence, pour la première fois, l'existence d'une population de cellules souches/progénitrices dans la glande mammaire de chèvre. La transplantation de ces cellules sous la capsule rénale de souris immunodéprimées a permis de régénérer des colonies de cellules myoépithéliales (caractérisées par l'expression de la

cytokératine 14), des colonies de cellules épithéliales (caractérisées par l'expression de la cytokératine 18) et des colonies mixtes (Prpar et al., 2012). Ce sont ces cellules souches et progénitrices qui confèreraient à la glande mammaire cette capacité unique à être le siège de cycles de développement/régression au rythme des cycles de reproduction. En effet, à la fin de la lactation, le tissu sécréteur régresse, la glande mammaire entre en involution. Au cours de cette phase d'involution, le taux d'apoptose est élevé, ce qui permet une élimination des CEM sénescents. Dans certains cas (cf. chapitre 4.1.) la glande mammaire doit se préparer à enchaîner plusieurs lactations successives, c'est pourquoi il est possible de mesurer, notamment dans la glande mammaire bovine, une augmentation de la prolifération cellulaire lors de l'involution (Capuco et al., 2003).

2.3.2. Remodelage tissulaire

La quantité de lait produite dépend également de l'organisation du tissu sécréteur. En fin de lactation et en début d'involution de la glande mammaire, la PL chute fortement, et cette chute de PL est associée à une augmentation du remodelage tissulaire (Stefanon et al., 2002). Dans la glande mammaire, les CEM sont séparées du stroma par une membrane basale composée des protéines de la matrice extracellulaire (fibronectine, collagènes I et IV, ...). Le remodelage intensif qui a lieu lors de l'involution nécessite la dégradation de la matrice extracellulaire par les MMP dont l'expression et l'activité protéasique augmentent considérablement dans la glande mammaire bovine après 5 jours d'involution (Rabot et al., 2007). Ambili et al. (1998) ont mis en évidence l'implication principale d'une gélatinase lors de l'involution de la glande mammaire chez la ratte, et ont montré que cette protéase pouvait être régulée par les stéroïdes ovariens. En effet, l'injection d'œstradiol chez des rattes en lactation induit, 48h après l'injection, une augmentation de l'expression et de l'activité de cette gélatinase. Un effet comparable est retrouvé après un traitement à l'œstradiol de CEM de rattes *in vitro*.

La dégradation de la matrice extracellulaire par les MMP influence non seulement l'organisation des structures alvéolaires sécrétrices, mais agit aussi directement sur la survie des CEM (Pullan et al., 1996 ; Green & Streuli, 2004). Des études *in vitro* ont permis d'estimer un taux d'apoptose supérieur à 2,5 % dans des cultures primaires de CEM murines lorsque celles-ci sont cultivées sur du collagène I ou sur du plastique. L'apoptose de ces CEM

est réduite à un taux de 0,1 % lorsqu'elles sont cultivées sur une membrane basale de synthèse (Pullan et al., 1996). La membrane basale agirait directement sur la survie des CEM via les intégrines $\beta 1$. D'une manière plus générale, les protéines impliquées dans les interactions cellule - cellule et cellule - matrice extracellulaire sont importantes pour la survie des CEM et permettent de stabiliser le cytosquelette des cellules (Green & Streuli, 2004).

2.4. Régulation hormonale de la lactation

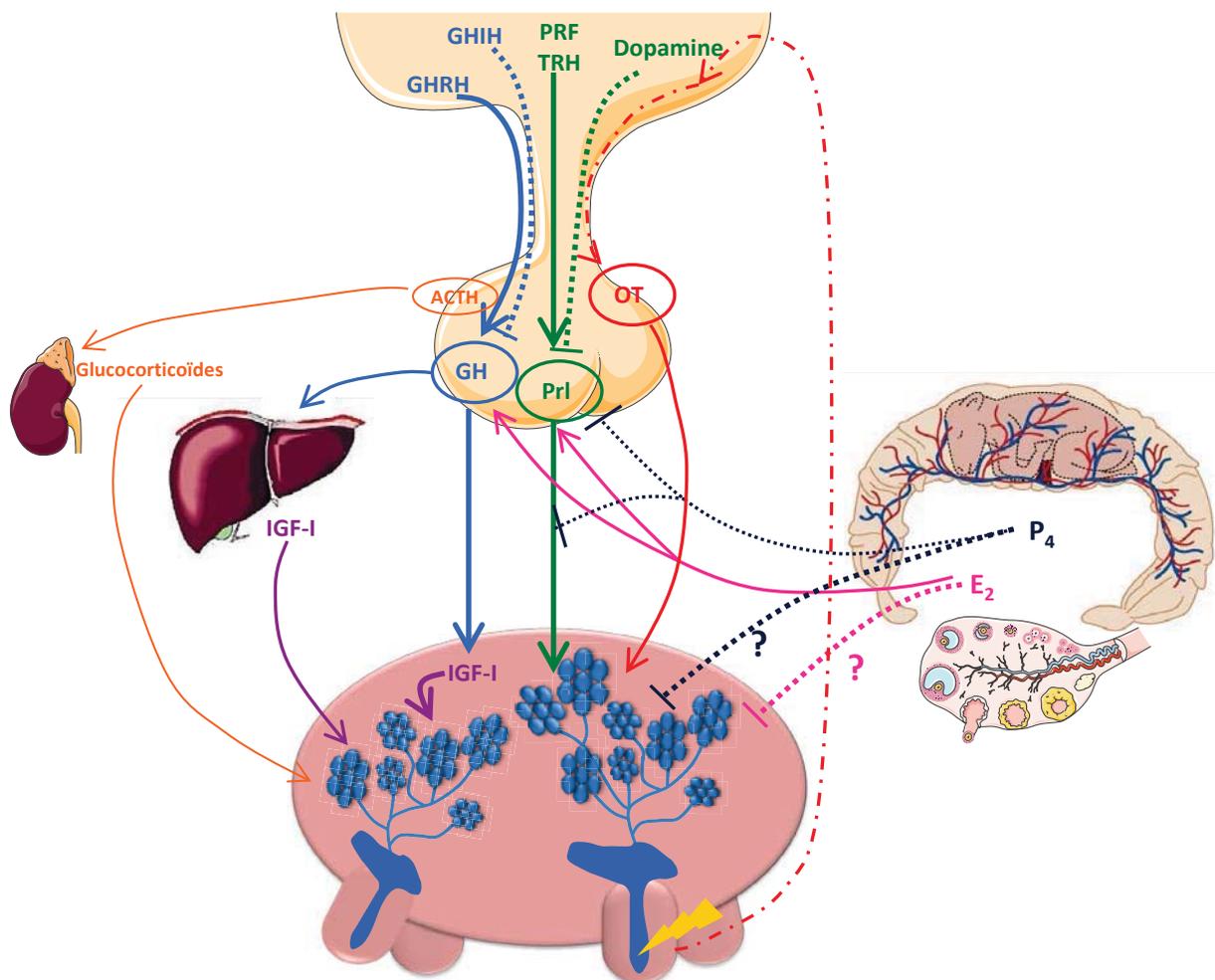


Figure 8. Représentation schématique de la régulation hormonale de la synthèse du lait. GH : Growth Hormone ; GHRH : GH Releasing Hormone ; GHIH : GH Inhibiting Hormone ; Prl : Prolactine ; PRF : Prolactin Releasing Factor ; TRH : Thyrotropin Releasing Hormone ; ACTH : hormone adrénocorticotropique ; IGF-I : Insulin-like Growth Factor I, OT : Ocytocine ; E₂ : Œstradiol ; P₄ : Progestérone.

2.4.1. Initiation de la lactation ou lactogénèse

Les premières sécrétions lactées apparaissent dans la glande mammaire dès la fin de la gestation. La fin de la gestation et la parturition constituent une période durant laquelle de grands bouleversements hormonaux ont lieu et conduisent à l'initiation des sécrétions lactées, en commençant par la production de colostrum. C'est ce qu'on appelle la phase de lactogénèse. Les principales hormones impliquées dans la lactogénèse sont les glucocorticoïdes, la Prl et la GH. Leur sécrétion est maximale autour de la parturition et elles sont essentielles à la transition mammogénèse/lactation dans la glande mammaire. La Prl et la GH sont deux hormones peptidiques chimiquement proches l'une de l'autre et sont respectivement sécrétées par les cellules lactotrophes et somatotrophes de l'hypophyse antérieure. La sécrétion de la Prl est régulée *via* l'action inhibitrice de la dopamine produite dans l'hypothalamus et les actions stimulatrices du PRF (Prolactin Releasing Factor) et de la TRH (Thyrotropin Releasing Hormone) (Freeman et al., 2000). La sécrétion de la GH est elle aussi placée sous contrôle hypothalamique au travers des actions combinées de la GHRH (GH Releasing Hormone) et de la GHIH. Cependant, leurs sécrétions et leurs actions sur la glande mammaire sont fortement liées aux changements des profils de sécrétion d'œstradiol et de progestérone qui surviennent au cours du dernier tiers de gestation. La sécrétion de progestérone, soit par le corps jaune chez les rongeurs, soit par le placenta chez la femme et les ruminants, chute progressivement. Cette diminution de la sécrétion de progestérone est indispensable à l'induction de la lactogénèse par la Prl. En effet il a été montré qu'au cours de la gestation, la progestérone exerçait une action inhibitrice sur la Prl. Cette action inhibitrice est double et s'exerce à la fois sur la décharge hypophysaire de Prl (Vermouth et al., 1974) et sur la différenciation des CEM (Loizzi et al., 1985). En parallèle de la diminution progressive de la sécrétion de progestérone, la sécrétion d'œstradiol augmente au cours de la gestation et chute brutalement après la parturition. Ce pic de sécrétion contribue également à l'initiation de la lactation en agissant directement sur les cellules lactotrophes et somatotrophes de l'hypophyse pour stimuler la synthèse et la sécrétion de Prl et de GH (Zarate & Seilicovich, 2010). L'œstradiol ne semble pas avoir d'effet direct sur la glande mammaire lors de la lactogénèse dans la mesure où c'est à ce moment-là que l'expression de ses récepteurs dans les CEM est la plus faible (Schams et al., 2003).

Ce sont Stricker & Grueter qui, en 1929, ont mis en évidence le rôle de facteurs hypophysaires dans l'initiation de la lactation, en observant que l'administration d'extraits

d'hypophyse chez des lapines pouvait induire une croissance mammaire et des sécrétions lactées. Le rôle de la GH dans la lactogénèse a été suggéré dès les années 1940 et confirmé ultérieurement, notamment chez la souris et chez la femme chez lesquelles une mutation soit du gène codant pour la GH soit du gène codant pour son récepteur empêche l'initiation de la lactation (Lamote et al., 2004). Cependant, son action directe sur les CEM a été peu décrite et semblerait passer majoritairement par une stimulation de la prolifération des CEM en fin de gestation (Annen et al., 2007), associée à une légère stimulation de la synthèse de caséines (Trott et al., 2008). La GH ne semble avoir aucun effet sur la différenciation de CEM, ni sur la synthèse des différents constituants du lait (Annen et al. 2007). En revanche, l'action de la Prl sur les CEM en début de lactation a été plus largement décrite, notamment par Akers et al. en 1981 (a et b). Ainsi, en traitant des vaches péri-parturientes à la bromocriptine (un agoniste de la dopamine), ils ont pu observer une diminution importante de la concentration plasmatique en Prl associée à une PL réduite de 40 % par rapport à des vaches non traitées. Le traitement à la bromocriptine a également induit une baisse de la concentration totale en ARN dans la mamelle sans toutefois diminuer la concentration en ADN, suggérant une action de la Prl sur l'activité et la différenciation des CEM plutôt que sur la prolifération. Des analyses cytologiques plus fines leur ont permis de montrer que la Prl était impliquée dans le développement du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi dans les CEM. De plus, l'activité d'enzymes impliquées dans la biosynthèse des acides gras ainsi que l' α -lactalbumine, indispensable à la synthèse du lactose, étaient significativement diminuées par le traitement, mettant ainsi en évidence une stimulation par la Prl de la synthèse des acides gras et du lactose dans les CEM.

Les glucocorticoïdes sécrétés par les glandes surrénales sont également nécessaires à l'initiation des sécrétions lactées. Leur production est contrôlée par l'ACTH, produite par l'antéhypophyse. Les glucocorticoïdes sont faiblement sécrétés pendant la gestation, mais un pic de sécrétion a lieu au moment de la parturition. Ces hormones seules n'ont pas d'effet sur les CEM, mais elles sont nécessaires à leur différenciation (Mills & Topper, 1969) et à la synthèse des acides gras, du lactose et des caséines (Goodman et al., 1983) et potentialisent les effets de la Prl. L'hormone placentaire lactogène dont la concentration dans le sang maternel augmente lors de la deuxième moitié de gestation chez la vache participe également à la différenciation des CEM et à l'initiation de leur activité sécrétrice avant la parturition (Akers, 1985).

2.4.2. Maintien de la lactation ou galactopoïèse

La galactopoïèse décrit l'ensemble des processus conduisant au maintien des sécrétions lactées dans la glande mammaire. Comme nous l'avons vu au chapitre précédent, la quantité de lait produite par la glande mammaire dépend de l'activité de synthèse et de sécrétion du lait par les CEM, mais aussi et surtout du nombre de CEM et de l'organisation du tissu sécréteur. Par conséquent, les facteurs galactopoïétiques regroupent l'ensemble des facteurs stimulant la synthèse des différents constituants du lait, des facteurs prolifératifs et des facteurs anti-apoptotiques. Là encore, la Prl et la GH jouent un rôle essentiel.

La Prl a longtemps été considérée comme étant principalement un facteur lactogénique et n'ayant que peu d'importance pour la galactopoïèse. Les premières preuves du rôle galactopoïétique de la Prl sont venues du fait que sa concentration plasmatique augmentait avec la photopériode et qu'elle était associée à une augmentation de la PL (Peters et al., 1981). A l'inverse, chez des vaches en lactation, l'administration de mélatonine, hormone sécrétée par la glande pinéale pendant la nuit, induit une baisse de la sécrétion de Prl et une diminution de la PL (Auldish et al., 2007). Plus récemment, toujours chez la vache en lactation, il a été montré que l'administration de quinagolide, un agoniste des récepteurs D2 à la dopamine permettant d'inhiber la sécrétion de Prl, induisait non seulement une baisse de la PL (Lacasse et al., 2011), mais également une diminution de l'expression des gènes codant pour la caséine κ et pour l' α -lactalbumine (Boutinaud et al., 2012), suggérant un rôle de la Prl dans le maintien de l'activité de synthèse du lactose et des protéines du lait pendant la lactation. Au cours de la lactation, la sécrétion de Prl est stimulée par la traite ou la tétée du jeune. Chez la vache, les décharges de Prl libérées à la traite peuvent être inhibées par l'administration de quinagolide, sans toutefois modifier le niveau basal de Prl (Lacasse et al., 2011). Ainsi, suite à la stimulation de thermorécepteurs et de mécanorécepteurs situés aux niveaux du trayon et du plancher de la mamelle, un signal serait transmis à l'hypothalamus pour activer la libération de Prl par l'hypophyse.

De la même manière que ce qui a été décrit dans le cadre de la lactogénèse, le rôle de la GH dans la galactopoïèse passerait essentiellement par des actions prolifératives et anti-apoptotiques sur les CEM, permettant ainsi de maintenir le nombre de cellules sécrétrices au cours de la lactation. Capuco et al. (2001) ont étudié l'effet de l'injection de GH chez des vaches en milieu de lactation. Un marquage immunohistochimique des cellules positives pour le marqueur Ki67 leur a permis de montrer que la GH induisait une

augmentation de la prolifération cellulaire dans la glande mammaire bovine en lactation. L'administration de GH au cours de la lactation augmente la PL (Svennersten-Sjaunja & Olsson, 2005).

Les actions de la GH sur la glande mammaire passent essentiellement par l'intermédiaire du facteur de croissance IGF-I. En effet, la GH stimule l'expression d'IGF-I à la fois localement, dans le stroma de la glande mammaire, et au niveau systémique, dans le foie (Herrington & Carter-Su, 2001). Plusieurs études ont montré qu'IGF-I stimulait la prolifération cellulaire dans la glande mammaire et augmentait la PL (Trott et al., 2008). Il agit également sur les CEM comme un facteur de survie en activant la phosphorylation de la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) qui active à son tour, par phosphorylation, le facteur anti-apoptotique Akt (Green & Streuli, 2004). Les actions prolifératives et anti-apoptotiques de la GH dans la glande mammaire sont suppléées par la Prl qui, en plus de stimuler la synthèse de différents constituants de lait, induit l'expression d'IGF-II et inhibe l'expression d'IGFBP-5 *via* l'activation de STAT5 (Signal Transducer and Activator of Transcription) (Hovey et al., 2003 ; Flint & Knight, 1997). Ainsi, l'inhibition de l'expression d'IGFBP-5 empêche la séquestration d'IGF-I et potentialise ses effets sur les CEM.

Les hormones stéroïdiennes (œstradiol et progestérone), qu'elles soient d'origine ovarienne ou fœto-placentaire, semblent avoir un effet négatif sur la glande mammaire en lactation. Dans les systèmes laitiers actuels, les vaches sont en lactation et gestantes de manière concomitante. Plusieurs études ont montré que la gestation avait un effet négatif sur la PL (Bachman et al., 1988 ; Bertilsson et al., 1997). Outre un effet évident de compétition énergétique entre la croissance intra-utérine du fœtus et la synthèse du lait, cet effet négatif pourrait être lié aux fortes quantités de progestérone sécrétées pendant les deux premiers tiers de la gestation et qui inhibent la sécrétion (Vermouth et al., 1974) et l'action de la Prl (Loizzi et al., 1985). Cependant, l'œstradiol semble aussi fortement impliqué dans cette baisse de PL. En effet, Bachman et al. (1988) puis Sorensen & Knight (2002) ont remarqué que l'effet négatif de la gestation sur la PL débutait entre 100 et 150 jours de gestation, ce qui coïncide avec le début des sécrétions d'œstrogènes par le système fœto-placentaire (Patel et al., 1999). Plusieurs études ont également montré que l'administration d'œstradiol exogène chez des vaches pendant la galactopoïèse induisait une forte baisse de la PL (Mollett et al., 1976 ; Athie et al., 1996 ; Delbecchi et al., 2005). L'administration de progestérone n'a, quant à elle, aucun effet seule et augmente légèrement l'effet de

l'œstradiol lorsque ces deux hormones sont administrées conjointement (Mollett et al., 1976). Delbecchi et al. (2005) ont également observé que la baisse de PL était associée à une diminution de l'ingestion alimentaire, suggérant que l'œstradiol pourrait agir sur le métabolisme général de l'animal, au niveau systémique. Par analogie, il est intéressant de relever que chez la femme allaitante, une contraception hormonale à base de progestatifs et exempte d'éthinylœstradiol est préconisée. L'utilisation de pilules d'éthinylœstradiol minidosées (< 50 µg) peut être envisagée, mais seulement après la 6^{ème} semaine d'allaitement. En effet, les pilules d'éthinylœstradiol normodosées (≥ 50 µg) réduisent les sécrétions lactées (Briend et al., 1991).

La lactation est une fonction biologique entraînant de grands changements métaboliques à l'échelle de l'organisme. L'entretien de la production de lait se fait grâce aux hormones galactopoïétiques qui agissent localement sur la glande mammaire, mais il passe également par des modulations hormonales au niveau systémique qui contrôlent le métabolisme. La production de lait par la mamelle conduit à une forte augmentation des besoins en eau et en nutriments (glucose, acides aminés et acides gras) nécessaires à la synthèse du lait. Ainsi, au moment du pic de production, les besoins en énergie pour synthétiser le lait représentent environ 80 % de l'énergie emmagasinée, ce qui implique une mobilisation importante des réserves corporelles. Tout ceci est orchestré par le système endocrinien : la GH et le cortisol augmentent la lipolyse dans le tissu adipeux et la néoglucogenèse dans le foie, la Prl et l'insuline favorisent l'absorption intestinale du calcium et d'acides aminés, tandis que la leptine (hormone peptidique régulant les réserves lipidiques dans l'organisme et responsable de la sensation de satiété) agit au niveau central pour réguler l'absorption d'énergie. La GH associée à l'action d'hormones vasoconstrictrices (vasopressine, adrénaline, noradrénaline, angiotensine II) et vasodilatatrices (oxyde nitrique, peptide atrial natriurétique) contribue à augmenter le débit sanguin et l'apport de sang à la glande mammaire (Svennersten-Sjaunja & Olsson, 2005).

Le lait synthétisé est stocké dans le compartiment alvéolaire et dans la citerne chez les ruminants. Une vidange régulière de la mamelle, soit par la traite soit par la tétée du jeune, est essentielle au maintien de la lactation. L'hormone qui permet l'éjection du lait du compartiment alvéolaire est l'ocytocine. L'ocytocine est une petite hormone peptidique produite dans l'hypothalamus et sécrétée par l'hypophyse postérieure (ou neurohypophyse) en réponse à la stimulation par la traite ou la tétée de récepteurs situés dans le trayon.

L'ocytocine induit la contraction des cellules myoépithéliales qui entourent les alvéoles, pour permettre le passage du lait des lumières alvéolaires vers la citerne. C'est ce qu'on appelle le réflexe d'éjection du lait. Outre son rôle dans la vidange de la mamelle qui assure le maintien de la PL en empêchant l'accumulation du lait et la formation de stases lactées, l'ocytocine joue un rôle direct dans la galactopoïèse. En effet, Lollivier et al. (2002) ont rapporté que l'administration d'ocytocine avant la traite permettait d'augmenter la PL de manière dose-dépendante, et que son action était plus efficace lors de la phase descendante de la lactation. Ils ont aussi démontré que dans la glande mammaire de rongeurs, le récepteur à l'ocytocine est exprimé par les cellules myoépithéliales, mais également par les CEM. L'action de l'ocytocine sur les CEM stimule alors la sécrétion des différents constituants du lait en accélérant les processus d'exocytose. Un traitement à l'ocytocine d'explants mammaires de lapine induit d'abord une accélération du transport intracellulaire de vésicules de sécrétions dans les CEM, puis une contraction des cellules myoépithéliales (Lollivier et al., 2006).

2.4.3. Arrêt de la lactation ou tarissement

La PL diminue spontanément après quelques mois de lactation, jusqu'à un arrêt total des sécrétions. La baisse de la PL au fur et à mesure de l'avancement de la lactation est favorisée par des décharges hypophysaires de Prl et de GH de moins en moins élevées. Les décharges de Prl induites par la tétée ou par la traite sont de plus en plus faibles au cours de la lactation (Fuchs et al., 1984). L'arrêt des tétées au sevrage ou l'arrêt de la traite au tarissement engendre un arrêt des sécrétions de Prl et d'ocytocine. Ainsi, ces hormones ne peuvent plus exercer leurs effets galactopoïétiques, que ce soit au niveau de la stimulation de la synthèse et de la sécrétion des différents constituants du lait par la Prl et l'ocytocine, ou par des effets prolifératifs et anti-apoptotiques exercés par la GH et la Prl sur les CEM. La baisse des concentrations plasmatiques de GH induit une diminution de l'expression d'IGF-I dans le foie et dans le stroma de la glande mammaire. En parallèle, la baisse des niveaux de Prl lève l'inhibition qu'elle exerçait sur l'expression d'IGFBP-5. Il en résulte une augmentation importante du taux d'apoptose dans la glande mammaire, associée à une baisse de l'activité de synthèse des CEM : le tissu sécréteur est en involution.

A cela vient s'ajouter une augmentation importante de l'expression de ER α dans la glande mammaire en fin de lactation. Plusieurs études ont mis en évidence un rôle de

l'œstradiol dans l'involution de la glande mammaire. Une augmentation du nombre de cellules dans le lait, associée à une baisse de la concentration en α -lactalbumine et lactose, ainsi qu'à une augmentation de la concentration en protéines totales (Athie et al., 1996) et plus particulièrement en lactoferrine (Welty et al., 1976 ; Athie et al., 1996, Singh et al., 2008) et en stanniocalcine (Delbecchi et al., 2005, Miller et al., 2006 ; Tremblay et al., 2009) ont été observées suite à l'injection d'œstradiol chez des vaches en fin de lactation. L'ensemble de ces phénomènes est caractéristique de l'ouverture des jonctions serrées qui a lieu lors de l'involution mammaire.

Peaker & Wilde (1996) ont également suggéré l'existence d'une rétroaction inhibitrice de l'un des constituants du lait sur la synthèse de lait dans la glande mammaire, et qui interviendrait à la suite de l'accumulation de lait dans la mamelle. Cette rétroaction serait due à la présence d'une protéine FIL (Feedback Inhibitor of Lactation), identifiée pour la première fois dans le lait de chèvre (Wilde et al., 1995) et qui, par une action autocrine, inhiberait la synthèse de différents constituants du lait par les CEM. Le FIL accentuerait également les processus apoptotiques en diminuant la réceptivité à la Prl qui ne peut alors plus exercer son action anti-apoptotique sur les CEM (Stefanon et al., 2002). Si ce type de mécanisme est probable, l'existence d'un peptide unique, et en particulier de celui mis en avant par cette équipe, est loin d'être prouvée (Marnet & Komara, 2008). Silanikove et al. (2000) ont d'ailleurs démontré l'effet inhibiteur d'autres peptides issus de la dégradation des caséines, et Stull et al. (2007) ont clairement identifié un contrôle sérotoninergique des jonctions serrées qui peut altérer l'activité synthétique des CEM.

2.5. Approches expérimentales pour l'étude anatomo-physiologique de la glande mammaire

Les études concernant le développement et le fonctionnement de la glande mammaire peuvent se faire *via* différentes approches *in vivo* ou *in vitro*. Le choix du modèle dépend essentiellement de la question posée et du niveau d'investigation souhaité.

2.5.1. Approches *in vivo*

Les études *in vivo* nécessitent la mise en place de prélèvements de matériel biologique mammaire. Des prélèvements de tissu mammaire peuvent être réalisés par prélèvement de la mamelle dans son intégralité lors de l'abattage de l'animal, ou par

biopsie, qui permet le prélèvement de petits échantillons. Farr et al. (1996) ont développé une méthode de prélèvement de tissu mammaire par biopsie qui permet l'échantillonnage de carottes de tissu d'environ 600 mg (**Figure 9A**). Cette méthode permet une étude en dynamique de l'évolution du tissu sécréteur dans la mesure où plusieurs prélèvements peuvent être effectués sur un même quartier, et où elle ne nécessite pas l'abattage des animaux. En revanche, elle présente également certaines limites. Dans le cadre de l'étude du développement de la glande mammaire à la puberté, une biopsie peut être difficile à réaliser si la mamelle est trop petite. Le problème inverse se pose dans le cadre d'études sur la glande mammaire en lactation. En effet, une glande mammaire bovine en lactation pèse entre 20 et 30 kg. La glande mammaire est un organe hétérogène, composé de différentes zones anatomiques et de différents tissus (cf. chapitre 2.I.). Il est donc légitime de se poser la question de la représentativité de 600 mg de tissu par rapport à un organe dont la masse est 50 000 fois supérieure (**Figure 9B**).

