

École Supérieure des  
Agricultures d'Angers  
55 rue Rabelais  
49007 ANGERS CEDEX 1



Institut National de la  
Recherche Agronomique et  
Environnementale  
16 Le clos, Domaine de la Prise  
35590 SAINT-GILLES  
Marion BOUTINAUD



## EFFET DU NIVEAU D'APPORT DE CONCENTRÉ SUR L'ACTIVITÉ DES CELLULES EPITHÉLIALES MAMMAIRES CHEZ LA CHÈVRE



**MINISTÈRE  
DE L'AGRICULTURE  
ET DE LA SOUVERAINETÉ  
ALIMENTAIRE**

*Liberté  
Égalité  
Fraternité*

**Mémoire de Fin d'Etudes**  
Promotion 2018

Date : 12 septembre 2024

*BLANCHER Magali  
Élèves-Ingénieurs ESA  
Patron de mémoire : Loïc Flatrès-Grall*

Ecole Supérieure des  
Agricultures d'Angers  
55 rue Rabelais  
49007 ANGERS CEDEX 1



Institut National de la  
Recherche Agronomique et  
Environnementale  
16 Le clos, Domaine de la Prise  
35590 SAINT-GILLES  
Marion BOUTINAUD



## EFFET DU NIVEAU D'APPORT DE CONCENTRÉ SUR L'ACTIVITÉ DES CELLULES EPITHÉLIALES MAMMAIRES CHEZ LA CHÈVRE



**Mémoire de Fin d'Etudes**  
Promotion 2018

Date : 12 septembre 2024

BLANCHER Magali  
Élèves-Ingénieurs ESA  
Patron de mémoire : Loïc Flatrès-Grall

## RÉSUMÉ D'AUTEUR

Auteur : Magali BLANCHER	
Promotion : 2018	
Patron de mémoire : Loïc Flatrès-Grall	
<p>Signalement du mémoire : <b>Effet du niveau d'apport de concentré sur l'activité des cellules épithéliales mammaires chez la chèvre</b>, 131 pages ; 15 figures ; 10 tableaux et 12 annexes.</p> <p>Mots-clés : <i>capra hircus</i>, restriction alimentaire, concentré, épithélium mammaire</p>	
PLAN INDICATIF	Le rapport se compose d'une synthèse bibliographique qui fait état des connaissances actuelles. Ensuite, le matériel et les méthodes décrivent l'essai sur chèvres mis en place. Enfin, les deux dernières parties présentent et discutent les résultats.
BUTS DE L'ETUDE	L'objectif principal est de déterminer comment l'apport de concentré influence non seulement la quantité, mais aussi la qualité du lait produit et d'identifier les mécanismes sous-jacents mesurés à l'échelle de la cellule épithéliale mammaire et de l'épithélium mammaire.
METHODES ET TECHNIQUES	Un essai en double carré latin complet et équilibré a été réalisé sur 18 chèvres Alpines multipares. Trois doses de concentré (0 g, 400 g et 800 g) ont été testées sur trois périodes successives de trois semaines. Les chèvres étaient alimentées avec du foin de luzerne à volonté. Les variables relatives à la production laitière, la composition du lait, la viabilité, l'activité et l'exfoliation des cellules ainsi que l'intégrité de l'épithélium mammaire et le taux d'expression de certains gènes après 3 semaines de traitement, ont été étudiées à l'aide d'analyses de variance et d'études de contrastes.
RESULTATS	La production de lait, le taux butyreux, les matières grasses et protéiques, le taux de lactose, la quantité de lactose et la quantité de caséines ont augmenté avec l'apport de concentré, respectivement de +19%, 3,8%, 24%, 20%, 2,8%, 27,2% et 26% entre le traitement sans concentré et le traitement le plus élevé. Ces effets n'ont pas été accompagnés de variations de l'activité des CEM (viabilité cellulaire, apoptose, proportion des CEM produisant des espèces réactives à l'oxygène) ou du niveau d'expression des gènes. Cependant, une détérioration de l'intégrité de l'épithélium mammaire a été identifiée (+5,9% de ratio $Na^+/K^+$ du lait et -46% du ratio caséines/protéines solubles du lait) avec l'apport de concentré sans pour autant affecter le taux d'exfoliation des CEM dans le lait.
CONCLUSIONS	Les analyses des cellules épithéliales mammaires isolées du lait n'ont pas permis de conclure quant aux mécanismes de synthèse du lait face à la variation du concentré. D'autres niveaux de régulations (comme à l'échelle de la traduction) pourraient être impliqués. Enfin, l'impact sur l'intégrité de l'épithélium nécessite des études supplémentaires.

## BIBLIOGRAPHIC NOTICE

<p>Author: Magali BLANCHER</p> <p>Academic class: 2018 <span style="float: right;">Internship director: Loïc Flatrès-Grall</span></p> <p>Report description: <b>Effect of concentrate intake level on the activity of mammary epithelial cells in goats</b>, 131 pages, 10 tables, 15 figures, 12 appendixes          Key-words: <i>capra hircus</i>, feed restriction, concentrate, mammary epithelium</p>	
PLAN	<p>The report consists of a literature review summarizing current knowledge. Then, the materials and methods section describe the trial conducted on dairy goats. Finally, the last two sections present and discuss the results</p>
PURPOSES OF THE STUDY	<p>The primary objective is to determine how concentrate supplementation affects not only the quantity but also the quality of the milk produced, and to identify the underlying mechanisms at the level of the mammary epithelial cells and the integrity of the mammary epithelium</p>
METHODS AND TECHNICS	<p>A complete and balanced double Latin square trial was conducted on 18 multiparous Alpine goats. Three levels of concentrate supplementation (0 g, 400 g and 800 g) were tested over three consecutive three-week periods. The goats were fed <i>ad libitum</i> alfalfa hay. Variables related to milk production, milk composition, cell viability, activity and exfoliation as well as the integrity of the mammary epithelium and expression levels of certain genes after 3 weeks of treatment, were analysed using variance analyses and contrast studies.</p>
RESULTS	<p>Milk production, fat content, fat and protein yields, lactose percentage, lactose yield and casein yield increased with the inclusion of concentrate, showing respective increases of 19%, 3.8%, 24%, 20%, 2.8%, 27.2%, and 26% between the no-concentrate treatment and the highest concentrate level. These effects were not accompanied by changes in MEC activity (cell viability, apoptosis, proportion of MECs producing reactive oxygen species) or gene expression levels. However, a deterioration in mammary epithelial integrity was observed, with a 5.9% increase in the milk Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ratio and a 46% decrease in the milk casein/soluble protein ratio, despite no impact on MEC exfoliation rate in the milk.</p>
CONCLUSIONS	<p>The analyses of mammary epithelial cells isolated from milk did not provide conclusive insights into the mechanisms of milk synthesis in response to variations in concentrate intake. Other regulatory levels, such as translational regulation, might be involved. Finally, the impact on epithelial integrity requires further investigation.</p>

## REMERCIEMENTS

Je souhaite tout d'abord exprimer ma profonde gratitude au groupe d'intérêt scientifique « Avenir Elevage » pour leur soutien financier, qui a rendu possible la réalisation de ce stage. Un grand merci également à l'association GALA de CCPA, sans laquelle les analyses en laboratoire auraient été fortement restreintes.

Je tiens à remercier chaleureusement Marion Boutinaud, mon encadrante, pour sa confiance, son expertise et sa bienveillance tout au long de cette expérience. Sa patience lors des nombreuses relectures de mes écrits et son accompagnement constant ont été essentiels.

Mes sincères remerciements vont également à Catherine Hurtaud, dont les relectures rigoureuses et les conseils avisés ont largement contribué à la qualité de ce travail.

Je remercie également Loïc Flatrès-Grall, encadrant référence de mon stage de fin d'études, qui a suivi ma progression, m'a fait part de ses remarques et conseils autant au sujet du mémoire que sur mon avenir professionnel.

Je suis profondément reconnaissante envers les techniciens de l'UMR PEGASE, en particulier Perrine Poton, Nicole Huchet et Sabrina Philau, pour leur aide précieuse lors des analyses en laboratoire ainsi que leur formation aux différentes techniques d'analyse, qui ont enrichi mon apprentissage.

Je souhaite également adresser mes remerciements aux membres de l'atelier caprin laitier de l'installation expérimentale de Méjusseaume, notamment Jean Parois, Jean-Yves Thébault et Léa pour leur flexibilité lors des changements de dernière minute dans le protocole et leur enthousiasme matinal pendant les prélèvements, même aux premières heures du matin. Mes remerciements vont également à Ophélie Dhumez pour sa disponibilité et ses réponses à mes questions.

Enfin, je tiens à remercier toute l'équipe de l'UMR PEGASE pour les moments de convivialité passés ensemble, qu'il s'agisse de pauses café ou de repas partagés. Ces moments ont largement contribué à la richesse de cette expérience.

Enfin, un merci tout particulier à Marie et Clara, avec qui j'ai partagé de nombreux instants mémorables, tant au travail qu'en dehors. Je leur souhaite beaucoup de succès et de bonheur pour l'avenir

## TABLE DES MATIÈRES

<b>RÉSUMÉ D'AUTEUR .....</b>	<b>1</b>
<b>BIBLIOGRAPHIC NOTICE .....</b>	<b>2</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>6</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>6</b>
<b>SIGLES ET ABRÉVIATIONS.....</b>	<b>8</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>7</b>
CHAPITRE 1 : LES SYSTEMES ALIMENTAIRES DES ELEVAGES CAPRINS FRANÇAIS A LA RECHERCHE DE L'AUTONOMIE ALIMENTAIRE.....	7
CHAPITRE 2 : LES DIFFÉRENTS CONSTITUANTS DU LAIT ET LES MÉCANISMES DE LEUR SYNTHÈSE ET DE LEUR SÉCRÉTION PAR LA GLANDE MAMMAIRE.....	9
I. Les principaux constituants du lait et leurs mécanismes de synthèse et de sécrétion .....	9
A. Les glucides .....	9
B. Les lipides.....	11
C. Les matières azotées.....	11
D. Minéraux et oligo-éléments .....	13
Ii. Les cellules et débris cellulaires du lait de chèvre .....	15
CHAPITRE 3 : LES MÉCANISMES DE VARIATION DU NOMBRE, DE L'ACTIVITÉ ET DU STATUT REDOX DES CEM DANS LA GLANDE MAMMAIRE.....	15
I. Le nombre de cem régulé par les processus cellulaires .....	17
ii. L'expression des gènes régule les activités de synthèse des cem .....	21
iii. Le statut redox intervient dans les mécanismes de régulation .....	21
CHAPITRE 4 : EFFET D'UNE RESTRICTION ALIMENTAIRE SUR LE NOMBRE, L'ACTIVITÉ ET LE STATUT REDOX DES CEM DANS LA GLANDE MAMMAIRE .....	23
I. Restriction alimentaire et processus de renouvellement cellulaire .....	23
ii. Restriction alimentaire et activité de synthèse des cem .....	25
iii. Restriction alimentaire et statut redox des cem.....	27
<b>OBJECTIF DE L'ÉTUDE ET HYPOTHÈSES DE RECHERCHE .....</b>	<b>29</b>
<b>MATÉRIELS ET MÉTHODES .....</b>	<b>33</b>
I. Animaux et alimentation .....	33
II. Protocole expérimental .....	33
III. Mesures et analyses.....	35
INGESTION DES ANIMAUX ET ANALYSES CHIMIQUES DE L'ALIMENT .....	35
QUANTITÉ ET COMPOSITION DU LAIT .....	35
ANALYSE DE L'EXPRESSION DES GÈNES .....	37
DÉTERMINATION DU TAUX D'EXFOLIATION .....	41
CARACTÉRISATION DE LA POPULATION DES CELLULES DU LAIT ET DE LEUR SURVIE .....	41
ANALYSE STATISTIQUE .....	43
<b>RÉSULTATS DE L'ÉTUDE .....</b>	<b>45</b>
Ingestion de fourrage journalier .....	45
Production laitière journalière .....	45
Taux butyreux et matières grasses .....	47
Taux protéique et matières protéiques .....	49
Taux cellulaire .....	51
Taux de lactose et quantité de lactose .....	51
Concentration en caséines, protéines totales et protéines solubles .....	53
Quantité de caséines .....	55
Ratio de la quantité de caséines sur la quantité de protéines solubles.....	55
Viabilité et activités des cellules épithéliales mammaires isolées et purifiées du lait ..	57
Exfoliation des cellules épithéliales mammaires .....	57

Caractéristiques des populations cellulaires isolées du lait.....	61
Intégrité de l'épithélium mammaire .....	63
Taux d'expression des gènes étudiés .....	65
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>67</b>
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>81</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>83</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>94</b>

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Répartition de la production laitière caprine en 2023 en France métropolitaine (en millions de L) .....	10
Figure 2 : Composition de la fraction de concentrés de la ration des troupeaux caprins en France (en %) .....	10
Figure 3a et b : Ingestion de fourrage journalière moyenne des chèvres selon le niveau de concentré <sup>1</sup> ou la période <sup>2</sup> .....	44
Figure 4a et b : Production laitière journalière moyenne de chèvres selon le niveau de concentré <sup>1</sup> ou la période <sup>2</sup> . .....	44
Figure 5a et b : Taux butyreux journalier du lait de chèvre selon le niveau de concentré <sup>1</sup> ou la période <sup>2</sup> .....	46
Figure 6a et b : Matières grasses journalières du lait de chèvre selon le niveau de concentré <sup>1</sup> ou la période <sup>2</sup> .....	46
Figure 7a et b : Taux protéique journalier du lait de chèvre selon le niveau de concentré <sup>1</sup> ou la période <sup>2</sup> .....	48
Figure 8a et b : Matières protéiques journalière du lait de chèvre selon le niveau de concentré <sup>1</sup> ou la période <sup>2</sup> . .....	48
Figure 9a et b : Taux cellulaire par jour du lait de chèvre selon le niveau de concentré <sup>1</sup> ou la période <sup>2</sup> .....	50
Figure 10a et b : Taux de lactose du lait de chèvre analysé le matin du prélèvement selon le niveau de concentré <sup>1</sup> ou la période <sup>2</sup> . .....	50
Figure 11a et b : Quantité de lactose du lait de chèvre analysé le matin du prélèvement selon le niveau de concentré <sup>1</sup> ou la période <sup>2</sup> . .....	52
Figure 12a et b : Quantité de caséines dans le lait de chèvre le matin du prélèvement selon le niveau de concentré <sup>1</sup> ou la période <sup>2</sup> . .....	54
Figure 13a et b : Ratio de la quantité de caséines sur la quantité de protéines solubles du lait de chèvre le matin du prélèvement selon le niveau de concentré <sup>1</sup> ou la période <sup>2</sup> . .....	54
Figure 14 : Valeurs moyennes des proportions de cellules du lait de chèvre produisant des espèces réactives de l'oxygène selon le type cellulaire et leur état de survie analysées par cytométrie en flux. ....	62
Figure 15a et b : Ratio de la concentration en sodium sur la concentration en potassium du lait de chèvre le matin du prélèvement selon le niveau de concentré <sup>1</sup> ou la période <sup>2</sup> . .....	62

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau n°1 : Répartition des traitements selon le lot et la période .....	32
Tableau n°2 : Transitions de la dose de concentré selon le changement de traitement en grammes.....	32
Tableau n°3 : Moyennes marginales, contrastes des moyennes ajustées et p-value de la concentration en caséines, protéines solubles et protéines totales dans le lait de chèvre selon le niveau de concentré (en g/kg de lait).....	52
Tableau n°4 : Moyennes marginales, contrastes des moyennes ajustées et p-value de la concentration en caséines, protéines solubles et protéines totales dans le lait de chèvre selon la période (en g/kg de lait). ....	52

Tableau n°5a et b : Viabilité des CEM isolées du lait de chèvre selon le niveau de concentré ou la période.....	56
Tableau n°6a et b : Nombre de cellules épithéliales mammaires exfoliées du lait de chèvre selon le niveau de concentré ou la période ( $\times 10^6$ ).....	56
Tableau n°7a et b : Pourcentage de cellules selon le type cellulaire, leur état de survie ainsi que leur production de ROS (en %).....	60
Tableau n°8 : Taux d'expression des gènes chez des chèvres laitières analysé dans les CEM isolées du lait en fonction du niveau de concentré apporté dans la ration. ....	64
Tableau n°9 : Taux d'expression des gènes chez des chèvres laitières analysé dans les CEM isolées du lait en fonction de la période.....	64
Tableau 10 : Valeurs de viabilité des CEM obtenues selon deux méthodes différentes.....	74

## **SIGLES ET ABRÉVIATIONS**

5-OHmdU : 5-Hydroxymethyluracil

ABCG2 : ATP-binding cassette sub-family G member 2

ACACA : Acetyl-CoA Carboxylase Alpha

ADF : Acid Detergent Fiber

ADL : Acid Detergent Lignin

ARN/RNA : Acide RiboNucléique / Ribonucleic Acid

ATP : Adenosine Triphosphate

B4GALT1 : Beta-1,4-galactosyltransferase 1

BAX : Bcl-2-associated X protein

BCL-2 : B-cell lymphoma 2

BECN1 : Beclin 1

CEM : Cellules Épithéliales Mammaires

CASP8 : Caspase-8

CD49F : Integrin Alpha-6

CoA : Coenzyme A

CSN1S1 : Casein Alpha S1

CSN1S2 : Casein Alpha S2

CSN3 : Casein Kappa

DGAT1 : Diacylglycerol O-acyltransferase 1

ELOVL : Elongation of Very Long Chain Fatty Acids Protein

FasL : Fas Ligand

FASN : Fatty Acid Synthase

FITC : Fluorescein Isothiocyanate

FSC : Forward Scatter

GPAM : Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase

HSL : Hormone-Sensitive Lipase

ICP : Inductively Coupled Plasma

IEPL : Internal Elastic Plate Layer

INSIG1 : Insulin-induced gene 1

LALBA : Alpha-lactalbumin

LPL : Lipoprotein Lipase

Na : Sodium

NDF : Neutral Detergent Fiber

NRF2 : Nuclear factor erythroid 2-related factor 2

PA2G4 : Proliferation-associated 2G4

PBS : Phosphate-Buffered Saline

PCR : Polymerase Chain Reaction

PEGASE : Physiologie, Environnement et Génétique pour l'Animal et les Systèmes d'Élevage

ROS : Reactive Oxygen Species

SCD : Stearyl-CoA Desaturase

SCD1 : Stearoyl-CoA Desaturase 1

SLC2A1: Solute Carrier Family 2 Member 1

SLC5A1 : Sodium-glucose cotransporter 1

SOD1 : Superoxide Dismutase 1

SSC : Side Scatter

TB : Taux Butyreux

TNF- $\alpha$  : Tumor Necrosis Factor-alpha

TP : Taux Protéique

UMR : Unité Mixte de Recherche

v-ATPase/mTORC1 : Vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPase / Mechanistic Target of Rapamycin Complex 1

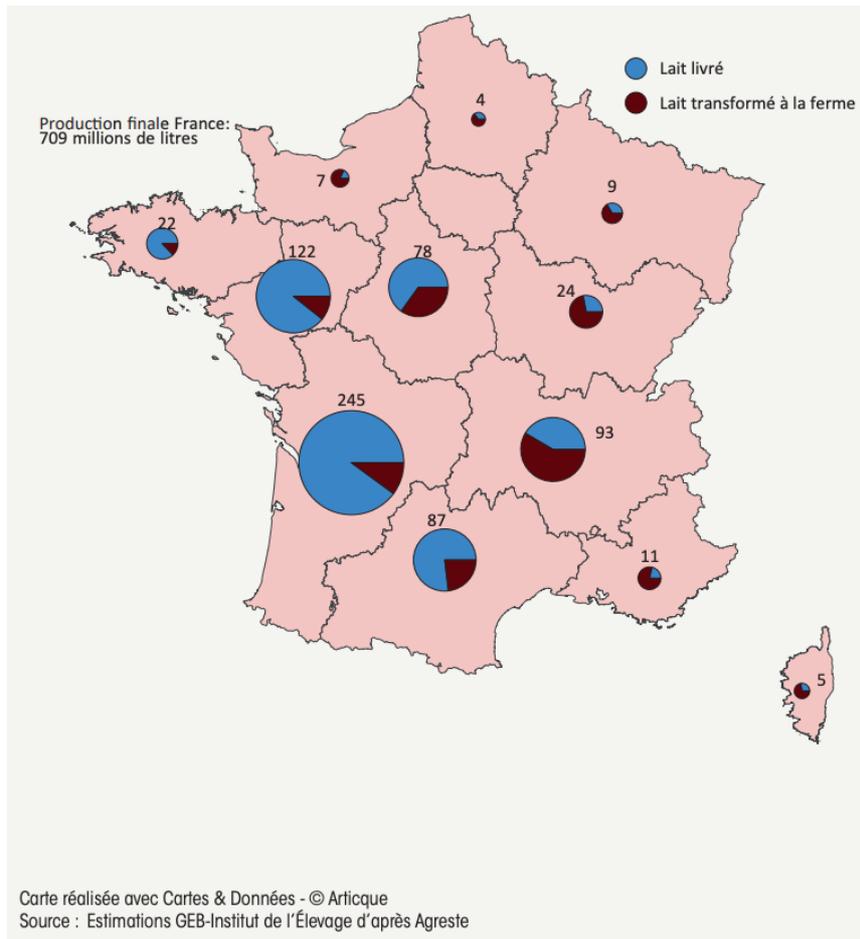


Figure 1 : Répartition de la production laitière caprine en 2023 en France métropolitaine (en millions de L)  
Source : Bossis et al. 2024