Le prélèvement de la mamelle dans son intégralité nécessite quant à lui l'abattage des animaux, mais permet un échantillonnage plus important, dans différentes zones du tissu sécréteur, ce qui le rend plus représentatif que le prélèvement par biopsie (**Figure 9B**).

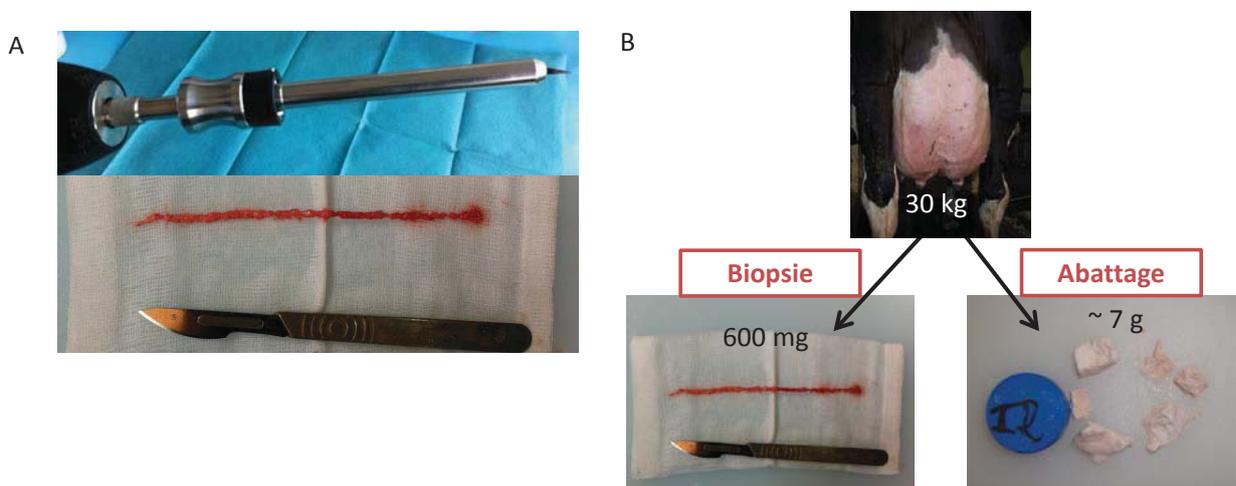


Figure 9. Méthodes de prélèvement de tissu mammaire. (A) Outil pour biopsie mammaire et carotte de tissu obtenue par la méthode proposée par Farr et al. (1996). (B) Représentativité des prélèvements de tissu mammaire par biopsie ou lors de l'abattage.

Les prélèvements par biopsies et lors de l'abattage sont donc deux approches complémentaires qui, lorsqu'elles sont associées, permettent une étude en dynamique du tissu mammaire tout en assurant une certaine représentativité du tissu sécréteur dans la mamelle au travers des prélèvements à l'abattage. Cependant, même s'il est parfois possible de n'effectuer des prélèvements que par biopsie, sans abattre les animaux, cette approche reste invasive.

L'utilisation de la fraction de CEM exfoliées dans le lait est une méthode non invasive, alternative à l'utilisation de biopsies mammaires. En effet, bien que la majorité des cellules présentes dans le lait soit des cellules immunitaires, une faible proportion des cellules du lait est composée de cellules épithéliales. Le nombre de ces CEM retrouvées dans le lait est directement lié à la structure de l'épithélium mammaire qui évolue au cours de la lactation et qui peut également être influencé par certaines pratiques d'élevage telles que des variations de la fréquence de traite ou encore par l'état sanitaire de la mamelle. Cette fraction cellulaire peut être identifiée par cytométrie de flux, et isolées grâce à l'utilisation d'un anticorps dirigé contre la cytokératine 8-18, spécifiquement exprimée par les CEM. Un marquage TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labelling) réalisé sur cette fraction cellulaire, isolée du lait de chèvre, et analysé par cytométrie de flux a permis d'estimer que 10% de ces cellules étaient apoptotiques. Cependant, parmi les 90 % restantes, une analyse de la viabilité des CEM du lait basée sur la capacité des cellules viables à exclure le colorant bleu trypan de leur cytoplasme, n'a mis en évidence que 40% de cellules viables (Boutinaud et al., 2002b). Les CEM viables contenues dans le lait peuvent malgré cela être mises en culture ou être utilisées pour des analyses transcriptionnelles représentatives. Ainsi, à partir des CEM contenues dans le lait de chèvre, Ben Chedly et al. (2010) ont pu mettre en évidence l'expression différentielle de gènes impliqués dans l'activité de synthèse du lait et dans des processus apoptotiques en réponse à une variation de la fréquence de traite.

2.5.2. Approches *in vitro/ex vivo*

Des études pharmacologiques sur les CEM peuvent être également menées *in vitro* ou *ex vivo*. Ces études concernent la réponse à un traitement d'un type cellulaire en particulier. Elles permettent de s'affranchir de l'ensemble des communications hormonales systémiques et paracrines en isolant un ou quelques types cellulaires du reste de

l'organisme. Des cultures primaires de CEM ont été établies à partir des cellules exfoliées dans le lait (Buehring, 1990) ou à partir d'explants mammaires purifiés (McGrath, 1987). Ces modèles d'étude *ex vivo* sont les plus à même de répondre à un stimulus en restant fidèles aux mécanismes qui ont lieu *in vivo*. Cependant ces cellules en culture ont une durée de vie limitée et ne peuvent excéder 16 passages (Huynh et al., 1991).

Des lignées de CEM sont également disponibles. Deux lignées principales de CEM bovines ont été largement caractérisées et utilisées : la lignée BME-UV développée par Zavizion et al. en 1996, et la lignée MAC-T développée par Huynh et al. en 1991. Ces deux lignées cellulaires ont été obtenues à partir de cultures primaires de CEM bovines. Ces cellules ont été immortalisées par transfection stable d'un plasmide contenant la séquence codant pour le grand antigène T du virus simien 40 (ou SV40). Cette transfection leur a conféré la capacité à proliférer sans se détériorer dans un milieu de culture adapté. Ces deux lignées présentent des caractéristiques morphologiques propres aux CEM, telles que l'acquisition d'une forme cubique, la présence de microvillosités et de desmosomes, ainsi que l'expression de certains marqueurs biochimiques comme les cytokératines spécifiques des CEM (Huynh et al., 1991 ; Zavizion et al., 1996). Les cellules BME-UV comme les cellules MAC-T possèdent également la capacité à synthétiser certains constituants du lait. Ainsi, les cellules BME-UV expriment l' α -lactalbumine et l' α -caséine (Zavizion et al., 1996) tandis que les cellules MAC-T sont capables de produire et de sécréter dans le milieu de culture de l' α -lactalbumine et des caséines α et β (Huynh et al., 1991 ; Zhou et al., 2008). L'utilisation de ces deux lignées par différentes équipes de recherche a permis d'affiner leur caractérisation. Au regard des résultats obtenus par Zarzynska et al. (2005), il semblerait que la lignée BME-UV soit un bon modèle pour l'étude des actions d'hormones lactogéniques ou anti-lactogéniques telles que la GH et la GHIH (GH Inhibiting Hormone). La lignée MAC-T est également réceptive à la GH (Zhou et al., 2008) et à la Prl (Huynh et al., 1991) mais serait un modèle plus pertinent pour étudier l'action des stéroïdes sexuels, notamment l'œstradiol et la progestérone (Zarzynska et al., 2005).

3. CONTEXTE :

3.1. Description du positionnement et chronologie :

Depuis toujours je suis passionné par la biologie animale ; c'est ainsi que j'ai basé ma formation universitaire (DEUG, Licence, Maîtrise) à Rennes sur l'acquisition de connaissances axées sur la biologie et la physiologie animale. A l'issue de ma maîtrise, j'ai fait le choix d'approfondir mes connaissances dans ce domaine en intégrant le DEA de Physiologie de la Reproduction de l'Université Paris VI où j'ai eu l'opportunité d'avoir un enseignement de grande qualité avec de nombreuses interventions de chercheurs INRA et un séjour de deux semaines sur le site INRA de Nouzilly. Mon stage de DEA dans le laboratoire du Pr. Ozon m'a permis d'avoir une « vision » biochimique du monde animal par l'étude d'une protéine phosphatase de l'ovocyte de Xénope.

Par la suite, j'ai choisi de compléter ma formation en effectuant un Doctorat d'Immunologie à l'Institut Pasteur de Paris dans le laboratoire de signalisation immunoparasitaire sous la direction du Dr Gordon Langsley. Cette thèse m'a permis de travailler sur le parasite *Theileria* qui infecte uniquement les bovins et qui provoquent de lourdes pertes économiques dans les régions d'endémie. C'était pour moi l'occasion d'étudier, à l'échelle cellulaire et à travers une pathologie bovine sévère, un modèle de transformation lymphocytaire. Ce travail m'a permis de compléter mes compétences biochimiques et moléculaires mais également d'acquérir un savoir dans le domaine de la mort cellulaire programmée et de la cancérologie. Au cours de ma thèse, j'ai également été responsable de la mise en oeuvre d'une nouvelle stratégie anti-tumorale, la « Drug Phosphatase Technology » dans le cadre d'un Projet Transversal de Recherche de l'Institut Pasteur dirigé par le Dr Garcia. Les résultats que j'ai obtenus à travers ce travail ont permis à l'Institut Pasteur de déposer quatre déclarations d'invention dont deux ont été transformées récemment en brevet international. Cette expérience m'a permis de collaborer avec de nombreux chercheurs et d'intégrer tous mes résultats pour faire le lien entre des approches cellulaires et moléculaires et une vision plus appliquée de mon travail. Ces trois années de travail ont été marquées par la présentation de mes résultats et ceux de mes collaborateurs lors de différents congrès internationaux, et concrétisées par plusieurs publications.

A la suite de cette formation complète, j'ai effectué un post-doctorat au sein du laboratoire d'Immunologie Cellulaire et Tissulaire du Pr. Patrice Debré à l'hôpital de la Pitié-Salpêtrière. J'ai choisi ce laboratoire car je voulais acquérir une expérience dans le domaine des pathologies humaines que sont les leucémies lymphoïdes et myéloïdes. Ce projet a été pour moi l'occasion de compléter mes connaissances techniques et intellectuelles dans le domaine de l'apoptose, et de déterminer le plus précisément possible les défaillances de ce processus dans différentes hémopathies.

En octobre 2005, j'ai été recruté en tant que CR2 dans l'équipe BIOLAIT « Régulation de l'activité métabolique et sécrétrice de la mamelle et qualité du lait » de l'Unité Mixte de Recherches Production du Lait (UMR PL). Depuis le 1er janvier 2012 (CR1 depuis 2009), je fais partie de la nouvelle UMR PEGASE (Physiologie, Environnement et Génétique pour l'Animal et les Systèmes d'Élevage) et je suis intégré au sein de l'équipe Physiologie de la lactation et synthèse du lait. Le projet de l'équipe « Physiologie de la lactation et synthèse du lait » s'inscrit en partie dans la continuité des travaux de l'équipe Biolait de l'UMR PL. Il vise à mieux comprendre le fonctionnement de la glande mammaire chez les animaux ruminants et porcins afin de valider des stratégies d'élevage acceptables par les éleveurs, les consommateurs et les citoyens et auxquelles les animaux peuvent s'adapter. Quant à mes recherches, elles s'intègrent dans les missions de cette UMR qui sont d'acquérir des connaissances sur la biologie des femelles laitières et la maîtrise de la lactation et de mettre en œuvre ces connaissances pour développer des pratiques d'élevage répondant aux demandes émanant des filières (efficacité de la production, qualité des laits) et aux exigences de la société (impact environnemental de la production, bien-être animal). Mes recherches s'intègrent également dans le schéma stratégique du département INRA PHASE (Physiologie Animale et Systèmes d'élevage) où elles dépendent du champ thématique Production.

3.2. Contexte socio-économique :

La production de lait en France constitue un élément important de l'agriculture française, les exploitations laitières valorisant environ 8.2 M d'ha (28% de la surface agricole utile) et produisant plus de 22 millions de tonnes de lait. La filière française concerne

aujourd'hui un peu plus de 200 000 emplois entre les secteurs de la production et de la transformation et génère un excédent commercial de plus de 3 milliards d'euros.

Habitée depuis plusieurs décennies à une grande stabilité avec le système des quotas et une organisation nationale très structurée, elle se trouve aujourd'hui confrontée à plusieurs défis nouveaux et importants.

- La stabilité des marchés n'est plus assurée par des systèmes de régulation et la sortie des quotas annoncée va accentuer le problème de la fluctuation du prix du lait déjà observé. De nouvelles formes plus flexibles de négociation des prix, des volumes et de la qualité du lait vont sans doute émerger.
- L'agrandissement des exploitations, plus lent que dans la plupart des pays voisins, s'est aujourd'hui accéléré avec en perspective des problèmes de cohérence des systèmes et des structures d'exploitation, mais aussi de travail, la production de lait par travailleur augmentant. Ce problème du travail est également accentué par une baisse des qualités d'élevage des vaches laitières (reproduction, santé) et des contraintes moins bien acceptées qu'auparavant (astreintes de traite).
- La question de l'environnement a pris une place importante dans les préoccupations des systèmes laitiers. Plus de la moitié des exploitations laitières sont en zones vulnérables et sont donc fortement incitées à réduire leurs rejets, notamment d'azote et de phosphore. De plus, la question du réchauffement climatique a mis en avant le problème des rejets de méthane par les ruminants ainsi que les émissions de protoxyde d'azote liées aux effluents. Mais l'élevage laitier qui présente une grande diversité de systèmes de production viables, peut offrir des alternatives pour maintenir la biodiversité et une certaine qualité de l'environnement.
- Enfin, la notion de qualité des produits s'est étendue aux problèmes de qualité nutritionnelle des produits laitiers, les matières grasses et en particulier les matières grasses saturées ayant été particulièrement mises en accusation. De plus, de nouvelles questions nutritionnelles apparaissent sur la nutrition minérale ou sur les allergies liées au lait.

C'est donc bien l'ensemble des questionnements de la place de l'élevage laitier dans le développement durable des territoires et des systèmes alimentaires qui est au cœur de

l'évolution de ce secteur dans les années à venir. Ce contexte en pleine mutation incite à considérablement renouveler les questions de recherche finalisées pour apporter des connaissances, des références, des outils et des innovations aux acteurs de la filière et en réponse aux attentes citoyennes.

3.3. Contexte scientifique:

Face à des situations économiques de plus en plus tendues et des fluctuations fortes du prix du lait, la maîtrise optimale du coût de production, tout en maintenant l'efficacité zootechnique de l'animal au long de sa carrière, s'impose. La carrière d'une vache laitière se décompose en plusieurs phases clés. La première, l'élevage de la génisse, dure généralement de 2 à 3 ans. Elle est suivie par une 2ème phase de vie de production (alternance de phases de lactation et de tarissement), qui dure en moyenne 3 à 4 ans, ce qui correspond à une moyenne de 3 lactations environ par vache à la réforme. Chez la chèvre, la durée d'élevage est d'environ 1 an, pour une durée de vie en production de 6 à 7 ans. La période d'élevage du jeune est essentielle car elle correspond à la croissance et au développement corporel, à l'acquisition de la maturité sexuelle, au développement de la glande mammaire et donc au final, à l'aptitude à se reproduire et à produire du lait.

De nombreuses études, y compris au sein de l'unité, ont montré l'importance de la phase pré-pubère chez la génisse sur le développement de la glande mammaire et sur le potentiel laitier ultérieur. Il existe peu de données chez la chevrette et de plus, les études se sont focalisées sur les aspects zootechniques (croissance, production de lait, développement pondéral des organes...), mais sans distinguer finement les stades de croissance. Certaines phases sont en effet probablement plus importantes et sensibles à des modifications fines de l'environnement, de l'alimentation... Ces modifications pourraient peut-être modifier finement et durablement le fonctionnement des cellules sécrétrices de lait, expliquant les effets observés ultérieurement. **Il apparaît ainsi que l'étude du développement de la glande mammaire et des facteurs capable de la moduler chez le jeune devient nécessaire pour répondre aux critères économiques des éleveurs et pour déceler plus précocement les aptitudes sécrétrices des jeunes femelles laitières.**

A l'heure actuelle, l'industrie laitière française tend à encourager une évolution de la production laitière (PL) permettant un approvisionnement régulier des laiteries au cours de l'année par les producteurs, afin de limiter les fluctuations du prix du litre de lait. En parallèle, les éleveurs cherchent à aménager leur temps de travail en pratiquant par exemple des vêlages groupés sur quelques mois de l'année ou l'omission d'une traite le dimanche, quotidiennement en période estivale, ou en fin de saison laitière. Ces aménagements ont pour but de faciliter l'organisation du travail de l'éleveur qui peut planifier différentes tâches sur l'année et ainsi se réserver davantage de temps libre. Le souci du bien-être animal est de plus en plus présent chez le consommateur citoyen et influence fortement l'évolution des conduites d'élevages. Or, dans les systèmes laitiers actuels, la majorité des vaches produit un veau chaque année et est en lactation pendant 10 mois de l'année. En début de lactation, au moment du pic de production, les besoins énergétiques nécessaires à la production du lait sont supérieurs à l'énergie que la vache peut absorber par son alimentation. Il lui est donc nécessaire de puiser dans ses réserves corporelles l'énergie manquante, on dit que la vache est en balance énergétique négative. Cette période, ainsi que la mise-bas constituent deux périodes à risques pour la vache, qui sont à la fois difficiles à gérer pour l'éleveur et mal perçues par le consommateur citoyen. L'allongement des lactations par l'amélioration de la persistance de lactation (phase de déclin de la PL qui succède au pic de production) permet de réduire la fréquence des vêlages et des périodes de balance énergétique négative, tout en maintenant une PL plus stable au cours de l'année. Pour maîtriser ce phénomène, il est nécessaire de comprendre les différents mécanismes impliqués dans la synthèse du lait et leur régulation au niveau de la glande mammaire et à l'échelle de l'animal.

La persistance de la lactation définit la vitesse à laquelle chute la PL après le pic de lactation. Cette persistance dépend du maintien du nombre de cellules épithéliales mammaires (CEM – cellules qui sécrètent le lait) et de l'organisation du tissu sécréteur dans la glande mammaire. Elle peut être modulée par différents facteurs d'élevage tels que la fréquence de traite, le niveau d'apport alimentaire, ou encore le statut sanitaire et hormonal de l'animal. L'ensemble de ces facteurs agit plus ou moins directement sur la balance prolifération/apoptose des CEM et sur le remodelage tissulaire. Les stéroïdes ovariens (œstradiol et progestérone) jouent un rôle important dans le développement et le

fonctionnement de la glande mammaire. Lors des phases de mammogenèse, à la puberté et au cours de la gestation, les stéroïdes ovariens stimulent la prolifération cellulaire et favorisent la mise en place des structures sécrétrices. En revanche, ils semblent avoir un effet négatif sur la glande mammaire en lactation. Plusieurs études menées chez la vache ont montré que l'administration d'œstradiol associé ou non à de la progestérone pendant la lactation induisait une baisse rapide de la PL et accélérât le processus d'involution de la glande mammaire. **Les mécanismes physiologiques mis en œuvre dans la glande mammaire et dans la CEM pour moduler la persistance de la lactation doivent être mieux maîtrisés. Dans ce contexte, il est nécessaire d'étudier si les stéroïdes ovariens influencent la persistance de la lactation et par quels mécanismes ils agissent sur la glande mammaire et sur les CEM en lactation.**

Mon activité de recherche depuis mon recrutement s'est ainsi déclinée ainsi en 3 sous-projets :

- 1-** Etudier le développement précoce de la glande mammaire dans l'objectif de mieux connaître les déterminants et les régulations du développement de la mamelle au cours de la phase pré-pubère chez le jeune ruminant.
- 2-** Etudier le rôle des stéroïdes ovariens sur le développement de la mammaire au cours de la lactation et sur la persistance de la lactation.
- 3-** Etudier l'effet des stéroïdes ovariens sur la cellule épithéliale mammaire.

4. ACTIVITES SCIENTIFIQUES :

4.1. Etude du développement mammaire chez le jeune :

4.1.1. L'ovariectomie comme modèle d'étude des déterminants du développement mammaire (2006-2011):

Le développement de la glande mammaire avant la puberté influence la production de lait chez les ruminants laitiers. Avant la puberté, les différentes phases de développement du parenchyme mammaire sont critiques pour la mise en place des futures unités sécrétrices de lait. Chez la génisse, de nombreuses études ont montré que les stéroïdes ovariens ont un rôle majeur dans le développement mammaire avant la puberté. En revanche, les sécrétions ovariennes ne semblent pas nécessaires pour la mammogénèse chez la brebis. Les études sur les effets systémiques des stéroïdes ovariens sur le développement mammaire étaient inexistantes chez la chevrete et les mécanismes moléculaires liés à l'influence des stéroïdes ovariens au cours de la mammogénèse n'étaient pas clairs. Dans un essai mené en 2007, nous avons montré que les stéroïdes ovariens étaient nécessaires pour le développement mammaire chez la chevrete avant la puberté (Dessauge *et al*, 2009). La suite de ce projet a été de déterminer la période critique dans laquelle les stéroïdes ovariens sont requis pour la mammogénèse chez la chevrete et quels étaient les mécanismes moléculaires mis en jeu.

Dans cet objectif, une approche par ovariectomies sériées a été utilisée. Des chevrettes ont été ovariectomisées (Ovx) à 1, 2, 3 et 7 mois d'âge ou ont subi des chirurgies témoins (Int) aux mêmes âges (8 chevrettes par date dont 4 ovx et 4 int). Les chevrettes âgées de 1, 2 et 3 mois étaient pré-pubères et les chevrettes âgées de 7 mois étaient pubères (contrôles positifs). A l'âge de 9 mois, tous les animaux ont été sacrifiés pour réaliser des études sur les glandes mammaires. Tout au long de l'essai, des prises de sang ont été effectuées dans le but de suivre les niveaux plasmiqes en progestérone.

La première étape de cette étude a consisté à valider notre modèle chirurgical. Ainsi, nous avons montré une absence totale de progestérone plasmatique circulante chez

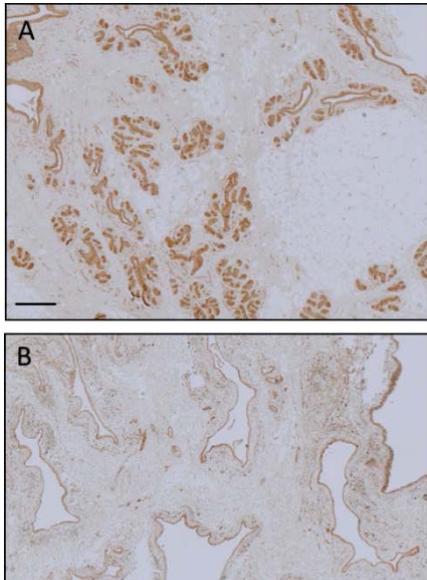


Figure 10. Effet de l'ovariectomie à 1 mois d'âge sur le développement du parenchyme mammaire. (A) Chevrete Int, (B) Chevrete Ovx-1.

l'ensemble des animaux ovariectomisés et une réduction de 57% du poids des utérus. Dans une étude précédente (Dessaige et al., 2009), nous avons montré que l'ovariectomie chez la chevrete pré-pubère provoquait une diminution significative de l'œstradiol. L'ovariectomie chez la chevrete provoque donc clairement une diminution des stéroïdes ovariens comme cela a été décrit chez la génisse (Berry et al., 2003). De manière intéressante, nous avons montré que l'organisation du tissu mammaire avait été négativement affectée par l'ovariectomie sans pour autant mettre en

évidence une différence de poids de glande mammaire entre les différents lots. Les analyses histologiques ont révélés que chez les animaux ovariectomisés de manière précoce (avant 3 mois d'âge), le parenchyme mammaire présentait des structures mammaires rudimentaires et non développées (**Figure 10**). En revanche, chez les animaux témoins, les glandes mammaires étaient correctement structurées et organisées en lobes et lobules avec des canaux épithéliaux bien développés.

Ces défaillances de développement mammaire chez les animaux ovariectomisés de manière précoce étaient systématiquement associées avec une réduction significative de la surface épithéliale mammaire. De plus, nous avons observé que les quantités de la protéine FABP-4 (Fatty Acid Binding Protein), marqueur spécifique du tissu adipeux (Samulin et al., 2008) étaient augmentées chez les animaux ovariectomisés.

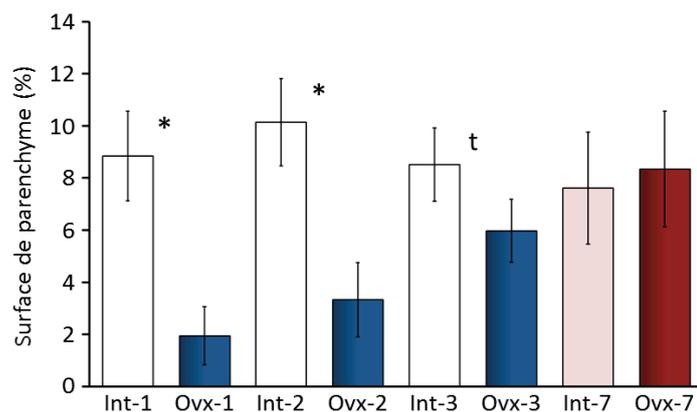


Figure 11. Effet de l'ovariectomie sur le développement du parenchyme mammaire. Les surfaces du tissu épithélial ont été mesurées à l'aide du logiciel JMicroVision.

L'ensemble de ces résultats suggérait ainsi que l'ovariectomie, pratiquée avant la puberté, favoriserait le développement du tissu adipeux mammaire à la place du tissu épithélial mammaire (**Figure 11**). Ces observations étaient en accord avec celles obtenues chez la génisse. Berry et al. (2003) avaient montré que des génisses ovariectomisées à 2.5 mois d'âge et euthanasiées à 9 mois présentaient une réduction significative de l'épithélium mammaire associée à une augmentation du tissu adipeux.

A travers cette étude, nous avons également montré que la suppression de la source principale d'œstradiol et de progestérone avant la puberté avait provoqué une diminution de la concentration en ADN mammaire et de la prolifération des CEM. Ces effets ont également été identifiés chez la génisse. La prolifération des cellules mammaires chez des génisses ovariectomisées avant la puberté était 10 fois plus faible que chez les animaux intacts. De plus, chez les génisses ovariectomisées, moins d'1% des CEM étaient en prolifération contre 2.5% chez les animaux intacts. Dans notre expérimentation, nous avons également confirmé que le nombre de CEM marquées positivement avec Ki67 (marqueur de prolifération, **Figure 12**) et le niveau de PCNA (protéine liée à la prolifération) étaient affectés négativement par l'ovariectomie. Ces résultats montrent que les sécrétions ovariennes contrôlent la prolifération des cellules épithéliales mammaires avant la puberté.

Les CEM sont entourées d'une structure stromale composée d'adipocytes, de fibroblastes, de vaisseaux sanguins et de matrice extracellulaire. Pour le développement et la croissance des canaux mammaires dans ce

stroma, le remodelage de la glande est essentiel. En 2009, nous avons montré que l'ablation des ovaires avant la puberté induisait une dérégulation négative des niveaux de nombreuses protéines impliquées dans l'adhésion cellulaire (Famille des cadhérines). Dans cette

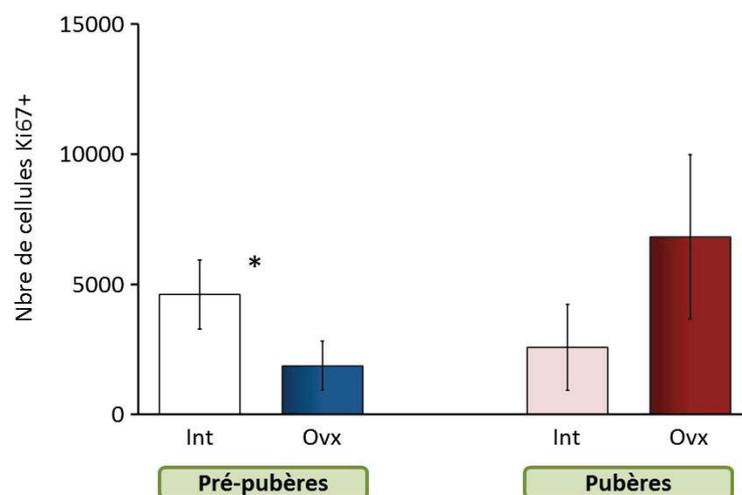


Figure 12. Effet de l'ovariectomie sur la prolifération des CEM déterminée par l'immunodétection de Ki67 et rapportée par mm² d'épithélium mammaire.

expérimentation, nous avons observé que les niveaux de la protéine E-Cadhérine étaient diminués par l’ovariectomie mais uniquement chez les animaux ovariectomisés à 1 et 2 mois d’âge. Ainsi l’organisation rudimentaire de la glande mammaire que nous avons observée suite à l’ovariectomie avant la puberté et plus précisément avant 3 mois d’âge, pourrait être due à une réduction à la fois de la prolifération cellulaire et de l’adhésion cellulaire. Les métalloprotéases (MMPs) sont également connues pour jouer un rôle déterminant au cours de la mammogenèse à la puberté, au cours de la gestation et au moment de l’involution. Durant la mammogenèse, l’expression de la MMP-2 est augmentée après l’initiation de la puberté durant le développement et la ramification des canaux mammaires. Les MMPs influencent également la balance prolifération/apoptose. Chez la souris, la sur-expression de la MMP-3 dans la glande mammaire induit une augmentation de la prolifération des CEM (Simpson et al., 1994 ; Witty et al., 1995). Dans cette étude, l’activité des MMPs mesurée sur l’ensemble des animaux montre que celle-ci est diminuée chez les animaux ovariectomisés à 1 et 2 mois d’âge. Nous avons donc fait l’hypothèse que les sécrétions ovariennes étaient étroitement associées avec l’expression ou l’activation des MMPs au cours de la phase pré-pubère précoce. Par conséquent, la diminution de l’activité des MMPs pourrait contribuer à la diminution de la prolifération des CEM et au remodelage de la glande mammaire médiées

par les protéines de la matrice extracellulaire.

L’altération très marquée du développement mammaire observée chez les animaux ovariectomisés à 1 et 2 mois d’âge était associée à une diminution significative de l’expression du récepteur à

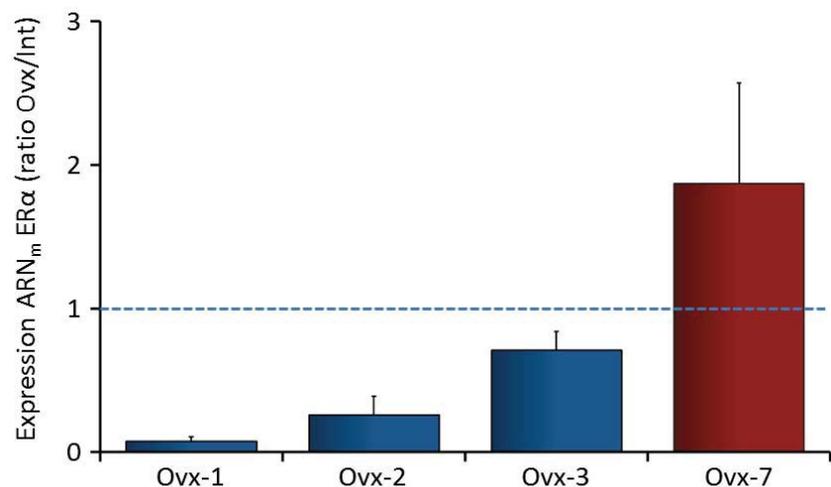


Figure 13. Effet de l’ovariectomie sur l’expression du récepteur ERα évaluée par RT-qPCR. Les niveaux sont rapportés aux groupes intacts.

l’œstradiol ERα (**Figure 13**) et à l’absence de l’expression du récepteur à la progestérone (PR). L’expression des gènes codant pour les récepteurs à la progestérone sont sous le

contrôle des œstrogènes. La région promotrice des gènes codant pour les récepteurs à la progestérone contiennent un demi-site de liaison à l'œstrogène (Kastner et al., 1990). L'élément de réponse à l'œstrogène permet à ER α de se lier à la région promotrice de PR et d'activer sa transcription (Petz et al., 2004). Dans cet essai, nous avons inhibé les sécrétions ovariennes et donc les concentrations en progestérone et en œstradiol, ainsi la fixation d'ER α sur la promoteur de PR a pu être partiellement inhibée et par conséquent, la transcription de PR aurait été inactivée. Cette hypothèse expliquerait l'absence de transcription de PR observée chez l'ensemble des animaux ovariectomisés. Chez la génisse, ER α est principalement exprimé par les CEM (Capuco et al., 2002). Dans notre étude, nos données immuno-histochimiques confirment qu'ER α est exprimé au niveau du parenchyme mammaire. Chez les ruminants, l'ovariectomie précoce n'affecterait pas uniquement le développement du parenchyme mammaire mais diminuerait également le taux de prolifération et la réceptivité aux œstrogènes. La diminution de l'expression d'ER α chez les animaux ovariectomisés à 1 et 2 mois d'âge serait donc la conséquence de l'inhibition du feedback négative que l'œstradiol exerce normalement sur l'expression de son récepteur. Le feedback négatif médié par l'œstradiol sur les régions promotrices de nombreux gènes pourrait expliquer l'augmentation des niveaux de l'E-Cadhérine chez les chevrettes ovariectomisées avant la puberté. De plus, cette diminution de l'expression d'ER α n'a pas été observée chez les animaux ovariectomisés à 3 mois d'âge qui ne présentaient pas non plus de diminution significative de la prolifération des CEM. En utilisant des doubles marquages ER α -Ki67 sur des coupes de glandes mammaires issues de génisses traitées aux œstrogènes, Capuco *et al.* ont montré que 99% des cellules en prolifération n'exprimaient pas ER α . Ceci suggère que la prolifération des cellules mammaires en réponse aux œstrogènes peut être stimulée de manière paracrine *via* le tissu adipeux.

En conclusion, cette étude a montré que les sécrétions ovariennes jouaient un rôle prédominant dans le contrôle de la mammogenèse chez la chevrete pré-pubère. Nous avons ainsi mis en évidence l'existence d'une période critique (avant 2 mois d'âge), durant laquelle les sécrétions ovariennes sont indispensables pour un bon développement mammaire.

4.1.2. Effets de différents niveaux d'alimentation sur le développement de la glande mammaire et sur les performances laitières chez la chèvre (2010-2013):

Les conduites d'élevages des jeunes ruminants laitiers déterminent en partie leur niveau de production ultérieur. Les difficultés à atteindre un poids vif supérieur à 35 kg lors de la mise à la reproduction amènent les éleveurs à augmenter la densité énergétique et protéique des rations avant la puberté. Il a été cependant démontré, chez les bovins, qu'une croissance élevée des génisses avant la puberté peut affecter négativement le développement de la glande mammaire et ultérieurement le potentiel laitier de l'animal. Cette étude avait pour objectif d'évaluer cet effet chez les chèvres. Dans cet objectif, deux dispositifs expérimentaux ont été initiés en 2010 et en 2011 pour étudier l'impact de différents niveaux de concentrés (à volonté ou restreint) sur le développement de la glande mammaire et sur les performances laitières ultérieures, d'une part du sevrage à la mise à la reproduction (2010) et d'autre part, du sevrage à la mise bas (2011). Les principaux résultats ont montré que l'utilisation de l'alimentation à volonté chez la chevrette avait un impact positif sur la production de lait lorsqu'elle était appliquée durant un temps court et avant la mise à la reproduction.

Dans le cadre de la deuxième étude (2011), nous avons utilisé deux lots de 26 chevrettes qui ont été alimentées avec un concentré (1.5Mcal/17% protéines) distribué à volonté (HD) ou de manière restreinte (BD, condition d'élevage classique) avec paille et foin à volonté du sevrage à la mise bas. A mi-gestation, 6 animaux de chaque groupe ont été euthanasiés afin d'étudier le développement de la glande mammaire. L'ensemble des animaux restants ont été alimentés sur le même régime restreint à partir de la mise bas et les performances laitières ont été enregistrées.

Les courbes de poids vif ont montré que les animaux nourris à volonté avaient une croissance significativement plus élevée que les animaux nourris de manière restreinte (+18 Kg en moyenne à mi-gestation). Les poids des glandes mammaires ont également révélé que les mamelles issues des animaux HD étaient plus lourdes que celles issues des animaux BD (700g vs. 290g, $P < 0.001$).

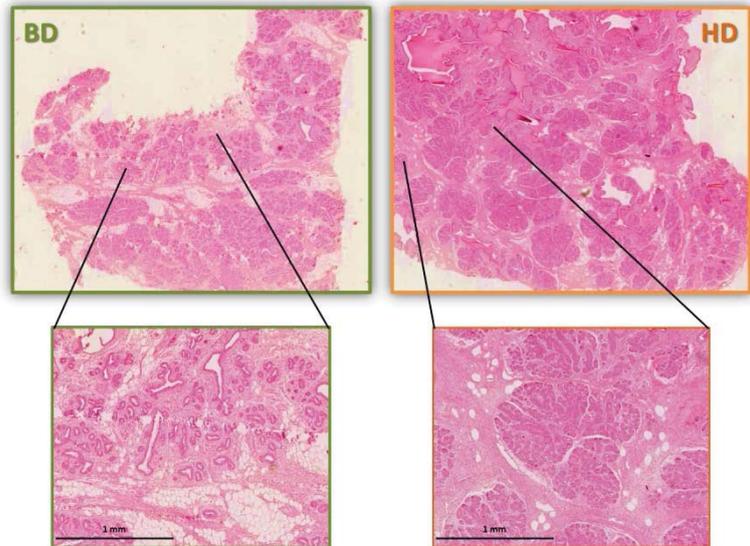


Figure 14 : Effet des régimes BD et HD sur le développement de la glande mammaire. Coloration Hématoxyline.

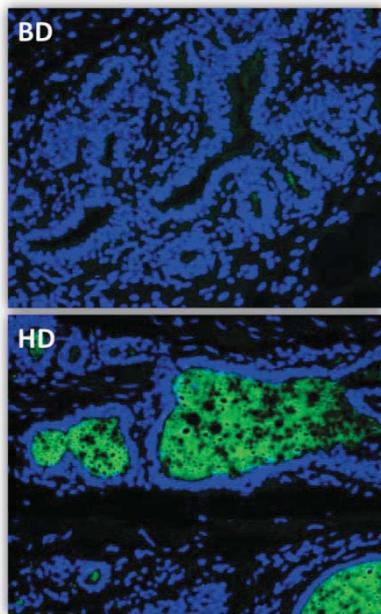


Figure 15 : Effet des régimes BD et HD sur la synthèse de constituants du lait. Marquage Bodipy.

Les analyses histologiques ont montré que les animaux alimentés à volonté (HD) présentaient des structures mammaires (**Figure 14**) bien différenciées comparées à celles des animaux contrôles (BD). De plus, la présence de lait dans les glandes mammaires des animaux HD a été observée au moment de l'euthanasie. Les différentes analyses moléculaires ont montré qu'il y avait plus de tissu sécréteur, plus de canaux mammaires et moins de tissu adipeux chez les animaux alimentés à volonté. Les concentrations en prolactine, hormone lactogénique, étaient 20 fois plus élevées chez les animaux HD. Enfin, l'analyse histologique des glandes mammaires avec un marqueur spécifique des phospholipides (BodyPI) a révélé la présence en abondance de gouttelettes lipidiques dans les canaux mammaires des animaux HD alors qu'aucun marquage n'était présent chez les animaux BD (**Figure 15**).

En revanche, les performances laitières des animaux nourris à volonté du sevrage à la mise ont été négativement affectées par ce régime alimentaire. En effet, dès le début de leur

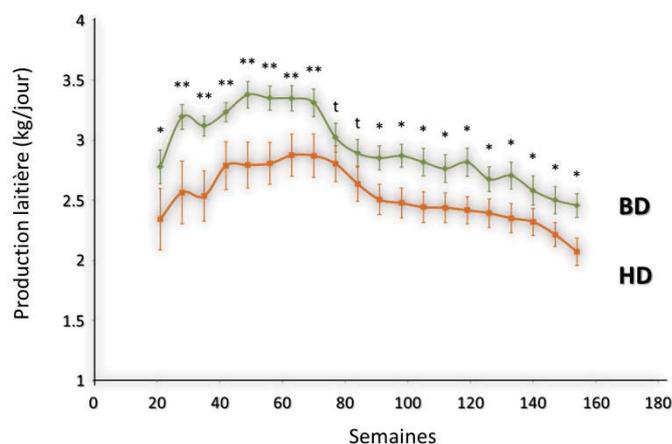


Figure 16 : Effet des régimes BD et HD sur le potentiel de production laitière en première lactation.

lactation, les animaux du groupe HD produisaient significativement moins de lait (-25%) que les animaux restreints (**Figure 16**). Ces animaux n'ont jamais réussi à produire autant que les animaux du groupe BD. De plus, aucun problème sanitaire n'a été rapporté dans cette étude.

En conclusion, l'alimentation utilisée à volonté et de manière intensive (ce qui est le cas dans de grandes exploitations) du sevrage à la mise bas, a entraîné de graves défauts de développement mammaire et une diminution du potentiel laitier de manière irréversible. L'alimentation à volonté du sevrage à la mise bas a dramatiquement affecté le développement de la mamelle, la différenciation des cellules épithéliales mammaires et le potentiel de production. Les résultats de ce travail sont à la base d'une demande de financement ANR pour répondre à l'appel à projets BioAdapt 2012 en collaboration avec N. Friggens.

4.1.3. Effets de différentes stratégies d'élevage de la génisse sur les performances de croissance et sur la glande mammaire (2010-2014):

Avec l'agrandissement de la taille des troupeaux laitiers, les effectifs de génisses de renouvellement ont tendance à fortement augmenter. L'organisation du travail est souvent affectée et des simplifications de conduite alimentaire peuvent aller à l'encontre de la maîtrise du coût alimentaire et de la longévité des vaches dans l'élevage. Le troupeau de génisses est par ailleurs un bon «valorisateur» de prairies non accessibles aux vaches laitières (et/ou non retournables) et de fourrages conservés de moindre valeur alimentaire. Mais les conditions d'élevage de la génisse laitière ont des impacts non négligeables, sur l'animal bien sûr (production de lait, carrière...), sur l'éleveur (travail occasionné, gestion de la reproduction...) mais aussi sur l'exploitation toute entière (coûts d'élevage, rejets azotés...). De nombreuses études, tant en France qu'à l'étranger, ont souvent mis en avant

leur importance économique (Heinrichs 1996, Pirlo et al 1997, Mourits et al 1999, Brisson 2006, Hadley et al 2006). La faisabilité et l'intérêt économique de la réduction de l'âge au vêlage de 36 à 24 mois chez la race Holstein est connue mais au cours des deux dernières décennies, les données des élevages suivis au contrôle laitier montrent qu'au niveau national, l'âge au 1er vêlage n'a pratiquement pas évolué (29-30 mois en moyenne), tout comme l'importance du renouvellement. La maîtrise de l'âge au premier vêlage (24, 30 ou 36 mois) selon le système de fourrage est cruciale. Des pratiques cohérentes avec l'objectif d'âge au 1er vêlage retenu sont essentielles. Dans le cas d'un vêlage à 24 mois d'âge, une puberté acquise précocement, une cyclicité maintenue, un bon état d'engraissement et un bon développement aux différents stades sont importants. Ceux-ci dépendent grandement des programmes alimentaires et des races. Il existe néanmoins une grande variabilité de performances, de maturité... non seulement entre races et individus, mais aussi entre systèmes d'élevage. La prise en compte de cette variabilité est essentielle dans la gestion à moyen et court terme des politiques de mise à la reproduction des génisses. Les effets de l'utilisation de la croissance compensatrice pratiquée en vue de maîtriser le coût alimentaire, sur la fertilité et la longévité des vaches constituent une piste intéressante de travail, mais ils doivent être testés en termes de faisabilité en élevage.

Dans cet objectif, un long projet de recherche est mené en sein de notre station expérimentale (2010-2014) afin d'étudier les effets de différents niveaux de croissance de la naissance à la mise à la reproduction chez la génisse de race Holstein combinés à des objectifs de vêlage de 22 ou 24 mois. Dans ce cadre, des animaux sont prélevés tous les 10 jours afin de suivre les niveaux plasmatiques en progestérone et des animaux ont été euthanasiés à différents âges afin de suivre le développement de la glande mammaire. Les analyses sont actuellement en cours au laboratoire.

4.2. Rôle des stéroïdes ovariens sur le développement de la mammaire au cours de la lactation et sur la persistance de la lactation (2009-2012):

Ce travail a fait l'objet de la thèse de Lucile Yart que j'ai co-encadrée avec Vanessa Lollivier (2009-2012) et qui a été soutenue le 3 juillet 2012.

La persistance de la lactation chez la vache laitière peut être influencée par des facteurs d'élevage et environnementaux (apport alimentaire, fréquence de traite, statut sanitaire et hormonal, photopériode, ...) qui agissent sur le nombre de CEM et l'organisation du tissu sécréteur dans la glande mammaire. Des études menées chez des vaches en lactation et présentant des niveaux plasmatiques en œstradiol et en progestérone élevés, soit en raison d'une gestation (Bachman et al., 1988 ; Bertilsson et al., 1997 ; Olori et al., 1997), soit à la suite d'injections de ces deux hormones (Mollett et al., 1976 ; Athie et al., 1996 ; Delbecchi et al., 2005), suggèrent que ces stéroïdes ont une influence négative sur la PL et la persistance de la lactation. Il a également été rapporté que, chez la vache en lactation, la suppression des sécrétions cycliques d'œstradiol et de progestérone, par une ovariectomie, améliore la persistance de la lactation (Du Roizel-Marlier, 2004). Cependant, les effets des sécrétions ovariennes sur la glande mammaire restent à étudier.

Dans ce contexte, au cours de cette thèse, nous nous sommes attachés à répondre aux questions suivantes : **les stéroïdes ovariens influencent-ils la persistance de la lactation ? Par quels mécanismes agissent-ils sur la glande mammaire et sur les CEM en lactation ?** La réponse à ces questions a nécessité la mise en place de plusieurs études *in vivo* et *in vitro*, permettant ainsi une approche intégrative du sujet.

Le premier objectif de cette thèse a été d'étudier, chez la vache en lactation, l'effet de la suppression des sécrétions ovariennes sur la persistance de la lactation et sur la glande mammaire (dynamique cellulaire et remodelage tissulaire).

Ce premier point a fait l'objet de deux études *in vivo*, menées sur un modèle de vaches ovariectomisées (une étude sur des vaches de race Normande x Holstein à l'UE 326 de l'INRA du Pin-au-Haras, et une étude sur des vaches de race Prim'Holstein dans les installations expérimentales de Méjusseume, rattachées à notre UMR 1348 PEGASE, à l'INRA de Saint-Gilles).

Le modèle d'ovariectomie a été utilisé lors de deux études menées sur des vaches en lactation, de races et de périodes de vêlage différentes. Il a permis de satisfaire l'objectif premier, à savoir d'étudier l'effet des stéroïdes ovariens sur la persistance de la lactation et sur l'activité du tissu sécréteur mammaire. Il est en effet d'usage de pratiquer l'ablation d'un organe pour étudier son action sur le reste de l'organisme. Ainsi, nous avons pu étudier les effets de l'œstradiol et de la progestérone sur la glande mammaire bovine en lactation en supprimant leur source principale. D'autres modèles expérimentaux, notamment de suppléments pharmacologiques en œstradiol et/ou progestérone, avaient initialement été envisagés. Cependant, les données de la littérature ne permettaient pas d'avoir un recul suffisant sur les doses de traitement à utiliser, la durée des traitements ou encore le stade de lactation à étudier. Mener de telles études aurait donc été très coûteux à la fois en temps et en argent, et aurait nécessité l'utilisation de nombreux animaux.

La suppression durable des sécrétions d'œstradiol et de progestérone par les ovaires, de manière chirurgicale, offrait la possibilité d'induire des différences de taux hormonaux circulants d'ordre physiologique entre les lots de vaches ovariectomisées et les lots de vaches témoins, et ce sur la quasi-totalité d'une lactation (les vaches ayant été opérées au 2^{ème} mois de lactation). De plus, la technique utilisée dans le cadre de cette thèse est une intervention chirurgicale faite par voie vaginale et est parfois pratiquée en élevage bovin laitier. Bien que l'objectif premier de cette thèse était d'étudier les mécanismes de régulation de la production laitière dans la glande mammaire par les stéroïdes ovariens, l'utilisation comme modèle expérimental de l'ovariectomie telle qu'elle peut être pratiquée en élevage nous a permis d'échanger avec les éleveurs sur les intérêts zootechniques de la suppression des sécrétions ovariennes. L'efficacité de l'intervention chirurgicale a été vérifiée dans les deux études *in vivo* par la pesée des utérus au moment de l'abattage, le développement de l'utérus étant positivement corrélé aux taux d'œstrogènes circulants (Johnson et al., 1997), et par des dosages de la progestérone plasmatique. La progestérone plasmatique a été dosée grâce à l'automate de dosage AIA-1800 (Kitvia, Labarthe-Inard, France) avec un kit de dosage de la progestérone dont les limites de détection inférieure et supérieure sont de 0,1 ng/mL et 40 ng/mL (0025281, Kitvia, Labarthe-Inard, France).

Cependant, ce modèle comportait certaines limites. Dans le cadre de nos études, une des limites majeures de l'ovariectomie était l'impossibilité de cibler exclusivement les sécrétions d'œstradiol ou de progestérone. En effet, bien que ces deux hormones soient les

principaux produits de sécrétion par les ovaires, la sécrétion d'autres facteurs ovariens est affectée par l'ovariectomie. C'est notamment le cas de l'ocytocine ou de facteurs de croissance. Ces facteurs agissent potentiellement au niveau de la glande mammaire et ont donc pu influencer les mesures réalisées sur les animaux au cours de ces études. Ainsi, l'ovariectomie ne nous a pas permis de distinguer l'action de l'œstradiol de celle de la progestérone ou d'éventuels autres acteurs ovariens.

Une autre limite du modèle *in vivo* est l'animal lui-même. La suppression d'une glande endocrine et donc de ses produits de sécrétion induit des bouleversements à l'échelle de l'organisme qui sont difficiles à contrôler et parfois même à mesurer. Vient s'ajouter à cela le fait que la glande mammaire est un organe composé de différents types cellulaires qui entretiennent des relations étroites de communication, les uns avec les autres. Il est donc difficile, par un simple prélèvement de tissu mammaire, d'étudier l'action d'une hormone ou d'un facteur sur un type cellulaire en particulier.

Ainsi, dans la 1^{ère} étude, nous avons utilisé un modèle expérimental de vaches ovariectomisées pendant la lactation. Les objectifs de cette étude étaient 1/ de tester l'hypothèse selon laquelle l'ovariectomie améliore la persistance de la lactation et 2/ d'étudier les effets de l'ovariectomie sur le tissu sécréteur mammaire en fin lactation.

Neuf vaches de race Normande x Holstein ont été réparties en deux lots équivalents : un lot ovariectomisé autour du 2^{ème} mois post-partum (Ovx, n = 4) et un lot témoin (Sham, n = 5). Les ovariectomies ont été réalisées par ligature des pédicules ovariens provoquant une nécrose sèche des ovaires dans la cavité abdominale. Les deux lots ont été maintenus en lactation pendant 14 mois. La PL a été enregistrée quotidiennement et des échantillons de lait ont été prélevés chaque semaine afin de suivre l'évolution de sa composition en matières grasses, en matières protéiques et en lactose, ainsi que le nombre de cellules somatiques. Des prélèvements de tissu mammaire ont été réalisés sur chaque vache, à 1,5 mois post-partum (2 semaines avant l'ovariectomie) puis lors de leur abattage, après 14 mois de lactation. Ces échantillons de tissu mammaire ont été utilisés pour étudier l'organisation tissulaire et l'expression de marqueurs d'apoptose (ou mort cellulaire programmée) dans la glande mammaire. Les objectifs de cette étude étaient 1/ de tester l'hypothèse selon laquelle l'ovariectomie améliore la persistance de la lactation et 2/ d'étudier les effets de l'ovariectomie sur le tissu sécréteur mammaire en fin lactation.