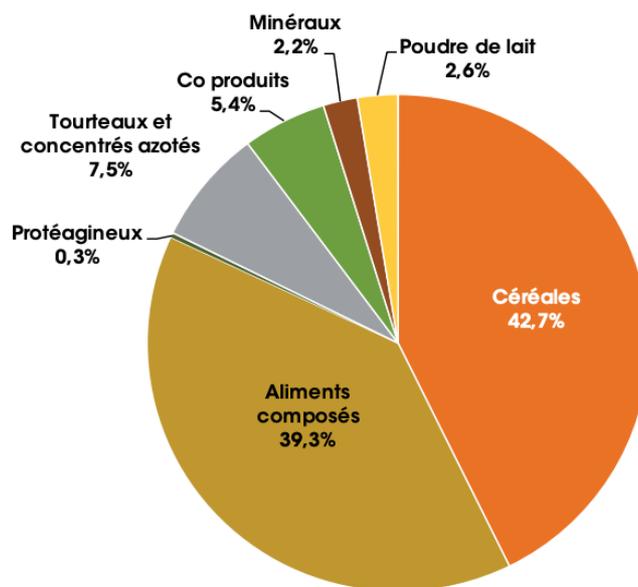


Figure 2 : Composition de la fraction de concentrés de la ration des troupeaux caprins en France (en %)  
Source : Bossis et al. 2024

## INTRODUCTION

La filière caprine en France joue un rôle crucial dans le secteur agricole européen, représentant une part significative de la production laitière caprine à l'échelle continentale. Avec plus de 7 000 élevages professionnels et un cheptel dépassant le million de têtes, la France se positionne comme un acteur clé de cette filière, non seulement en termes de quantité mais aussi de qualité de production. En 2023, le pays a produit 709 millions de litres de lait de chèvre dont la répartition est illustrée sur la figure 1, se plaçant ainsi en tête des pays européens devant l'Espagne, la Grèce et la Roumanie (Maigret 2023; Bossis et al. 2024). Cette performance exceptionnelle est le fruit d'une expertise accumulée sur plusieurs décennies, tant au niveau des pratiques d'élevage que des stratégies alimentaires adoptées.

L'élevage caprin en France est diversifié, avec des systèmes alimentaires adaptés aux spécificités régionales et aux exigences nutritionnelles des animaux. La ration des chèvres en France est majoritairement composée de fourrages, verts ou conservés, représentant en moyenne 68% de l'alimentation totale des caprins (Bossis, Jost 2016). Cependant, ces fourrages ne suffisent pas à couvrir l'intégralité des besoins énergétiques et protéiques des animaux, nécessitant l'ajout de concentré, qui représente environ 32% de la ration. Les différents types de concentré et leur proportion dans la ration sont illustrés sur la figure 2. En effet, en 2010, il fallait en moyenne 570 g de concentré pour produire un litre de lait, soulignant ainsi l'importance de l'efficacité dans l'utilisation de ces ressources (Bossis, Jost 2016). L'apport de ces concentrés, qu'ils soient produits sur l'exploitation ou achetés à l'extérieur, est crucial pour maintenir la productivité des chèvres tout en répondant à leurs besoins nutritionnels.

Dans le contexte actuel, marqué par une hausse des prix des matières premières en raison de la situation en Europe de l'Est, et plus particulièrement en Ukraine, l'augmentation du coût des aliments pour animaux représente un défi majeur pour les éleveurs. La hausse des prix des grains et des oléagineux a un impact direct sur les coûts de production, d'autant plus que les concentrés jouent un rôle essentiel dans l'alimentation des chèvres. Pour faire face à ces défis, l'autonomie alimentaire des élevages devient un enjeu central. Produire une part significative des aliments directement sur l'exploitation permet non seulement de réduire les coûts liés à l'achat de concentré mais aussi d'assurer une meilleure maîtrise de la qualité des rations distribuées aux animaux. En France, environ 61% de l'alimentation caprine est produite sur place, ce qui souligne l'importance de l'autonomie alimentaire dans la gestion économique des exploitations (Bossis, Jost 2016). Toutefois, cette autonomie varie en fonction des systèmes alimentaires mis en place, avec des différences notables entre les systèmes basés sur le foin, le pâturage ou l'ensilage de maïs.



L'étude de l'alimentation caprine en France révèle également une diversité de systèmes alimentaires, chacun ayant ses spécificités et ses performances en termes de production laitière et d'autonomie. Les systèmes basés sur le foin de légumineuses ou un mélange de graminées et légumineuses sont les plus répandus, couvrant près de 40% des élevages (Bossis, Jost 2016). Ces systèmes se caractérisent par une forte proportion de fourrages dans la ration, ce qui est essentiel pour assurer une bonne rumination et une salivation efficace chez le chèvre, des processus indispensables à leur santé digestive et à leur productivité. Cependant, d'autres systèmes, comme ceux basés sur l'ensilage de maïs ou le pâturage, montrent des performances variées en termes de production laitière, d'autonomie alimentaire et d'efficacité économique.

L'importance de l'alimentation dans la production laitière caprine ne se limite pas à la quantité de lait produit. Elle joue également un rôle déterminant dans la qualité du lait, notamment en influençant la composition en glucides, lipides et protéines. La qualité des fourrages et la gestion de l'apport en concentré sont ainsi des facteurs clés qui affectent directement la rentabilité des élevages et la satisfaction des exigences du marché en termes de qualité des produits laitiers. Dans un contexte économique marqué par l'augmentation des coûts de production, notamment en raison de la hausse des prix des matières premières, la maîtrise des coûts alimentaires devient une priorité pour les éleveurs. En effet, l'utilisation efficace des aliments concentrés est essentielle pour réduire les coûts tout en maintenant la performance des animaux.

C'est dans ce cadre que s'inscrit ce mémoire, qui vise à approfondir la compréhension des effets de l'alimentation sur la production laitière caprine, en particulier en ce qui concerne l'utilisation des concentrés. L'objectif principal est d'évaluer l'impact de différentes doses de concentré sur les performances des chèvres laitières, tant au niveau de la production de lait que du fonctionnement de l'épithélium mammaire. En effet, la glande mammaire est un organe complexe dont la productivité dépend de nombreux facteurs, notamment le nombre et l'activité des cellules épithéliales mammaires (CEM) qui la composent.

Les CEM jouent un rôle central dans la synthèse et la sécrétion du lait. Leur activité métabolique, leur capacité de prolifération, ainsi que leur viabilité sont directement influencées par la qualité et la quantité des nutriments ingérés par les animaux. De plus, l'exfoliation de ces cellules, c'est-à-dire leur détachement de la paroi de la glande mammaire, peut être un indicateur important de la santé de l'épithélium mammaire. En étudiant ces aspects, ce mémoire cherche à déterminer comment l'apport de concentré influence non seulement la quantité de lait produit, mais aussi la qualité des constituants du lait et l'état de la glande mammaire.



En outre, cette étude s'intéresse également au statut redox des CEM, un indicateur clé du stress oxydant au sein de la glande mammaire. Le stress oxydant est un phénomène qui peut avoir des conséquences délétères sur la santé des cellules, entraînant une réduction de leur viabilité et de leur fonction. En évaluant l'effet de différentes doses de concentré sur le statut redox des CEM, ce mémoire contribue à une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires sous-jacents à la production laitière et à la santé des CEM de la glande mammaire.

L'importance de cette recherche réside dans sa capacité à fournir des recommandations pratiques aux éleveurs pour optimiser l'alimentation de leurs troupeaux, réduire les coûts de production et améliorer la rentabilité de leurs exploitations. Dans un contexte de concurrence croissante sur le marché des produits laitiers et de marges bénéficiaires de plus en plus étroites, toute amélioration de l'efficacité alimentaire peut avoir un impact significatif sur la viabilité économique des élevages caprins.

Ce mémoire est structuré en deux grandes parties. La première partie se concentre sur un état des lieux des connaissances actuelles sur les mécanismes de synthèse et de sécrétion du lait par la glande mammaire, ainsi que sur les différents systèmes alimentaires caprins en France. Cette section abordera également les mécanismes cellulaires impliqués dans la prolifération, l'apoptose et l'exfoliation des CEM, ainsi que les notions de statut redox et de régulation génétique dans le contexte de la lactation. La deuxième partie sera consacrée à la présentation de l'essai expérimental mené dans le cadre de cette étude, à la méthodologie utilisée, et à l'analyse des résultats obtenus. Ces résultats seront ensuite discutés à la lumière des connaissances théoriques présentées dans la première partie, en vue de formuler des recommandations concrètes pour les éleveurs.



## **SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE**

### **CHAPITRE 1 : LES SYSTEMES ALIMENTAIRES DES ELEVAGES CAPRINS FRANÇAIS A LA RECHERCHE DE L'AUTONOMIE ALIMENTAIRE**

En France, les systèmes alimentaires caprins sont principalement composés de fourrages, qu'ils soient verts ou conservés. En effet, le système d'alimentation le plus répandu se compose en moyenne de 64 % de foin de légumineuses ou d'un mélange de foin de graminées et de légumineuses produits sur l'exploitation et concerne près de 40% des élevages caprins français (Bossis, Jost 2016). Cette base de fibre dans la ration est particulièrement essentielle pour la salivation et la rumination de la chèvre d'autant plus que c'est un animal qui exige un fourrage de qualité. La qualité des fourrages en caprin est un véritable enjeu pour réduire les refus alimentaires. Par exemple, un fourrage de mauvaise qualité pourra être refusé à hauteur de 32 % de la quantité distribuée tandis qu'un fourrage de bonne qualité ne sera refusé qu'à 12 %. Ainsi, un fourrage de qualité permet d'augmenter l'ingestion de 20 % en réduisant le gaspillage (França, Bluet 2022). Toutefois, ces fourrages ne sont pas en mesure de couvrir l'ensemble des besoins nutritionnels des chèvres, ce qui nécessite l'apport d'un aliment concentré. Ces compléments énergétiques peuvent avoir différentes formes : simples avec des céréales produites généralement sur l'exploitation ou composés, c'est-à-dire un assemblage de diverses matières premières commercialisées par les fabricants d'aliments. L'aliment concentré représente 32 % de la ration des chèvres dont 23 % en moyenne est directement produit sur la ferme. La part de concentré dans la ration comprend également des correcteurs azotés simples et des aliments minéraux et vitaminiques pour compenser les carences en calcium et en phosphore de la ration (Bossis, Jost 2016).

Face à ces spécificités alimentaires, l'éleveur veut réduire le coût de production d'un litre de lait. Afin d'y parvenir, il peut maximiser son autonomie alimentaire en améliorant la qualité de ses fourrages et/ou en produisant les concentrés sur la ferme pour réduire la part d'aliment acheté (Foisnon 2016). D'autres approches peuvent être envisagées, telles que l'utilisation de techniques de récolte alternatives permettant de valoriser l'herbe à un stade plus optimal (affouragement en vert, enrubannage, séchage en grande...) (Bluet, Bossis 2022). Un passage au pâturage permet de réduire les concentrés consommés en augmentant la part de fourrages toutefois cela nécessite des surfaces adaptées et pose le risque du parasitisme, auquel les chèvres sont très sensibles (Lefrileux, Morand-Fehr, Pommaret 2012; Hoste et al. 2012). Optimiser l'apport de concentré tout en conservant les performances de production du troupeau est une stratégie plus accessible permettant d'améliorer le coût alimentaire.



Les pratiques alimentaires adoptées par les éleveurs jouent également un rôle crucial dans la composition et la qualité du lait produit (Doyon 2005). En effet, les différents constituants du lait tels que les glucides, les lipides et les protéines, sont directement influencés par la qualité et la nature des aliments ingérés par les chèvres (Sauvant et al. 2012). Cette relation étroite entre alimentation et composition du lait souligne l'importance de bien comprendre les mécanismes de synthèse et de sécrétion des constituants du lait par la glande mammaire.

## **CHAPITRE 2 : LES DIFFÉRENTS CONSTITUANTS DU LAIT ET LES MÉCANISMES DE LEUR SYNTHÈSE ET DE LEUR SÉCRÉTION PAR LA GLANDE MAMMAIRE**

Le lait est un liquide biologique généralement de couleur blanchâtre, produit par les glandes mammaires des mammifères femelles et sert à la nutrition des jeunes (Larousse). Le lait de chèvre est principalement composé de 87 % d'eau. Il est constitué ensuite de glucides, de lipides et de protéines. Il contient également des minéraux et des oligo-éléments dont certaines vitamines (Albert, Lagriffoul 2019).

Toutefois, la proportion de chaque constituant varie tout au long de la vie et dépend de plusieurs facteurs tels que l'alimentation (Inglingstad et al. 2014), la race (Akshith et al. 2024), la parité (Peris et al. 1997; Ciappesoni et al. 2004; Olechnowicz, Sobek 2008), la saison (Inglingstad et al. 2014), la gestion du troupeau (Ciappesoni et al. 2004), les conditions environnementales, le lieu d'élevage (Akshith et al. 2024), le stade de lactation (Ciappesoni et al. 2004; Olechnowicz, Sobek 2008) et l'état de santé de la mamelle (Sramek et al. 2018).

La sécrétion des principaux constituants du lait se fait selon deux voies d'exocytose. La première voie permet de sécréter les protéines majeures du lait, des oligosaccharides, du lactose, du citrate, du phosphate et du calcium. Ces substances sont contenues dans des vésicules sécrétrices provenant de l'appareil de Golgi qui sont transportées vers le pôle apical de la cellule et vidées par la suite dans le milieu extracellulaire. Les lipides et les lipoprotéines sont sécrétés par un processus unique à la cellule épithéliale mammaire (Mather, Keenan 1998; McManaman, Neville 2003).

### **I. LES PRINCIPAUX CONSTITUANTS DU LAIT ET LEURS MECANISMES DE SYNTHÈSE ET DE SÉCRÉTION**

#### **A. Les glucides**

Le lait de chèvre est composé de 4,1% de lactose, le sucre majeur du lait (Haenlein, Caccese 1984). Le lactose est un disaccharide de deux oses : le glucose et le galactose (Desjeux 1993). Il est synthétisé dans la mamelle par les CEM à partir du glucose sanguin et nécessite la lactose synthétase, un complexe qui combine l'alpha-lactalbumine et la galactosyltransférase. La CEM capte des molécules de glucose à partir du sang au niveau de la membrane basolatérale de la cellule par un



mécanisme de transport particulier impliquant principalement le transporteur SLC2A1 (codé par le gène SLC2A1 également nommé GLUT1) (Truchet, Ollivier-Bousquet 2009; Zhao, Keating 2007). Une fois dans la cellule et plus précisément dans le cytosol, une partie du glucose subit une épimérisation par les enzymes épimérasés qui le transforment en galactose. Le glucose et le galactose sont alors transportés vers l'appareil de Golgi dans lequel ils seront dimérisés par liaison covalente grâce à l'enzyme lactose synthase (Tsugami et al. 2020). L'accumulation de lactose dans les vésicules de sécrétion favorise l'entrée d'eau dans ces vésicules grâce au pouvoir osmotique du lactose, qui joue un rôle significatif dans la détermination du volume de lait produit (Zhao, Keating 2007; Tsugami et al. 2020).

### B. Les lipides

Le lait de chèvre contient 3,8 % de lipides représentés en majorité par les triglycérides (environ 98 %) (Haenlein, Caccese 1984). Les lipides contiennent également des acides gras simples, complexes et des composés liposolubles. Les acides gras présents dans le lait ont deux origines : 40 % d'entre eux sont issus de la circulation sanguine tandis que 60 % sont synthétisés *de novo* dans la mamelle à partir de précurseurs présents dans le sang. (Palmquist, Harvatine 2020).

Les triglycérides et les phospholipides sont principalement synthétisés dans le réticulum endoplasmique lisse au pôle basal de la cellule à partir de précurseurs d'acides gras et de glycérol. Ces molécules, entourées de protéines pour former ce qu'on appelle un corps lipidique ou une gouttelette lipidique, sont transportées au pôle apical de la cellule puis fusionnent sous la forme de globule gras avant d'être excrété dans la lumière alvéolaire (McManaman, Neville 2003; Mather, Keenan 1998).

### C. Les matières azotées

Le lait est constitué de deux groupes de matières azotées dans le lait : les protéines et les matières azotées non protéiques (Snappe, Lepoudere, Sredzinski 2010).

#### o Les protéines

Le lait est constitué de 3,4 % de protéines scindées en deux phases : une phase micellaire insoluble majoritaire (80 %) essentiellement constituée de caséines et une phase soluble stable constituée d' $\alpha$ -lactalbumine, de  $\beta$ -lactoglobuline et de protéines diverses (lactoferrine et sérum albumine bovine) (Haenlein, Caccese 1984).

À l'exception de certaines protéines de la phase soluble qui proviennent directement du sang, les autres protéines du lait sont synthétisées par les CEM à partir d'acides aminés captés du sang.



On distingue dans la phase insoluble 5 caséines différentes : les caséines  $\alpha$ S1 et  $\alpha$ S2, les caséines  $\beta$  (majoritaires dans le lait de chèvre),  $\kappa$  et  $\gamma$  (Snappe, Lepoudere, Sredzinski 2010).

- Les matières azotées non protéiques

L'azote non protéique est constitué en majorité d'urée, mais on y retrouve aussi la créatine, la créatinine, des acides hippuriques, des acides aminés libres, de l'acide orotique, de l'acide urique et enfin de l'ammoniaque (Jenness 1959 ; Journet, Vérité, Vignon 1975). Cet azote non protéique provient de l'ammoniaque produit dans le rumen à partir des matières azotées alimentaires d'origine protéique et non protéique mais également du catabolisme des protéines. Une partie de l'ammoniaque en excès, qui n'est pas réutilisé, traverse l'épithélium du rumen pour être transformé en urée par le foie (Block 1998).

Une autre partie de l'urée produit dans le foie provient des acides aminés en excès issus de la digestion enzymatique dans l'intestin de protéines non dégradées dans le rumen. Cette urée peut pénétrer dans la glande mammaire et se retrouver dans le lait grâce à la perméabilité de l'épithélium mammaire à l'urée (Journet, Verite, Vignon 1975; Block 1998).

#### D. Minéraux et oligo-éléments

Le lait renferme des sels en solution (molécules et ions), ainsi que sous forme colloïdale, principalement d'origine minérale. La fraction minérale du lait est de 7 à 9 g/L et se répartit entre la phase soluble et la phase micellaire des protéines du lait (Mekmene 2010). Le calcium et le phosphore constituent les piliers de la structure des micelles, tandis que le magnésium, en association avec eux, contribue à les stabiliser (Singh et al. 2019).

Le calcium du lait provient du plasma et entre dans la cellule au niveau de la membrane du pôle basal. Le calcium est alors transporté du cytoplasme vers des vésicules sécrétrices par une pompe ATP dépendante  $\text{Ca}^{2+}$  (McManaman, Neville 2003)

Les ions potassium, sodium et chlore, conjointement avec le lactose, régulent la pression osmotique du lait dans la mamelle par rapport à la pression sanguine. Leur concentration subit des fluctuations significatives en cas de mammites, avec une augmentation du taux de chlore. Des variations du ratio de sodium et potassium dans le lait peuvent indiquer un changement dans l'état d'intégrité de l'épithélium mammaire (Sorensen et al. 2001). Les niveaux des minéraux varient principalement selon l'espèce, l'animal, l'alimentation, le stade de lactation et la santé de la mamelle (Singh et al. 2019). Le lait de chèvre contient les vitamines A, B1, B2, B3, B5, B6, B8, B9, B12, C et D.



## II. LES CELLULES ET DÉBRIS CELLULAIRES DU LAIT DE CHÈVRE

Le lait contient aussi des cellules somatiques de différentes catégories. La concentration de ces cellules dépend de plusieurs facteurs tels que la santé de la mamelle ou le stade de lactation. En effet, en milieu de lactation, la concentration cellulaire du lait de chèvre est d'environ 400 000 cellules tandis qu'en fin de lactation elle peut atteindre plus de 7 millions de cellules en moyenne (Hervé et al. 2016 ; Leitner et al. 2012). Selon l'Institut de l'Élevage (IDELE), il faut considérer une mamelle en bonne santé ou avec une faible inflammation lorsque la numération cellulaire ne dépasse pas 750 000 cellules par mL (De Cremoux 2013a).

Au sein de cet ensemble de cellules, on retrouve des cellules du tissu mammaire, essentiellement des cellules épithéliales qui sont éliminées dans le lait. Elles sont très minoritaires dans le lait puisqu'elles ne représentent que 4,6 % des cellules somatiques totales (Ben Chedly et al. 2011) mais selon l'IDELE, ce pourcentage peut varier entre 7 à 12 % du total de cellules comptabilisées (De Cremoux 2013b).

Les leucocytes constituent le type cellulaire présent en majorité dans le lait. Il s'agit notamment de lymphocytes et de macrophages qui sont des cellules immunitaires d'origine sanguine. Les granulocytes (ou polynucléaires) se divisent en trois sous-catégories : neutrophiles, éosinophiles et basophiles qui ont un rôle de neutralisation et de contrôle de la prolifération bactérienne. D'après des analyses sur le lait de 10 chèvres toutes les deux semaines à partir du 14<sup>ème</sup> jour après la mise-bas et pendant 22 semaines, le nombre de leucocytes est de  $14,27 \times 10^3$  par mL dont 59,1 % de lymphocytes, 36,3 % de neutrophiles, 2,0 % d'éosinophiles, 2,0 % de monocytes et 0,6 % de basophiles (Das, Singh 2000). Ces globules blancs peuvent représenter jusqu'à 90 % du total des cellules du lait chez la chèvre (De Cremoux 2013a).

Le lait de chèvre a la particularité, contrairement au lait de vache ou de brebis, d'être riche en débris cellulaires. Ces fragments cellulaires proviennent des cellules sécrétrices du lait, qui au cours de l'excrétion, subissent une décapitation de leur partie supérieure (De Cremoux 2013b)

## **CHAPITRE 3 : LES MÉCANISMES DE VARIATION DU NOMBRE, DE L'ACTIVITÉ ET DU STATUT REDOX DES CEM DANS LA GLANDE MAMMAIRE**

Au cours de la lactation d'une chèvre, la quantité de lait produit est variable. Ce volume produit dépend du nombre de cellules dans le tissu mais également de l'activité de synthèse/production par cellule (Hervé 2017). En effet, il a pu être observé 5 phases au cours de la lactation chez la chèvre : selon Knight et Peaker (1984), les 3 premières semaines, la production laitière est en hausse avec une augmentation du nombre de cellules dans le tissu mammaire.



De la 3<sup>ème</sup> à la 5<sup>ème</sup> semaine, les observations sont similaires à la différence que le nombre de cellules du tissu est statique et que la production de lait par cellule augmente. De la 5<sup>ème</sup> à la 8<sup>ème</sup> semaine, la production laitière est plutôt stable. De la 8<sup>ème</sup> à la 23<sup>ème</sup> semaine, le volume de lait produit est en baisse avec une diminution du nombre de cellule dans le tissu. Enfin, les deux dernières semaines de la lactation sont marquées par une diminution de la production de lait avec une diminution du lait produit par cellule.

Le nombre de cellules au sein d'un tissu dépend des phénomènes de division et de mort cellulaires qui eux-mêmes dépendent de mécanismes intracellulaires et de molécules extracellulaires (Capuco et al. 2001; Conlon, Raff 1999). Par conséquent, le volume de lait produit dépend de ces processus.

#### I. LE NOMBRE DE CEM REGULÉ PAR LES PROCESSUS CELLULAIRES

Le nombre de cellules épithéliales au sein du tissu de la glande mammaire dépend en partie des processus de prolifération et d'apoptose des cellules. La prolifération cellulaire est le mécanisme par lequel la cellule grandit et duplique son contenu pour ensuite se diviser en deux cellules (Hervé 2017). Ce processus cellulaire est régulé par des mitogènes extracellulaires et des molécules inhibitrices. Les mitogènes activent des voies de signalisation spécifiques du système de contrôle du cycle cellulaire. Pour que la cellule réplique son contenu avant de démarrer la division, les mitogènes stimulent d'abord la croissance cellulaire (Duronio, Xiong 2013).

A l'inverse, les inhibiteurs de la prolifération activent les voies de signalisation qui bloquent le cycle cellulaire. Ce système de régulation est contrôlé par les protéines kinases dépendantes de la cycline, qui sont activées de manière cyclique pour engendrer les différentes phases du cycle cellulaire (Conlon, Raff 1999).

C'est le phénomène de prolifération cellulaire qui permet une augmentation de la production de lait au début de la lactation. En effet, une étude menée par Knight et Wilde en 1993 met en évidence que la prolifération atteint un pic simultanément avec la lactation, puis diminue.

Les cellules du tissu mammaire ont donc la capacité de proliférer grâce à un contrôle à l'échelle moléculaire. De la même façon, les cellules des mammifères peuvent être maintenues vivantes grâce à certains facteurs moléculaires. Lorsque la cellule ne reçoit plus ou pas assez de ces molécules, elle entre dans un phénomène d'apoptose ou de mort programmée (Boutinaud, Guinard-Flament, Jammes 2004 ; Raff 1992 ; Conlon, Raff 1999). L'initiation du phénomène d'apoptose peut se faire de manière intrinsèque par des stimuli intracellulaires, lorsque l'ADN est endommagé ou de manière extrinsèque (Conlon, Raff 1999) comme lors de l'accumulation du lait chez la chèvre (Ben Chedly et al. 2011).



Ce phénomène de mort programmée se définit par une condensation du noyau et du cytoplasme suivi de la fragmentation de la cellule (Kerr, Wyllie, Currie 1972). La voie extracellulaire est initiée par la liaison de ligands de mort comme TNF- $\alpha$  ou FasL, et a des récepteurs correspondant sur la surface cellulaire. L'apoptose est donc régulée par plusieurs molécules : les protéines de la famille BCL-2 dont certaines sont des protéines pro-apoptotiques comme BAX, et des protéines anti-apoptotiques comme bcl-2 (Strasser, Harris, Cory 1991 ; Raff 1992).

D'autres facteurs de régulation existent comme les inhibiteurs de l'apoptose ou la protéine p53 qui a l'inverse, induit l'apoptose en cas de dommages à l'ADN ou d'autres stress cellulaires (Hengartner 2000 ; Hervé 2017).

L'exfoliation des CEM est un processus par lequel les cellules épithéliales se détachent du tissu mammaire et sont éliminées dans le lait (Boutinaud et al. 2013). Les cellules épithéliales sont fixées à la membrane basale et se connectent entre-elles grâce à des molécules d'adhésion cellulaire qui constituent les jonctions serrées (Tsugami et al. 2020; Cereijido et al. 1998). La perte de cette adhésion peut entraîner les cellules épithéliales luminales à se détacher de la membrane basale et des cellules voisines en raison de divers facteurs comme un stress mécanique ou la mort de cellule (Stelwagen et al. 2000; Suzanne, Steller 2009). Les molécules d'adhésion cellulaires sont représentées par les intégrines et les cadhérines. La régulation négative ou la modification de ces molécules peut entraîner le détachement des cellules (Hervé 2017). Il existe aussi d'autres facteurs qui induisent ce détachement (Hervé et al. 2016). Par exemple, les cytokines, les hormones ou le stress mécaniques peuvent parfois engendrer des voies de signalisation qui modifient l'expression ou l'activité des molécules d'adhésion (Hervé 2017).

Lorsque les jonctions serrées perdent leur adhésion, cela entraîne une rupture de l'intégrité de l'épithélium mammaire, permettant un échange de substances entre le lait et le sang. Par exemple, la concentration de sodium est naturellement plus élevée dans le sang que dans le lait, tandis que la concentration en potassium est plus importante dans le lait. Par conséquent, lorsque ces jonctions sont ouvertes, le sodium du sang peut se retrouver dans le lait, tandis que le potassium du lait passe dans le sang, augmentant ainsi le rapport  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  dans le lait (Sorensen et al. 2002 ; Hervé 2017).

Le processus d'apoptose est un mécanisme clé qui peut également induire l'exfoliation des cellules. Ces cellules mortes perdent alors leur adhésion ce qui entraîne leur détachement des tissus environnants. En revanche, les cellules exfoliées dans le lait ne sont pas toujours des cellules mortes (Loktionov 2011).



### III. L'EXPRESSION DES GÈNES RÉGULE LES ACTIVITÉS DE SYNTHÈSE DES CEM

L'expression des gènes est le processus par lequel l'information contenue dans un gène est utilisée pour synthétiser des produits fonctionnels, généralement des protéines, mais aussi des ARN fonctionnels (Brody 2024). La synthèse des constituants du lait est en partie régulée par les niveaux d'expression de certains gènes.

L' $\alpha$ -lactalbumine, impliquée dans la synthèse du lactose, est codée par le gène LALBA tandis que la galactosyltransférase est codée par le gène B4GALT1 (Zhang et al. 2018). Ainsi, des variations dans l'expression de ces gènes par les cellules entraînent des différences dans la synthèse de ces deux protéines et donc des variations dans la production de lactose par la CEM (Sadovnikova, Garcia, Hovey 2021). De la même façon, l'expression des gènes qui codent pour les transporteurs du glucose (SLC2A1 et SCL5A1) peuvent également avoir des répercussions sur la synthèse de lactose (Zhao, Keating 2007).

La synthèse des lipides par la cellule dépend également de l'expression de certains gènes. Par exemple, le gène ACACA code pour l'acétyl-CoA carboxylase, une enzyme qui catalyse la carboxylation de l'acétyl-CoA en malonyl-CoA, une étape cruciale de la biosynthèse des acides gras (Wang et al. 2022; Bernard, Leroux, Chilliard 2008).

Le gène FASN code pour une enzyme multifonctionnelle qui catalyse la synthèse des acides gras à partir de malonyl et d'acétyl-CoA (Wakil 1960). Les acides gras peuvent être allongés par les enzymes ELOVL (Jakobsson, Westerberg, Jacobsson 2006) et désaturés par la stéaryl-CoA désaturase (SCD) (Paton, Ntambi 2009). Les triglycérides sont formés par estérification au glycérol-3-phosphate via l'action des enzymes telles que GPAM et DGAT1. Avant de quitter la cellule, les lipides forment des globules lipidiques qui contiennent des protéines comme la butyrophiline et la xanthine déshydrogénase (Mu et al. 2021). Enfin, ABCG2 est une protéine impliquée dans le transport de ces gouttelettes hors de la cellule (Zhou et al. 2023). La quantité de certaines de ces protéines peut donc réguler la synthèse des différents lipides produits dans le lait.

Les caséines du lait sont codées par différents gènes : les caséines  $\alpha$ -S1 et  $\alpha$ -S2 sont codées par les gènes CSN1S1 et CSN1S2 respectivement. La caséine  $\beta$  est codée par CSN2 tandis que la caséine  $\kappa$  est codée par le gène CSN3 (Bałowska et al. 2012).

### IV. LE STATUT REDOX INTERVIENT DANS LES MÉCANISMES DE RÉGULATION

Le statut redox d'une cellule fait référence à l'équilibre entre les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les antioxydants. Lorsqu'une cellule est confrontée à un stress oxydant, des espèces réactives oxygénées pénètrent ou se forment dans la cellule (He et al. 2017). Ce sont des molécules instables et cytotoxiques qui peuvent endommager les structures cellulaires et les macromolécules.



Le stress oxydant découle de différents stress cellulaires, qu'ils soient biotiques (d'origine biologique – attaque de pathogènes) ou abiotiques (d'origine non biologique - stress hydrique, thermique...) (Trachootham et al. 2008). Lorsque les niveaux de ces espèces réactives oxygénées dépassent la capacité de la cellule à les neutraliser, cela entraîne un déséquilibre que l'on peut également appeler stress oxydant (Ighodaro, Akinloye 2018).

Par conséquent, des niveaux élevés de ROS peuvent causer du stress oxydant, ce qui peut compromettre la survie de la CEM et engendrer sa mort. De ce fait, le statut redox pouvant entraîner la mort de la cellule, aura un impact sur le nombre de cellules de la glande mammaire. Une telle instabilité pourrait occasionner des modifications de l'intégrité de l'épithélium mammaire mettant en péril son rôle de barrière mais également sa capacité à produire du lait (Hervé et al. 2016).

Le statut redox d'une CEM peut également être régulé par l'expression de certains gènes. Par exemple, NRF2 code pour un facteur de transcription qui régule l'expression de nombreux gènes impliqués dans la défense antioxydante tel que SOD1 qui code pour une enzyme antioxydante. Leurs rôles protecteurs sont cruciaux dans la réponse au stress oxydant, la prévention des maladies et la maintenance de l'homéostasie cellulaire (Loboda et al. 2016 ; Zhang et al. 2021).

#### **CHAPITRE 4 : EFFET D'UNE RESTRICTION ALIMENTAIRE SUR LE NOMBRE, L'ACTIVITÉ ET LE STATUT REDOX DES CEM DANS LA GLANDE MAMMAIRE**

##### **I. RESTRICTION ALIMENTAIRE ET PROCESSUS DE RENOUVELLEMENT CELLULAIRE**

À notre connaissance, les effets de diverses restrictions alimentaires sur les processus cellulaires régulant le nombre de CEM n'ont jamais été étudiés chez la chèvre. Une étude d'Ollier et al. (2007) a montré une régulation négative de gènes impliqués dans le cycle cellulaire, la prolifération, la différenciation et la mort cellulaire dans le cas d'un jeûne alimentaire de 48 h chez la chèvre. En effet, 11 gènes impliqués dans ces phénomènes cellulaires ont été régulés négativement. Par exemple, les gènes INSIG1 et PA2G4 impliqués dans la prolifération cellulaire ont été régulés négativement par le traitement. C'est aussi le cas de gènes de la mort cellulaire avec BECN1 et CASP8.

Toujours selon Ollier et al. (2007), d'autres gènes qui ont été régulés négativement dans cette étude ont montré avoir un impact sur l'activation de la différenciation cellulaire et de la prolifération dans le cas de carcinogénèse mammaire (Xue et al. 2006 ; López-Abente, Mispireta, Pollán 2014 ; Oskouian 2000 ; Dieudonne et al. 2002 ; Lessor et al. 2000 ; Gil-Puig et al. 2005). Selon Ollier et al. (2007), la diminution de l'expression de ces gènes est cohérente avec un ralentissement de la prolifération et de la différenciation des cellules mammaires chez les chèvres à jeun depuis 48 heures, comparativement aux chèvres témoins.



Toutefois, plusieurs études réalisées sur vaches montrent que selon les types et niveau de restrictions alimentaires, les effets observés ne sont pas les mêmes. En effet, dans le cas d'une restriction énergétique (25 % de concentré dans la ration contre 75 %), il a été observé une diminution de la production laitière parallèlement à une diminution de la prolifération cellulaire dans le tissu mammaire (Nørgaard et al. 2008). De la même façon, une restriction alimentaire quantitative (80 % de l'ingestion de matière sèche proposée *ad libitum* en période pré-expérimentale) a engendré une diminution de la production laitière sans pour autant montrer de variation dans le processus de prolifération (Hervé et al., 2019). En revanche, cette expérimentation a montré une augmentation du taux d'exfoliation des CEM qui pourrait expliquer la diminution de production laitière.

Dans le cas d'une restriction à la fois énergétique et protéique intense en début de lactation, il a été observé que la baisse de la production laitière été associée à une augmentation de l'apoptose des CEM sans variation de la prolifération cellulaire (Dessaugue et al. 2011).

Chez la brebis, une étude a montré une diminution du phénomène d'apoptose et de prolifération des CEM dans le tissu de glande mammaire pour des régimes riches en amidon et des régimes riches en graisse. Dans cette étude, le ratio prolifération/apoptose n'a pas montré de différence significative selon le traitement si ce n'est une tendance à la diminution pour le traitement riche en graisse par rapport au témoin et au traitement riche en amidon (Colitti et al. 2005).

## II. RESTRICTION ALIMENTAIRE ET ACTIVITÉ DE SYNTHÈSE DES CEM

Deux études se sont intéressées à l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme des lipides et des protéines du lait dans le cas de rations couvrant 70 %, 100 % ou 130 % des besoins énergétiques et protéiques quotidiens chez la chèvre (Tsiplakou et al. 2015 ; Tsiplakou et al. 2016). Un bilan énergétique négatif induit une régulation négative de l'expression des gènes impliqués dans la synthèse des constituants du lait au niveau de la glande mammaire (ACACA, FASN, LPL, SCD1 et HSL ainsi que CSN1S2 et LALBA). Une revue récente de Leduc et al. (2021) a suggéré que la diminution de la synthèse de lactose lors de restriction alimentaire pourrait résulter de la régulation négative du gène LALBA, soulignant ainsi son importance dans la régulation de la composition du lait. En effet, dans une étude de Dessaugue et al. (2011), une restriction alimentaire sévère chez la vache s'est accompagnée d'une diminution du taux de lactose aboutissant à une diminution de 41 % de la quantité de lactose produite dans le lait conjointement à une diminution de l'expression du gène LALBA. Les études sur l'effet de restrictions alimentaires chez la vache ont également montré une diminution de l'expression du gène SLC2A1, suggérant également son implication dans la diminution de la synthèse de lactose par jour (Sigl, Meyer, Wiedemann 2014 ; Boutinaud et al. 2008 ; Herve et al. 2019).



Les effets des restrictions alimentaires sur les niveaux d'expressions des gènes impliqués dans la synthèse du lactose et des protéines dépendent de la sévérité et de la durée de la restriction, mais aussi du stade de lactation et du niveau d'énergie dans le régime alimentaire. En effet, dans le cas d'une restriction sévère exercée sur des vaches en début de lactation, il a été montré une diminution de la quantité de protéines dans le lait conjointement à une diminution de l'expression de CNS3 (Dessaugue et al. 2011). Toutefois, ces résultats ne sont pas en accord avec une augmentation de l'expression de CNS3 dans le cas d'une restriction alimentaire modérée chez les vaches au même stade de lactation (Sigl, Meyer, Wiedemann 2014a). Plus les restrictions sont modérées et le stade de lactation tardif, moins les effets sur l'expression de CNS3 sont visibles (Boutinaud et al. 2008; Hervé et al. 2019). S'ajoute à ces observations, l'absence quasi-systématique d'effets sur l'expression de CNS1S1 (Dessaugue et al. 2011; Boutinaud et al. 2008; Hervé et al. 2019).

### III. RESTRICTION ALIMENTAIRE ET STATUT REDOX DES CEM

Parallèlement, les effets du niveau alimentaire sur le statut redox des cellules produisant le lait ne sont pas connus quelle que soit l'espèce de ruminant. Toutefois, Zhong et al. (2019) ont montré qu'une restriction alimentaire sur le long terme chez la truie pourrait induire progressivement un stress oxydant et compromettre la synthèse de protéines par la glande mammaire par la répression du signal v-ATPase/mTORC1.

Chez le rat, les résultats sont contradictoires puisque les régimes restrictifs ont généralement montré une diminution des niveaux de stress oxydant. En effet, une étude d'une durée de 2 semaines a montré que les niveaux de 5-OHmdU, un marqueur du stress oxydant, ont diminué progressivement dans la glande mammaire des rats lorsqu'ils étaient nourris à hauteur de 75 % du régime témoin (Djuric et al. 1992). La même étude réalisée avec une restriction calorique similaire mais des niveaux plus élevés de vitamines et de minéraux n'a pas permis d'observer les mêmes effets sur le statut oxydant de la glande mammaire des rats (Djuric et al. 2002).



## OBJECTIF DE L'ÉTUDE ET HYPOTHÈSES DE RECHERCHE

La revue bibliographique précédente a rappelé les connaissances sur les mécanismes de variation du nombre, de l'activité et du statut redox des CEM dans la glande mammaire ainsi que les effets de la restriction alimentaire sur l'activité cellulaire de cette glande. Les données montrent une baisse de la production laitière, indépendamment du type de restriction exercé sur les animaux. Toutefois, les effets de diverses restrictions alimentaires sur les processus cellulaires régulant le nombre de CEM n'ont jamais été étudiés chez la chèvre à notre connaissance. Ce manque de connaissances a été comblé par diverses études réalisées chez la vache et la brebis permettant d'identifier plusieurs processus cellulaires pouvant être impliqués dans les variations de production laitière dans le cas de restrictions alimentaires.