Pour la 2^{ème} étude, un schéma expérimental similaire à celui de la 1^{ère} étude a été utilisé. Quatorze vaches de race Prim'Holstein ont été réparties en deux lots équivalents : un lot ovariectomisé autour du 2^{ème} mois post-partum (Ovx, n = 7) et un lot témoin (Sham, n = 7). Les deux lots ont été maintenus en lactation pendant 13 mois. La PL a été enregistrée quotidiennement et des échantillons de lait ont été prélevés chaque semaine afin de suivre l'évolution de sa composition en matières grasses, en matières protéiques et en lactose, ainsi que le nombre de cellules somatiques. Des prélèvements de tissu mammaire ont été réalisés sur chaque vache à 6 semaines de lactation (2 semaines avant l'ovariectomie) puis à 16 et 34 semaines de lactation par biopsie, et à 52 semaines, lors de leur abattage. Des analyses protéomiques, enzymologiques et histologiques réalisées sur ces échantillons ont permis de suivre en dynamique l'évolution de la balance prolifération/apoptose, le remodelage tissulaire et la réceptivité aux stéroïdes ovariens dans la glande mammaire. De plus, les niveaux plasmatiques de progestérone ont été suivis grâce à des prélèvements de sang effectués régulièrement au cours de l'étude. Les objectifs de cette seconde étude étaient 1/ de suivre en dynamique l'effet de l'ovariectomie sur la glande mammaire en lactation, et 2/ de tester l'hypothèse selon laquelle la suppression des sécrétions cycliques de stéroïdes ovariens retarde l'involution de la glande mammaire.

Le deuxième objectif de cette thèse a été de caractériser plus finement l'action de l'œstradiol sur les CEM en début et en fin de lactation.

En complément du modèle *in vivo* de vaches ovariectomisées, nous avons utilisé un modèle *in vitro* afin de préciser l'action directe de l'œstradiol sur les CEM.

Plusieurs solutions avaient initialement été envisagées. Comme nous l'avons détaillé dans la synthèse bibliographique, nous avons à disposition différentes possibilités pour étudier *in vitro* l'action de l'œstradiol sur les CEM, chacune présentant des avantages et des inconvénients différents. La lignée MAC-T a été choisie pour cette étude dans la mesure où son utilisation n'est pas limitée dans le temps (en comparaison avec une culture primaire de CEM dont la durée de vie ne peut excéder 16 passages, Hyunh et al., 1991), et elle semble être la lignée la plus adéquate pour étudier l'action des stéroïdes sexuels (Zarzynska et al., 2005).

Nous avons utilisé ce modèle *in vitro* dans le but d'étudier les effets directs de l'œstradiol sur des CEM bovines en considérant deux états cellulaires distincts : un état de

cellules en activité et un état de cellules pré-apoptotiques. L'état pré-apoptotique a été jugé pertinent dans le cadre de cette étude car il peut être apparenté au statut physiologique des cellules sénescentes dont le nombre augmente dans la glande mammaire avec l'avancement de la lactation. Les cellules MAC-T ont été rendues pré-apoptotiques par un traitement à la camptothécine. La camptothécine est un agent apoptotique modéré qui induit l'inhibition de la topoisomérase I, enzyme nécessaire à la synthèse d'ADN. D'autres agents apoptotiques, tels que la staurosporine ou l'étoposide ont été testés à différentes doses. Grâce aux différents tests effectués, l'agent apoptotique (la camptothécine) et la dose (10 μ M) ont été choisis de manière à avoir une cinétique de réponse, en termes de cellules apoptotiques et pré-apoptotiques, comparable à celle obtenue suite à un traitement à l'œstradiol. Pour cette étude, nous avons privilégié une induction chimique de l'apoptose par rapport à une induction de l'apoptose par une déprivation en sérum de veau fœtal (SVF) dans le milieu de culture. En effet, la déprivation en SVF dans le milieu de culture a été utilisée par Zarzynska et al. (2005) sur des cellules de la lignée MAC-T afin de mimer la diminution progressive d'apport de nutriments et de facteurs de survie vers la glande mammaire, au cours de la lactation. Ce traitement a pour conséquence une augmentation de la mort cellulaire par apoptose, mais il semble également favoriser le phénomène d'autophagie (Zarzynska & Motyl, 2008). Nous avons donc fait le choix d'une induction chimique de la mort cellulaire pour obtenir d'une part un effet rapide, et d'autre part afin de mieux contrôler l'état physiologique de nos cellules en privilégiant le phénomène d'apoptose à celui d'autophagie.

Pour cette étude, des CEM de la lignée MAC-T ont ainsi été traitées avec des doses croissantes d'œstradiol (10^{-6} à 10^{-3} M) pendant 24h, 48h et 72h (seules les données à 48h sont présentées). Les doses les plus élevées d'œstradiol (10^{-4} et 10^{-3} M) ont induit une baisse de la prolifération et de la viabilité cellulaire, ainsi qu'une augmentation de l'activité des caspases 3/7, témoignant d'une augmentation de l'apoptose. Le second temps de l'étude a consisté à comparer l'effet de d'œstradiol sur l'apoptose des cellules MAC-T « normales » (mimant des CEM en début de lactation), et des cellules MAC-T rendues pré-apoptotiques par un traitement à la camptothécine (inducteur d'apoptose) (mimant des CEM en fin de lactation). Les deux modèles ainsi définis ont été traités ou non avec de l'œstradiol (10^{-4} M) pendant 2h, 6h, 24h et 48h.

Seuls les résultats de la deuxième étude « *in vivo* » et de l'étude « *in vitro* » seront présentés dans ce mémoire. En revanche, l'ensemble des résultats issus de ces trois études sera discuté par la suite.

4.2.1. Principaux résultats la deuxième étude « *in vivo* » :

4.2.1.1. L'ovariectomie limite le déclin de la production laitière après le pic de lactation

La production laitière (PL) a été enregistrée quotidiennement au cours de l'étude, et la composition du lait en matière grasse, matière protéique, lactose et nombre de cellules somatiques (SCC) a été évaluée chaque semaine.

L'ovariectomie des vaches au moment du pic de lactation augmente la production laitière de 8,1 % entre la 16^{ème} et la 52^{ème} semaine de lactation, par rapport aux vaches du groupe

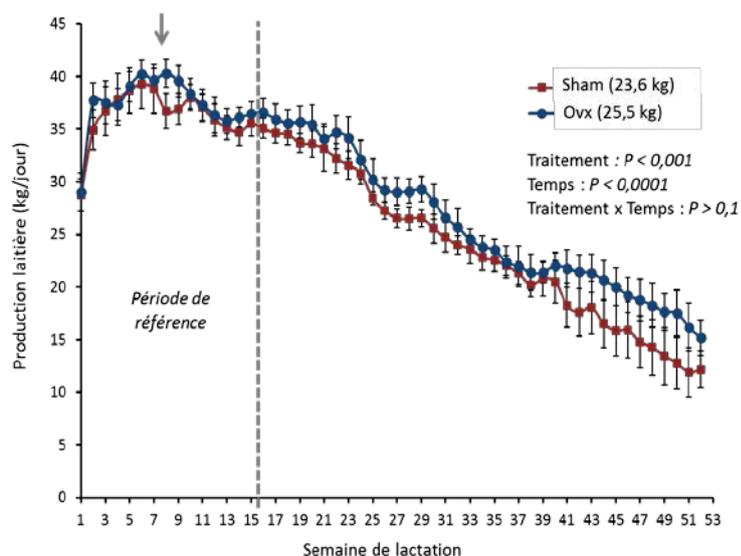


Figure 17. Effet de l'ovariectomie sur la production laitière pendant 52 semaines de lactation. Les données de production laitière pour les vaches témoins (Sham, n = 7, carrés rouges) et les vaches ovariectomisées (Ovx, n = 7, cercles bleus) sont exprimées en moyennes hebdomadaires de productions laitières journalières \pm SEM. La flèche indique le moment de l'ovariectomie. La production laitière moyenne des semaines 1 à 15 a été utilisée comme covariable pour l'analyse des données de production des semaines 16 à 52. La production laitière des semaines 16 à 52 est significativement plus élevée chez les vaches Ovx que chez les vaches Sham ($P < 0,001$). Un effet significatif du temps est mis en évidence pour l'ensemble de ces données ($P < 0,0001$).

Sham maintenues cycliques et non gestantes (25,5 kg vs 23,6 kg respectivement, $P < 0,0001$, **Figure 17**). L'augmentation de la quantité de lait produit par les vaches Ovx est accompagnée d'une augmentation des quantités totales produites de matière grasse ($P < 0,0005$), de matière protéique ($P < 0,05$) ainsi que de lactose ($P < 0,0001$). A l'inverse, l'ovariectomie tend à diminuer le nombre total de cellules dans le lait entre la

4.2.1.2. L'ovariectomie réduit les taux de stéroïdes ovariens circulants

Des prélèvements de sang réguliers au cours de l'étude ont permis de suivre l'évolution des concentrations plasmatiques en progestérone. Comme le montre la **Figure 18**, les taux de progestérone plasmatique sont inférieurs au seuil de détection (< 0,1 ng/mL) chez les vaches Ovx dès la 2^{ème} semaine après l'ovariectomie et pendant toute la durée de l'étude. Les vaches Sham présentent quant à elles des niveaux de progestérone plasmatique

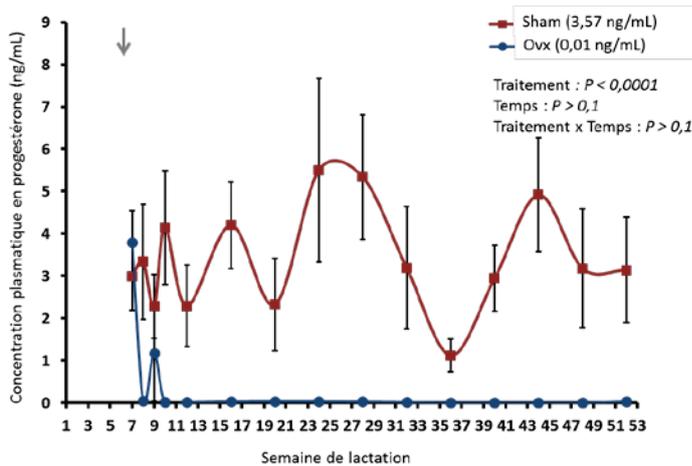


Figure 18. Effet de l'ovariectomie sur la concentration plasmatique en progestérone. La concentration plasmatique en progestérone a été mesurée chez les vaches témoins (Sham, n = 7, carrés rouges) et chez les vaches ovariectomisées (Ovx, n = 7, cercles bleus) régulièrement au cours de l'étude. Les données sont exprimées en valeurs moyennes ± SEM, en ng/mL de plasma. La flèche indique le moment de l'ovariectomie.

significativement plus élevés ($P < 0,0001$), de l'ordre de 3,4 ng/mL en moyenne.

Le développement du tractus génital est positivement corrélé aux taux d'œstrogènes circulants (Johnson et al., 1997). A l'abattage, les tractus génitaux ont été prélevés et pesés. La masse moyenne de tractus génital est réduite d'un tiers dans le groupe Ovx par rapport au groupe Sham ($P < 0,01$).

4.2.1.3. L'ovariectomie limite la régression du parenchyme mammaire

La pesée de mamelles (avec la peau, les trayons et les nœuds lymphatiques) lors de l'abattage des vaches, après 52 semaines de lactation, a mis en évidence une augmentation de 17,3 % de la masse mammaire chez les vaches Ovx (Ovx : 23,7 kg vs Sham : 20,2 kg, $P < 0,05$), associée à une augmentation de près de 10 % de la quantité totale d'ADN dans les mamelles ($P = 0,11$) (**Tableau 1**).

	Groupe		P
	Sham (n=7)	Ovx (n=7)	
Tractus génital (g)	922 ± 82	585 ± 36	0,003
Mamelle (kg)	20,2 ± 1,3	23,7 ± 0,8	0,04
ADN (mg)	28,4 ± 1,4	31,9 ± 1,5	0,11

Tableau 1. Effet de l'ovariectomie sur les masses de tractus génital, de mamelle et d'ADN total dans les mamelles. Lors de l'abattage des vaches, les tractus génitaux et les mamelles (avec la peau, les trayons et les nœuds lymphatiques) ont été pesés chez les vaches témoins (Sham, n = 7) et chez les vaches ovariectomisées (Ovx, n = 7). Le dosage d'ADN dans le parenchyme mammaire prélevé lors de l'abattage pour ces animaux a été rapporté au poids de mamelle.

L'analyse histologique de la morphologie du parenchyme mammaire après 52 semaines de lactation a montré une différence d'organisation du tissu sécréteur entre les deux groupes de vaches. Les vaches Ovx présentent un nombre moyen de lobules/ μm^2 de tissu inférieur aux vaches Sham, mais une surface totale de tissu sécréteur (surface des lobules) plus importante ($P < 0,01$, **Figure 19**).

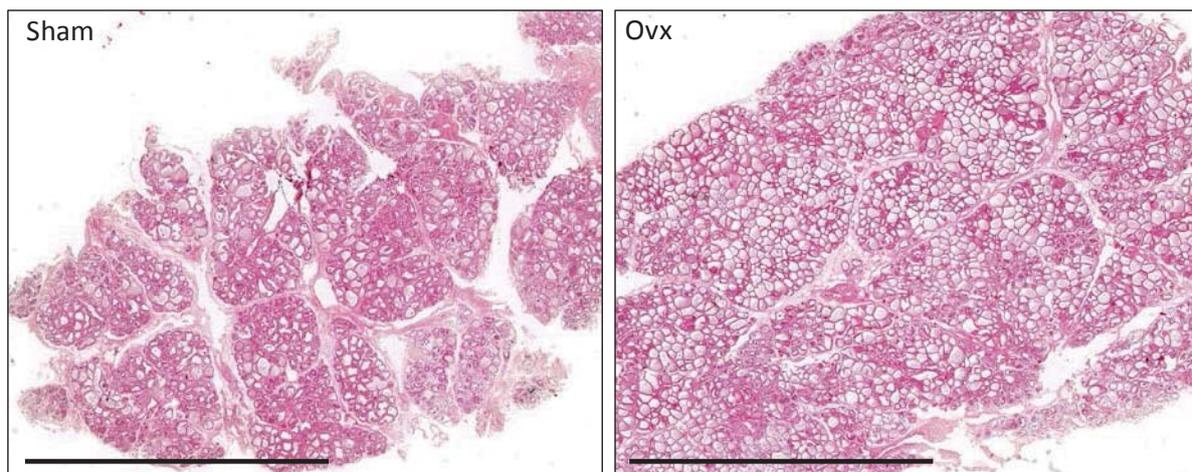


Figure 19. Effet de l'ovariectomie sur l'organisation du tissu sécréteur. Des coupes histologiques ont été réalisées sur des échantillons de parenchyme mammaire prélevés lors de l'abattage sur les vaches témoins (Sham, n = 7) et sur les vaches ovariectomisées (Ovx, n = 7). Ces coupes ont été colorées à l'hématoxyline et à l'éosine. La barre d'échelle représente 4 mm.

4.2.1.4. L'ovariectomie modifie l'équilibre de la balance prolifération/apoptose

L'équilibre de balance prolifération/apoptose des cellules dans le parenchyme mammaire a été estimé par la quantification de la protéine PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), un marqueur de prolifération cellulaire, et de la protéine PARP (Poly(ADP-ribose) polymérase) impliquée dans la fragmentation de l'ADN à la fin du processus d'apoptose.

Les niveaux de PCNA sont significativement plus élevés chez les vaches Ovx ($P < 0,05$) et diminuent significativement au cours du temps ($P < 0,0001$, **Tableau 2**) indépendamment du traitement (données non présentées). A l'inverse, la quantification de la protéine PARP a mis en évidence une baisse significative de son expression chez les vaches Ovx ($P < 0,01$, **Tableau**

2). Là encore, une baisse significative au cours du temps ($P < 0,0001$) est observée pour la

	Groupe		P
	Sham (n=7)	Ovx (n=7)	
PCNA/Actine	1,31 ± 0,08	1,67 ± 0,08	0,02
PARP/Actine	3,75 ± 0,29	2,40 ± 0,29	0,008

Tableau 2. Effet de l'ovariectomie sur l'expression de PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) et de PARP (Poly (ADP-Ribose) Polymerase).

protéine PARP (données non présentées).

L'activité des caspases 3/7, enzymes clés de différentes voies apoptotiques, a été mesurée dans le parenchyme mammaire.

L'activité des caspases 3/7 n'évolue pas de manière significative au cours du temps ($P > 0,1$), mais tend à être diminuée par l'ovariectomie à la 34^{ème} semaine de lactation.

4.2.1.5. L'ovariectomie limite le remodelage tissulaire mais n'influence pas les marqueurs d'involution

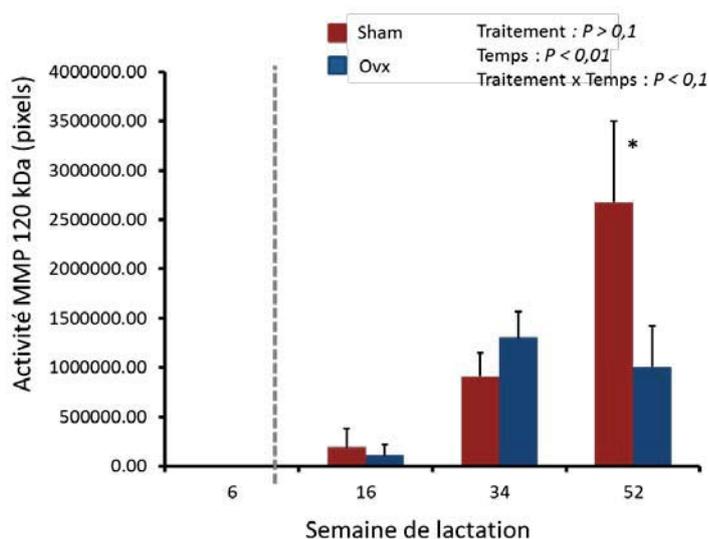


Figure 20. Effet de l'ovariectomie sur l'activité des gélatinases dans le lait. L'activité enzymatique des gélatines a été mesurée dans le lait des vaches témoins (Sham, n = 7) et des vaches ovariectomisées (Ovx, n = 7) à 6, 16, 34 et 52 semaines de lactation. L'activité d'une gélatinase de poids moléculaire de 120 kDa augmente au cours du temps ($P < 0,01$) et est significativement diminuée chez les vaches Ovx à 52 semaines de lactation (*, $P < 0,05$).

L'intensité du remodelage tissulaire dans la glande mammaire a été mesurée au travers de l'activité de gélatinases contenues dans le lait. L'activité de la gélatinase de poids moléculaire de 57 kDa, identifiée comme étant la MMP2, est significativement diminuée par l'ovariectomie à 16 semaines de lactation ($P < 0,0001$), mais ne présente pas de différence significative entre les deux traitements à 34 et 52 semaines. De manière intéressante, une seconde bande de dégradation,

non identifiée, a été quantifiée à 120 kDa. Cette bande est absente à 6 semaines de lactation et est apparue à la 16^{ème} semaine. Dans les deux groupes de vaches, son intensité augmente

progressivement entre la 16^{ème} et la 52^{ème} semaine de lactation ($P < 0,01$), mais est significativement inférieure chez les vaches Ovx à la 52^{ème} semaine ($P < 0,05$, **Figure 20**).

La quantification par western blot de la lactoferrine dans le parenchyme mammaire montre une baisse significative de son expression chez les vaches Ovx à 16 semaines ($P < 0,05$), et cette différence s'atténue et devient non significative à 34 et 52 semaines (**Figure 21**).

L'expression de l'E-cadhérine, protéine impliquée dans l'adhésion des CEM entre elles, augmente au cours du temps dans les deux groupes ($P < 0,0001$) et tend à être plus élevée chez les vaches Ovx à 52 semaines de lactation ($P < 0,1$).

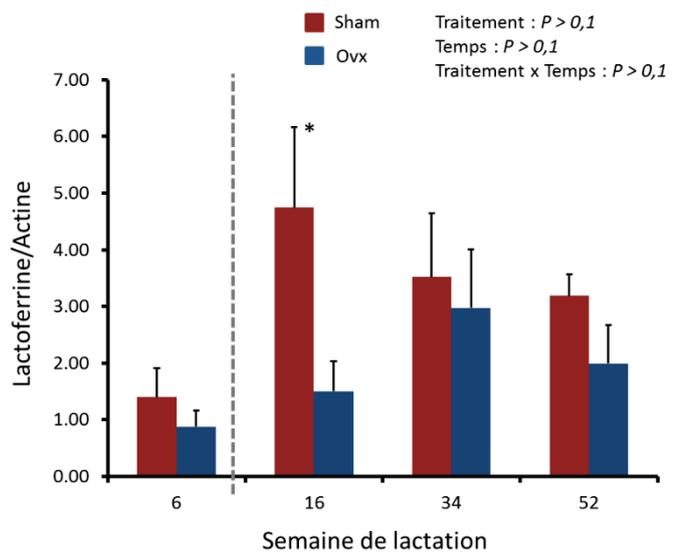


Figure 21. Effet de l'ovariectomie sur l'expression de la lactoferrine dans le parenchyme mammaire. La lactoferrine a été quantifiée par western blot dans le parenchyme mammaire chez les vaches témoins (Sham, n = 7) et chez les vaches ovariectomisées (Ovx, n = 7) à 6, 16, 34 et 52 semaines de lactation. Pour chaque quantification, la valeur obtenue pour la lactoferrine a été rapportée à la quantité d'actine β , protéine de référence, dans le même échantillon. (*, $P < 0,05$).

4.2.1.6. L'ovariectomie diminue la réceptivité aux stéroïdes ovariens dans le parenchyme et le tissu adipeux mammaire

L'expression des récepteurs à l'œstradiol et à la progestérone a été mesurée par western blot dans le parenchyme mammaire à 6, 16, 34 et 52 semaines de lactation, et dans le tissu adipeux mammaire à 52 semaines de lactation.

L'expression d'ER α dans le parenchyme mammaire augmente au cours du temps dans les deux groupes ($P < 0,0001$, **Figure 22A**). A 52 semaines de lactation, l'expression de ce récepteur est significativement diminuée chez les vaches Ovx dans le parenchyme mammaire ($P < 0,05$, **Figure 22A**) et dans le tissu adipeux ($P < 0,01$, **Figure 22B**).

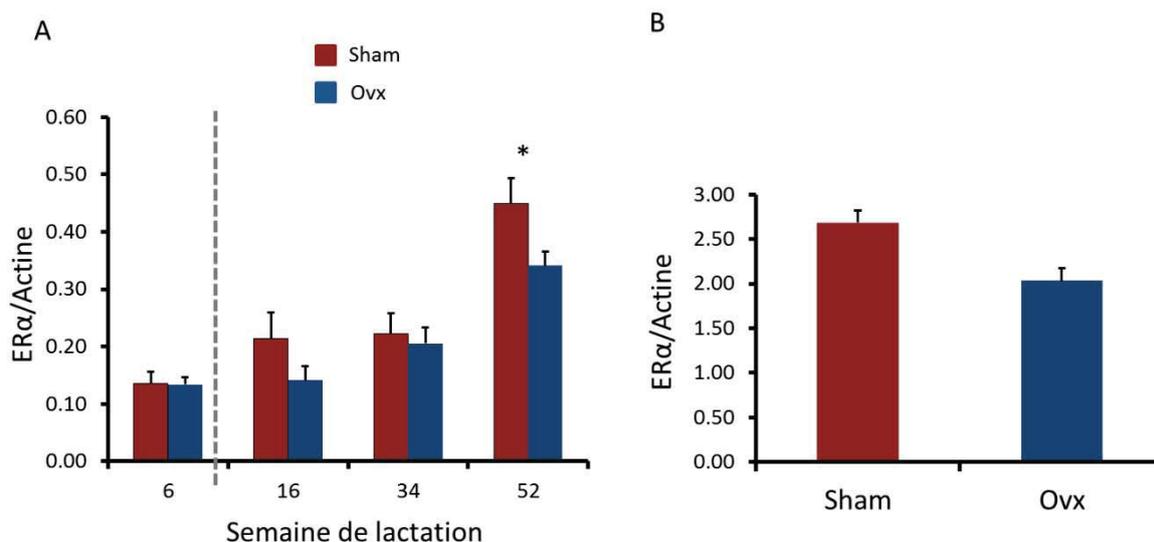


Figure 22. Effet de l'ovariectomie sur l'expression du récepteur α à l'œstradiol (ER α) dans le parenchyme et dans le tissu adipeux mammaire. A) La protéine ER α (60 kDa) a été quantifiée par western blot chez les vaches témoins (Sham, n = 7) et chez les vaches ovariectomisées (Ovx, n = 7) à 6, 16, 34 et 52 semaines de lactation dans le parenchyme mammaire. Pour chaque quantification, la valeur obtenue pour ER α a été rapportée à la quantité d'actine β , protéine de référence, dans le même échantillon. La valeur à 6 semaines de lactation a été utilisée comme covariable pour l'analyse des données à 16, 34 et 52 semaines. Les données sont exprimées en valeurs moyennes \pm SEM. L'expression de ER α dans le parenchyme mammaire est significativement diminuée chez les vaches Ovx à 52 semaines de lactation (*, $P < 0,05$). B) La protéine ER α (60 kDa) a été quantifiée par western blot chez les vaches ovariectomisées (Ovx, n = 7) et chez les vaches témoins (Sham, n = 7), à 52 semaines de lactation dans le tissu adipeux mammaire. Pour chaque quantification, la valeur obtenue pour ER α a été rapportée à la quantité d'actine β , protéine de référence, dans le même échantillon. Les données sont exprimées en valeurs moyennes \pm SEM. L'expression de ER α dans le tissu adipeux mammaire est significativement diminuée chez les vaches Ovx à 52 semaines de lactation ($P < 0,01$).

En ce qui concerne les récepteurs à la progestérone, plusieurs formes ont été identifiées dans le parenchyme et le tissu adipeux. Dans le parenchyme, la forme majoritaire est celle dont le poids moléculaire est de 130 kDa, identifiée comme étant PRB. Aucune expression différentielle de PRB n'est mesurée que ce soit entre les deux groupes ($P > 0,1$), ou au cours du temps ($P > 0,1$). Une forme à 80 kDa correspondant à PRA a également été identifiée, mais seulement à 52 semaines chez les vaches Sham (données non présentées). Dans le tissu adipeux mammaire, ces deux formes sont également présentes. Comme dans le parenchyme mammaire, PRA est environ 57 fois moins exprimée que PRB. L'expression de ces deux formes est significativement diminuée chez les vaches Ovx d'environ 47 % pour PRA ($P < 0,01$) et comme pour PRB ($P < 0,001$).