Seulement deux études chez la chèvre se sont intéressées à l'activité de synthèse des CEM à travers l'étude de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme des lipides et des protéines du lait dans le cas de restrictions énergétiques et protéiques (Tsiplakou et al. 2015; 2016). Considérant l'ensemble des données dont les études réalisées chez la chèvre, la littérature scientifique démontre une régulation négative de gènes impliqués dans la synthèse des constituants du lait, cette régulation dépendant de la sévérité et de la durée de la restriction, du stade de lactation et du niveau énergétique du régime alimentaire (Leduc et al. 2021).

L'étude du contexte scientifique n'a pas permis d'identifier les effets de diverses restrictions alimentaires sur le statut redox des cellules produisant le lait quel que soit l'espèce de ruminant.

Bien que plusieurs hypothèses aient été formulées pour expliquer les mécanismes réduisant le volume de lait synthétisé lors de restrictions alimentaires (réduction du nombre et/ou de l'activité des cellules mammaires), les contradictions dans la littérature selon les types de restriction (énergétique seulement ou énergétique et protéique) ne permettent pas de conclure définitivement quant aux mécanismes cellulaires impliqués. Dans le cas de variation de l'apport de concentré dans la ration, on parle de restriction à la fois énergétique et protéique. Par ailleurs, dans les études impliquant un apport *ad libitum* de foin, les animaux les plus restreints peuvent compenser par l'ingestion de fibres ajoutant ainsi des variations dans l'apport de fibres des différents traitements. Ces spécificités dans les diverses études rendent les effets des différentes restrictions alimentaires exercées chez les espèces ruminantes difficilement comparables. Enfin, l'absence de connaissances sur le statut redox des CEM dans le cas d'une restriction énergétique chez les espèces ruminantes justifie la nécessité de conduire des travaux sur ce sujet.



L'objectif général de cette étude est donc de caractériser les effets d'un apport variable de concentré apporté dans l'alimentation des chèvres sur l'activité des CEM et l'intégrité de l'épithélium mammaire.

Cette étude doit permettre de répondre aux questions de recherche suivantes :

- Quels sont les effets des niveaux d'apports de concentré sur les mécanismes impliqués dans la variation de la production laitière et des constituants du lait ?
- Quels sont les potentiels effets toxiques de l'apport de concentré sur les différents statuts des cellules épithéliales mammaires notamment la viabilité, le taux d'exfoliation, le statut redox ainsi que sur l'intégrité de l'épithélium mammaire ?

Dans le cadre de la première question de recherche et conjointement à la synthèse bibliographique, nous faisons l'hypothèse que la diminution des apports de concentré dans la ration induit une diminution de la production laitière et des constituants du lait par les mécanismes de régulation de l'expression des gènes impliqués dans la synthèse du lait et de ses constituants.

Pour la seconde question de recherche, nous faisons l'hypothèse qu'une augmentation du niveau d'apport de concentré engendre une augmentation de la production de ROS par les cellules isolées du lait ayant des effets éventuellement néfastes sur la survie des cellules.

Une question de recherche complémentaire s'ajoute aux deux objectifs principaux : Comment l'avancée dans le stade de lactation influence-t-elle les mécanismes impliqués dans la variation de la production laitière, des constituants du lait, des différents statuts des CEM et de l'intégrité de l'épithélium mammaire ?

Afin de répondre aux questions de recherche formulées ci-dessus, l'étude consiste à évaluer les effets de trois niveaux de concentré dans la ration alimentaire des chèvres laitières. Ces effets sont examinés à travers plusieurs analyses du lait, notamment la composition générale (taux de matières grasses, protéines, lactose, caséines et protéines solubles) et les quantités produites. De plus, l'activité cellulaire de la glande mammaire est évaluée par l'étude de la mort cellulaire et du taux d'exfoliation des cellules épithéliales conjointement à l'intégrité de l'épithélium mammaire. Enfin, pour caractériser le potentiel effet toxique d'un niveau énergétique trop élevé ou trop faible plus élevé sur la glande mammaire, l'étude se concentre sur le statut redox des CEM. Ce paramètre permettra d'évaluer l'équilibre redox des cellules, crucial pour comprendre les éventuelles altérations de l'intégrité du tissu de la glande mammaire.

Tableau n°1 : Répartition des traitements selon le lot et la période

Carré latin	Lot	P1	P2	P3
1	L1	C0	C400	C800
1	L2	C400	C800	C0
1	L3	C800	C0	C400
2	L4	C0	C800	C400
2	L5	C400	C0	C800
2	L6	C800	C400	C0

Tableau n°2 : Transitions de la dose de concentré selon le changement de traitement en grammes

Transitions	Jour1	Jour2	Jour3	Jour4	Jour5	Jour6
de 0 à 800 g	400	400	400	800	800	800
de 800 g à 0 g	400	400	400	0	0	0

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

### **I. Animaux et alimentation**

Un essai a eu lieu à partir d'avril 2024 à la ferme expérimentale de l'UMR PEGASE située au Rheu (Ferme de Mejusseaume – IEPL Domaine de La Charpentrais 35650 Le Rheu ; <https://doi.org/10.15454/yk9q-pf68>). Dix-huit chèvres de race alpine en milieu de lactation ont été sélectionnées pour cette étude. Ces chèvres provenaient d'un dispositif expérimental existant de 36 individus au total. La mise en lot des chèvres a été réalisée sur la base de critères tels que la production laitière, les taux butyreux et protéiques, le rang de lactation et une numération cellulaire faible (inférieure ou égale à 400 000 cellules) afin que chaque lot soit homogène. De plus, elles ont été sélectionnées afin d'avoir deux demi-mamelles fonctionnelles en début d'essai et sur toute la durée de celui-ci (à confirmer). Aucune mammite clinique n'a été détectée lors de la mise en lot. Les chèvres ont été nourries avec du foin de luzerne à volonté afin de simuler un fourrage de qualité pour limiter les refus, ainsi que des pierres à sel et à oligo-éléments.

### **II. Protocole expérimental**

La sélection des 18 chèvres au sein du dispositif expérimental préexistant s'est faite à l'aide des données de la période de référence du 23 au 29 mars 2024 afin de constituer des sous-lots homogènes de 3 chèvres au sein des lots préexistants. Les chèvres ont été soumises à trois traitements successifs pendant des périodes de trois semaines selon un schéma expérimental en double carré latin (cf. tableau 1). Chaque lot a reçu un traitement différent à chaque période et selon un ordre spécifique (cf. tableau 1). Les traitements étaient les suivants :

- C0 : Foin de luzerne à volonté sans concentré
- C400 : Foin de luzerne à volonté avec 440 g de concentré énergie (environ 400 g de MS)
- C800 : Foin de luzerne à volonté avec 880 g de concentré énergie (environ 800 g de MS)

La composition de l'aliment concentré est la suivante : 20% de blé, 20% de maïs, 20% d'orge, 15% de son fin de blé tendre, 20% de pulpe de betterave, 1% d'huile de soja, 3% de mélasse de canne et 1% de sel. Des périodes de transition de cinq jours ont été observées lors de certains changements de traitement (cf. tableau 2). La collecte des échantillons de lait a eu lieu les deux derniers jours de chaque période pour permettre diverses analyses.



En raison de contrainte de temps et d'expérimentation (puisque certaines analyses nécessitent d'être réalisées sur des échantillons frais), les échantillons de lait des 18 chèvres ont été collectés sur deux jours successifs : les derniers jeudis de chaque période ont été consacrés à la collecte et l'analyse du lait de 9 chèvres issus des 6 lots. Le jour suivant, les 9 autres chèvres ont été collectées.

### **III. Mesures et analyses**

#### **INGESTION DES ANIMAUX ET ANALYSES CHIMIQUES DE L'ALIMENT**

L'ingestion en foin des animaux a été mesurée par lot à partir de l'offert et des refus. Des analyses chimiques seront effectuées sur le concentré et le foin de luzerne afin de déterminer leur qualité nutritionnelle (matières minérales, azote total, NDF, ADF et ADL), ces résultats ne sont donc pas disponibles pour le moment.

#### **QUANTITÉ ET COMPOSITION DU LAIT**

Des échantillons de lait de la traite du matin ont été collectés pour la mesure du taux butyreux, du taux protéique, du lactose et des cellules du lait à chaque date de prélèvement à l'aide d'un échantillonneur et analysés par le laboratoire indépendant MyLab (35410). D'autres échantillons de lait (environ 1 à 2 L par chèvre, soit la quasi-totalité de la traite) ont été transportés à l'unité de recherche PEGASE à Saint-Gilles pour d'autres analyses. La production laitière individuelle a été mesurée à chaque traite et pendant toute la durée de l'essai.

Les différentes fractions de la matière azotée du lait ont été déterminées par la méthode de Kjeldahl, méthode de référence, afin d'obtenir les teneurs en caséines et protéines solubles du lait. Ces derniers dosages indiquent les niveaux de synthèses des caséines, données complémentaires à l'analyse de l'expression du gène d'une caséine.

Une partie du lait a été conservée pour l'analyse de deux minéraux du lait, le sodium et le potassium qui sont des indicateurs de l'intégrité de l'épithélium mammaire (Sorensen, Muir, Knight 2001). La méthode utilisée pour la détermination des minéraux du lait est l'ICP-AES (Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy). D'autres méthodes existent par spectrophotométrie ou chimiométrie mais ne semblent pas avoir été concluantes pour des minéraux comme le sodium et le potassium, en trop faible concentrations dans le lait (Nguyen et al. 2011). Le protocole détaillé de cette analyse est décrit dans l'Annexe 2.



## ANALYSE DE L'EXPRESSION DES GÈNES

Avant de pouvoir analyser l'expression des gènes, une préparation des cellules du lait a été réalisée après chaque prélèvement soit les derniers jeudis et vendredis de chaque période expérimentale. Le lait de chaque chèvre a été aliquote afin d'obtenir au total 932 g de lait. La centrifugation a permis de retirer la crème et de récupérer le lait écrémé.

Les culots cellulaires ont été lavés avec du tampon phosphate PBS, puis filtrés afin de retirer les saletés qui ne sont ni des cellules, ni des débris cellulaires.

Une fois la solution cellulaire obtenue, un aliquot a été prélevé pour réaliser un comptage cellulaire permettant de préparer un échantillon contenant 2,4 millions de cellules à marquer pour être analysées en cytométrie en flux. Le volume restant a été utilisé pour préparer les CEM.

La séparation des CEM des autres cellules s'est faite par purification immuno-magnétique selon la méthode décrite par Boutinaud et al. 2008. Le principe repose sur l'utilisation de billes magnétiques recouvertes d'anticorps spécifiques aux CEM. Lorsqu'on mélange ces billes avec l'échantillon, les anticorps se lient aux CEM. Ensuite, un aimant est appliqué pour attirer les billes magnétiques, permettant ainsi de récupérer les leucocytes dans le surnageant (soit toutes les cellules qui ne proviennent pas de l'épithélium mammaire). Puis les CEM ont ensuite été dissociées des billes par aspiration refoulement.

Les CEM ont servi à l'analyse de la mort cellulaire et également à l'analyse de l'expression des gènes. Cette dernière a été réalisée par la méthode de la PCR quantitative. Cette méthode était idéale dans le cadre de notre étude puisque c'est à la fois une méthode simple, rapide et abordable.

La PCR (Polymerase Chain Reaction) amplifie de manière exponentielle une fragmentation spécifique d'ADN complémentaire à l'aide du couple d'amorces spécifiques de la séquence du gène à amplifier. La PCR dite quantitative se distingue des autres par un système de mesure en temps réel permettant d'enregistrer la fluorescence d'un marqueur. Cette méthode est très bien décrite par Nolan et al. (2006).

L'analyse de l'expression des gènes a porté sur 6 gènes impliqués dans divers processus métaboliques : les gènes BAX, FASN, LALBA, CSN3, SOD1 et ELF5.

Pour évaluer l'expression de chaque gène cible et compenser les variations individuelles d'expression, une combinaison de gènes de référence, stables et non affectés par la variation de l'apport alimentaire, a été utilisée. Ce gène doit être exprimé de manière constante dans toutes les cellules. Les gènes de référence testés dans cette étude incluent la cyclophiline, la glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase et la protéine ribosomale RPLP0.



Le taux d'ARNm est exprimé en fonction du ratio entre le nombre de molécules d'ARNm du gène cible et ceux des gènes de référence. Le nombre semi relatif de molécules d'ARNm dans un échantillon est calculé avec la formule suivante (Boutinaud et al. 2004) :

$$\text{Nombre de molécules} = 10^{\frac{C_{\text{moyen}}-40}{a}} \text{ où } a \text{ est la pente de la gamme étalon.}$$

### Extraction de l'ARN

L'extraction de l'ARN a été réalisée sur des échantillons des CEM à l'aide d'un kit d'extraction des ARN («RNeasy mini kit») (Stangegaard, Dufva, Dufva 2006). Les acides nucléiques ont été piégés sur une colonne d'extraction. Les ARN ont été élués dans 16 µL, puis conservés à -70°C jusqu'au dosage des ARN et l'évaluation de leur qualité. Le détail de cette étape est décrit en annexe 4.

### Mesure de la quantité et de la qualité

La concentration des échantillons en ARN a été mesurée à partir d'un volume de 1 µL de chaque échantillon d'ARN l'aide de l'appareil Spectrophotomètre DS-11+ (DeNovix Inc. Wilmington, DE). La qualité de l'ARN a été mesurée à l'aide de l'appareil Bioanalyseur Agilent 2100 (Masotti, Preckel 2006). Le principe repose sur la détection des ARN à l'aide d'un intercalant fluorescent spécifique à l'ARN et la séparation des ARN selon leur taille. Le logiciel de l'appareil calcule le RIN (RNA Integrity Number), un indice de qualité allant de 1 à 10. Un RIN de 1 indique des ARN totalement dégradés, tandis qu'un RIN proche de 10 indique des ARN de haute qualité.

### Rétro-transcription

L'étape de rétro-transcription a permis de transcrire nos échantillons d'ARN en ADN, une étape indispensable puisque les PCR ne fonctionnent que sur des matrices ADN. La transcription se fait à l'aide de l'enzyme transcriptase inverse et de quelques acides nucléiques. Le protocole est détaillé en annexe 5.

### Choix des amorces PCR et vérification de l'efficacité

Un couple d'amorce se réfère à deux courtes séquences d'ADN qui sont spécialement conçues pour s'hybrider aux extrémités opposées d'une région cible d'un gène de l'ADN à amplifier. Ces amorces servent de point de départ pour la synthèse de l'ADN pendant le processus de PCR. Pour l'analyse de l'expression des gènes, les amorces ont été créées et vérifiées. La vérification de l'efficacité consiste à réaliser une PCR pour chaque gène utilisé sur une gamme de dilution de l'ADN de cellules du tissu mammaire de chèvre. Le protocole est détaillé en annexe 6.



## DÉTERMINATION DU TAUX D'EXFOLIATION

Une fois les CEM séparées du reste des cellules, un comptage cellulaire a été réalisé à l'aide de l'appareil Vi-CELL XR (Szabo et al. 2004). Cet appareil marque les cellules à l'aide du bleu trypan et permet la mesure de la viabilité cellulaire par détection automatique des cellules sur une image. L'automatisation de cet appareil permet la coloration et le comptage des cellules en seulement quelques minutes et annule le risque de partialité de l'utilisateur. Cela permet d'obtenir la concentration en cellules immunitaires et en CEM pour chaque échantillon. Après comptage des CEM, nous avons pu déterminer un taux d'exfoliation :

$$\text{Concentration en CEM dans le lait} \times \text{Production laitière de la journée}$$

## CARACTÉRISATION DE LA POPULATION DES CELLULES DU LAIT ET DE LEUR SURVIE

### Principe de la cytométrie en flux

Le principe de la cytométrie en flux repose sur l'analyse des caractéristiques physiques et chimiques des cellules en suspension. Cette analyse a été effectuée à partir de la solution cellulaire à 2,4 millions de cellules isolées du lait. Nous avons d'abord marqué les cellules avec des fluorochromes selon la description faite dans le paragraphe ci-dessous. Ensuite, nous avons injecté l'échantillon dans le cytomètre en flux (Macsquant 10 analyzer) (Herber et al. 2012), où il a été hydro dynamiquement focalisé pour former un flux de cellules individuelles passant devant un faisceau laser. Lorsque chaque particule a traversé le faisceau, les fluorochromes ont été excités et ont émis de la lumière à des longueurs d'onde spécifiques. Les détecteurs optiques ont capté les signaux de fluorescence et de diffusion de la lumière. La diffusion de la lumière avant (FSC) a été proportionnelle à la taille des cellules, tandis que la diffusion latérale (SSC) a été proportionnelle à leur complexité interne ou granulosité.

Enfin, nous avons converti les signaux collectés en données numériques, permettant ainsi une analyse détaillée et la quantification des différentes populations cellulaires présentes dans l'échantillon.

### Marquages utilisés et principes associés aux deux types d'analyses réalisées par cytométrie en flux

Pour les analyses en cytométrie en flux, nous avons utilisé des marquages de différents types (cf. annexe 7). Premièrement, pour différencier au sein de notre échantillon les cellules épithéliales des leucocytes, nous avons utilisé l'anticorps CD49F, un anticorps spécifique de l'intégrine  $\alpha$ -6, qui est une protéine exclusivement exprimée par les cellules épithéliales, les cellules souches hématopoïétiques et certaines cellules tumorales (Martignani et al. 2009) couplé à un fluorochrome.



Le fluorochrome FITC (fluorescein isothiocyanate) est un composé organique fluorescent qui est excité par la lumière bleue avec une longueur d'onde d'excitation maximale autour de 488 nm. Il émet de la lumière verte avec une longueur d'onde d'émission maximale autour de 519 nm.

Sur les mêmes échantillons cellulaires marqués au CD49F, nous avons pu marquer les ROS à l'aide du marquage CellROX™ (Luo et al. 2018). Il permet de détecter et de quantifier les niveaux de ROS dans les cellules par réaction avec les espèces réactives de l'oxygène et l'émission de fluorescence. Cette sonde a une longueur d'onde d'émission maximale autour de 565 nm, émettant une fluorescence orange.

Enfin, pour déterminer la viabilité des cellules, un marquage de viabilité cellulaire couplé à un fluorochrome eFluor™ a été utilisé (Zhao et al. 2016). Ce colorant pénètre les cellules dont la membrane plasmique est endommagée, comme c'est le cas pour les cellules mortes ou apoptotiques mais ne pénètre pas les cellules dont la membrane est intacte, c'est-à-dire les cellules vivantes.

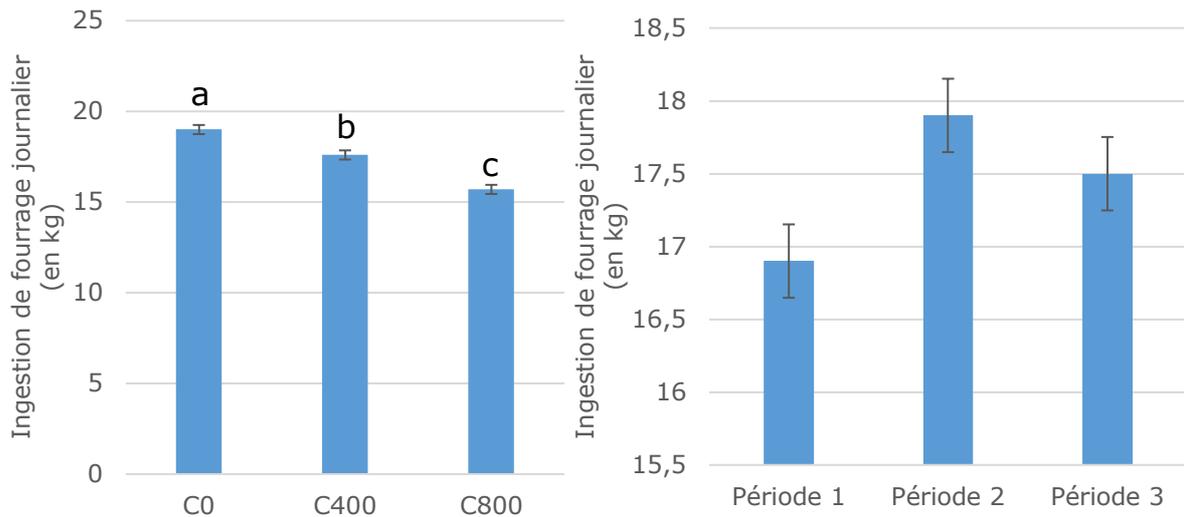
Nous avons également réalisé une autre analyse en cytométrie concernant uniquement les CEM (après avoir réalisé la séparation immuno-magnétique décrite dans le paragraphe *Analyse de l'expression des gènes*) en utilisant le kit de marquage FITC Annexin V (référence A13199) (cf. annexe 8). Ce marquage permet de détecter et de quantifier les cellules en apoptose en exploitant la translocation de la phosphatidylsérine vers la surface cellulaire, un événement caractéristique de l'apoptose (Wang et al. 2013).

## ANALYSE STATISTIQUE

Les données ont été traitées par analyse de variance avec la fonction `lm()` dans R. Pour l'ensemble des données, le modèle suivant a été utilisé :

$$Y = \mu + \text{Chèvre}_i + \text{Période}_j + \text{Traitement}_k + \epsilon_m$$

Où  $Y$  est la variable analysée,  $\mu$  est la moyenne générale,  $\text{Chèvre}_i$  est l'effet de la chèvre ( $n=18$ ),  $\text{Période}_j$  est l'effet de la période ( $n=3$ ),  $\text{Traitement}_k$  est l'effet du traitement ( $n=3$ ) et  $\epsilon_m$  est l'erreur résiduelle du modèle. La commande `emmeans` a été utilisée pour estimer les moyennes marginales pour chaque niveau de la variable traitement. Ce modèle permet d'évaluer l'impact des différents traitements et périodes sur la production laitière, tout en tenant compte de la variabilité entre les chèvres.

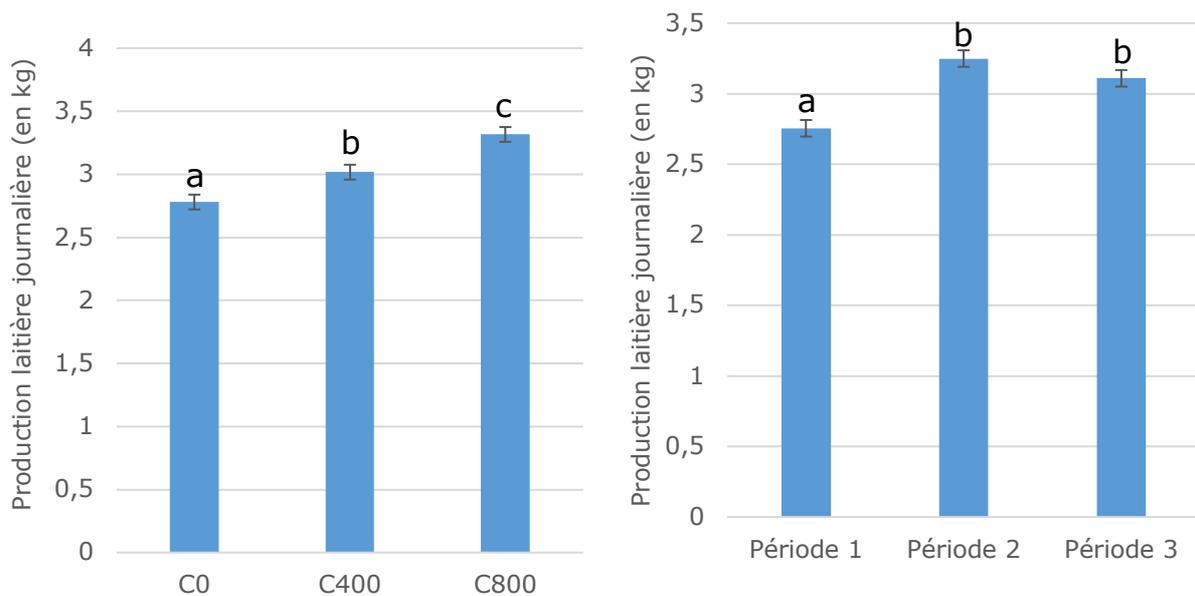


**Figure 3a et b : Ingestion de fourrage journalière moyenne des chèvres selon le niveau de concentré<sup>1</sup> ou la période<sup>2</sup>**

Dix-huit chèvres, apports de concentré (C0: 0g, C400: 400g, C800: 800g/jour), schéma en double carré latin, trois périodes de 3 semaines. Moyennes pondérées des 5 à 7 derniers jours ajustées  $\pm$  SEM. Différences significatives codées par a, b, c.

<sup>1</sup>Effet traitement  $p = 0,006 \times 10^{-2}$ . Contrastes C0-C400 ( $p = 0,010$ ), C0-C800 ( $p < 0,0001$ ) et C400-C800 ( $p = 0,002$ ).

<sup>2</sup>Effet période  $p = 0,064$ . Contrastes P1-P2 ( $p = 0,053$ ), P1-P3 ( $p = 0,341$ ) et P2-P3 ( $p = 0,427$ ).



**Figure 4a et b : Production laitière journalière moyenne de chèvres selon le niveau de concentré<sup>1</sup> ou la période<sup>2</sup>.**

Dix-huit chèvres, apports de concentré (C0: 0g, C400: 400g, C800: 800g/jour), schéma en double carré latin, trois périodes de 3 semaines. Moyennes pondérées des 4 derniers jours ajustées  $\pm$  SEM. Différences significatives codées par a, b, c.

<sup>1</sup>Effet traitement  $p = 0,015 \times 10^{-4}$ . Contrastes C0-C400 ( $p = 0,02$ ), C0-C800 ( $p < 0,0001$ ) et C400-C800 ( $p = 0,003$ ).

<sup>2</sup>Effet période  $p = 0,039 \times 10^{-4}$ . Contrastes P1-P2 ( $p < 0,0001$ ), P1-P3 ( $p = 0,0005$ ) et P2-P3 ( $p = 0,2239$ ).

## RÉSULTATS DE L'ÉTUDE

### Ingestion de fourrage journalier

Aucun refus dans l'ingestion du concentré n'a été observé pendant la durée de l'essai. Le niveau de concentré dans la ration a eu un effet significatif sur la quantité de fourrage ingéré journalier des chèvres ( $p = 0,006 \times 10^{-2}$ ; cf. figure 3a). L'ingestion a diminué d'environ 7,4% ( $p$  value = 0,010) entre le traitement C0 et le traitement C400 puis a diminué de presque 10,8% ( $p$  value = 0,002) entre le traitement C400 et le traitement C800. Entre le traitement sans concentré et le traitement dont l'apport est le plus élevé, l'ingestion journalière de fourrage a diminué de 17,4% environ ( $p < 0,0001$ ).

La période a exercé une tendance sur la quantité de fourrage ingéré journalier des chèvres ( $p = 0,064$ ; cf. figure 3b). L'ingestion a eu tendance à augmenter d'environ 5,9% ( $p$  value = 0,053) entre la période 1 et la période 2 puis n'a pas varié ( $p = 0,427$ ) entre la période 2 et la période 3. Entre la première et la dernière période, l'ingestion journalière de fourrage a augmenté d'environ 3,5% environ ( $p = 0.341$ ).

### Production laitière journalière

Le niveau de concentré dans la ration a eu un effet significatif sur la production laitière journalière des chèvres ( $p = 0,015 \times 10^{-4}$ ; cf. figure 4a). La production laitière a augmenté d'environ 8,5% ( $p$  value = 0,020) entre le traitement C0 et le traitement C400 puis a augmenté de presque 10% ( $p$  value = 0,003) entre le traitement C400 et le traitement C800. Entre le traitement sans concentré et le traitement dont l'apport est le plus élevé, la production laitière journalière a augmenté de 19% environ ( $p$  value  $< 0,0001$ ).

La période a eu un effet significatif sur la production laitière journalière des chèvres ( $p = 0,039 \times 10^{-4}$ ; cf. figure 4b). La production laitière a augmenté d'environ 17,9% ( $p$  value =  $< 0,0001$ ) entre la période 1 et la période 2 puis n'a pas varié ( $p$  value = 0,224) entre la période 2 et la période 3. Entre la première et la dernière période, la production laitière journalière a augmenté de 12% environ ( $p$  value = 0,0005).

L'animal a eu un effet significatif sur la production laitière journalière des chèvres ( $p = 0,027 \times 10^{-5}$ ).

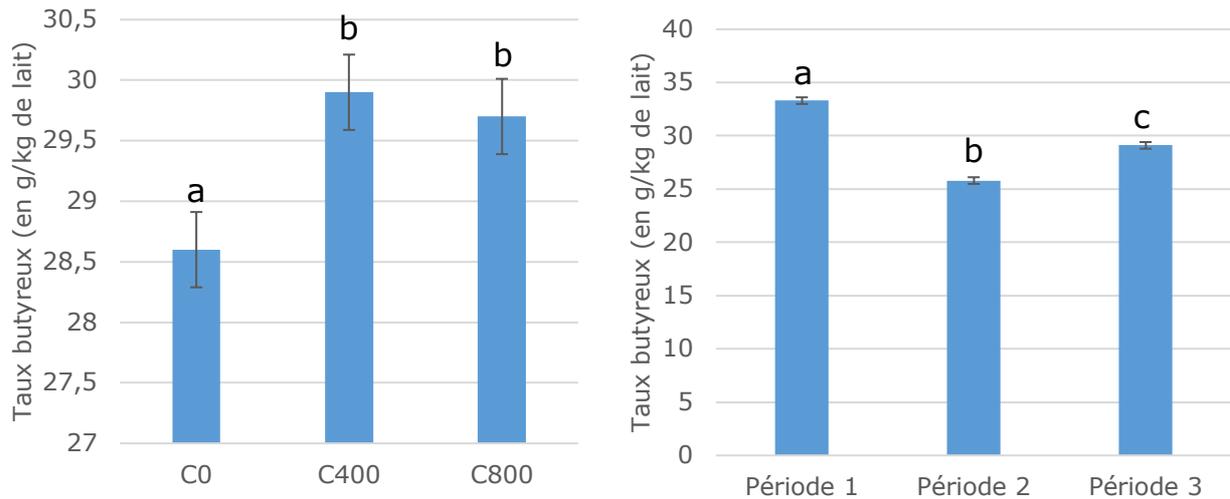


Figure 5a et b : Taux butyreux journalier du lait de chèvre selon le niveau de concentré<sup>1</sup> ou la période<sup>2</sup>.

Dix-huit chèvres, apports de concentré (C0: 0g, C400: 400g, C800: 800g/jour), schéma en double carré latin, trois périodes de 3 semaines. Moyennes pondérées des 4 derniers jours ajustées  $\pm$  SEM. Différences significatives codées par a, b, c.

<sup>1</sup>Effet traitement  $p = 0,011$ . Contrastes C0-C400 ( $p = 0,015$ ), C0-C800 ( $p = 0,035$ ) et C400-C800 ( $p = 0,934$ ).

<sup>2</sup>Effet période  $p < 0,02 \times 10^{-14}$ . Contrastes P1-P2 ( $p < 0,0001$ ), P1-P3 ( $p < 0,0001$ ) et P2-P3 ( $p < 0,0001$ ).

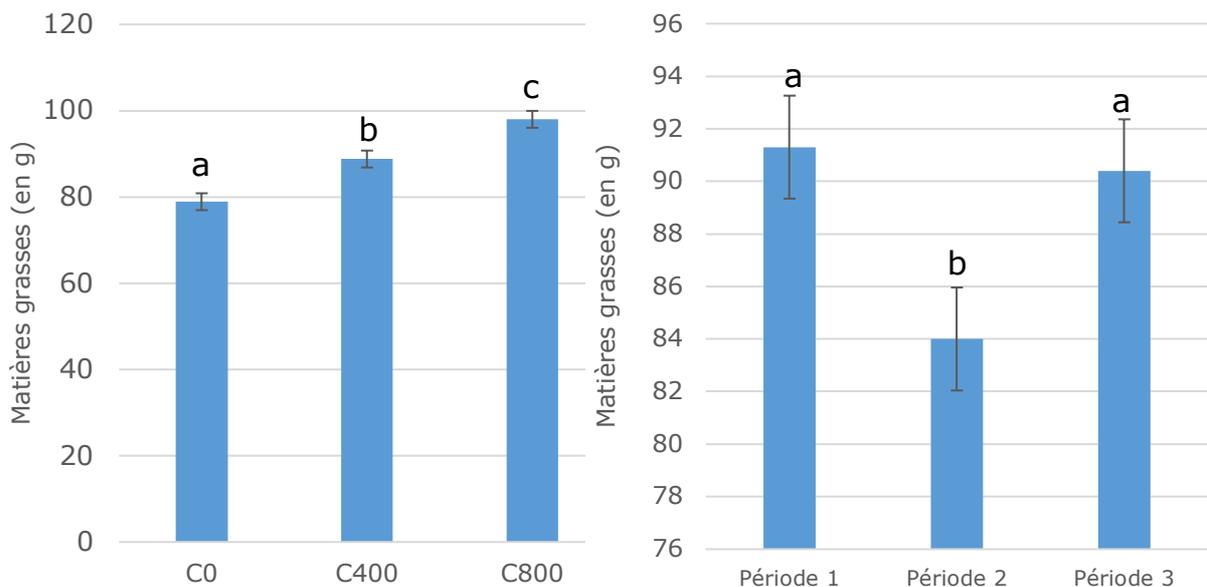


Figure 6a et b : Matières grasses journalières du lait de chèvre selon le niveau de concentré<sup>1</sup> ou la période<sup>2</sup>.

Dix-huit chèvres, apports de concentré (C0: 0g, C400: 400g, C800: 800g/jour), schéma en double carré latin, trois périodes de 3 semaines. Moyennes pondérées des 4 derniers jours ajustées  $\pm$  SEM. Différences significatives codées par a, b, c.

<sup>1</sup>Effet traitement  $p = 0,047 \times 10^{-5}$ . Contrastes C0-C400 ( $p = 0,003$ ), C0-C800 ( $p < 0,0001$ ) et C400-C800 ( $p = 0,006$ ).

<sup>2</sup>Effet période  $p = 0,026$ . Contrastes P1-P2 ( $p < 0,033$ ), P1-P3 ( $p = 0,936$ ) et P2-P3 ( $p = 0,071$ ).

## Taux butyreux et matières grasses

Le traitement a eu un effet significatif sur le taux butyreux journalier du lait de chèvre ( $p = 0,011$  ; cf. figure 5a). Le taux butyreux a augmenté d'environ 5,2% ( $p \text{ value} = 0,015$ ) entre le traitement C0 et le traitement C400 puis n'a pas varié ( $p = 0,934$ ) entre le traitement C400 et le traitement C800. Entre le traitement sans concentré et le traitement dont l'apport est le plus élevée, le taux butyreux journalier a augmenté de 4,4% environ ( $p \text{ value} = 0,035$ ).

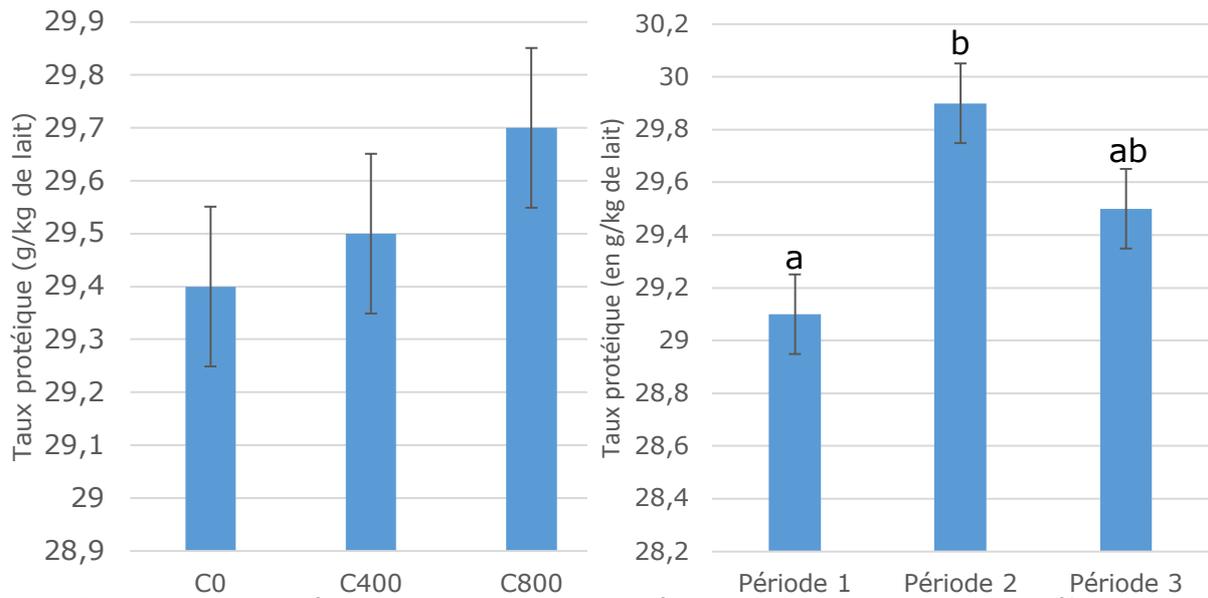
La période a eu un effet significatif sur le taux butyreux journalier du lait de chèvre ( $p < 0,02 \times 10^{-14}$  ; cf. figure 5b). Le taux butyreux a diminué d'environ 20% ( $p \text{ value} = <0,0001$ ) entre la période 1 et la période 2 puis a augmenté de 11,5% ( $p \text{ value} = <0,0001$ ) entre la période 2 et la période 3. Entre la première et la dernière période, le TB journalier a diminué de 11,5% environ ( $p \text{ value} = <0,0001$ ).

L'animal a eu un effet significatif sur le taux butyreux journalier du lait de chèvre ( $p = 0,094 \times 10^{-11}$ ).

Le traitement a eu un effet significatif sur les matières grasses pondérées du lait de chèvre ( $p = 0,047 \times 10^{-5}$  ; cf. figure 6a). La matière grasse a augmenté d'environ 12,5% ( $p \text{ value} = 0,003$ ) entre le traitement C0 et le traitement C400 puis a augmenté de 10% ( $p = 0,006$ ) entre le traitement C400 et le traitement C800. Entre le traitement sans concentré et le traitement dont l'apport est le plus élevée, le taux butyreux journalier a augmenté de 24% environ ( $p \text{ value} < 0,0001$ ).

La période a eu un effet significatif sur les matières grasses pondérées du lait de chèvre ( $p < 0,026$  ; cf. figure 6b). La matière grasse a diminué d'environ 8% ( $p \text{ value} = 0,033$ ) entre la période 1 et la période 2 puis a eu tendance à augmenter de 7,6% ( $p \text{ value} = 0,071$ ) entre la période 2 et la période 3. Entre la première et la dernière période, la matière grasse journalière n'a pas varié ( $p \text{ value} = 0,936$ ).

L'animal a eu un effet significatif sur les matières grasses journalière du lait de chèvre ( $p = 0,022 \times 10^{-5}$ )

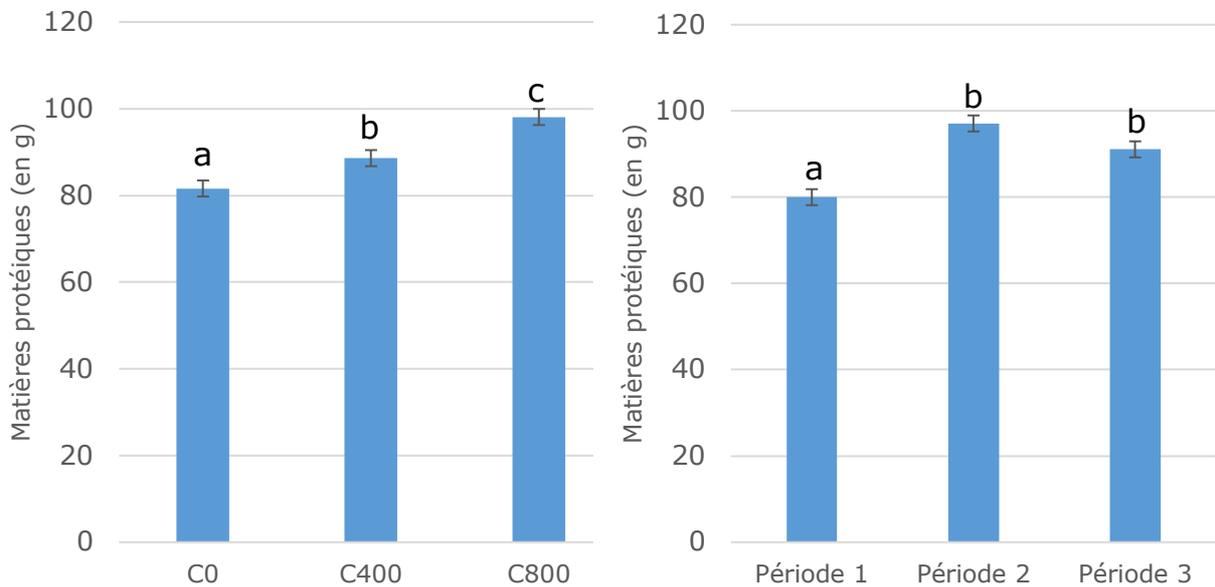


**Figure 7a et b : Taux protéique journalier du lait de chèvre selon le niveau de concentré<sup>1</sup> ou la période<sup>2</sup>**

Dix-huit chèvres, apports de concentré (C0: 0g, C400: 400g, C800: 800g/jour), schéma en double carré latin, trois périodes de 3 semaines. Moyennes pondérées des 4 derniers jours ajustées  $\pm$  SEM. Différences significatives codées par a, b, c.