4.2.2. Principaux résultats de l'étude « *in vitro* » :

4.2.2.1. L'œstradiol diminue la prolifération et augmente l'apoptose des cellules épithéliales mammaires bovines MAC-T :

Dans un premier temps, nous avons étudié l'effet de l'E₂ (Œstradiol) sur la viabilité des cellules MAC-T. L'application de doses croissantes en E₂ (de 1x10⁻⁹ à 1x10⁻⁶ mol/ml) pendant 48 heures a induit une diminution de la viabilité cellulaire (-11% à 1x10⁻⁷ mol/ml et -26% à 1x10⁻⁶ mol/ml, P < 0.01, **Figure 23**). Des résultats similaires ont été obtenus après 24

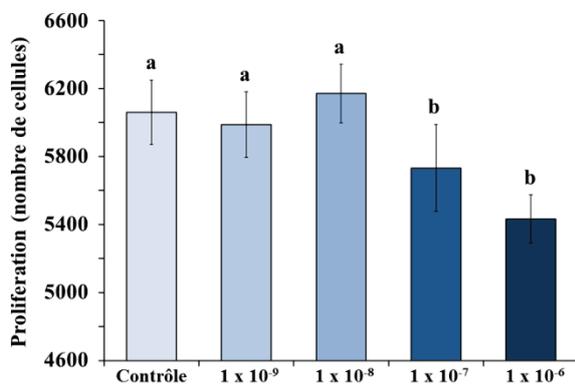


Figure 23. Les cellules MAC-T ont été cultivées pendant 48 h dans du milieu sans E₂ (Contrôle) ou contenant différentes concentrations d'E₂ (de 1 x 10⁻⁹ mol/mL à 1 x 10⁻⁶ mol/mL). Le nombre de cellules a été déterminé en utilisant la méthode CyQuant. Les barres représentent la moyenne ± les écarts types. Les différentes lettres sont significativement différentes (P < 0.05). Les expériences ont été répétées au minimum 3 fois.

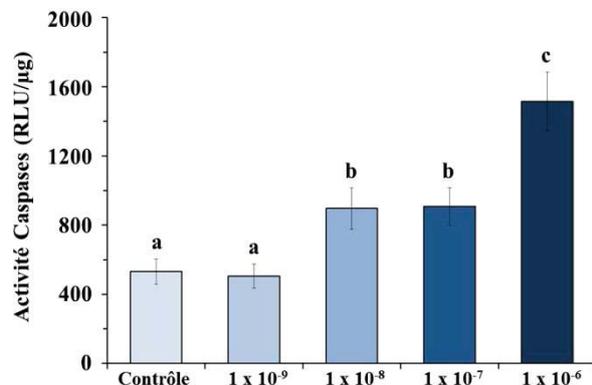


Figure 24. Les cellules MAC-T ont été cultivées pendant 48 h dans du milieu sans E₂ (Contrôle) ou contenant différentes concentrations d'E₂ (de 1 x 10⁻⁹ mol/mL à 1 x 10⁻⁶ mol/mL). L'activité des caspases 3/7 a été mesurée à partir des extraits protéiques totaux en utilisant le kit Caspase GLO. Les différentes lettres sont significativement différentes (P < 0.05). Les expériences ont été répétées au minimum 3 fois.

et 72 heures de traitement à l'E₂. Les

mêmes doses d'E₂ ont été utilisées pour l'effet de l'œstradiol sur la prolifération des cellules MAC-T. Comme nous l'avons observé sur la viabilité, les traitements par l'E₂ à des doses croissantes (de 1x10⁻⁹ à 1x10⁻⁶ mol/ml) appliquées pendant 48 heures ont induit une diminution du nombre de cellules (-6% à 1x10⁻⁷ mol/ml et -11% à 1x10⁻⁶ mol/ml, P < 0.01).

L'activité des caspases 3/7 a été quantifiée afin de déterminer le potentiel apoptotique de l'E₂ sur les cellules épithéliales mammaires bovines *in vitro*.

Après 48 heures de traitement, nous avons détecté des formes actives de caspases 3/7 à partir de la dose d'E₂ de 1x10⁻⁸ mol/ml (**Figure 24**). En fait, le traitement à l'œstradiol a augmenté l'activité des caspases 3/7 de manière dose-dépendante, suggérant que l'œstradiol a induit l'apoptose des cellules MAC-T.

4.2.2.2. L'œstradiol stimule l'expression de protéines cibles :

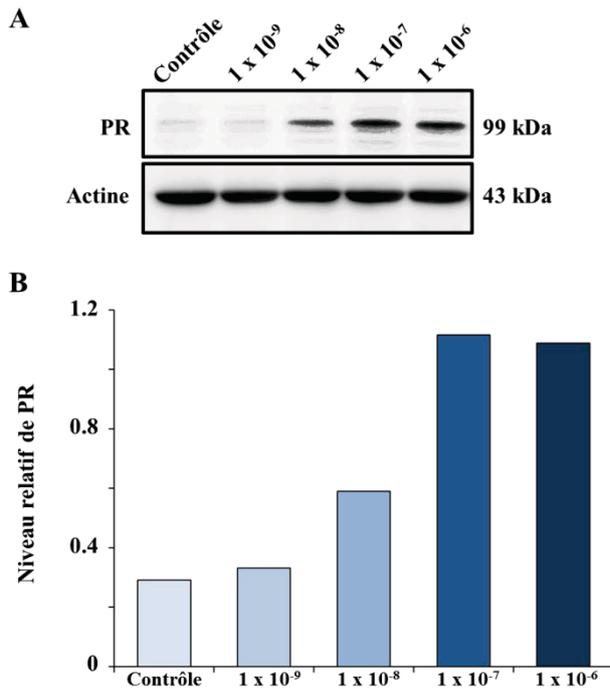


Figure 25. Les cellules MAC-T ont été cultivées pendant 48 h dans du milieu sans E₂ (contrôle) ou contenant de l'E₂ (de 1 x 10⁻⁹ mol/mL à 1 x 10⁻⁶ mol/mL). Les cellules ont été lysées dans du tampon MPER pour l'extraction des protéines totales and 15 µg de protéines ont été utilisées pour l'analyse par western de la protéine PR et de l'actine (A). Chaque bande a été quantifiée et normalisée par rapport à l'actine (B).

La réceptivité à l'œstradiol des cellules MAC-T a été évaluée à travers la quantification par western blot du récepteur nucléaire ERα. Nous avons montré que l'expression d'ERα était significativement augmentée en réponse à l'E₂ quel que soit la dose utilisée. Les niveaux du récepteur à la progestérone (PR) ont également été quantifiés (**Figure 25**). Son expression a été augmentée lorsque les cellules ont été traitées à 1x10⁻⁸, 1x10⁻⁷, 1x10⁻⁶ mol/ml avec une stimulation importante de son expression à 1x10⁻⁷ mol/ml après 48 heures de traitement (3 fois plus que dans le contrôle).

4.2.2.3. Effet de l'œstradiol sur l'induction de l'apoptose des cellules MAC-T :

La camptothécine (CPT) est un agent cytotoxique, souvent utilisé dans les traitements de cancers du sein, qui inhibe la topoisomérase I et induit l'apoptose. Nous avons ainsi utilisé cet agent pour pré-induire un état apoptotique des cellules MAC-T et étudier l'effet de l'E₂

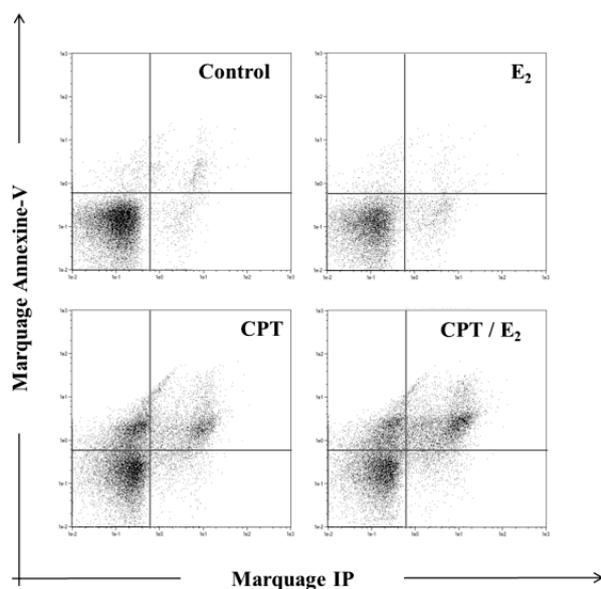


Figure 26. Les cellules MAC-T ont été cultivées pendant 48 h dans du milieu sans E₂ (contrôle) ou contenant 1×10^{-7} mol/mL d'E₂ (E₂), 10 μ M de CPT (CPT) ou 1×10^{-7} mol/mL d'E₂ + 10 μ M CPT (CPT/E₂). Les marquages à l'annexine V et à l'iodure de propidium (IP) ont été analysés par cytométrie en flux. Chaque plot correspond à 20000 cellules.

sur ces cellules pré-apoptotiques dans l'objectif de mimer le phénotype de MEC en fin de lactation.

Dans un premier temps, nous avons observé les changements de morphologie des cellules MAC-T traitées par la CPT (10 μ M), l'E₂ (1×10^{-7} mol/ml) ou par la combinaison des deux (CPT/E₂). Les cellules traitées par la camptothécine ont subi des modifications importantes au niveau de la surface cellulaire et de leur morphologie générale alors que ces modifications sur les cellules traitées à l'E₂ seule étaient moins évidentes. De façon intéressante, les cellules traitées à la fois par la CPT et par l'E₂ avaient de nombreuses déformations au niveau de la membrane plasmique et des perturbations au niveau de leur adhésion cellulaire. Ces

observations ont d'ailleurs été confirmées par des analyses de prolifération cellulaire. En effet, nous avons montré que l'E₂ avait un effet négatif sur la prolifération des cellules MAC-T lorsqu'il était associé à la CPT que ce soit après 24 ou 48 heures de traitement.

Nous avons ensuite cherché à caractériser plus précisément l'apoptose induite par l'E₂ \pm CPT. Les résultats obtenus par cytométrie en flux indiquaient qu'un traitement E₂/CPT pendant 48 heures avait augmenté le nombre de cellules Annexine-V positives et iodure de propidium positives (respectivement de 3% et 7%, **Figure 26**). De manière intéressante, l'E₂

a induit un switch de la population apoptotique précoce (cellules annexine-V positives) à une population apoptotique tardive (cellules doubles positives Annexine-V / IP).

4.2.2.4. Le traitement par l'œstradiol a induit une activation des voies de signalisation impliquées par les caspases :

Les effets induits par l'E2 seul, la CPT et le traitement CPT/E2 sur plusieurs marqueurs apoptotiques ont finalement été étudiés. Dans un premier temps, nous avons traité les cellules MAC-T pendant différents temps (2h, 6h, 24h et 48h) et mesuré l'activité des caspases 3/7. Nous avons montré que l'œstradiol avait un effet additif à l'action de la CPT en induisant une augmentation de l'activité des caspases 3/7 après 24 h de traitement. La

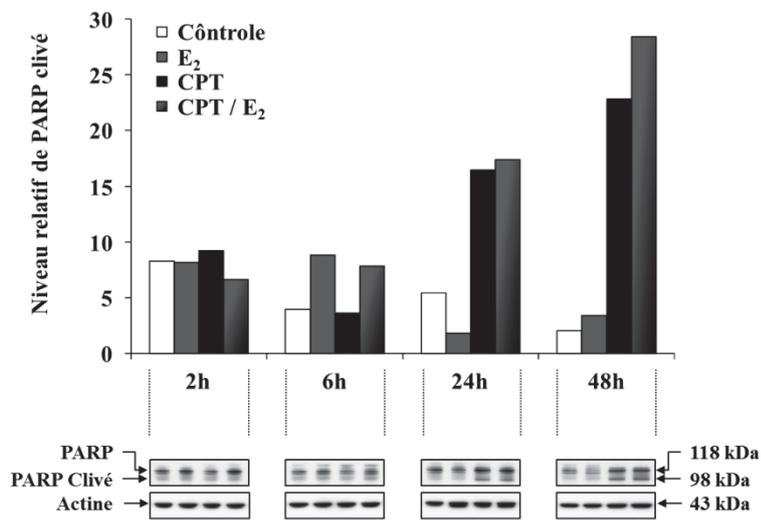


Figure 27. Les cellules MAC-T ont été cultivées pendant 48 h dans du milieu sans E2 (contrôle) ou contenant 1×10^{-7} mol/mL d'E2 (E2), 10 μ M de CPT (CPT) ou 1×10^{-7} mol/mL d'E2 + 10 μ M CPT (CPT/E2). Les cellules ont été lysées dans du tampon MPER pour l'extraction des protéines totales and 15 μ g de protéines ont été utilisées pour l'analyse par western des protéines PARP et PARP clivée ainsi que de l'actine. Les expériences ont été répétées au minimum 3 fois.

protéine PARP est impliquée dans la réparation de l'ADN et peut être clivée et inactivée par les caspases. Dans cette étude, nous avons ainsi pu mettre en évidence que le traitement CPT/E2 avait entraîné le clivage de PARP après 24h et 48h de traitement. La quantification des niveaux de la protéine PARP clivée ont révélé que l'œstradiol avait augmenté ces niveaux de 6% et de 25% après respectivement 24h et 48h de traitement, comparativement au traitement à la camptothécine seule (**Figure 27**).

4.2.3. Discussion générale :

4.2.3.1. Les stéroïdes ovariens influencent la balance prolifération/apoptose des CEM

Dans nos deux études *in vivo*, nous avons supprimé la source principale d'œstradiol et de progestérone chez des vaches en lactation par des ovariectomies pratiquées au moment du pic de lactation. Nos études sur le tissu sécréteur de la glande mammaire ont mis en évidence une baisse du taux d'apoptose en fin de lactation, ainsi qu'une augmentation de la prolifération cellulaire juste après le pic de lactation chez les vaches ovariectomisées.

L'étude *in vitro*, consistant en l'application de différentes doses d'œstradiol sur des CEM de la lignée bovine MAC-T, a montré que l'œstradiol induisait et stimulait l'apoptose de ces CEM. L'œstradiol a induit une augmentation de l'activité des caspases 3/7, ainsi que du clivage de la protéine PARP (Poly (ADP-ribose) Polymerase). Ce sont ces mêmes marqueurs dont l'activité et l'expression ont été négativement influencées dans les glandes mammaires des vaches ovariectomisées. Ceci a donc confirmé l'implication de l'œstradiol dans l'augmentation du taux d'apoptose mesurée chez les vaches témoins par rapport aux vaches ovariectomisées. La littérature rapporte que des études *in vitro* menées sur les lignées de CEM MAC-T et BME-UV1 ont également mis en évidence une augmentation de l'activation de la caspase 3 (Sobolewska et al., 2009 et 2011), ainsi qu'une augmentation de l'expression de TGF- β , un facteur impliqué dans l'induction de l'apoptose lors de l'involution mammaire (Zarzynska et al., 2005), en réponse à un traitement à l'œstradiol.

Ainsi, au regard des résultats obtenus au cours de la première étude *in vivo*, il est apparu, suite à l'abattage des vaches, que l'ovariectomie avait diminué le taux d'apoptose dans la glande mammaire. Ce résultat a conduit à l'hypothèse que l'ovariectomie, principalement *via* la suppression des sécrétions d'œstradiol, retarderait l'évolution, en faveur de l'apoptose, de la balance prolifération/apoptose des CEM.

L'étude en dynamique du tissu sécréteur dans la glande mammaire, grâce aux prélèvements effectués par biopsies lors de la 2^{ème} étude, a permis de suivre l'évolution de différents paramètres au cours de la lactation, en fonction du traitement (vaches ovariectomisées ou vaches témoins). Au cours d'une lactation, l'environnement hormonal et tissulaire des CEM évolue : la mise en place du tissu sécréteur se fait sous l'action des niveaux élevés en progestérone et en œstradiol (Clarke, 2000), puis la lactation est initiée et

entretenu par la Prl, la GH et l'ocytocine qui stimulent la synthèse des différents constituants du lait et agissent comme facteurs de survie sur les CEM. Au début de la lactation, le flux sanguin dans la glande mammaire est très important et permet l'apport en grandes quantités d'éléments nécessaires à la synthèse du lait. Au fur et à mesure de l'avancement de la lactation, les niveaux de sécrétions hormonales et le flux sanguin dans la glande mammaire diminuent (Svennersten-Sjaunja & Olsson, 2005) ce qui contribue à l'augmentation du taux d'apoptose et à la baisse de PL après le pic de lactation. L'étude en dynamique de l'expression d'ER α dans le parenchyme mammaire a montré que l'expression de ce récepteur augmentait au cours de la lactation et était diminuée par l'ovariectomie en fin de lactation. Ce résultat suggère que la sensibilité des CEM à l'œstradiol augmente avec l'avancement de la lactation et est liée au niveau de PL. Des arguments issus de la littérature viennent appuyer cette hypothèse d'une sensibilité croissante à l'œstradiol en lien avec une évolution du phénotype des CEM. Chez la génisse, dans la glande mammaire en développement, il semblerait que les cellules en prolifération n'expriment pas ER α (Capuco et al., 2002). Ainsi, l'acquisition de la réceptivité à l'œstradiol se ferait au cours de la différenciation des CEM. Afin de tester la sensibilité des CEM à l'œstradiol en fonction du stade de lactation, nous avons étudié *in vitro* un modèle cellulaire mimant des CEM en début de lactation, et un modèle de CEM en fin de lactation, induites en apoptose grâce à un traitement à la camptothécine. Ce schéma expérimental a permis de mettre en évidence un effet additionnel de l'œstradiol sur celui de la camptothécine. En effet, si l'œstradiol a un faible pouvoir inducteur d'apoptose sur des cellules viables, cette hormone accélère les mécanismes d'apoptose et augmente le taux d'apoptose dans les CEM pré-apoptotiques. Une limite à l'utilisation de la camptothécine est qu'elle permet certes d'induire l'apoptose, et donc d'obtenir une fragilisation des CEM, mais qu'elle ne permet pas de mimer les effets de la baisse des facteurs de survie inhérents à l'avancée de la lactation. Les milieux utilisés pour cultiver ces lignées cellulaires reconstituent, de manière plus ou moins fidèle, l'environnement hormonal dont les CEM peuvent bénéficier dans la glande mammaire. En jouant sur la composition du milieu de culture il est donc possible de mimer la déprivation en facteurs de survie et en nutriments qui a lieu de manière progressive dans la glande mammaire en lactation. Zarzynska et al. (2005) ont ainsi pu observer une augmentation de l'expression de TGF- β et du taux d'apoptose suite à une restriction en sérum de veau foetal (SVF) dans le milieu de culture. Une autre méthode permettant de mimer *in vitro* le

vieillesse des CEM dans la glande mammaire consiste à placer les CEM en culture dans un milieu dit de différenciation, riche en Prl et en GH (Huynh et al., 1991 ; Zhou et al., 2008). *In vivo*, ces deux hormones sont indispensables à l'acquisition de la capacité à synthétiser les différents constituants du lait par les CEM. En effet, même si l'action de la GH sur les CEM semble majoritairement passer par un effet prolifératif, cette hormone est indispensable à l'initiation de la lactation (Annen et al., 2007). La Prl, quant à elle, stimule la différenciation des CEM et induit la synthèse des différents constituants du lait (Akers et al., 1981a et b). Cependant, que ce soit par induction de l'apoptose par la camptothécine, par fragilisation des cellules en diminuant la disponibilité en nutriments et en facteurs de survie, ou par la culture des cellules dans un milieu de différenciation, l'étude du comportement des CEM en début et en fin de lactation *via* des lignées immortalisées comporte certaines limites. En effet, le phénotype et le comportement de ces cellules évoluent au fur et à mesure des passages et en fonction des conditions de culture. Des cellules issues des deux lignées BME-UV1 et MAC-T ont été cultivées dans les mêmes conditions et ont reçu les mêmes traitements, mais les résultats obtenus étaient sensiblement différents d'une lignée à l'autre : suite à une déprivation en SVF, le taux d'apoptose et l'expression de TGF- β augmentent deux fois plus rapidement dans les BME-UV1 que dans les MAC-T (Zarzyńska et al., 2005). Cette comparaison de deux lignées de CEM issues de glandes mammaires bovines en lactation souligne l'existence d'une dérive dans le comportement des lignées au cours du temps.

4.2.3.2. L'ovariectomie modifie les interactions des CEM avec les autres cellules et la matrice extracellulaire

Au début des années 1990, Woodward (1991) s'est attaché, au cours de sa thèse, à étudier l'effet des stéroïdes ovariens sur la prolifération des CEM lors de la mammogénèse chez la génisse. Une de ses premières étapes de travail a consisté à injecter à des génisses prépubères, des doses pharmacologiques d'œstradiol, de progestérone, et d'œstradiol combiné à de la progestérone. Cette première étude lui a permis de mettre en évidence une stimulation de la prolifération des CEM par l'œstradiol, associé ou non à la progestérone, et aucun effet sur la prolifération cellulaire par la progestérone. La seconde étape de son travail a consisté à étudier *in vitro* l'effet de ces deux stéroïdes sur la prolifération des CEM de la lignée MAC-T. Il n'a alors mis en évidence aucun effet prolifératif ni de la progestérone,

ni de l'œstradiol sur ces CEM. De ces études, il a conclu que, dans la glande mammaire bovine en développement, les stéroïdes ovariens, et plus particulièrement l'œstradiol, stimulaient la prolifération des CEM de manière indirecte. Il semblerait donc que, chez les bovins, les communications paracrines jouent un rôle crucial dans le contrôle du développement mammaire par les stéroïdes ovariens. Chez la génisse, lors de la mammogénèse, 99 % des CEM qui prolifèrent en réponse à l'administration d'œstradiol n'expriment pas ER α (Capuco et al., 2002). Ces résultats confortent l'hypothèse faite par Woodward (1991) selon laquelle la prolifération des CEM dans la glande mammaire bovine, en réponse à l'œstradiol, serait initiée indirectement par des cellules exprimant ER α *via* un signal paracrine.

De nombreuses études menées chez la génisse ont fourni des éléments démontrant l'implication du stroma et plus particulièrement des adipocytes dans la transmission du signal œstrogénique lors de la mammogénèse (Capuco et al., 2002 ; Meyer et al., 2006 ; Connor et al., 2007). Cependant, à notre connaissance, aucune étude ne s'est encore intéressée à la communication paracrine des signaux œstrogéniques et progestéroniques dans la glande mammaire en lactation. Aussi, lors de la seconde étude *in vivo* menée dans le cadre de la thèse, nous nous sommes attachés à étudier l'expression des récepteurs aux stéroïdes ovariens non seulement dans le parenchyme mais aussi dans le tissu adipeux mammaire. Comme nous avons pu le constater lors de la dissection des mamelles à l'abattage, le volume de tissu adipeux est fortement réduit dans la glande mammaire en lactation, et se situe essentiellement dans des régions sous-cutanées. La grande majorité du volume mammaire, pendant la lactation, est occupé par le parenchyme sécréteur, chez les vaches ovariectomisées comme chez les vaches témoins. C'est vraisemblablement la raison pour laquelle le tissu adipeux a suscité si peu d'intérêt auprès des différentes équipes de recherches travaillant sur la glande mammaire en fonctionnement.

La quantification de la protéine ER α dans le parenchyme mammaire à différents stades de lactation a montré que la sensibilité à l'œstradiol du tissu sécréteur augmente au cours du temps. L'ovariectomie a induit une baisse de l'expression d'ER α en fin de lactation, dans le parenchyme et dans le tissu adipeux mammaire. Ainsi, cette baisse des niveaux de ER α mesurée en fin de lactation chez les vaches ovariectomisées ne serait pas liée à une régulation négative de l'expression de ce récepteur, mais plutôt à une diminution de la proportion de cellules exprimant ER α . Un marquage immunohistologique d'ER α réalisé sur

des coupes de parenchyme mammaire prélevé lors de l'abattage dans la 2^{ème} étude soutient cette hypothèse : la proportion de cellules positives pour ER α dans le parenchyme mammaire des vaches ovariectomisées est 5 fois inférieure à celle mesurée chez les vaches témoins ($P < 0,05$).

Dans les deux études *in vivo* réalisées dans le cadre de cette thèse, l'ovariectomie a non seulement modifié l'équilibre de la balance prolifération/apoptose en limitant l'apoptose, mais elle a également réduit l'intensité du remodelage tissulaire. Dans la glande mammaire en lactation, l'intensité du remodelage tissulaire peut être mesurée au travers de l'activité des MMP et d'autres gélatinases relarguées dans le lait. La dégradation de la matrice extracellulaire par les MMP augmente fortement en fin de lactation et est indispensable à l'involution mammaire (Stefanon et al., 2002). Dans notre 2^{ème} étude, la baisse de l'intensité du remodelage tissulaire était associée à un niveau de protéine E-cadhérine plus élevé chez les vaches ovariectomisées, suggérant une intégrité de l'épithélium sécréteur mieux conservée en absence de sécrétions ovariennes. Des données issues de la littérature montrent que les stéroïdes ovariens, notamment l'œstradiol, accélèrent les processus d'involution (Athie et al., 1996) et peuvent stimuler l'expression et l'activité de certaines gélatinases (Ambili et al., 1998). Au regard de nos résultats et des données bibliographiques, nous avons fait l'hypothèse que la suppression de la source principale d'œstradiol et de progestérone permettait de ralentir les processus d'involution mammaire. Athie et al. (1996) ont utilisé plusieurs marqueurs afin d'étudier l'effet d'un traitement à l'œstradiol sur l'involution mammaire chez des vaches Prim'Holstein. Ils ont ainsi rapporté une baisse des concentrations en α -lactalbumine, en lactose et en minéraux dans les sécrétions mammaires, ainsi que des augmentations des concentrations en cellules somatiques, en lactoferrine et en sodium. Cependant, les quantifications de la lactoferrine et de IGFBP-5 dans le parenchyme mammaire réalisées lors de notre 2^{ème} étude n'ont révélé ni d'évolution des niveaux d'expression de ces deux marqueurs au cours de la lactation, ni d'effet de l'ovariectomie. Dans cette étude, les vaches ont été traitées jusqu'au matin de leur abattage et produisaient encore du lait en quantités très variables (entre 1,1 et 24,6 kg/jour). L'ensemble des mamelles était donc encore en activité, et, bien que ces mamelles aient été sujettes à un remodelage tissulaire, elles n'étaient probablement pas en involution *stricto sensu*. Le choix de la lactoferrine comme marqueur d'involution est également discutable. Bien que Welty et al. (1976) aient mis en évidence une augmentation de la

concentration en lactoferrine dans le lait dès le 2^{ème} jour d'involution, il semblerait que cette augmentation ne devienne significative qu'à partir du 11^{ème} jour d'involution (Hurley, 1989) et que son expression dans le parenchyme mammaire n'augmente qu'à partir de 8 jours d'involution (Singh et al., 2008). Il serait donc intéressant d'étudier l'expression d'autres marqueurs tels les caséines ou l' α -lactalbumine dont l'expression diminue quand l'activité de la glande mammaire se réduit (Singh et al., 2008), ou encore d'étudier la composition fine du lait. En effet, en toute fin de lactation, la composition du lait est modifiée : le nombre de cellules somatiques augmente, ainsi que la concentration en protéines totales, résultant d'une diminution des teneurs en caséines et en α -lactalbumine conjointement à une augmentation des teneurs en lactoferrine et en N-Acétyle- β -glucosaminidase (Hurley, 1989). Plus récemment, il a été mis en évidence que la concentration en stanniocalcine-1 (STC-1) dans le lait augmentait au cours de la lactation (Miller et al., 2006), dans les sécrétions mammaires après tarissement (Tremblay et al., 2009), ainsi que lors d'une baisse importante de la PL en réponse à un traitement œstrogénique (Delbecchi et al., 2005). Chez les mammifères, cette hormone est impliquée dans l'homéostasie du calcium, mais il semblerait également que, dans le lait, elle stimule l'apoptose des CEM. Le traitement *in vitro* de CEM de la lignée MAC-T avec des sécrétions mammaires prélevées après tarissement, et donc riches en STC-1, induit une augmentation de l'apoptose (Tremblay et al., 2009).