<sup>1</sup>Effet traitement  $p = 0,351$ . Contrastes C0-C400 ( $p = 0,9437$ ), C0-C800 ( $p = 0,351$ ) et C400-C800 ( $p = 0,534$ ).

<sup>2</sup>Effet période  $p = 0,005$ . Contrastes P1-P2 ( $p < 0,003$ ), P1-P3 ( $p = 0,212$ ) et P2-P3 ( $p = 0,175$ ).



**Figure 8a et b : Matière protéique journalière du lait de chèvre selon le niveau de concentré<sup>1</sup> ou la période<sup>2</sup>.**

Dix-huit chèvres, apports de concentré (C0: 0g, C400: 400g, C800: 800g/jour), schéma en double carré latin, trois périodes de 3 semaines. Moyennes pondérées des 4 derniers jours ajustées  $\pm$  SEM. Différences significatives codées par a, b, c.

<sup>1</sup>Effet traitement  $p = 0,024 \times 10^{-4}$ . Contrastes C0-C400 ( $p = 0,029$ ), C0-C800 ( $p < 0,0001$ ) et C400-C800 ( $p = 0,003$ ).

<sup>2</sup>Effet période  $p = 0,011 \times 10^{-4}$ . Contrastes P1-P2 ( $p < 0,0001$ ), P1-P3 ( $p = 0,0005$ ) et P2-P3 ( $p = 0,075$ ).

## Taux protéique et matières protéiques

Les différents traitements alimentaires n'ont exercé aucun effet sur le taux protéique journalier pondéré du lait de chèvre ( $p = 0,351$ ; cf. figure 7a).

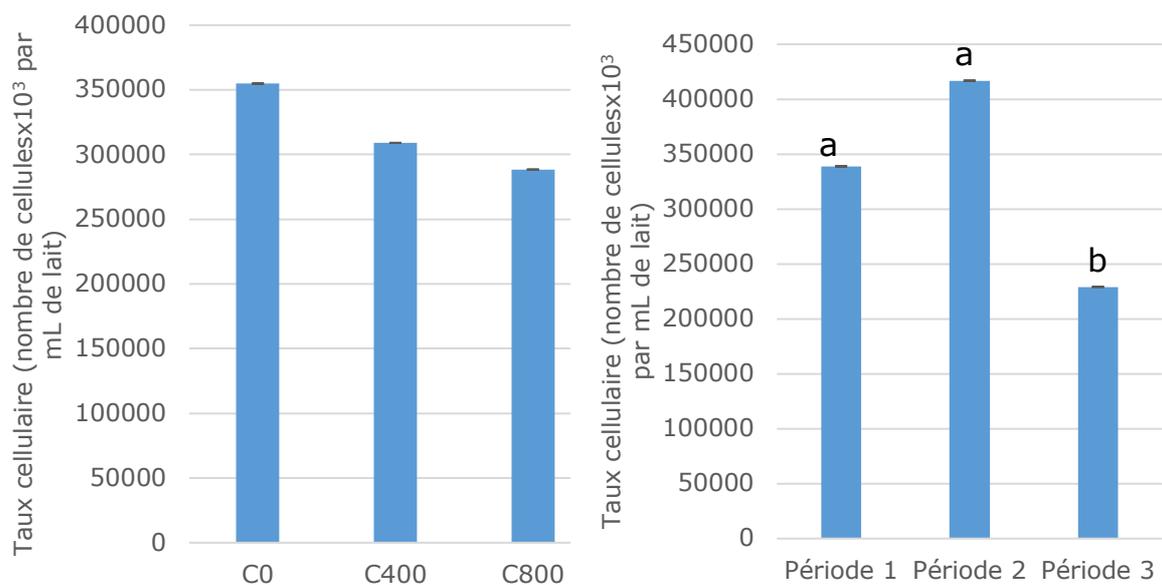
La période a eu un effet significatif sur le taux protéique journalier du lait de chèvre ( $p = 0,005$ ; cf. figure 7b). Le taux protéique a augmenté d'environ 2,7% ( $p \text{ value} = 0,003$ ) entre la période 1 et la période 2 puis n'a pas varié ( $p \text{ value} = 0,175$ ) entre la période 2 et la période 3. Entre la première et la dernière période, le TP journalier n'a pas varié ( $p \text{ value} = 0,212$ ).

L'animal a eu un effet significatif sur le taux protéique journalier du lait de chèvre ( $p = 0,022 \times 10^{-4}$ ).

Le traitement a eu un effet significatif sur la matière protéique journalière pondérée du lait de chèvre ( $p = 0,024 \times 10^{-4}$ ; cf. figure 8a). La matière protéique a augmenté d'environ 8,6% ( $p \text{ value} = 0,029$ ) entre le traitement C0 et le traitement C400 puis a augmenté de 10,7% ( $p = 0,003$ ) entre le traitement C400 et le traitement C800. Entre le traitement sans concentré et le traitement dont l'apport est le plus élevée, la matière protéique journalière a augmenté de 20% environ ( $p \text{ value} < 0,0001$ ).

La période a eu un effet significatif sur la matière protéique pondérée du lait de chèvre ( $p = 0,011 \times 10^{-4}$ ; cf. figure 8b). La matière protéique a augmenté d'environ 21% ( $p < 0,0001$ ) entre la période 1 et la période 2 puis a eu tendance à diminuer de 6% ( $p \text{ value} = 0,075$ ) entre la période 2 et la période 3. Entre la première et la dernière période, la matière protéique journalière a augmenté de 13,9% ( $p \text{ value} = 0,0005$ ).

L'animal a eu un effet significatif sur la matière protéique journalière du lait de chèvre ( $p = 0,076 \times 10^{-4}$ ).

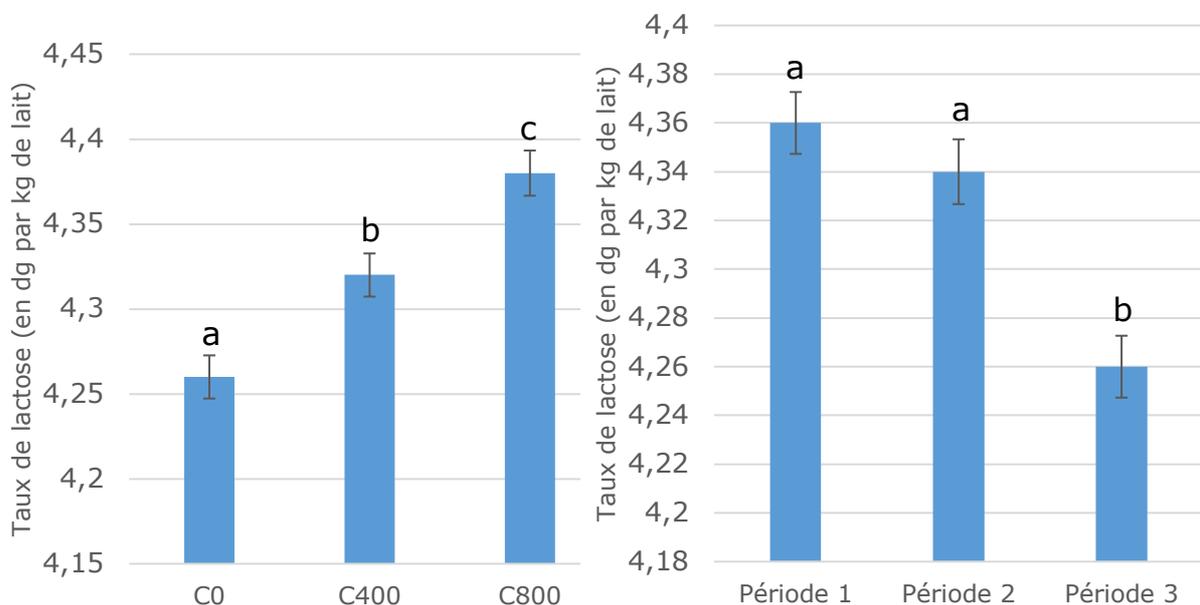


**Figure 9a et b : Taux cellulaire par jour du lait de chèvre selon le niveau de concentré<sup>1</sup> ou la période<sup>2</sup>.**

Dix-huit chèvres, apports de concentré (C0: 0g, C400: 400g, C800: 800g/jour), schéma en double carré latin, trois périodes de 3 semaines. Moyennes pondérées des 4 derniers jours ajustées  $\pm$  SEM. Différences significatives codées par a et b.

<sup>1</sup>Effet traitement  $p = 0,363$ . Contrastes C0-C400 ( $p = 0,688$ ), C0-C800 ( $p = 0,364$ ) et C400-C800 ( $p = 0,841$ ).

<sup>2</sup>Effet période  $p = 0,002$ . Contrastes P1-P2 ( $p = 0,372$ ), P1-P3 ( $p = 0,047$ ) et P2-P3 ( $p = 0,001$ ).



**Figure 10a et b : Taux de lactose du lait de chèvre analysé le matin du prélèvement selon le niveau de concentré<sup>1</sup> ou la période<sup>2</sup>.**

Dix-huit chèvres, apports de concentré (C0: 0g, C400: 400g, C800: 800g/jour), schéma en double carré latin, trois périodes de 3 semaines. Moyennes pondérées des 4 derniers jours ajustées  $\pm$  SEM. Différences significatives codées par a, b, c.

<sup>1</sup>Effet traitement  $p = 0,008 \times 10^{-3}$ . Contrastes C0-C400 ( $p = 0,009$ ), C0-C800 ( $p < 0,0001$ ) et C400-C800 ( $p = 0,005$ ).

<sup>2</sup>Effet période  $p = 0,021 \times 10^{-3}$ . Contrastes P1-P2 ( $p = 0,336$ ), P1-P3 ( $p < 0,0001$ ) et P2-P3 ( $p = 0,001$ ).

## **Taux cellulaire**

Les différents traitements alimentaires n'ont exercé aucun effet sur le taux cellulaire journalier du lait de chèvre ( $p = 0,363$ ; cf. figure 9a).

La période a eu un effet significatif sur le taux cellulaire journalier du lait de chèvre ( $p = 0,001$ ; cf. figure 9b). Le taux cellulaire n'a pas varié ( $p$  value =  $0,371$ ) entre la période 1 et la période 2 puis a diminué de 45% ( $p$  value =  $0,001$ ) entre la période 2 et la période 3. Entre la première et la dernière période, le taux cellulaire journalier a diminué d'environ 32% ( $p$  value =  $0,05$ ).

L'animal a eu un effet significatif sur le taux cellulaire du lait de chèvre ( $p = 0,031^{-5}$ ).

## **Taux de lactose et quantité de lactose**

Le traitement a eu un effet significatif sur le taux de lactose analysé le matin du prélèvement du lait de chèvre ( $p = 0,008 \times 10^{-3}$ ; cf. figure 10a). Le taux de lactose a augmenté d'environ 1,4% ( $p$  value =  $0,009$ ) entre le traitement C0 et le traitement C400 puis a augmenté de 1,4% ( $p = 0,005$ ) entre le traitement C400 et le traitement C800. Entre le traitement sans concentré et le traitement dont l'apport est le plus élevée, le taux de lactose a augmenté de 2,8% environ ( $p$  value <  $0,0001$ ).

La période a eu un effet significatif sur le taux de lactose analysé le matin du prélèvement du lait de chèvre ( $p = 0,021 \times 10^{-3}$ ; cf. figure 10b). Le taux de lactose n'a pas varié ( $p = 0,336$ ) entre la période 1 et la période 2 puis a diminué de 1,8% ( $p$  value =  $0,001$ ) entre la période 2 et la période 3. Entre la première et la dernière période, le taux de lactose a diminué de 2,3% ( $p$  value <  $0,0001$ ).

L'animal a eu un effet significatif sur le taux de lactose analysé le matin du prélèvement du lait de chèvre ( $p = 0,035 \times 10^{-13}$ ).

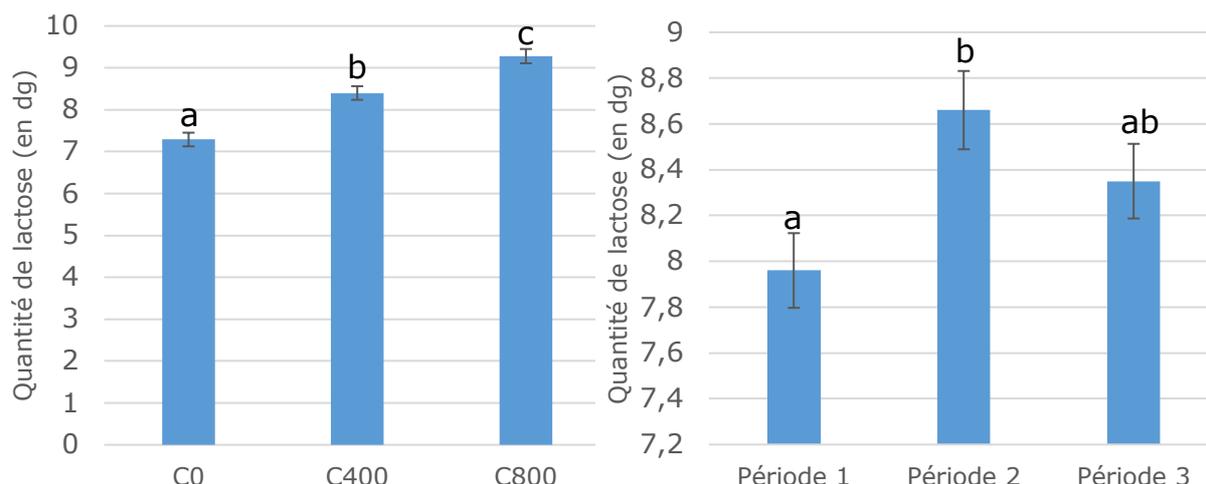


Figure 11a et b : Quantité de lactose du lait de chèvre analysé le matin du prélèvement selon le niveau de concentré<sup>1</sup> ou la période<sup>2</sup>.

Dix-huit chèvres, apports de concentré (C0: 0g, C400: 400g, C800: 800g/jour), schéma en double carré latin, trois périodes de 3 semaines. Moyennes pondérées des 4 derniers jours ajustées  $\pm$  SEM. Différences significatives codées par a, b, c.

<sup>1</sup>Effet traitement  $p = 0,017 \times 10^{-6}$ . Contrastes C0-C400 ( $p = 0,0001$ ), C0-C800 ( $p < 0,0001$ ) et C400-C800 ( $p = 0,002$ ).

<sup>2</sup>Effet période  $p = 0,037$ . Contrastes P1-P2 ( $p = 0,016$ ), P1-P3 ( $p = 0,220$ ) et P2-P3 ( $p = 0,412$ ).

Tableau n°3 : Moyennes marginales, contrastes des moyennes ajustées et p-value de la concentration en caséines, protéines solubles et protéines totales dans le lait de chèvre selon le niveau de concentré (en g/kg de lait).

	Moyennes marginales calculées				p-value	Contrastes des moyennes ajustées		
	C0	C400	C800	SEM		Traitement	C0-C400	C0-C800
Concentration caséines	25,7	25,6	25,9	0,157	0,457	0,888	0,770	0,493
Concentration protéines totales	27,3 <sup>a</sup>	27,9 <sup>ab</sup>	28,4 <sup>b</sup>	0,196	$0,07 \times 10^{-2}$	0,102	0,0008	0,120
Concentration protéines solubles	1,6 <sup>a</sup>	2,3 <sup>b</sup>	2,6 <sup>b</sup>	0,098	$0,012 \times 10^{-5}$	0,0001	<0,0001	0,083

Dix-huit chèvres, apports de concentré (C0 : 0g, C400 : 400g, C800 : 800g/jour), schéma en double carré latin, trois périodes de 3 semaines. Moyennes pondérées des 4 derniers jours ajustées  $\pm$  SEM. Différences significatives codées par a et b. Analyses réalisées sur le lait écrémé prélevé le matin .

Tableau n°4 : Moyennes marginales, contrastes des moyennes ajustées et p-value de la concentration en caséines, protéines solubles et protéines totales dans le lait de chèvre selon la période (en g/kg de lait).

	Moyennes marginales calculées				p-value	Contrastes des moyennes ajustées		
	P1	P2	P3	SEM		Période	P1 - P2	P1 - P3
Concentration caséines	25,2 <sup>a</sup>	26,3 <sup>b</sup>	25,7 <sup>a</sup>	0,16	$0,02 \times 10^{-3}$	<0,0001	0,096	0,011
Concentration protéines totales	27,3 <sup>a</sup>	28,4 <sup>b</sup>	27,9 <sup>ab</sup>	0,20	0,001	0,002	0,103	0,199
Concentration protéines solubles	2,1	2,0	2,2	0,10	0,426	0,778	0,722	0,336

Dix-huit chèvres, apports de concentré (C0: 0g, C400: 400g, C800: 800g/jour), schéma en double carré latin, trois périodes de 3 semaines. Moyennes pondérées des 4 derniers jours ajustées  $\pm$  SEM. Différences significatives codées par a et b. Analyses réalisées sur le lait écrémé prélevé le matin.

Le traitement a eu un effet significatif sur la quantité de lactose du lait de chèvre analysé le matin du prélèvement ( $p = 0,017 \times 10^{-6}$ ; cf. figure 11a). La quantité de lactose a augmenté d'environ 15,2% ( $p$  value = 0,0001) entre le traitement C0 et le traitement C400 puis a augmenté de 10,5% ( $p = 0,002$ ) entre le traitement C400 et le traitement C800. Entre le traitement sans concentré et le traitement dont l'apport est le plus élevée, la matière protéique journalière a augmenté de 27,2 % environ ( $p$  value < 0,0001).

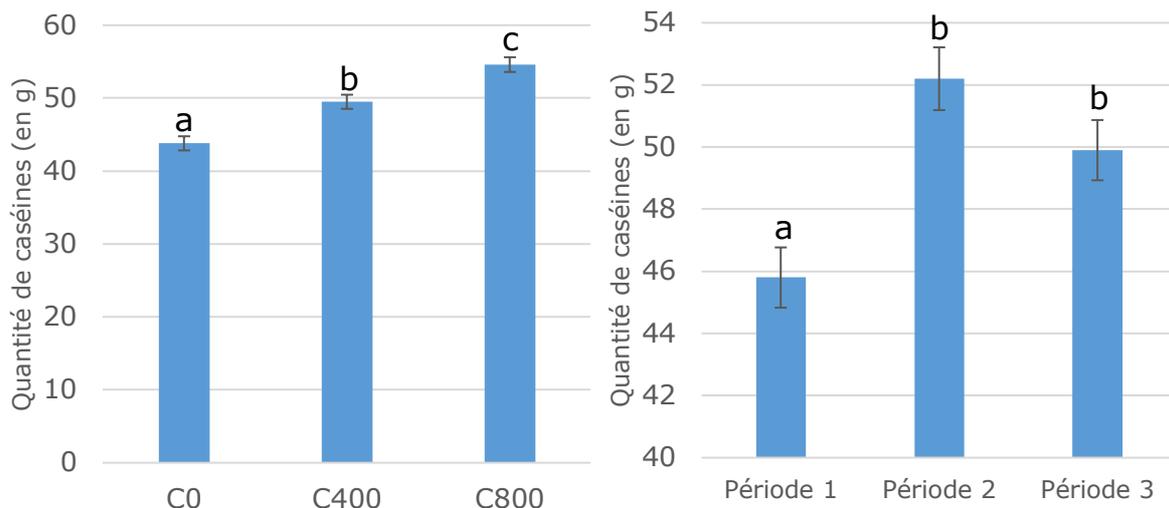
La période a eu un effet significatif sur la quantité de lactose analysé le matin du prélèvement du lait de chèvre ( $p = 0,037$ ; cf. figure 11b). Le taux de lactose a augmenté de 8,8% ( $p = 0,016$ ) entre la période 1 et la période 2 puis n'a pas varié ( $p$  value = 0,412) entre la période 2 et la période 3. Entre la première et la dernière période, le taux de lactose n'a pas varié non plus ( $p$  value = 0,220).