Au cours de notre 2^{ème} étude *in vivo*, des prélèvements de lait ont été effectués avant chaque prélèvement de tissu mammaire (à 6, 16, 34 et 52 semaines de lactation) afin de purifier les CEM exfoliées dans le lait. Des analyses sont en cours sur ces cellules, et il est important de noter que l'évolution des proportions de CEM dans le lait ainsi que leur taux de mortalité pourrait apporter des éléments intéressants concernant l'état d'involution des glandes mammaires des vaches ovariectomisées et des vaches témoins.

Par ailleurs, les ovaires ne sont pas l'unique source d'œstradiol et de progestérone chez la femelle mammifère non gestante. Les glandes surrénales, notamment, sont le siège d'une stéroïdogénèse importante et produisent de la progestérone ainsi que des androgènes qui pourront être localement convertis en œstrogènes par l'aromatase. Le dosage plasmatique de la progestérone dans nos deux études *in vivo* a mis en évidence une baisse importante des niveaux de progestérone suite à l'ovariectomie. De plus, le fait que les masses de tractus génitaux chez les vaches ovariectomisées, mesurées lors des abattages, étaient significativement inférieures à celles des vaches témoins cycliques, suggère

fortement que les vaches ovariectomisées avaient des taux d'œstradiol circulant inférieurs à ceux des vaches témoins cycliques (Johnson et al., 1997).

Initialement, dans le cadre de la 1^{ère} étude *in vivo*, dont l'objectif était d'étudier les effets zootechniques de différents niveaux d'œstradiol et de progestérone, un troisième lot de vaches gestantes avait été envisagé. Le rôle de ce troisième lot dans le schéma expérimental devait être double dans la mesure où 1/ ce lot aurait été représentatif des conduites d'élevage courantes, à savoir que les vaches sont en lactation et gestantes de manière concomitante, et 2/ ces vaches auraient présenté des niveaux élevés en progestérone et en œstradiol dus à la gestation. Ainsi, l'étude de trois lots de vaches présentant chacun des niveaux différents d'œstradiol et de progestérone (lot ovariectomisé théoriquement « bas », lot cyclique « intermédiaire » et lot gestant « haut ») aurait pu partiellement palier à l'absence de dosage d'œstradiol. Pour des raisons liées à la gestion du troupeau de l'unité expérimentale du Pin-au-Haras, ces vaches ont subi des transferts d'embryons dont le taux de réussite a été de 37 % (soit 3 vaches gestantes) après le troisième transfert embryonnaire. Ces 3 vaches présentaient une grande disparité dans le stade de lactation au moment du début de la gestation et ce lot n'a donc pas pu être exploité.

4.2.3.3. Implication des stéroïdes ovariens dans la modulation de la persistance de la lactation

Les deux études menées au cours de cette thèse sur des vaches ovariectomisées ont confirmé que la suppression des sécrétions ovariennes pendant la lactation améliore la persistance de la lactation en limitant la chute de production laitière qui succède au pic de lactation. Bien que, comme nous l'avons discuté ci-dessus, l'œstradiol et la progestérone ne soient pas les seules molécules libérées par les ovaires en activité, la littérature suggère que ces deux stéroïdes, et plus particulièrement l'œstradiol, influencent négativement la PL et la persistance de la lactation chez les vaches laitières (Mollett et al., 1976 ; Athie et al., 1996 ; Delbecchi et al., 2005).

Il a été montré que la persistance de la lactation était dépendante de la race et du rang de lactation ; la persistance se stabilisant à partir de la 3^{ème} lactation (Schutz et al., 1990). Nos deux études *in vivo* ont été menées sur des vaches de races différentes (1^{ère} étude : Normande x Holstein, 2^{ème} étude : Prim'Holstein) et sur des rangs de lactation

compris entre 2 et 6. Nous nous sommes donc intéressés aux effets de la race et du rang de lactation dans nos deux études. L'analyse de covariance des données de persistances de lactation calculées pour les périodes de 100 à 200 jours de lactation ($P_{100-200}$) et de 200 à 300 jours de lactation ($P_{200-300}$) n'a pas révélé d'effet significatif du rang de lactation ($P = 0,62$ et $P = 0,58$, respectivement). En revanche, un fort effet de la race a été mis en évidence ($P_{100-200} : P < 0,0001$; $P_{200-300} : P < 0,05$). Les vaches Prim'Holstein ont une meilleure persistance de lactation que les vaches Normande x Holstein, indépendamment du traitement et du rang de lactation. Le calcul des moyennes individuelles de PL sur les 10 dernières semaines de lactation pour les vaches ovariectomisées et les vaches témoins dans nos deux études *in vivo* a également montré cette variabilité entre les deux races (ou croisement de races) étudiées. Il apparaît en effet que, si les résultats obtenus dans ces deux études sont similaires en termes de PL (à savoir que la PL des vaches ovariectomisées est supérieure à celle des vaches témoins), les réponses individuelles aux traitements ont été différentes entre les deux races. Les écarts de médianes entre les vaches ovariectomisées et les vaches témoins sont plus importants chez les vaches Normande x Holstein que chez les vaches Prim'Holstein, mais la répartition semble plus étendue chez les Prim'Holstein.

Il est également intéressant de noter que dans ces deux études, la différence de PL entre les vaches ovariectomisées et les vaches cycliques n'a été significative que plusieurs mois après l'ovariectomie (6^{ème} mois de lactation chez les vaches Normande x Holstein – soit 4 mois après l'ovariectomie ; 10^{ème} mois de lactation chez les vaches Prim'Holstein – soit 8 mois après l'ovariectomie). Or, les dosages de la progestérone plasmatique effectués régulièrement au cours de l'étude chez les vaches Prim'Holstein ont montré que les niveaux de progestérone étaient inférieurs au seuil de détection ($< 0,1$ ng/mL) dès la 2^{ème} semaine après ovariectomie, tandis qu'ils étaient de l'ordre de 3,4 ng/mL (valeur moyenne pour l'ensemble des prélèvements) chez les vaches témoins cycliques. Ceci suggère que les ovaires se sont nécrosés dans les deux semaines qui ont suivi la ligature des pédicules ovariens. Il est très rare que l'application d'un traitement engendre une réponse directe 4 à 8 mois après l'application de ce traitement. On peut donc raisonnablement faire l'hypothèse que la suppression des sécrétions ovariennes ne permette pas directement de limiter la chute de PL après le pic de lactation, mais plutôt de ralentir ou d'inhiber partiellement des mécanismes physiologiques impliqués dans la baisse d'activité de synthèse du lait, dans

l'œstradiol accélérerait les mécanismes d'apoptose en activant les caspases et le clivage de PARP dans des cellules pré-apoptotiques. D'autres études menées sur la lignée de CEM bovines BME-UV1 ont également montré que l'œstradiol et le progestérone stimulaient *in vitro* l'autophagie des CEM, et que l'œstradiol stimulait également l'activité des caspases caractéristiques de l'apoptose (Sobolewska et al., 2009 et 2011). A court terme, nous envisageons d'effectuer des dosages plasmatiques de la Prl et de la GH afin de conforter ou non cette hypothèse. Cette hypothèse pourrait également être testée par le biais d'études *in vitro*, en cultivant des CEM soit en culture primaire, soit issues de la lignée MAC-T en présence d'œstradiol et/ou de progestérone, combinée à des doses décroissantes de Prl et de GH dans le milieu de culture. Accorsi et al. (2002) ont étudié l'effet protecteur de la Prl, de la GH et d'IGF-I sur les CEM, en cultivant des explants de glandes mammaires bovines en toute fin de lactation dans des milieux contenant de l'œstradiol et de la progestérone, supplémentés en Prl, GH et IGF-I conjointement ou chacune séparément. Un schéma expérimental sensiblement différent permettrait de tester notre hypothèse et d'aller plus loin dans les conclusions faites par cette équipe.

L'évolution des réserves corporelles au cours de la lactation et la différence de gestion de ces réserves corporelles en fonction de la race et du potentiel laitier peut également apporter des éléments d'explications concernant la latence observée entre l'application du traitement et la différence de PL entre les vaches ovariectomisées et les vaches témoins cycliques. En effet, en début de lactation, lorsque la PL augmente, la mobilisation des réserves lipidiques et protéiques augmente fortement. Cette mobilisation est plus ou moins forte selon la race considérée : des vaches Normandes perdent en moyenne 11 kg de masse corporelle pendant les 5 premières semaines de lactation et 0,4 points de note d'état corporel au cours des 30 premiers jours de lactation, contre 23 kg et 0,8 points pour des vaches Prim'Holstein (communication personnelle, Dr E. Cutullic). Dans nos études, les vaches Normande x Holstein ont présenté une mobilisation des réserves corporelles légèrement inférieure à celle des Prim'Holstein (en moyenne, sur les 8 premières semaines de lactation : -0,38 points de note d'état corporel pour les Normande x Holstein et -0,43 points pour les Prim'Holstein – données non présentées). Bien que la mobilisation des réserves corporelles des vaches Normande x Holstein ne soit que légèrement inférieure à celle des vaches Prim'Holstein, les vaches Normande x Holstein ont reconstitué leurs réserves beaucoup plus rapidement que les Prim'Holstein, et ce quel que soit le traitement

(données non présentées). Cette différence dans la vitesse de reconstitution des réserves corporelles pourrait être en lien avec le moment auquel l'effet de l'ovariectomie sur la PL a été observé dans nos deux études.

Enfin, cette hypothèse quant à la reconstitution des réserves corporelles n'exclue pas la première hypothèse concernant un effet de la photopériode, bien au contraire. Accorsi et al. (2005) ont étudié l'évolution des profils de sécrétion de la leptine, une hormone produite par le tissu adipeux, impliquée dans la gestion des réserves lipidiques et dont la sécrétion diminue lorsque ces réserves sont faibles, au cours de la lactation chez des vaches de race Frisonne. Ils ont mis en évidence que la sécrétion de leptine diminuait juste après le vêlage et augmentait pendant la période estivale, indépendamment du stade de lactation. Ainsi, la concentration en leptine plasmatique est positivement corrélée à la température ($r = 0,77$) et à la longueur des jours ($r = 0,58$) (Accorsi et al., 2005). On peut donc également envisager qu'au cours des deux études sur vaches laitières, menées dans le cadre de cette thèse, les variations annuelles de la photopériode et de la température aient influencé la vitesse de reconstitution des réserves corporelles, *via* la sécrétion de leptine, et par là, la PL.

4.2.3.4. Intérêts zootechniques de la modulation des niveaux d'œstradiol et de progestérone

En Europe, l'utilisation d'hormones stéroïdes en élevage est interdite depuis les années 1980. A l'heure actuelle, seulement deux pratiques permettent de moduler les niveaux d'œstradiol et de progestérone chez la vache laitière :

- l'augmentation de l'intervalle entre les vêlages par décalage de la mise à la reproduction, de sorte que le stade de gestation auquel les sécrétions de progestérone et d'œstradiol par le placenta deviennent importantes coïncide avec un stade de lactation le plus avancé possible, et permette ainsi d'allonger les lactations,
- l'ovariectomie sur certaines vaches du troupeau, avant de les réformer.

En ce qui concerne les intervalles entre les vêlages, une étude réalisée par l'Institut de l'Élevage à partir de la base de données nationale d'identification (BDNI), qui répertorie l'ensemble des bovins du territoire français, a montré qu'entre 2005 et 2010 l'intervalle de vêlage moyen des vaches Prim'Holstein était passé de 390 à 403 jours (Dossier Economie de l'Élevage n°415, Juillet 2011). D'une part, la fonction de reproduction est altérée chez les vaches à fort potentiel laitier. En effet, il a été montré que la cyclicité ovarienne, le taux de

fécondation et le développement embryonnaire précoce dépendaient des réserves corporelles ; réserves qui sont fortement mobilisées chez les vaches hautes productrices. De plus, l'expression des chaleurs est diminuée et le taux de mortalité embryonnaire tardive est augmenté chez ces vaches (Cutullic, 2010). D'autre part, il est de plus en plus fréquent que, chez les vaches Prim'Holstein, la production laitière soit supérieure à 25 kg/jour au-delà de 320 jours de lactation. Le tarissement de ces vaches très productives peut s'avérer délicat pour les éleveurs qui sont alors amenés à prolonger les lactations (Dossier Economie de l'Elevage n°415, Juillet 2011). Cependant, l'allongement de l'intervalle entre les vêlages afin d'améliorer la persistance de lactation engendre une diminution du nombre de veaux nés, ce qui peut poser des problèmes quant au renouvellement du troupeau étant donné le fort taux de renouvellement en élevage bovin laitier (en élevage bovin laitier, la durée de vie d'une vache excède rarement les 6 ans - Dossier Economie de l'Elevage n°415, Juillet 2011).

Dans le cadre de cette thèse, deux enquêtes ont été réalisées auprès d'éleveurs bovins laitiers (*via* le magazine Production laitière moderne, paru en janvier 2012, cf. Annexe 10) et auprès de praticiens vétérinaires (*via* le bulletin des Groupements Techniques Vétérinaires, paru en février 2012, cf. Annexe 11). Parmi les 132 éleveurs de bovins ayant répondu à cette enquête, 49 % n'avaient jamais eu connaissance de la pratique de l'ovariectomie, et 70 % n'y ont jamais eu recours. Les principales raisons invoquées par les éleveurs connaissant l'existence de cette pratique mais ne l'utilisant pas sont liées à plus de 64 % au fait que leur vétérinaire ne pratique pas cette intervention, et à 33 % à des doutes concernant la rentabilité de l'intervention. L'enquête menée auprès des vétérinaires praticiens a confirmé les réponses données par les éleveurs. En effet, seulement ¼ des vétérinaires qui ont répondu à l'enquête (47/196) pratiquent des ovariectomies chez la vache. Une maîtrise insuffisante de la technique (56 %), des effets positifs méconnus ou non suffisamment démontrés (35 %) ou des risques liés à l'intervention trop importants (18 %) justifient le fait que la pratique de l'ovariectomie chez la vache soit peu répandue (Chastant et al., 2012).

Les différences moyennes de production laitière quotidienne entre les vaches ovariectomisées à 2 mois de lactation et les vaches témoins (cycliques et non gestantes) ont été calculées pour les deux études réalisées dans le cadre de cette thèse. Ainsi, à durées de lactation égales entre les deux lots de vaches, la différence de production laitière s'élevait à 2,5 kg/jour entre le 6^{ème} et le 14^{ème} mois de lactation dans l'étude menée sur des vaches de

race Normande x Holstein, et à 2,3 kg/jour entre le 4^{ème} et le 13^{ème} mois de lactation (semaines 16 à 52) dans l'étude menée sur des vaches de race Prim'Holstein. De plus, dans le but de clarifier les effets de l'ovariectomie sur les performances laitières, une étude cas-témoins a été réalisée par l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, sur des données récoltées entre 2001 et 2003 dans des élevages de vaches Montbéliardes et Prim'Holstein dans l'Est de la France. Cette étude a montré que des vaches ovariectomisées avant le 125^{ème} jour de lactation avaient une production laitière augmentée en moyenne de 2,8 kg/jour par rapport à leurs témoins gestants, dans les 4 mois qui ont suivi l'ovariectomie (Du Roizel-Marlier, 2004). Une ovariectomie est facturée entre 50€ et 80€ par la plupart des vétérinaires praticiens (Chastant et al., 2012), et le lait est acheté aux éleveurs en moyenne à 0,33€/L (données PLM, mars 2012). Si on considère que l'ovariectomie augmente la production laitière de 2,5 kg/jour en moyenne, l'intervention serait rentabilisée en 60 à 100 jours de lactation en fonction du montant de facturation de l'intervention.

Les premières ovariectomies pratiquées sur des vaches remontent à la fin du Moyen-Age et étaient initialement pratiquées dans le but de supprimer les chaleurs, faciliter la gestion des animaux et favoriser l'engraissement. Ce n'est que plus tard, dans les années 1800, que l'ovariectomie a trouvé son intérêt dans l'amélioration des performances laitières des vaches (Gobet, 2008). Aujourd'hui, en France, l'engraissement des vaches avant leur réforme reste une des motivations majeures de l'utilisation de l'ovariectomie, 71 % des éleveurs qui ont répondu à l'enquête et qui utilisent l'ovariectomie sur leur troupeau avancent l'argument d'une facilitation de l'engraissement. Cependant, ces éleveurs utilisent également l'ovariectomie pour allonger les durées de lactation dans 71 % des cas, tandis qu'une meilleure gestion du troupeau (par la suppression des chaleurs) n'est avancée que dans 47 % des cas.

Il est intéressant de noter que dans cette enquête, 26 % des éleveurs ayant utilisé l'ovariectomie n'ont obtenu aucun résultat et que 29 % ne sont pas satisfaits des résultats obtenus suite à l'ovariectomie. L'ovariectomie ne peut donc pas être pratiquée sur n'importe quelle vache. En effet, comme nous avons pu l'observer dans nos études, il existe une forte variabilité à la fois individuelle et liée à la race dans la réponse à l'ovariectomie. A cette variabilité viennent s'ajouter des contraintes quant au statut sanitaire et à l'involution utérine, incontournables pour pratiquer l'ovariectomie dans les meilleures conditions possibles. En conclusion de son étude, Du Roizel-Marlier (2004) préconisait de pratiquer

l'ovariectomie à un stade le plus proche possible du pic de lactation. Il est cependant nécessaire que l'involution utérine, qui a lieu après la mise-bas soit achevée, et que la vache ne présente ni de métrite, ni de pneumovagin ou urovagin qui pourraient rendre l'intervention délicate et engendrer des complications.

4.3. Collaborations

4.3.1. Etude sur la restriction alimentaire chez la vache laitière:

Dans le cadre de la thèse d'Erwan Cutullic (2006-2009), un essai expérimental a eu lieu à la ferme expérimentale du Pin au Haras visant à étudier l'impact d'une restriction alimentaire sur la reproduction des vaches Holstein croisées Normandes. A l'issue de cet essai, les vaches ont été euthanasiées et nous avons étudié l'influence d'une restriction alimentaire sur la dynamique cellulaire et le remodelage tissulaire de la glande mammaire chez la vache laitière.

L'alimentation agit sur le potentiel de production de la mamelle de vache laitière. Alors que les résultats zootechniques d'une restriction alimentaire chez la vache en lactation sont bien connus, son influence sur la dynamique cellulaire et le remodelage de la glande mammaire reste peu étudiée. Nous avons utilisé 16 vaches laitières croisées Holstein x Normande réparties en deux lots avec des apports alimentaires différents: régime Haut (ration complète composée de 55 % d'ensilage de maïs, 15 % de foin de luzerne et 30 % de concentré) vs régime Bas (ration complète composée de 60 % d'ensilage d'herbe et 40% de foin). Ces 2 régimes alimentaires ont été appliqués de 2 semaines avant le vêlage jusqu'à l'abattage des animaux (85 jours après vêlage). Nous avons mesuré la production laitière, réalisé des prélèvements sanguins et prélevé les mamelles après abattage. Ceci nous a permis d'étudier les effets de la restriction alimentaire sur le remodelage tissulaire, sur l'équilibre prolifération/mort cellulaire et sur l'activité des cellules épithéliales mammaires.

La restriction alimentaire a entraîné une forte diminution de la production laitière (20.5 vs. 33.5 kg/j, $P < 0.001$) accompagnée d'une diminution des quantités de matières utiles produites. Elle a provoqué une diminution du poids de la glande ainsi que de la quantité d'ADN total dans la glande mammaire. La restriction alimentaire ne modifie pas

significativement la prolifération cellulaire dans la glande mais provoque la mort des cellules par apoptose. Elle provoque un remodelage de la glande mammaire par dégradation de la matrice extracellulaire. Enfin, elle diminuerait l'activité de synthèse des cellules épithéliales. De plus, la restriction alimentaire provoque une diminution des concentrations plasmatiques d'IGF-1 (Insulin-like Growth factor 1) et une augmentation des concentrations de GH (Growth Hormone).

Une stéroïdogénèse accrue a été observée chez les vaches soumises à la restriction alimentaire. Il semble donc exister un lien fort entre stéroïdes ovariens et dynamique de la cellule épithéliale mammaire. Nos recherches futures viseront ainsi à étudier le rôle des stéroïdes ovariens sur la persistance de la lactation.

4.3.2. Etude confidentielle pour CEVA Santé Animale (2010-2011):

Deux protocoles expérimentaux sur vaches laitières ont été réalisés au sein de notre station expérimentale et avaient pour but d'évaluer l'efficacité d'une injection de C646 au moment du tarissement sur l'involution de la glande mammaire chez la vache laitière, au moyen d'analyse du remodelage et de l'activité du tissu mammaire et du suivi de l'ouverture des jonctions serrées sur les 15 premiers jours de tarissement. Les différentes analyses sont actuellement terminées et doivent permettre à CEVA Santé Animale de déposer une demande d'autorisation de mise sur le marché (AMM) pour une commercialisation du produit en 2014. D'autres les résultats issus de ces travaux seront publiés dans des journaux à comité de lecture internationale et présentés à différents congrès au cours de l'année 2013.

4.3.3. Projet européen « Roquefort'in » : 2010-2013

En collaboration avec l'INRA de Toulouse (SAGA), le projet Roquefort'in a l'ambition de contribuer, par l'innovation, à un regain de compétitivité et d'attractivité pour l'ensemble des acteurs de la filière, éleveurs et industriels laitiers du Rayon de Roquefort. Porté par la Confédération Générale de Roquefort, il mobilise un consortium de 7 partenaires particulièrement représentatifs de l'environnement scientifique et technique d'excellence

de la filière. Le programme de recherche est axé sur l'identification de caractères permettant d'évaluer la prédisposition génétique des brebis Lacaune à la monotraite et à l'entretien de la lactation et mise sur l'utilisation des dernières avancées en génomique ovine, les puces SNP haute densité, pour concevoir et maîtriser durablement un nouveau schéma de sélection intégrant ces caractères génétiques d'intérêt. « Première mondiale » dans la filière ovine, cette innovation permettra de renforcer le positionnement de la brebis de race Lacaune dans la compétition génétique internationale.

Dans ce projet, j'interviens dans le « work package 3 » : comment améliorer génétiquement l'aptitude à la monotraite et à l'entretien de la lactation de la brebis Lacaune. Au sein de la station expérimentale de La Fage, j'ai effectué 5000 échographies afin de réaliser des mesures anatomo-physiologiques de la mamelle et mesurer la répartition du lait dans la mamelle par la méthode Atosiban/Ocytocine. Nous avons également réalisé des dosages de cortisol, lactose et sodium/potassium pour étudier le stress et l'ouverture des jonctions serrées chez tous ces animaux.

4.3.4. [Projet ANR « Epigrani » : 2010-2013](#)

En collaboration avec l'INRA de Jouy en Josas (GPL et BDR).

Le projet Epigrani vise à étudier la contribution de l'épigénétique dans l'expression phénotypique de caractères d'intérêt agronomique relevant de régulations polygéniques chez les animaux de rente. Les causes et conséquences des modifications épigénétiques telles que la méthylation de l'ADN chez les espèces d'élevage sont méconnues. Il est nécessaire de comprendre et de définir précisément les contributions des modifications épigénétiques à la détermination de la variabilité phénotypique des caractères à valeur économique, tels que la production du lait. Dans ce projet, j'interviens dans le « work package 4 » qui vise à décrire les variations épigénétiques liés à la lactation et leur variabilité entre des vaches laitières clonées et non clonées. Dans un premier temps, nous avons mené une étude au sein de notre station expérimentale visant à déterminer des modifications des profils de méthylation de l'ADN chez des vaches primipares en début de lactation qui ont subies une traite différentielle (monotraite appliquée à une demi-mamelle tandis que l'autre

demi-mamelle reste traite 2 fois par jour). Ce protocole présente l'avantage de pouvoir obtenir des échantillons sur un même animal, ce qui permet d'éliminer les effets de la variabilité génétique et de l'influence du système d'élevage. Cette première étude nous a permis de montrer, en collaboration avec l'unité INRA GPL (Eve Devinoy) que le passage à la monotraite avait entraîné une diminution de 37% de la production laitière et une diminution de 50% des ARN messagers codant pour la caséine alpha S1. Une augmentation significative de 12 à 25% de la méthylation de l'ADN au niveau de 2 sites CpG localisés dans la région de la caséine alpha S1 a également été observée.

4.3.5. Collaboration avec la chambre d'agriculture d'Ile et Vilaine et de Saône et Loire:

Afin de cibler au mieux mes futures recherches sur l'élevage des jeunes ruminants, je suis en contact étroit avec ces deux chambres d'agriculture depuis 2010 pour faire émerger de nouvelles attentes de la filière. Dans ce contexte, je communique mes résultats et j'échange 2 à 3 fois par an avec les éleveurs caprins.

5. Perspectives de recherche:

Dans un contexte actuel où le financement de la recherche publique est de plus en plus difficile et aléatoire et où l'expérimentation animale est de plus en plus contraignante, il est très difficile de projeter mes recherches à long terme. Je développerai donc ici des projets de recherche pour lesquels j'estime être en mesure de les réaliser...

5.1. Développement mammaire chez la chevrete:

Les différents travaux menés sur la chevrete (ovariectomies, régimes alimentaires) ouvrent de nouvelles perspectives en terme de recherche et de stratégies d'élevage du jeune. Ainsi je m'attacherai à caractériser encore plus finement le rôle des stéroïdes ovariens sur le développement mammaire et à déterminer les périodes d'élevage durant lesquelles il est opportun de manipuler l'alimentation pour un développement mammaire optimal et un potentiel de production efficient.