L'animal a eu un effet significatif sur la quantité de lactose analysé le matin du prélèvement du lait de chèvre ( $p = 0,001 \times 10^{-6}$ ).

### **Concentration en caséines, protéines totales et protéines solubles**

Les différents traitements alimentaires n'ont eu aucun effet sur la concentration en caséines le matin du prélèvement du lait de chèvre ( $p = 0,457$ ; cf. tableau n°3). La période et l'animal ont eu un effet significatif sur la concentration en caséines (Effet période  $p = 0,02 \times 10^{-3}$ ; cf. tableau n°4) (Effet animal  $p < 0,022 \times 10^{-14}$ ). La concentration en caséines a augmenté de 4,4% ( $p$  value < 0,0001) entre les périodes 1 et 2 puis a diminué de 2,3% ( $p$  value = 0,011) entre les périodes 2 et 3. Entre la première et la dernière période, le taux cellulaire journalier a eu tendance à augmenter d'environ 2% ( $p$  value = 0,096).

Le traitement a eu un effet significatif sur la concentration en protéines totales du lait de chèvre analysé le matin du prélèvement ( $p = 0,07 \times 10^{-2}$ ; cf. tableau n°3). La concentration de protéines totales n'a pas varié ( $p = 0,102$ ) entre les traitements C0 et C400 et les traitements C400 et C800 ( $p = 0,120$ ). Entre le traitement sans concentré et le traitement dont l'apport est le plus élevée, la concentration en protéines totales a augmenté de 4% environ ( $p$  value = 0,0008). La période et l'animal ont eu un effet significatif sur la concentration en protéines totales (Effet période  $p = 0,001$ ; cf. tableau n°4) (Effet animal  $p = 0,023 \times 10^{-14}$ ). La concentration en protéines totales a augmenté de 4% ( $p$  value = 0,002) entre les périodes 1 et 2 et n'a pas varié ( $p$  value = 0,199) entre les périodes 2 et 3 ainsi que les périodes 1 et 3 ( $p$  value = 0,103).

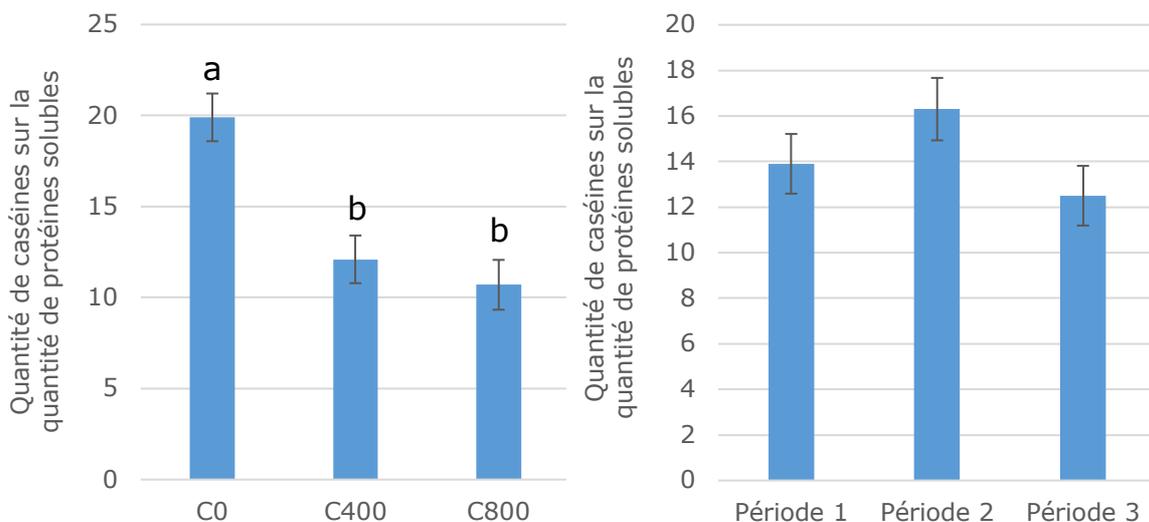


**Figure 12a et b : Quantité de caséines dans le lait de chèvre le matin du prélèvement selon le niveau de concentré<sup>1</sup> ou la période<sup>2</sup>.**

Dix-huit chèvres, apports de concentré (C0: 0g, C400: 400g, C800: 800g/jour), schéma en double carré latin, trois périodes de 3 semaines. Moyennes pondérées des 4 derniers jours ajustées  $\pm$  SEM. Différences significatives codées par a, b, c.

<sup>1</sup>Effet traitement  $p = 0,011 \times 10^{-5}$ . Contrastes C0-C400 ( $p = 0,0007$ ), C0-C800 ( $p < 0,0001$ ) et C400-C800 ( $p = 0,003$ ).

<sup>2</sup>Effet période  $p = 0,037 \times 10^{-2}$ . Contrastes P1-P2 ( $p = 0,0002$ ), P1-P3 ( $p = 0,016$ ) et P2-P3 ( $p = 0,231$ ).



**Figure 13a et b : Ratio de la quantité de caséines sur la quantité de protéines solubles du lait de chèvre le matin du prélèvement selon le niveau de concentré<sup>1</sup> ou la période<sup>2</sup>.**

Dix-huit chèvres, apports de concentré (C0: 0g, C400: 400g, C800: 800g/jour), schéma en double carré latin, trois périodes de 3 semaines. Moyennes pondérées des 4 derniers jours ajustées  $\pm$  SEM. Différences significatives codées par a et b.

<sup>1</sup>Effet traitement  $p = 0,036 \times 10^{-3}$ . Contrastes C0-C400 ( $p = 0,0006$ ), C0-C800 ( $p < 0,0001$ ) et C400-C800 ( $p = 0,745$ ).

<sup>2</sup>Effet période  $p = 0,138$ . Contrastes P1-P2 ( $p = 0,409$ ), P1-P3 ( $p = 0,735$ ) et P2-P3 ( $p = 0,122$ ).

Le traitement a eu un effet significatif sur la concentration en protéines solubles du lait de chèvre analysé le matin du prélèvement ( $p = 0,012 \times 10^{-5}$ ; cf. tableau n°3). La concentration de protéines solubles a augmenté de 41% ( $p = 0,0001$ ) entre le traitement C0 et C400 puis a eu tendance à augmenter ( $p = 0,083$ ) entre le traitement C400 et C800. Entre le traitement sans concentré et le traitement dont l'apport est le plus élevée, la concentration en protéines solubles a augmenté de 60% environ ( $p \text{ value} < 0,0001$ ). La période n'a pas exercé d'effet sur la concentration en protéines solubles ( $p = 0,426$ ; cf. tableau n°4) tandis que l'animal a exercé un effet significatif ( $p = 0,031 \times 10^{-4}$ ).

### **Quantité de caséines**

Le traitement a eu un effet significatif sur la quantité de caséines du lait de chèvre analysé le matin du prélèvement ( $p = 0,011 \times 10^{-5}$ ; cf. figure 12a). La quantité de caséines a augmenté de 13% ( $p = 0,0007$ ) entre les traitements C0 et C400 puis a augmenté de 10,3% ( $p = 0,003$ ) entre les traitements C400 et C800. Entre le traitement sans concentré et le traitement dont l'apport est le plus élevée, la concentration en protéines solubles a augmenté de 25% environ ( $p \text{ value} < 0,0001$ ). La période et l'animal ont eu un effet significatif sur la quantité de caséines (Effet période  $p = 0,037 \times 10^{-2}$ ; cf. figure 12b) (Effet animal  $p = 0,072 \times 10^{-7}$ )

### **Ratio de la quantité de caséines sur la quantité de protéines solubles**

Le traitement a eu un effet significatif sur le ratio de la quantité de caséines sur la quantité de protéines solubles ( $p = 0,036 \times 10^{-3}$ ; cf. figure 13a). Le ratio caséines/protéines solubles a diminué de 39% ( $p = 0,0006$ ) entre les traitements C0 et C400 puis n'a pas varié entre les traitements C400 et C800 ( $p = 0,745$ ). Entre le traitement sans concentré et le traitement dont l'apport est le plus élevée, le ratio a diminué de 46% environ ( $p \text{ value} < 0,0001$ ). La période n'a pas eu d'effet sur le ratio ( $p = 0,138$ ; cf. figure 13b) et seulement une tendance a été observé de l'effet animal sur le ratio caséines/protéines solubles ( $p = 0,059$ ).

Tableau n°5a et b : Viabilité des CEM isolées du lait de chèvre selon le niveau de concentré ou la période.

	Moyennes marginales calculées selon le traitement				P value	Contrastes des moyennes ajustées selon le traitement		
	C0	C400	C800	SEM	Traitement	C0-C400	C0-C800	C400-C800
viabilité_CEM <sup>1</sup>	56,5	57,0	58,7	2,26	0,904	0,990	0,785	0,849
	Moyennes marginales calculées selon la période				P value	Contrastes des moyennes ajustées selon le traitement		
	Période 1	Période 2	Période 3	SEM	Période	P1-P2	P1-P3	P2-P3
viabilité_CEM <sup>1</sup>	58,5	58,7	55,0	2,36	0,439	0,999	0,490	0,494

<sup>1</sup> Viabilités des cellules épithéliales mammaires déterminés par comptage ViCell (en %) après séparation immuno-magnétique des CEM et des leucocytes. Dix-huit chèvres, apports de concentré (C0: 0g, C400: 400g, C800: 800g/jour), schéma en double carré latin, trois périodes de 3 semaines. Moyennes pondérées des 4 derniers jours ajustées ± SEM. Différences significatives codées par a et b.

Tableau n°6a et b : Nombre de cellules épithéliales mammaires exfoliées du lait de chèvre selon le niveau de concentré ou la période (x10<sup>6</sup>)

	Moyennes marginales calculées selon traitement				P value	Contrastes des moyennes ajustées selon traitement		
	C0	C400	C800	SEM	Traitement	C0-C400	C0-C800	C400-C800
nb_cellexfo_matin <sup>1</sup>	12,6	18,2	19,5	1,18	0,129	0,248	0,153	0,946
nb_cellexfo_apoptotique <sup>2</sup>	2,2	2,7	3,7	1,23	0,149	0,755	0,195	0,520
nb_cellexfo_ECapoptose <sup>3</sup>	3,9	5,4	5,5	1,27	0,350	0,609	0,551	0,998
	Moyennes marginales calculées selon la période				P value	Contrastes des moyennes ajustées selon le traitement		
	Période 1	Période 2	Période 3	SEM	Période	P1-P2	P1-P3	P2-P3
nb_cellexfo_matin <sup>1</sup>	22 <sup>a</sup>	18 <sup>b</sup>	11 <sup>b</sup>	1,18	0,020	0,673	0,016	0,134
nb_cellexfo_apoptotiques <sup>2</sup>	3,09	3,16	2,34	1,73	0,243	0,999	0,514	0,578
nb_cellexfo_ECapoptose <sup>3</sup>	8,1 <sup>a</sup>	6,2 <sup>a</sup>	2,2 <sup>b</sup>	1,33	0,0007	0,712	0,006x10 <sup>-1</sup>	0,022

<sup>1</sup> Nombre de cellules épithéliales mammaires exfoliées dans le lait le matin du prélèvement déterminé par comptage ViCell (x10<sup>6</sup>)

<sup>2</sup> Nombre de cellules épithéliales mammaires apoptotiques et exfoliées dans le lait le matin du prélèvement déterminé par comptage ViCell et marquage Annexin V pour cytométrie en flux (x10<sup>6</sup>)

<sup>3</sup> Nombre de cellules épithéliales mammaires en voie d'apoptose et exfoliées dans le lait le matin du prélèvement déterminé par comptage ViCell et marquage Annexin V pour cytométrie en flux (x10<sup>6</sup>). Dix-huit chèvres, apports de concentré (C0: 0g, C400: 400g, C800: 800g/jour), schéma en double carré latin, trois périodes de 3 semaines. Moyennes pondérées des 4 derniers jours ajustées ± SEM. Différences significatives codées par a et b.

## **Viabilité et activités des cellules épithéliales mammaires isolées et purifiées du lait**

Les différents traitements et périodes n'ont pas exercés d'effets sur la viabilité des cellules épithéliales mammaires déterminée à l'aide de l'automate de comptage cellulaire ViCell (Effet traitement  $p = 0,904$  ; cf. tableau 5a) (Effet période  $p = 0,439$  ; cf. tableau 5b). Il n'y a pas non plus eu d'effet de l'animal ( $p = 0,296$ ). La proportion de CEM vivantes déterminé par marquage en cytométrie de flux avec le kit Annexin V a montré un effet significatif de la période ( $p = 0,006$  ; cf. Annexe 11). La proportion de CEM vivantes déterminé par marquage en cytométrie de flux avec le kit Annexin V n'a pas varié ( $p = 0,915$ ) entre la période 1 et 2 puis a augmenté de 27,8% ( $p = 0,048$ ) entre la période 2 et 3. Entre la première et la dernière période, le pourcentage a augmenté de 34% environ ( $p = 0,009$ ).

Les différents traitements n'ont pas exercé d'effets les pourcentages de CEM isolées du lait de chèvre et nécrosées ( $p = 0,438$  ; cf. Annexe 10). Aucun effet du niveau de concentré n'a été observé sur le pourcentage de CEM mortes par apoptose ( $p = 0,389$ ; cf. Annexe 12) ou en voie d'apoptose ( $p = 0,434$ ; cf. Annexe 10), tous déterminés après marquage à l'Annexin V et analysés par cytométrie en flux.

La période n'a exercé d'effet ni sur le pourcentage de CEM nécrosées ( $p = 0,084$ ; cf. Annexe 11) ni sur le pourcentage de CEM mortes par apoptose ( $p = 0,353$ ; cf. Annexe 11). L'animal a exercé un effet significatif ces deux pourcentages ( $p = 0,034$  et  $p = 0,029$  respectivement) mais n'a pas exercé d'effets sur le pourcentage de CEM en voie d'apoptose ( $p = 0,134$ ). La période a exercé un effet significatif sur le pourcentage de CEM en voie d'apoptose et isolées du lait de chèvre le matin du prélèvement ( $p = 0,006 \times 10^{-4}$ ). Ce pourcentage n'a pas varié ( $p$  value =  $0,784$ ) entre la période 1 et la période 2 puis a diminué de 48% ( $p$  value =  $0,0001$ ) entre la période 2 et la période 3. Entre la première et la dernière période, le pourcentage a diminué de 51% environ ( $p$  value  $< 0,0001$ ).

## **Exfoliation des cellules épithéliales mammaires**

Les différents traitements n'ont pas exercé d'effets sur le nombre de CEM exfoliées du lait quelle que soit leur niveau d'activité (apoptotiques ou en voie d'apoptose ; cf. Tableau 6a). La période a exercé un effet significatif sur le nombre de CEM totales exfoliées dans le lait le matin du prélèvement ( $p = 0,020$  ; cf. Tableau 6b). Le nombre de CEM exfoliées du lait n'a pas varié ( $p$  value =  $0,673$ ) entre la période 1 et la période 2 ainsi que la période 2 et la période 3 ( $p$  value =  $0,134$ ). Entre la première et la dernière période, le nombre de CEM a diminué de 49% environ ( $p$  value =  $0,016$ ). L'animal a exercé un effet significatif sur le nombre de CEM exfoliées ( $p = 0,046 \times 10^{-3}$ ).



La période n'a pas exercé d'effet significatif sur le nombre de CEM apoptotiques exfoliées dans le lait le matin du prélèvement ( $p = 0,243$  ; cf. Tableau 6b).

La période a exercé un effet significatif sur le nombre de CEM en voie d'apoptose exfoliées dans le lait le matin du prélèvement ( $p = 0,0007$  ; cf. Tableau 6b). Le nombre de CEM exfoliées et en voie d'apoptose n'a pas varié ( $p$  value =  $0,712$ ) entre la période 1 et la période 2 puis a diminué de 64% ( $p$  value =  $0,022$ ) entre la période 2 et la période 3. Entre la première et la dernière période, le nombre de CEM a diminué de 73% environ ( $p$  value =  $0,0006$ ). L'animal a exercé un effet significatif sur le nombre de CEM exfoliées dans le lait et en voie d'apoptose ( $p = 0,005$ ).

Tableau n°7a et b : Pourcentage de cellules selon le type cellulaire, leur état de survie ainsi que leur production de ROS (en %)

	Moyennes marginales calculées				P value	Contrastes des moyennes ajustées		
	C0	C400	C800	SEM	Traitement	C0-C400	C0-C800	C400-C800
Proportion de CEM <sup>1</sup>	9,7	8,1	7,8	1,02	0,356	0,480	0,360	0,966
Proportion de Leucocytes <sup>1</sup>	77,5	79,1	79,0	1,70	0,730	0,314	0,666	0,819
Proportion de CEM mortes ROS+ <sup>3</sup>	41,4	37,4	42,2	2,60	0,332	0,500	0,973	0,386
Viabilité des CEM <sup>2</sup>	13,3	13,8	14,3	1,41	0,845	0,960	0,867	0,965
Proportion de CEM vivantes ROS+ <sup>3</sup>	38,9	34,4	35,9	3,42	0,607	0,600	0,804	0,947
Proportion de Leucocytes morts ROS+ <sup>3</sup>	13,8	12,0	12,6	1,89	0,777	0,758	0,898	0,965
Viabilité des leucocytes <sup>2</sup>	38,0	42,6	42,8	2,86	0,376	0,460	0,450	1,000
Proportion de leucocytes vivants ROS+ <sup>3</sup>	23,7	19,4	20,9	3,51	0,658	0,650	0,840	0,950

	Moyennes marginales calculées				P value	Contrastes des moyennes ajustées		
	P1	P2	P3	SEM	Période	P1 - P2	P1 - P3	P2 - P3
Proportion de CEM <sup>1</sup>	6,4 <sup>a</sup>	8,8 <sup>ab</sup>	10,4 <sup>b</sup>	1,02	0,020	0,220	0,016	0,472
Proportion de Leucocytes <sup>1</sup>	80,0	79,3	76,3	1,70	0,233	0,954	0,253	0,410
Proportion de CEM mortes ROS+ <sup>3</sup>	50,8 <sup>a</sup>	39,0 <sup>b</sup>	31,1 <sup>b</sup>	2,60	0,017x10 <sup>-3</sup>	0,007	<0,0001	0,088
Viabilité des CEM <sup>2</sup>	10,8 <sup>a</sup>	11,4 <sup>a</sup>	19,1 <sup>b</sup>	1,41	0,0001	0,942	0,0004	0,001
Proportion de CEM vivantes ROS+ <sup>3</sup>	35,5	37,7	36	3,42	0,917	0,885	0,994	0,928
Proportion de Leuco morts ROS+ <sup>3</sup>	17,4 <sup>a</sup>	11,1 <sup>ab</sup>	9,9 <sup>b</sup>	1,89	0,016	0,061	0,018	0,883
Viabilité des leucocytes <sup>2</sup>	35,0 <sup>a</sup>	36,6 <sup>a</sup>	51,7 <sup>b</sup>	2,86	0,0001	0,913	0,0004	0,002
Proportion de leucocytes vivants ROS+ <sup>3</sup>	24,6	23,9	15,4	3,51	0,117	0,988	0,143	0,201

<sup>1</sup> Pourcentage de CEM ou de leucocytes au sein de la totalité de la population cellulaire détectée par cytométrie avec marquage des CEM par CD49F (en %)

<sup>2</sup> Pourcentage de CEM (ou leucocytes) mortes (ou vivantes) au sein de la population de CEM (ou leucocytes) (en %) détecté par cytométrie avec marquage des CEM par CD49F et détermination de la viabilité par eFluor™.

<sup>3</sup> Pourcentage de CEM (ou leucocytes) mortes (ou vivantes) produisant des ROS au sein de la population de CEM (ou leucocytes) mortes (ou vivantes) (en %) avec marquage des CEM par CD49F, détermination de la viabilité par eFluor™ et production de ROS par le kit CellRox orange

Dix-huit chèvres, apports de concentré (C0: 0g, C400: 400g, C800: 800g/jour), schéma en double carré latin, trois périodes de 3 semaines. Moyennes pondérées des 4 derniers jours ajustées ± SEM. Différences significatives codées par a et b.