5.1.1. Développement mammaire et stéroïdes ovariens.

Les différents résultats obtenus en utilisant le modèle d'ovariectomie m'ont permis de confirmer l'implication forte et essentielle des stéroïdes ovariens avant deux mois d'âge dans le développement de la glande mammaire. Les niveaux de stéroïdes circulants et plus particulièrement les niveaux d'œstrogènes ont donc une importance majeure dans l'initiation de la mammogénèse. Un enjeu agronomique majeur serait ainsi de moduler facilement ces niveaux à des périodes clés du développement mammaire afin d'améliorer le potentiel de production de la mamelle. Un des facteurs d'élevage permettant de moduler les niveaux en œstrogènes est l'alimentation. De nombreuses plantes ont une activité œstrogénique : les phyto-œstrogènes. Ces phyto-œstrogènes sont capables de se lier avec beaucoup d'affinité aux récepteurs ER α de façon équivalente à l'œstradiol 17 β endocrine. Chez la chevrete, mes différents travaux ont mis en évidence l'expression d'ER α au cours du développement mammaire. Il apparaît ainsi que chez la chevrete, la glande mammaire serait capable de répondre aux phyto-œstrogènes s'ils étaient introduits dans l'alimentation durant des périodes courtes. Je testerai donc l'apport de phyto-œstrogènes (Genistein, Luzerne ...) dans l'alimentation des chevrettes avant la puberté et après la puberté chez des animaux témoins

et des animaux ovariectomisés. Ce projet devrait permettre de fournir de nouveaux outils pour potentialiser le développement de la glande mammaire chez la chevrette.

5.1.2. Développement mammaire et niveaux alimentaires :

En élevage caprin, les difficultés à atteindre un poids vif supérieur à 35 kg lors de la mise à la reproduction amènent les éleveurs à augmenter la densité énergétique et protéique des rations avant la puberté. Ces pratiques suscitent de nombreuses interrogations quant aux régimes à utiliser, aux périodes durant lesquelles les distribuer et surtout sur les conséquences sur la reproduction et la production de lait. Les travaux menés sur les effets de différents niveaux alimentaires chez la chevrette ouvrent de nouvelles perspectives en terme de stratégies d'élevage du jeune. Ainsi je m'attacherai à déterminer les périodes d'élevage durant lesquelles il est opportun de manipuler les apports alimentaires pour un développement mammaire optimal et un potentiel de production efficient. La durée d'élevage du sevrage à la mise bas sera « découpée » en périodes de 2 mois et pendant chacune de ces périodes, les animaux seront conduits suivant différents régimes alimentaires. La mammogénèse, la différenciation du tissu mammaire et les performances laitières seront analysées. Pour l'accomplissement de ce travail, des financements pour une bourse de thèse CIFRE sont en cours de demande.

5.2. Stéroïdes ovariens et glande mammaire en lactation:

5.2.1. Projets « *in vivo* » :

Dans le contexte actuel, la filière tend à favoriser les animaux et les pratiques d'élevage permettant d'écarter le pic de production, d'améliorer la persistance afin d'allonger les durées des lactations et de régulariser l'approvisionnement des laiteries sur l'année. Ces objectifs sont essentiels dans une optique de PL intensive plus durable, mais il reste à comprendre les mécanismes physiologiques sous-jacents afin de définir et maîtriser cette meilleure persistance. Les travaux menés au cours de la thèse de L. YART ont permis de mettre en évidence un effet négatif des sécrétions ovariennes et en particulier de l'œstradiol sur la persistance de la lactation chez la vache laitière. Les premiers résultats *in vivo* issus de la thèse n'ont pour l'instant pas permis de discriminer précisément le rôle *in vivo* direct ou indirect des hormones ovariennes sur le contrôle de la CEM. En effet, ces hormones peuvent

interagir avec d'autres hormones (Ocytocine, Prolactine) connues pour leur rôle galactopoïétique. Les objectifs du projet seront: 1) de préciser le rôle respectif des stéroïdes ovariens dans le contrôle de la persistance de la lactation, 2) d'identifier les mécanismes physiologiques et moléculaires induits au niveau des CEM et impliqués dans la persistance de la lactation, 3) d'étudier les effets directs et indirects et seuls ou combinés de l'œstradiol et de la progestérone sur la dynamique et l'activité de la CEM (*in vivo* et *in vitro*). Ce projet contribuera à identifier de nouvelles pratiques qui devront permettre d'améliorer l'efficacité productive des ruminants. En effet, l'allongement de la durée de lactation présente les avantages d'espacer les vêlages et de limiter les risques liés au vêlage et au tarissement respectant ainsi les priorités du département PHASE en terme de bien-être animal et de durabilité des systèmes.

5.2.2. Projets « *in vitro* » :

La glande mammaire est un organe complexe composé de nombreux types cellulaires (Cellules épithéliales mammaires, cellules myoépithéliales, adipocytes, fibroblastes, cellules sanguines) intégré dans un environnement matriciel qui joue un rôle prépondérant dans les communications autocrines et paracrines. Au cours d'un cycle de lactation, la glande mammaire est soumise à des changements morphologiques, cellulaires et moléculaires très intenses. Depuis 20 ans, des nombreuses études se sont attachées à déterminer les relations entre les hormones et la glande mammaire. Les contrôles endocriniens impliqués dans des changements au niveau de la glande mammaire au cours de la mammogenèse et de la lactation ont toujours été caractérisés à un niveau cellulaire (cellule épithéliale mammaire, adipocyte ...) ou à un niveau animal (production laitière, composition fine du lait ...). Le cycle de lactation est classiquement divisé en 4 étapes consécutives : mammogenèse, lactogenèse, galactopoïèse et involution, qui sont caractérisées par un contrôle hormonal strict modulant les interactions des différents types cellulaires au sein de la glande mais aussi leur réceptivité, leur prolifération et leur mort. A travers la thèse de Lucile Yart, nous avons fait l'hypothèse que, chez la vache laitière, la réceptivité des CEM à l'œstradiol augmenterait au cours de la lactation. L'action de l'œstradiol sur ces cellules serait donc différente en début, en milieu et en fin de lactation. Il semblerait que l'œstradiol agisse de manière directe sur les CEM pour induire et accélérer les processus d'apoptose.

L'augmentation progressive de la réceptivité à ce stéroïde ovarien après le pic de lactation accentuerait, chez les vaches cycliques, la perte de CEM et la chute de PL (**Figure 29**).

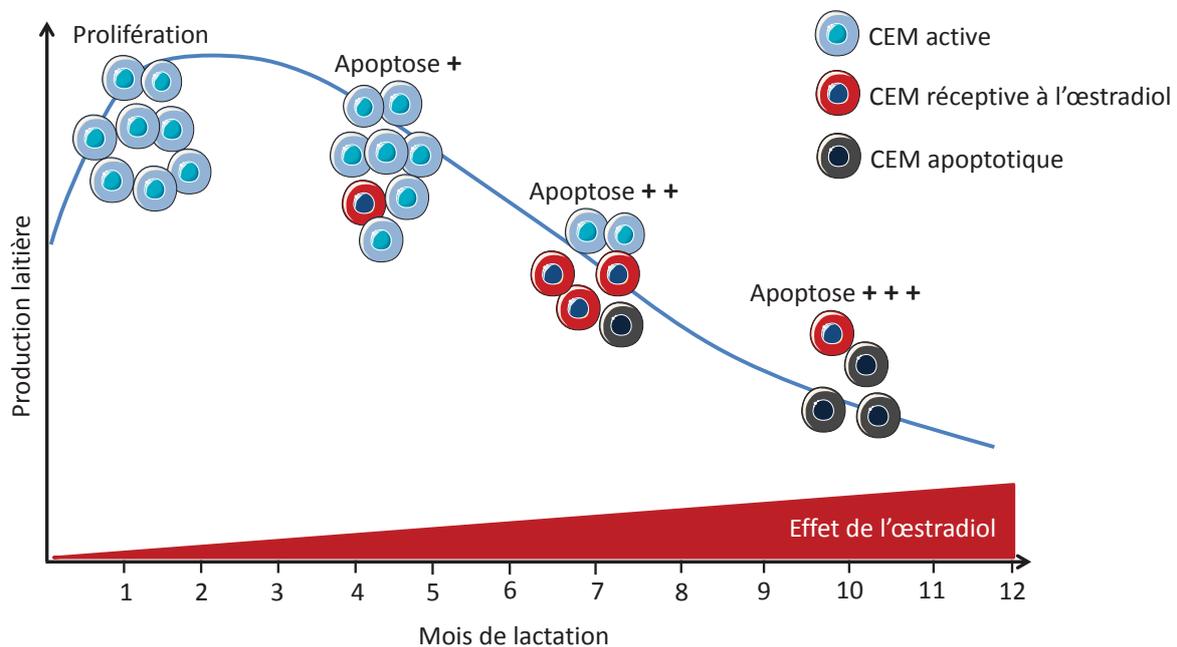


Figure 29. Schéma général présentant l'action de l'œstradiol ovarien sur les cellules épithéliales mammaires (CEM) au cours de la lactation chez la vache laitière non gestante.

Après le pic de lactation, le nombre de CEM diminue et leur sensibilité à l'œstradiol augmente. L'œstradiol agit alors sur les CEM pour induire et accélérer les processus d'apoptose, ce qui augmente la perte de CEM et la baisse de production laitière. L'effet croissant de l'œstradiol au cours de la lactation sur les CEM et sur la production laitière est représenté par le triangle rouge.

Ainsi pour un même type cellulaire, l'environnement stéroïdien lié au stade physiologique de l'animal (puberté, gestation, lactation) modifie la plasticité cellulaire et provoque sa différenciation, sa prolifération ou sa mort par apoptose. Dans différentes études, nous avons également mis en évidence le rôle majeur joué par la matrice extracellulaire sur le remodelage de la glande mammaire.

Un objectif de ce projet sera donc de phénotyper les différents types cellulaires présents dans la glande mammaire chez la vache laitière au cours d'un cycle de lactation afin d'étudier l'influence de l'environnement cellulaire (et matriciel) sur la plasticité de la cellule épithéliale mammaire. L'autre objectif sera le développement de nouveaux outils cellulaires pour des études spécifiques sur la plasticité de la cellule épithéliale mammaire et le rôle des différents types cellulaires sur celle-ci. Enfin, nous étudierons comment les stéroïdes

ovariens influencent cette plasticité et modifie le phénotype de la cellule épithéliale mammaire au cours d'un cycle de lactation.

5.2.2.1. Phénotypage des cellules mammaires.

Dans un premier temps, en utilisant du tissu mammaire issu de vaches en fin de gestation, l'objectif sera de réaliser l'isolement des différents types cellulaires présents : matures (cellules épithéliales mammaires, cellules myoépithéliales, fibroblastes, adipocytes) et cellules souches. La seconde étape consistera au phénotypage de ces pools cellulaires pour identifier des marqueurs spécifiques à l'aide des outils disponibles afin de caractériser plus finement les cellules présentes dans la glande mammaire. Notre objectif est de classer les populations cellulaires présentes dans les digestats de glande mammaire et d'identifier les cellules matures dont les phénotypes sont bien définis et connus et les cellules souches dont les premiers outils de phénotypage commencent à être décrits dans la littérature.

5.2.2.2. Immortalisation de cellules épithéliales mammaires.

Ce travail aura comme objectif principal de nous fournir des outils cellulaires pour des *essais in vitro* en immortalisant des cellules épithéliales mammaires (**Figure 30**). A partir de tissus mammaires prélevés à trois stades physiologiques clés liés à un statut hormonal particulier ainsi qu'à un niveau de différenciation cellulaire précis (génisse, vache au pic de lactation, vache en fin de lactation), nous isolerons des cellules épithéliales, des cellules myoépithéliales et des cellules souches. Ces cellules seront immortalisées selon un procédé ne dénaturant pas (ou peu) les caractéristiques intrinsèques de la cellule, et reproduisant ainsi les résultats obtenus avec des cellules isolées directement à partir de tissus vivants, offrant des conditions qui simulent étroitement un modèle vivant et permettent de générer des résultats plus pertinents physiologiquement.

37°C – Phénotype normal

Cellules épithéliales isolées de la glande mammaire



Transfection avec l'antigène Large-T et la télomérase



Création de cellules exprimant l'antigène Large-T et la télomérase de manière dépendante de la température



33°C – Antigène Large T actif

Phénotype cellules immortalisées (Expression des gènes altérés)



Population cellulaire en prolifération (liée à l'immortalisation)



37°C – Phénotype normal

Retour des cellules vers un phénotype normal

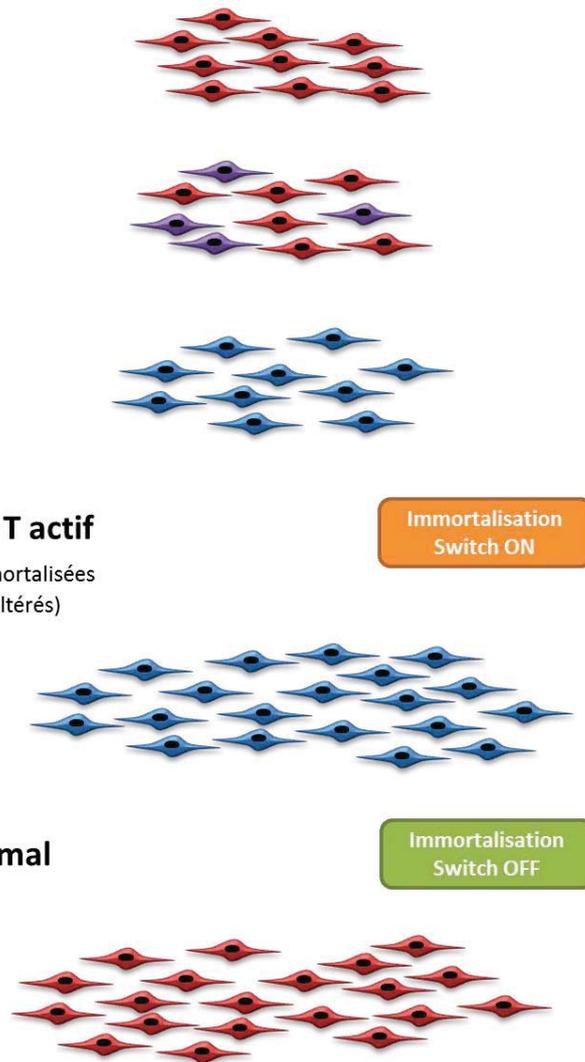


Figure 30. Principe de l'immortalisation : exemple des cellules épithéliales mammaires.

5.2.2.3. Effet des stéroïdes ovariens sur la cellule épithéliale +/- différenciée.

L'objectif sera d'étudier l'impact de l'environnement stéroïdien sur la plasticité de la cellule épithéliale mammaire en utilisant les lignées de cellules immortalisées. Pour cela, nous étudierons la sensibilité et la réceptivité de nos lignées à l'œstradiol et/ou à la progestérone par des approches pharmacologiques et des sous/sur expressions de récepteurs stéroïdiens (RNAi, transfection de plasmides ...).

5.2.2.4. Mise en place d'un modèle de co-culture.

Cette partie aura pour objectif de reproduire *in vitro* un tissu mammaire en utilisant un modèle de co-culture en 3 dimensions (en gel). Les différents types cellulaires de la glande

mammaire seront isolés et mis en co-culture dans un environnement matriciel afin d'identifier le rôle de chaque type cellulaire (cellules myoépithéliale, adipocyte et fibroblaste) sur la plasticité de la cellule épithéliale mammaire immature (cellules souches) ou mature (cellules épithéliales différenciées).

5.2.2.5. Effet de l'ovariectomie sur la cellule épithéliale mammaire.

L'objectif sera de modifier *in vivo* le profil en stéroïdes ovariens chez la vache laitière en pratiquant des ovariectomies et d'étudier, entre autres, l'effet de ces sérums sur la cellule épithéliale mammaire. Pour cela, nous utiliserons à la fois le modèle de lignées immortalisées et le modèle de co-culture développé précédemment. Nous chercherons également à phénotyper les différentes populations cellulaires présentes dans la glande mammaire des vaches ovariectomisées en les comparant aux populations présentes dans le tissu contrôle. Ceci nous permettra d'améliorer nos connaissances sur les mécanismes physiologiques mis en œuvre dans la glande mammaire et dans la cellule épithéliale mammaire pour moduler la persistance de la lactation, afin de mieux la maîtriser.

6. Références bibliographiques

- Accorsi PA, Pacioni B, Pezzi C, Forni M, Flint DJ, Seren E** 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
- Accorsi PA, Govoni N, Gaiani R, Pezzi C, Seren E, Tamanini C** 2005 Leptin, GH, PRL, insulin and metabolic parameters throughout the dry period and lactation in dairy cows. *Reprod Domest Anim* 40:217-223
- Ahola TM, Purmonen S, Pennanen P, Zhuang YH, Tuohimaa P, Ylikomi T** 2002 Progesterin upregulates G-protein-coupled receptor 30 in breast cancer cells. *Eur J Biochem* 269:2485-2490
- Akers RM, Bauman DE, Goodman GT, Capuco AV, Tucker HA** 1981 Prolactin regulation of cytological differentiation of mammary epithelial cells in periparturient cows. *Endocrinology* 109:31-40
- Akers RM, Bauman DE, Capuco AV, Goodman GT, Tucker HA** 1981 Prolactin regulation of milk secretion and biochemical differentiation of mammary epithelial cells in periparturient cows. *Endocrinology* 109:23-30
- Akers RM** 1985 Lactogenic hormones: binding sites, mammary growth, secretory cell differentiation, and milk biosynthesis in ruminants. *J Dairy Sci* 68:501-519
- Akers RM, McFadden TB, Purup S, Vestergaard M, Sejrsen K, Capuco AV** 2000 Local IGF-I axis in peripubertal ruminant mammary development. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 5:43-51
- Akers RM** 2002 *Lactation and the mammary gland.*, Blackwell Publishing(edn), Ames
- Akers RM, Beal WE, McFadden TB, Capuco AV** 1990 Morphometric analysis of involuting bovine mammary tissue after 21 or 42 days on non-suckling. *J Anim Sci* 68:3604-3613
- Akers RM, Ellis SE, Berry SDK** 2005 Ovarian and IGF-I axis control of mammary development in prepubertal heifers. *Domest Anim Endocrinol* 29:259-267
- Ambili M, Jayasree K, Sudhakaran P** 1998 60K gelatinase involved in mammary gland involution is regulated by beta-oestradiol. *Biochem Biophys* 1403:219-231
- Anderson E, Clarke R, Howell A** 1998 Estrogen responsiveness and control of normal human breast proliferation. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 3:23-35
- Anderson LL, Hard DL, Carpenter LS, Awotwi EK, Diekman MA, Trenkle AH, Cho J** 1999 Pregnancy, parturition, and lactation in hypophyseal stalk-transected beef heifers. *J Endocrinol* 163:463-475
- Annen E, Fitzgerald A, Gentry P, McGuire M, Capuco AV, Baumgard L, Collier R** 2007 Effect of continuous milking and bovine somatotropin supplementation on mammary epithelial cell turnover. *J Dairy Sci* 90:165-183
- Athie F, Bachman K, Head H, Hayen M, Wilcox C** 1996 Estrogen Administrated at final milk removal accelerates involution of bovine mammary gland. *J Dairy Sci* 79:220-226
- Atwood CS, Hovey RC, Glover JP, Chepko G, Ginsburg E, Robison WG, Vonderhaar BK** 2000 Progesterone induces side-branching of the ductal epithelium in the mammary glands of peripubertal mice. *J Endocrinol* 167:39-52
- Auldish MJ, Turner SA, McMahon CD, Prosser CG** 2007 Effects of melatonin on the yield and composition of milk from grazing dairy cows in New Zealand. *J Dairy Res* 74:52-57
- Aupperlee M, Haslam S** 2007 Differential hormonal regulation and function of progesterone receptor isoforms in normal adult mouse mammary gland. *Endocrinology* 148:2290-2300

- Bachman K, Hayen M, Morse D, Wilcox C** 1988 Effect of pregnancy, milk yield and somatic cell count on bovine milk fat hydrolysis. *J Dairy Sci* 71:925-931
- Baril G, Leboeuf B, Saumande J** 1993 Synchronization of estrus in goats: the relationship between time of occurrence of estrus and fertility following artificial insemination. *Theriogenology* 40:621-628
- Bartlewski PM, Baby TE, Giffin JL** 2011 Reproductive cycles in sheep. *Anim Reprod Sci* 124:259-268
- Bazer FW, First NL** 1983 Pregnancy and parturition. *J Anim Sci* 57 Suppl 2:425-460
- Ben Chedly H** 2009 Dynamique et activité des cellules épithéliales mammaires lors de la monotraite chez la chèvre : implication de l'ouverture des jonctions cellulaires. Agrocampus-Ouest. PhD Thesis
- Ben Chedly H, Boutinaud M, Bernier-Dodier P, Marnet PG, Lacasse P** 2010 Disruption of cell junctions induces apoptosis and reduces synthetic activity in lactating goat mammary gland. *J Dairy Sci* 93:2938-2951
- Benoit AM, Inskeep EK, Dailey RA** 1992 Effect of a nonsteroidal aromatase inhibitor on in vitro and in vivo secretion of estradiol and on the estrous-cycle in ewes. *Domest Anim Endocrinol* 9:313-327
- Bernier-Dodier P, Delbecchi L, Wagner GF, Talbot BG, Lacasse P** 2010 Effect of milking frequency on lactation persistency and mammary gland remodeling in mid-lactation cows. *J Dairy Sci* 93:555-564
- Berry SDK, McFadden TB, Pearson RE, Akers RM** 2001 A local increase in the mammary IGF-1: IGFBP-3 ratio mediates the mammogenic effects of estrogen and growth hormone. *Domest Anim Endocrinol* 21:39-53
- Berry SDK, Howard R, Jobst P, Jiang H, Akers RM** 2003 (a) Interactions between the ovary and the local IGF-1 axis modulate mammary development in prepubertal heifers. *J Endocrinol* 177:295-304
- Berry SDK, Jobst P, Ellis SE, Howard R, Capuco AV, Akers RM** 2003 (b) Mammary epithelial proliferation and estrogen receptor alpha expression in prepubertal heifers: effects of ovariectomy and growth hormone. *J Dairy Sci* 86:2098-2105
- Berry SDK, Weber Nielsen M, Sejrsen K, Pearson R, Boyle P, Akers RM** 2003 (c) Use of an immortalized bovine mammary epithelial cell line (MAC-T) to measure the mitogenic activity of extracts from heifer mammary tissue: effects of nutrition and ovariectomy. *Domest Anim Endocrinol* 25:245-253
- Berry SDK, Howard RD, Akers RM** 2003 (d) Mammary localization and abundance of laminin, fibronectin and collagen IV proteins in prepubertal heifers. *J Dairy Sci* 86:2864-2874
- Bertilsson J, Berglund B, Ratnayake G, Svennersten Sjaunja K, Wiktorsson H** 1997 Optimising lactation cycles for the high-yielding dairy cow. A European perspective. *Livest Product Sci* 50:5-13
- Boulares AH, Yakovlev AG, Ivanova V, Stoica BA, Wang G, Iyer S, Smulson M** 1999 Role of Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP) cleavage in apoptosis. *J Biol Chemistry* 274:22932-22940
- Boutinaud M, Rulquin H, Keisler D, Djiane J, Jammes H** 2002 (a) 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, Jammes H** 2002 (b) Potential uses of milk epithelial cells: a review. *Reprod Nutr Dev* 42:133-147
- Boutinaud M, Guinard-Flament J, Jammes H** 2004 The number and activity of mammary epithelial cells, determining factors for milk production. *Reprod Nutr Dev* 44:499-508
- Boutinaud M, Lollivier V, Finot L, Bruckmaier RM, 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

- Briend A, Fauveau V, Chakraborty J** 1991 Contraceptive use and breast-feeding duration in rural Bangladesh. *Eur J Clin Nutr* 45:341-346
- Brisken C, O'Malley B** 2010 Hormone action in the mammary gland. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2:a003178
- Brisken C, Heineman A, Chavarria T, Elenbaas B, Tan J, Dey SK, McMahon JA, McMahon AP, Weinberg RA** 2000 Essential function of Wnt-4 in mammary gland development downstream of progesterone signaling. *Genes Dev* 14:650-654
- Buehring GC** 1990 Culture of mammary epithelial cells from bovine milk. *J Dairy Sci* 73:956-963
- Burns AR, Bowden RA, MacDonell SD, Walker DC, Odebunmi TO, Donnachie EM, Simon SI, Entman ML, Smith CW** 2000 Analysis of tight junctions during neutrophil transendothelial migration. *J Cell Sci* 113 (Pt 1):45-57
- Capuco AV, Ellis SE, Wood DL, Akers RM, Garrett W** 2002 Postnatal mammary ductal growth: three-dimensional imaging of cell proliferation, effects of estrogen treatment, and expression of steroid receptors in prepubertal calves. *Tissue and Cell* 34:143-154
- Capuco AV, Akers RM** 2009 The origin and evolution of lactation. *J Biol* 8:37
- Capuco AV, Wood D, Baldwin R, Mcleod K, Paape M** 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
- Capuco AV, Ellis S, Hale S, Long E, Erdman R, Zhao X, Paape M** 2003 Lactation persistency : Insights from mammary cell proliferation studies. *J Anim Sci* 81:18-31
- Carnahan KG, Prince BC, Mirando MA** 1996 Exogenous oxytocin stimulates uterine secretion of prostaglandin F2 alpha in cyclic and early pregnant swine. *Biol Reprod* 55:838-843
- Chappat P** 1993 La castration de la vache. *Bulletin des GTV* 1:53-63
- Chastant S, Yart L, Dessauge F, Guérin P, Lollivier V** 2012 Intérêts zootechniques de la castration chez la vache. Journées Nationales GTV, Nantes, France
- Clarke R** 2000 Introduction and overview: sex steroids in the mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 5:245-250
- Connor E, Meyer M, Li R, Van Amburgh M, Boisclair Y, Capuco AV** 2007 Regulation of Gene Expression in the Bovine Mammary Gland by Ovarian Steroids. *J Dairy Sci* 90:E55-E65
- Cutullic E** 2010 Concurrence entre lactation et reproduction chez la vache laitière. 1-170. INRA / université de Caen Basse-Normandie. PhD Thesis
- Dahl GE, Elsasser TH, Capuco AV, Erdman RA, Peters RR** 1997 Effects of a long daily photoperiod on milk yield and circulating concentrations of insulin-like growth factor-1. *J Dairy Sci* 80:2784-2789
- Dahl GE, Buchanan BA, Tucker HA** 2000 Photoperiodic effects on dairy cattle: a review. *J Dairy Sci* 83:885-893
- Delbecchi L, Miller N, Prud'homme C, Petitclerc D, Wagner G, Lacasse P** 2005 17beta-Estradiol reduces milk synthesis and increases stanniocalcin gene expression in the mammary gland of lactating cows. *Livest Product Sci* 98:57-66
- Delbecchi L, Lacasse P** 2006 Suppression of estrous cycles in lactating cows has no effect on milk production. *J Dairy Sci* 89:636-639

- Delouis C, Richard P** 1991 La lactation. pp 487-514 In: La Reproduction chez les mammifères et l'homme. Thibault C, Levasseur M (eds). INRA (edn), Ellipse (edn), Paris
- Denamur R, Martinet J** 1961 Effect of hypophysectomy and pituitary stalk section on gestation in the sheep. *Ann Endocrinol* 22:755-759
- Deome KB, Faulkin LJ, Jr., Bern HA, Blair PB** 1959 Development of mammary tumors from hyperplastic alveolar nodules transplanted into gland-free mammary fat pads of female C3H mice. *Cancer Res* 19:515-520
- Desjardins C, Paape MJ, Tucker HA** 1968 Contribution of pregnancy, fetuses, fetal placentas and deciduomas to mammary gland and uterine development. *Endocrinology* 83:907-910
- Dessauge F, Finot L, Wiart S, Aubry J, Ellis SE** 2009 Effects of ovariectomy in prepubertal goats. *J Physiol Pharmacol* 60:127-133
- Dessauge F, Lollivier V, Ponchon B, Bruckmaier R, Finot L, Wiart S, Cutullic E, Disenhaus C, Barbey S, Boutinaud M** 2011 Effects of nutrient restriction on mammary cell turnover and mammary gland remodeling in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 94:4623-4635
- Dossier Economie de l'Elevage n°415, Juillet 2011
- Driancourt MA** 2001 Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology* 55:1211-1239
- Du Roizel-Marlier T** 2004 Effets de l'ovariectomie sur la production laitière des vaches de races Montbéliarde et Prim'Holstein. Etude cas-témoins. ENVA. DVM Thesis
- Dutta U, Pant K** 2008 Aromatase inhibitors: past, present and future in breast cancer therapy. *Med Oncol* 25:113-124
- Ellis SE, McFadden T, Akers RM** 1998 Prepubertal ovine mammary development unaffected by ovariectomy. *Domest Anim Endocrinol* 15:217-225
- Ellis SE, Capuco AV** 2002 Cell proliferation in bovine mammary epithelium: identification of the primary proliferative cell population. *Tissue and Cell* 34:155-163
- Elsasser TH, Rumsey TS, Hammond AC** 1989 Influence of diet on basal and growth hormone-stimulated plasma concentrations of IGF-I in beef cattle. *J Anim Sci* 67:128-141
- Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, Feuring M, Wehling M** 2000 Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Rev* 52:513-556
- Farr V, Stelwagen K, Cate L, Molenaar A, McFadden T, Davis S** 1996 An improved method for the routine biopsy of bovine mammary tissue. *J Dairy Sci* 79:543-549
- Fatet A, Pellicer-Rubio MT, Leboeuf B** 2011 Reproductive cycle of goats. *Anim Reprod Sci* 124:211-219
- Faverdin P, Delagarde R, Delaby L, Meschy F** 2007 Alimentation des vaches laitières. pp 23-55 In: Alimentation des bovins, ovins et caprins. Besoins des animaux – Valeurs des aliments. Quae (edn), Versailles
- Flint DJ, Knight CH** 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
- Forde N, Beltman ME, Lonergan P, Diskin M, Roche JF, Crowe MA** 2011 Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle. *Anim Reprod Sci* 124:163-169

- Forsyth IA** 1986 Variation among species in the endocrine control of mammary growth and function: the roles of prolactin, growth hormone, and placental lactogen. *J Dairy Sci* 69:886-903
- Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G** 2000 Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev* 80:1523-1631
- Fuchs AR, Cubile L, Dawood MY, Jorgensen FS** 1984 Release of oxytocin and prolactin by suckling in rabbits throughout lactation. *Endocrinology* 114:462-469
- Gendron P, Reveau A** 1995 L'alternative lactation longue. *La Chèvre* 208:33-36
- Gobet M** 2008 Historique de l'ovariectomie chez la vache : techniques chirurgicales et indications. ENVA. DVM Thesis
- Goodman GT, Akers RM, Friderici KH, Tucker HA** 1983 Hormonal regulation of alpha-lactalbumin secretion from bovine mammary tissue cultured in vitro. *Endocrinology* 112:1324-1330
- Green KA, Streuli CH** 2004 Apoptosis regulation in the mammary gland. *Cell Mol Life Sci* 61:1867-1883
- Guenette RS, Corbeil HB, Léger J, Wong K, Mézl V, Mooibroek M, Tenniswood M** 1994 Induction of gene expression during involution of the mammary gland of the rat. *J Mol Endocrinol* 12:47-60
- Hale SA, Capuco AV, Erdman RA** 2003 Milk yield and mammary growth effects due to increased milking frequency during early lactation. *J Dairy Sci* 86:2061-2071
- Haslam SZ, Woodward TL** 2001 Reciprocal regulation of extracellular matrix proteins and ovarian steroid activity in the mammary gland. *Breast Cancer Res* 3:365-372
- Heid HW, Keenan TW** 2005 Intracellular origin and secretion of milk fat globules. *Eur J Cell Biol* 84:245-258
- Herrington J, Carter-Su C** 2001 Signaling pathways activated by the growth hormone receptor. *Trends Endocrinol Metab* 12:252-257
- Hillier SG** 2001 Gonadotropic control of ovarian follicular growth and development. *Mol Cell Endocrinol* 179:39-46
- Hojsgaard S, Halekoh U, Yan J** 2006 The R package geepack for generalized estimating equations. *J Stat Software* 15:1-11
- Hoshino K** 1978 Mammary transplantation and its histogenesis in mice. pp 163-228 In: *Physiology of Mammary Gland*. Yokoyama A, Mizuno H, Nagasawa H (eds). Tokyo
- Hovey RC, McFadden TB, Akers RM** 1999 Regulation of mammary gland growth and morphogenesis by the mammary fat pad: a species comparison. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 4:53-68
- Hulboy DL, Rudolph LA, Matrisian LM** 1997 Matrix metalloproteinases as mediators of reproductive function. *Mol Hum Reprod* 3:27-45
- Hurley W** 1989 Symposium : Mammary gland function during involution and the declining phase of lactation. *J Dairy Sci* 72:1637-1646
- Huynh HT, Robitaille G, Turner JD** 1991 Establishment of bovine mammary epithelial cells (MAC-T): an in vitro model for bovine lactation. *Exp Cell Res* 197:191-199
- Janowski T, Zdunczyk S, Malecki-Tepicht J, Baranski W, Ras A** 2002 Mammary secretion of oestrogens in the cow. *Domest Anim Endocrinol* 23:125-137

- Jenness R** 1974 Proceedings: Biosynthesis and composition of milk. *J Invest Dermatol* 63:109-118
- Jenness R** 1986 Lactational performance of various mammalian species. *J Dairy Sci* 69:869-885
- Johnson ML, Redmer DA, Reynolds LP** 1997 Effects of ovarian steroids on uterine growth, morphology, and cell proliferation in ovariectomized, steroid-treated ewes. *Biol Reprod* 57:588-596
- Jordan VC, Lewis JS, Osipo C, Cheng D** 2005 The apoptotic action of estrogen following exhaustive antihormonal therapy: a new clinical treatment strategy. *Breast* 14:624-630
- Kastner P, Krust A, Turcotte B, Stropp U, Tora L, Gronemeyer H, Chambon P** 1990 Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *The EMBO Journal* 9:1603-1614
- Knight CH, Peaker M** 1982 Development of the mammary gland. *J Reprod Fertil* 65:521-536
- Knight CH, Peaker M** 1984 Mammary development and regression during lactation in goats in relation to milk secretion. *Quart J Experimental Physiol* 69:331-338
- Kolek O, Gajkowska B, Godlewski MM, Motyl T** 2003 Antiproliferative and apoptotic effect of TGF-beta 1 in bovine mammary epithelial BME-UV1 cells. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 134:417-430
- Kratochwil K** 1971 In vitro analysis of the hormonal basis for the sexual dimorphism in the embryonic development of the mouse mammary gland. *J Embryol Exp Morphol* 25:141-153
- Labussière J, Marnet P, Combaud J, Beaufile M, de la Chevalerie F** 1993 Influence du nombre de corps jaunes sur la libération d'ocytocine lutéale, le transfert du lait alvéolaire dans la citerne et la production laitière chez la brebis. *Reprod Nutr Dev* 33:383-393
- Lacasse P, Lollivier V, Bruckmaier RM, Boisclair YR, Wagner GF, Boutinaud M** 2011 Effect of the prolactin-release inhibitor quinagolide on lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 94:1302-1309
- Lamote I, Meyer E, Massart-Leen A, Burvenich C** 2004 Sex steroids and growth factors in the regulation of mammary gland proliferation, differentiation, and involution. *Steroids* 69:145-159
- Lewis JS, Meeke K, Osipo C, Ross EA, Kidawi N, Li T, Bell E, Chandel NS, Jordan VC** 2005 Intrinsic mechanism of estradiol-induced apoptosis in breast cancer cells resistant to estrogen deprivation. *J Natl Cancer Inst* 97:1746-1759
- Ley JM, Jenness R** 1970 Lactose synthetase activity of alpha-lactalbumins from several species. *Arch Biochem Biophys* 138:464-469
- Li R, Meyer M, Van Tassell C, Sonstegard T, Connor E, Van Amburgh M, Boisclair Y, Capuco AV** 2006 Identification of estrogen-responsive genes in the parenchyma and fat pad of the bovine mammary gland by microarray analysis. *Physiological Genomics* 24:42-53
- Linzell JL, Peaker M** 1971 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 JL** 1973 Innate seasonal oscillations in the rate of milk secretion in goats. *J Physiol* 230:225-233
- Loizzi RF** 1985 Progesterone withdrawal stimulates mammary gland tubulin polymerization in pregnant rats. *Endocrinology* 116:2543-2547
- Lollivier V, Guinard-Flament J, Ollivier-Bousquet M, Marnet PG** 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, Marnet PG, Delpal S, Rainteau D, Achard C, Rabot A, Ollivier-Bousquet M** 2006 Oxytocin stimulates secretory processes in lactating rabbit mammary epithelial cells. *J Physiol* 570:125-140
- Long E, Capuco AV, Wood DL, Sonstegard T, Tomita G, Paape MJ, Zhao X** 2001 *Escherichia coli* induces apoptosis and proliferation of mammary cells. *Cell Death Differ* 8:808-816
- Lonning PE** 2004 Aromatase inhibitors in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 11:179-189
- Lopez H, Caraviello DZ, Satter LD, Fricke PM, Wiltbank MC** 2005 Relationship between level of milk production and multiple ovulations in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 88:2783-2793
- Malpaux B, Viguie C, Skinner DC, Thiery JC, Chemineau P** 1997 Control of the circannual rhythm of reproduction by melatonin in the ewe. *Brain Res Bull* 44:431-438
- Manalu W, Sumaryadi MY** 1998 Correlations of litter size and maternal serum progesterone concentration during pregnancy with mammary gland growth and development indices at parturition in Javanese thin-tail sheep. *Asian-Australasian J Anim Sci* 11:300-306
- Marcek JM, Swanson LV** 1984 Effect of photoperiod on milk production and prolactin of Holstein dairy cows. *J Dairy Sci* 67:2380-2388
- Marnet PG, Komara M** 2008 Management systems with extended milking intervals in ruminants: regulation of production and quality of milk. *J Anim Sci* 86:47-56
- Martinet J, Houdebine L** 1993 Endocrinologie de la lactation. pp 3-58 In: *Biologie de la lactation*. Martinet J, Houdebine L (eds). INRA (edn), INSERM (edn), Versailles
- McGrath MF** 1987 A novel system for mammary epithelial cell culture. *J Dairy Sci* 70:1967-1980
- Meyer M, Capuco AV, Boisclair Y, Van Amburgh M** 2006 Estrogen-dependent responses of the mammary fat pad in prepubertal dairy heifers. *J Endocrinol* 190:819-827
- Miller AR, Stanisiewski EP, Erdman RA, Douglass LW, Dahl GE** 1999 Effects of long daily photoperiod and bovine somatotropin (Trobtest) on milk yield in cows. *J Dairy Sci* 82:1716-1722
- Miller N, Delbecchi L, Petitclerc D, Wagner GF, Talbot BG, Lacasse P** 2006 Effect of stage of lactation and parity on mammary gland cell renewal. *J Dairy Sci* 89:4669-4677
- Miller WL** 2007 Steroidogenic acute regulatory protein (StAR), a novel mitochondrial cholesterol transporter. *Biochim Biophys Acta* 1771:663-676
- Miller WL, Auchus RJ** 2011 The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocr Rev* 32:81-151
- Mills ES, Topper YJ** 1969 Mammary alveolar epithelial cells: effect of hydrocortisone on ultrastructure. *Science* 165:1127-1128
- Mollett T, Erb R, Monk E, Malven P** 1976 Changes in estrogen, progesterone, prolactin and lactation traits associated with injection of estradiol-17beta and progesterone into lactating cows. *J Dairy Sci* 42:655-663
- Mor G, Kohen F, Garcia-Velasco J, Nilsen J, Brown W, Song J, Naftolin F** 2000 Regulation of fas ligand expression in breast cancer cells by estrogen: functional differences between estradiol and tamoxifen. *J Steroid Biochem Mol Biol* 73:185-194
- Morrissey A, Cameron A, Tilbrook A** 2008 Artificial lighting during winter increases milk yield in dairy ewes. *J Dairy Sci* 91:4238-4243

- Motyl T, Gajkowska B, Zarzynska J, Gajewska M, Lamparska-Przybysz M** 2006 Apoptosis and autophagy in mammary gland remodeling and breast cancer chemotherapy. *J Physiol Pharmacol* 57 Suppl 7:17-32
- Norgaard J, Sorensen M, Theil P, Sehested J, Sejrsen K** 2008 Effect of pregnancy and feeding level on cell turnover and expression of related genes in the mammary tissue of lactating dairy cows. *Animal* 2:588-594
- Oftedal OT** 2012 The evolution of milk secretion and its ancient origins. *Animal* 6:355-368
- Ollivier-Bousquet M** 2002 Milk lipid and protein traffic in mammary epithelial cells: joint and independent pathways. *Reprod Nutr Dev* 42:149-162
- Olori VE, Brotherstone S, Hill WG, McGuirk BJ** 1997 Effect of gestation stage on milk yield and composition in Holstein Friesian dairy cattle. *Livest Product Sci* 52:167-176
- Patel O, Takenouchi N, Takahashi T, Hirako M, Sasaki N, Domeki I** 1999 Plasma oestrone and oestradiol concentrations throughout gestation in cattle: relationship to stage of gestation and fetal number. *Res Vet Sci* 66:129-133
- Peaker M, Wilde CJ** 1996 Feedback control of milk secretion from milk. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1:307-315
- Peters RR, Chapin LT, Emery RS, Tucker HA** 1981 Milk yield, feed intake, prolactin, growth hormone, and glucocorticoid response of cows to supplemented light. *J Dairy Sci* 64:1671-1678
- Petz LN, Ziegler YS, Schultz JR, Kim H, Kemper JK, Nardulli AM** 2004 Differential regulation of the human progesterone receptor gene through an estrogen response element half site and Sp1 sites. *J Steroid Biochem Mol Biol* 88:113-122
- Plath A, Einspanier R, Peters F, Sinowatz F, Schams D** 1997 Expression of transforming growth factors alpha and beta-1 messenger RNA in the bovine mammary gland during different stages of development and lactation. *J Endocrinol* 155:501-511
- Prpar S, Martignani E, Dovc P, Baratta M** 2012 Identification of goat mammary stem/progenitor cells. *Biol Reprod* 86 (4) 117:1-7
- Pullan S, Wilson J, Metcalfe A, Edwards GM, Goberdhan N, Tilly J, Hickman JA, Dive C, Streuli CH** 1996 Requirement of basement membrane for the suppression of programmed cell death in mammary epithelium. *J Cell Sci* 109:631-642
- Purup S, Sejrsen K, Foldager J, Akers RM** 1993 Effect of exogenous bovine growth hormone and ovariectomy on prepubertal mammary growth, serum hormones and acute in-vitro proliferative response of mammary explants from Holstein heifers. *J Endocrinol* 139:19-26
- Purup S, SEJRSEN K, AKERS RM** 1995 Effect of bovine GH and ovariectomy on mammary tissue sensitivity to IGF-I in prepubertal heifers. *J Endocrinol* 144:153-158
- Rabot A, Sinowatz F, Berisha B, Meyer HHD, Schams D** 2007 Expression and Localization of extracellular matrix-degrading proteinases and their inhibitors in the bovine mammary gland during development, function, and involution. *J Dairy Sci* 90:740-748
- Rae MT, Menzies GS, Bramley TA** 1998 Bovine ovarian non-genomic progesterone binding sites: presence in follicular and luteal cell membranes. *J Endocrinol* 159:413-427
- Ray EW, Averill SC, Lyons WR, Johnson RE** 1955 Rat placental hormonal activities corresponding to those of pituitary mammotropin. *Endocrinology* 56:359-373

- Ribadeau-Dumas B** 1993 Protéines du lait : structures et fonctions. pp 491-516 In: Biologie de la lactation. Martinet J, Houdebine L (eds). INRA (edn), INSERM (edn), Versailles
- Russo J, Yang X, Hu YF, Bove BA, Huang Y, Silva ID, Tahin Q, Wu Y, Higgy N, Zekri A, Russo IH** 1998 Biological and molecular basis of human breast cancer. *Front Biosci* 3:D944-D960
- Schams D, Kohlenberg S, Amselgruber W, Berisha B, Pfaffl MW, Sinowatz F** 2003 Expression and localisation of oestrogen and progesterone receptors in the bovine mammary gland during development, function and involution. *J Endocrinol* 177:305-317
- Schutz MM, Hansen LB, Steuernagel GR, Kuck AL** 1990 Variation of milk, fat, protein, and somatic cells for dairy cattle. *J Dairy Sci* 73:484-493
- Silanikove N, Shamay A, Shinder D, Moran A** 2000 Stress down regulates milk yield in cows by plasmin induced beta-casein product that blocks K⁺ channels on the apical membranes. *Life Sci* 67:2201-2212
- Simpson ER** 2000 Biology of aromatase in the mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 5:251-258
- Singh K, Davis S, Dobson J, Molenaar A, Wheeler T, Prosser C, Farr V, Oden K, Swanson K, Phyn C, Hyndman D, Wilson T, Henderson H, Stelwagen K** 2008 cDNA microarray analysis reveals that antioxidant and immune genes are upregulated during involution of the bovine mammary gland. *J Dairy Sci* 91:2236-2246
- Sobolewska A, Gajewska M, Zarzynska J, Gajkowska B, Motyl T** 2009 IGF-I, EGF, and sex steroids regulate autophagy in bovine mammary epithelial cells via the mTOR pathway. *Eur J Cell Biol* 88:117-130
- Sobolewska A, Motyl T, Gajewska M** 2011 Role and regulation of autophagy in the development of acinar structures formed by bovine BME-UV1 mammary epithelial cells. *Eur J Cell Biol* 90:854-864
- Sorensen A, Knight C** 2002 Endocrine profiles of cows undergoing extended lactation in relation to the control of lactation persistency. *Domest Anim Endocrinol* 23:111-123
- Souza CJ, Campbell BK, Webb R, Baird DT** 1997 Secretion of inhibin A and follicular dynamics throughout the estrous cycle in the sheep with and without the Booroola gene (FecB). *Endocrinology* 138:5333-5340
- Sölkner J, Fuchs W** 1987 A comparison of different measures of persistency with special respect to variation of test-day milk yields. *Livest Product Sci* 16:305-319
- Stefanon B, Colitti M, Gabai G, Knight CH, Wilde C** 2002 Mammary apoptosis and lactation persistency in dairy animals. *J Dairy Res* 69:37-52
- Stricker P, Grueter F** 1929 Recherches expérimentales sur les fonctions du lobe antérieur de l'hypophyse : influence des extraits du lobe antérieur sur l'appareil génital de la lapine et sur la montée laiteuse. *Presse Méd* 37:1268-1271
- Stull MA, Pai V, Vomachka AJ, Marshall AM, Jacob GA, Horseman ND** 2007 Mammary gland homeostasis employs serotonergic regulation of epithelial tight junctions. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:16708-16713
- Svennersten-Sjaunja K, Olsson K** 2005 Endocrinology of milk production. *Domest Anim Endocrinol* 29:241-258
- Talhok RS, Bissell MJ, Werb Z** 1992 Coordinated expression of extracellular matrix-degrading proteinases and their inhibitors regulates mammary epithelial function during involution. *J Cell Biol* 118:1271-1282
- Taylor AH, McParland PC, Taylor DJ, Bell SC** 2009 The cytoplasmic 60 kDa progesterone receptor isoform predominates in the human amniochorion and placenta at term. *Reprod Biol Endocrinol* 7:22

- Thatcher WW, Macmillan KL, Hansen PJ, Drost M** 1989 Concepts for regulation of corpus luteum function by the conceptus and ovarian follicles to improve fertility. *Theriogenology* 31:149-164
- Thomas P, Pang Y, Filardo EJ, Dong J** 2005 Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology* 146:624-632
- Tremblay G, Bernier-Dodier P, Delbecchi L, Wagner GF, Talbot BG, Lacasse P** 2009 Local control of mammary involution: is stanniocalcin-1 involved? *J Dairy Sci* 92:1998-2006
- Trott JF, Vonderhaar BK, Hovey RC** 2008 Historical perspectives of prolactin and growth hormone as mammogens, lactogens and galactagogues--agog for the future! *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 13:3-11
- Tucker HA** 2000 Hormones, mammary growth, and lactation: a 41-year perspective. *J Dairy Sci* 83:874-884
- Turner CW, Yamamoto H, Ruppert HL** 1956 The experimental induction of growth of the cow's udder and the initiation of milk secretion. *J Dairy Sci* 39:1717-1729
- Vashdi D, Elberg G, Sakal E, Gertler A** 1992 Biological activity of bovine placental lactogen in 3T3-F442A preadipocytes is mediated through a somatogenic receptor. *FEBS Lett* 305:101-104
- Veltmaat JM, Maillieux AA, Thiery JP, Bellusci S** 2003 Mouse embryonic mammogenesis as a model for the molecular regulation of pattern formation. *Differentiation* 71:1-17
- Vermouth NT, Deis RP** 1974 Prolactin release and lactogenesis after ovariectomy in pregnant rats: effect of ovarian hormones. *J Endocrinol* 63:13-20
- Vilotte JL** 2002 Lowering the milk lactose content in vivo: potential interests, strategies and physiological consequences. *Reprod Nutr Dev* 42:127-132
- Wallace C** 1953 Observations on mammary development in calves and lambs. *J Agric Sci* 43:413-421
- Walstra P** 1979 The voluminosity of bovine casein micelles and some of its implications. *J Dairy Res* 46:317-323
- Wareski P, Motyl T, Ryniewicz Z, Orzechowski A, Gajkowska B, Wojewodzka U, Ploszaj T** 2001 Expression of apoptosis-related proteins in mammary gland of goat. *Small Rumin Res* 40:279-289
- Wathes DC, Swann RW** 1982 Is oxytocin an ovarian hormone? *Nature* 297:225-227
- Welty FK, Smith KL, Schanbacher FL** 1976 Lactoferrin concentration during involution of the bovine mammary gland. *J Dairy Sci* 59:224-231
- Wilde CJ, KNIGHT CH** 1989 Metabolic adaptations in mammary gland during the declining phase of lactation. *J Dairy Sci* 72:1679-1692
- Wilde CJ, Addey CV, Boddy LM, Peaker M** 1995 Autocrine regulation of milk secretion by a protein in milk. *Biochem J* 305 (Pt 1):51-58
- Wiltbank M, Lopez H, Sartori R, Sangsritavong S, Gumen A** 2006 Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. *Theriogenology* 65:17-29
- Woodward TL** 1991 Effects of ovarian steroids on bovine mammary epithelial cells: in vitro and in vivo evidence of indirect stimulation of proliferation. Blacksburg Virginia. PhD Thesis
- Woodward TL, Beal WE, Akers RM** 1993 Cell interactions in initiation of mammary epithelial proliferation by oestradiol and progesterone in prepubertal heifers. *J Endocrinol* 136:149-157

- Woodward TL, Xie JW, Haslam SZ** 1998 The role of mammary stroma in modulating the proliferative response to ovarian hormones in the normal mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 3:117-131
- Yart L, Finot L, Marnet PG, Dessauge F** 2012 (a) Suppression of ovarian secretions before puberty strongly affects mammatogenesis in the goat. *J Dairy Res* 79:157-167
- Yart L, Dessauge F, Finot L, Barbey S, Marnet PG, Lollivier V** 2012 (b) Ovariectomy improves lactation persistency in dairy cows. *J Dairy Sci*. In Press
- Zarate S, Seilicovich A** 2010 Estrogen receptors and signaling pathways in lactotropes and somatotropes. *Neuroendocrinology* 92:215-223
- Zarzyńska J, Gajewska M, Motyl T** 2005 Effects of hormones and growth factors on TGF-beta1 expression in bovine mammary epithelial cells. *J Dairy Res* 72:39-48
- Zarzyńska J, Motyl T** 2005 Dissimilar effects of LY 294002 and PD 098059 in IGF-I-mediated inhibition of TGF-beta1 expression and apoptosis in bovine mammary epithelial cells. *J Physiol Pharmacol* 56 Suppl 3:181-193
- Zarzyńska J, Gajkowska B, Wojewodzka U, Dymnicki E, Motyl T** 2007 Apoptosis and autophagy in involuting bovine mammary gland is accompanied by up-regulation of TGF-beta1 and suppression of somatotrophic pathway. *Pol J Vet Sci* 10:1-9
- Zarzyńska J, Motyl T** 2008 Apoptosis and autophagy in involuting bovine mammary gland. *J Physiol Pharmacol* 59:275-288
- Zavizion B, van Duffelen M, Schaeffer W, Politis I** 1996 Establishment and characterization of a bovine mammary epithelial cell line with unique properties. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 32:138-148
- Zhou Y, Akers R, Jiang H** 2008 Growth hormone can induce expression of four major milk protein genes in transfected MAC-T cells. *J Dairy Sci* 91:100-108
- Zhu Y, Bond J, Thomas P** 2003 Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progesterin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:2237-2242