## Caractéristiques des populations cellulaires isolées du lait

Les différents niveaux de concentré n'ont pas exercé d'effets sur le pourcentage de cellules épithéliales et de leucocytes identifiés par le marqueur CD49F au sein des cellules isolées du lait de chèvre (cf. tableau 7a). On peut voir que quel que soit le niveau de concentré, les leucocytes sont majoritaires à près de 90%. Les CEM ne représentent donc que 10% de la population de cellules isolées du lait de chèvre.

Le traitement n'a également pas exercé d'effets sur la viabilité des cellules déterminée à l'aide du marqueur eFluor™, quel que soit leur type cellulaire (cf. tableau 7a). Les variations de concentré n'ont pas exercé d'effets sur la production des espèces réactives de l'oxygène, quel que soit le type cellulaire ainsi que leur état de survie (cf. tableau 7a).

La période a eu un effet sur les cellules épithéliales mammaires mortes produisant des ROS ( $p = 1,017 \times 10^{-3}$  ; cf. tableau 7b). Le pourcentage de CEM mortes et productrices de ROS a diminué de 23% ( $p$  value = 0,007) entre la période 1 et la période 2 puis a eu tendance à diminuer ( $p$  value = 0,088) entre la période 2 et la période 3. Entre la première et la dernière période, le pourcentage de CEM mortes et productrices de ROS a diminué de 39% environ ( $p$  value < 0,0001).

La période a eu un effet sur la viabilité des CEM déterminé par marquage CD49F et eFluor™ au sein des cellules isolées du lait ( $p = 0,0001$  ; cf. tableau 7b). Le pourcentage de viabilité des CEM n'a pas varié ( $p = 0,942$ ) entre la période 1 et 2 puis a augmenté de 67% ( $p = 0,001$ ) entre la période 2 et 3. Entre la première et la dernière période, le pourcentage de viabilité des CEM a augmenté de 77% ( $p = 0,0004$ ).

La période a eu un effet significatif sur la viabilité des leucocytes déterminé par marquage CD49F et eFluor™ au sein des cellules isolées du lait ( $p = 0,0001$  ; cf. tableau 7b). Le pourcentage de viabilité des leucocytes n'a pas varié ( $p = 0,913$ ) entre la période 1 et 2 puis a augmenté de 23% ( $p = 0,002$ ) entre la période 2 et 3. Entre la première et la dernière période, le pourcentage de viabilité des leucocytes a augmenté de 25% ( $p = 0,0004$ ).

La période a eu un effet significatif sur la proportion de leucocytes morts qui produisent des ROS déterminé par marquage CellRox Orange™ au sein des cellules isolées du lait ( $p = 0,016$  ; cf. tableau 7b). Le pourcentage de leucocytes morts producteurs de ROS a eu tendance à diminuer ( $p = 0,061$ ) entre la période 1 et 2 puis n'a pas varié ( $p = 0,883$ ) entre la période 2 et 3. Entre la première et la dernière période, le pourcentage de leucocytes morts a diminué de 43% ( $p = 0,018$ ).

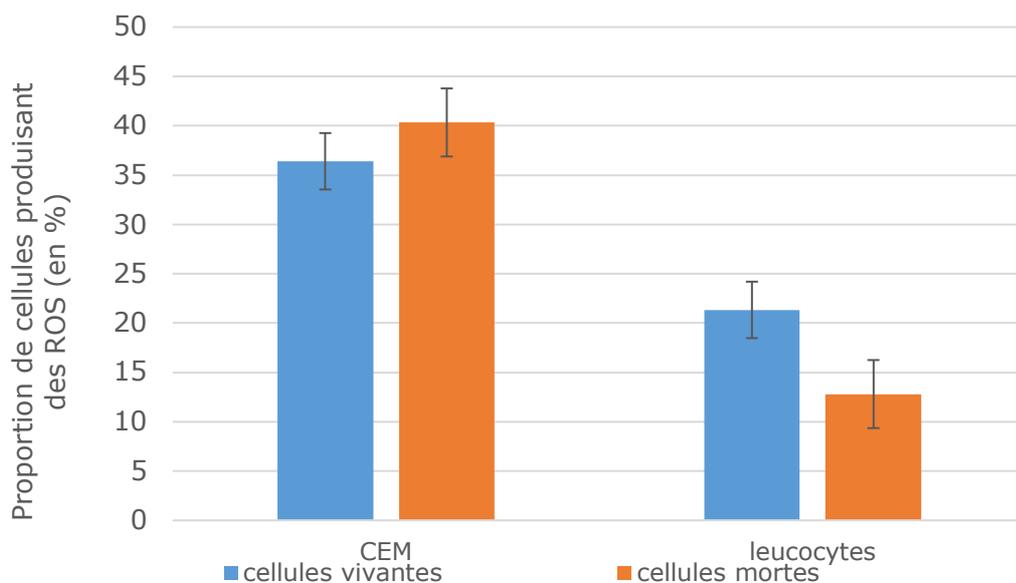


Figure 14 : Valeurs moyennes des proportions de cellules du lait de chèvre produisant des espèces réactives de l'oxygène selon le type cellulaire et leur état de survie analysées par cytométrie en flux.

Les valeurs présentées obtenues par cytométrie de flux avec marquage CD49F, eFluor™ et kit CellRox Orange. Dix-huit chèvres, apports de concentré (C0: 0g, C400: 400g, C800: 800g/jour), schéma en double carré latin, trois périodes de 3 semaines. Moyennes pondérées des 4 derniers jours ajustées  $\pm$  SEM.

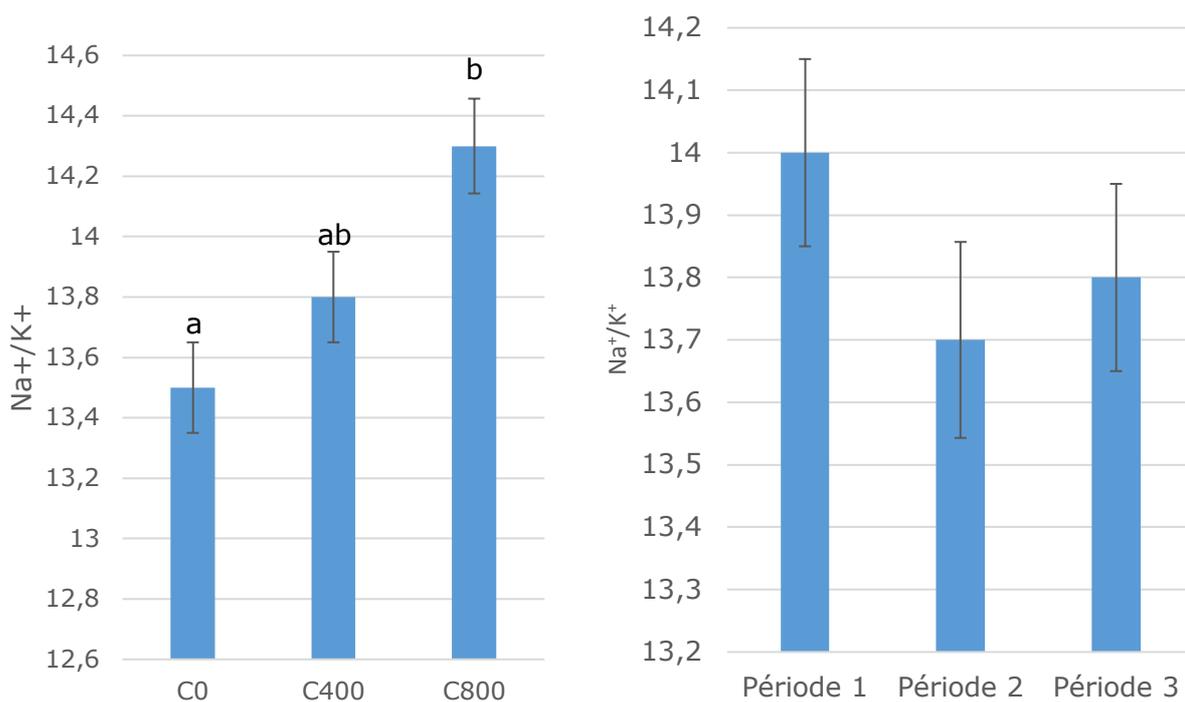


Figure 15a et b : Ratio de la concentration en sodium sur la concentration en potassium du lait de chèvre le matin du prélèvement selon le niveau de concentré<sup>1</sup> ou la période<sup>2</sup>.

Dix-huit chèvres, apports de concentré (C0: 0g, C400: 400g, C800: 800g/jour), schéma en double carré latin, trois périodes de 3 semaines. Moyennes pondérées des 4 derniers jours ajustées  $\pm$  SEM. Différences significatives codées par a et b.

<sup>1</sup> Effet traitement  $p = 0,007$ . Contrastes C0-C400 ( $p = 0,269$ ), C0-C800 ( $p = 0,001$ ) et C400-C800 ( $p = 0,067$ ).

<sup>2</sup> Effet période  $p = 0,245$ . Contrastes P1-P2 ( $p = 0,463$ ), P1-P3 ( $p = 0,770$ ) et P2-P3 ( $p = 0,861$ )

La figure 14 présente les moyennes de pourcentage de cellules produisant des ROS selon le type cellulaire et l'état de survie, indépendamment du traitement ou de la période car le traitement n'a pas eu d'effet sur la proportion de cellules du lait de chèvre produisant des ROS. Des tests de comparaison ont montré que la proportion de CEM mortes produisant des ROS était significativement plus élevée que celle des CEM vivantes (test de student, bilatéral et pairés,  $p < 2,2 \times 10^{-16}$ ). Dans la population des leucocytes, la production de ROS n'était pas significativement différente entre les cellules mortes et vivantes (test de student, bilatéral et pairés,  $p\text{-value} = 0,3587$ ).

La proportion de CEM mortes produisant des ROS était plus importante que celle des leucocytes morts (test de student, bilatéral et pairés,  $p\text{-value} = 7,409 \times 10^{-6}$ ). Enfin, parmi les cellules vivantes, la proportion des CEM productrices de ROS étaient plus nombreuses que celles des leucocytes (test de student, bilatéral et pairés,  $p = 7.134 \times 10^{-8}$ ).

### **Intégrité de l'épithélium mammaire**

Le traitement a eu un effet sur le ratio de la concentration en sodium sur la concentration en potassium du lait de chèvre le matin du prélèvement ( $p = 0,007$ ; cf. figure 15a). Le ratio  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ( $p = 0,269$ ) n'a pas varié entre les traitements C0 et C400 puis a eu tendance à augmenter entre les traitements C400 et C800 ( $p = 0,067$ ). Entre le traitement sans concentré et le traitement dont l'apport est le plus élevée, le ratio a augmenté de 5,9% environ ( $p = 0,001$ ). Les différentes périodes n'ont pas exercé d'effets sur le ratio  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ( $p = 0,245$ ; cf. figure 15b) tandis que l'animal a exercé un effet significatif ( $p = 0,014 \times 10^{-9}$ ).

Tableau n°8 : Taux d'expression des gènes chez des chèvres laitières analysé dans les CEM isolées du lait en fonction du niveau de concentré apporté dans la ration.

	Moyennes marginales calculées				p-value	Contrastes des moyennes ajustées		
	C0	C400	C800	SEM	Traitement	C0-C400	C0-C800	C400-C800
BAX	3,70	3,35	3,62	0,159	0,794	0,337	0,938	0,457
FASN	3,81	3,44	3,73	0,167	0,803	0,327	0,937	0,446
CASK	3,91	3,55	3,83	0,161	0,838	0,321	0,922	0,459
LALBA	3,92	3,56	3,84	0,161	0,828	0,332	0,931	0,460
SOD1	3,57	3,23	3,50	0,160	0,810	0,344	0,937	0,467
SLC2A1	3,71	3,35	3,63	0,161	0,824	0,333	0,935	0,457
ELF5	3,68	3,31	3,59	0,167	0,847	0,328	0,904	0,491

Dix-huit chèvres ont été soumises à un apport de concentré variable (0g, 400g ou 800g par jour) selon un schéma expérimental en double carré latin pendant trois périodes d'une durée de 3 semaines chacune. Les traitements alimentaires ont tourné lors de la période suivante. Les données présentées sont des moyennes ajustées  $\pm$  SEM exprimée en log du rapport entre le nombre de mole du gène cible et la moyenne géométrique du nombre de mol des gènes de référence (RPLP0, CYCLO et GAPDH) pour les données dont les RIN > 5.

Tableau n°9 : Taux d'expression des gènes chez des chèvres laitières analysé dans les CEM isolées du lait en fonction de la période.

	Moyennes marginales calculées				p-value	Contrastes des moyennes ajustées		
	P1	P2	P3	SEM	Période	P1 - P2	P1 - P3	P2 - P3
BAX	3,72	3,42	3,53	0,189	0,212	0,513	0,663	0,872
FASN	3,83	3,49	3,67	0,198	0,147	0,462	0,786	0,688
CASK	3,91	3,58	3,8	0,191	0,136	0,465	0,885	0,572
LALBA	3,92	3,59	3,81	0,191	0,124	0,453	0,870	0,575
SOD1	3,58	3,25	3,47	0,189	0,131	0,437	0,861	0,565
SLC2A1	3,7	3,4	3,59	0,191	0,175	0,511	0,862	0,664
ELF5	3,66	3,35	3,58	0,199	0,127	0,522	0,941	0,560

Dix-huit chèvres ont été soumises à un apport de concentré variable (0g, 400g ou 800g par jour) selon un schéma expérimental en double carré latin pendant trois périodes d'une durée de 3 semaines chacune. Les traitements alimentaires ont tourné lors de la période suivante. Les données présentées sont des moyennes ajustées  $\pm$  SEM exprimée en log du rapport entre le nombre de mole du gène cible et la moyenne géométrique du nombre de mol des gènes de référence (RPLP0, CYCLO et GAPDH) pour les données dont les RIN > 5.

## **Taux d'expression des gènes étudiés**

Le niveau de concentré dans la ration ainsi que la période n'ont pas exercé d'effets sur l'expression de l'ensemble des gènes étudiés (cf. tableaux n°8 et n°9). La variable animale, dont les p-values sont disponibles en annexe 9, n'a pas non plus exercé d'effet sur le taux d'expression des gènes des cellules isolées du lait de chèvre.



## DISCUSSION

Le premier objectif de cette étude est de déterminer les effets des niveaux d'apports de concentré sur les mécanismes impliqués dans la variation de la production laitière et des constituants du lait. Nous discuterons dans un premier temps des effets observés sur le lait et la synthèse de ses constituants avant d'aborder les niveaux d'expression des gènes impliqués dans la synthèse des constituants du lait analysés dans les CEM isolées du lait.

Notre étude a effectivement montré une augmentation de la production laitière avec l'augmentation du niveau d'apport de concentré dans la ration. Ce résultat est en accord avec des travaux concernant la variation des apports alimentaires réalisés chez la vache (Hervé et al. 2019; Dessauge et al. 2011; Nørgaard et al. 2008; Boutinaud et al. 2020) et chez la chèvre (Morand-Fehr, Sauvant 1980) mais s'oppose aux résultats décrits dans une étude de Tsiplakou (2016) qui n'a pas observé de changement de la production laitière chez des chèvres nourries pour couvrir 70%, 100% ou 130% de leur besoin énergétique individuel. Une autre étude comparant deux niveaux d'énergies chez la chèvre n'a pas non plus observé de différence significative de la production laitière (Boutinaud et al. 2020). Ces contradictions peuvent notamment s'expliquer par la sévérité du traitement appliqué, qui s'avère plus légère dans les deux études mentionnées ci-dessus que dans notre étude.

Dans notre étude, l'augmentation significative de la production laitière s'est accompagnée de celle du taux butyreux, entre l'absence de concentré dans la ration et les autres niveaux d'apports. Cette observation est en accord avec une autre étude qui observe une hausse de 10% du taux de matière grasse du lait avec un apport énergétique plus élevé (Boutinaud et al. 2020). Cependant, cela s'oppose aux résultats d'autres études dont celle de Morand-Fehr et Sauvant (1980), qui observait un taux de matière grasse stable dans le lait malgré des niveaux énergétiques différents chez les chèvres laitières en milieu de lactation. Cette contradiction peut s'expliquer par un ratio fourrage/concentré identique pour les rations à forte et faible densité énergétique dans le cas de l'étude de Morand-Fehr et Sauvant tandis que dans notre étude le foin de luzerne a été distribué à volonté.

L'apport variable de concentré n'a pas exercé d'effets sur le taux protéique du lait, analysé par le laboratoire indépendant Mylab. C'est également le cas d'une autre étude qui n'observe pas de différence significative du taux protéique malgré la hausse de l'apport énergétique (Boutinaud et al. 2020). Or, ces observations sont contraires à d'autres études qui montrent une augmentation du taux protéique du lait avec l'augmentation de l'apport énergétique de la ration chez la vache (Nørgaard et al. 2008) mais aussi chez la chèvre (Inglingstad et al. 2014; Morand-Fehr, Sauvant 1980).



La mesure des concentrations en protéines totales du lait déterminées par la méthode Kjeldahl sur le lait écrémé montre que celles-ci augmentent significativement avec l'apport de concentré. Nous n'avons pas d'explication à la divergence entre ce résultat et celui concernant l'analyse du taux protéique dans le lait par le laboratoire indépendant Mylab. L'augmentation des concentrations en protéines totales du lait est dû à l'augmentation du taux de protéines solubles déterminé par les analyses sur le lait écrémé.

La concentration en caséines du lait de chèvre n'a pas été significativement impactée par l'apport de concentré dans la ration comme observé également dans une autre étude (Lemosquet et al. 2020) mais la quantité de caséines dans le lait augmente bien avec l'apport de concentré dans la ration. Ce résultat est également observé dans l'étude d'Inglingstad (2011).

Concernant le taux de lactose, l'augmentation significative observée avec l'apport de concentré est similaire à d'autres études montrant des effets du niveau d'apport alimentaire chez la vache (Andersen et al. 2003 ; Dessauge et al. 2011) et chez la chèvre (Tsiplakou et al. 2016; Lemosquet et al. 2020).

Les variations observées dans la quantité de caséines dans le lait ne sont pas conjointes à une variation du niveau d'expression du gène CSN3. Cette observation rejoint les conclusions d'une autre étude (Boutinaud et al. 2020).

Les variations observées dans les concentrations des différents constituants du lait avec le traitement ne se sont pas accompagnées d'effets sur les niveaux d'expressions des gènes impliqués dans la synthèse des constituants du lait analysé dans les CEM isolées du lait. Plusieurs hypothèses peuvent permettre d'expliquer ces observations. Premièrement, une limitation a pu être liée à la faiblesse de la puissance statistique du modèle pour traiter les résultats de l'analyse d'expression de gènes. En effet, afin de s'assurer de la fiabilité des résultats obtenus par PCR quantitative, seuls les ARN dont le RIN (indicateur de l'état de dégradation des ARN) est supérieur à 5 ont été conservés. Plus le RIN est faible, plus l'ARN a subi des dégradations. Conserver des ARN dont le RIN est trop faible peut impacter négativement la solidité des résultats (Boutinaud, Herve, Lollivier 2015). Ce tri implique donc une perte de données importante limitant ainsi la puissance du modèle statistique. Deuxièmement, nous pouvons faire l'hypothèse qu'il existe d'autres mécanismes de régulation de la synthèse des constituants du lait que la transcription des gènes avec par exemple des mécanismes à l'échelle de la traduction ou liés à l'activité des enzymes impliquées. Troisièmement, les résultats pourraient différer du fait de la nature des échantillons utilisés pour étudier l'expression des gènes.



En effet, l'absence de variation du niveau d'expression du gène FASN, impliqué dans la synthèse des matières grasses dans le lait observé dans notre étude s'oppose à une autre étude qui a permis de montrer une diminution du niveau d'expression du gène avec la diminution de l'apport énergétique de la ration (Tsiplakou et al. 2015). Dans l'étude de Tsiplakou (2015), les cellules proviennent de biopsies du tissu mammaire tandis que dans notre étude, il s'agit de cellules épithéliales mammaires isolées du lait. Même si le tissu d'origine est le même, les cellules n'ont pas un état similaire puisque certaines font partie du tissu tandis que les autres se sont décrochées de l'épithélium mammaire. Nous faisons la même observation concernant le gène LALBA qui, dans une étude de Dessauge (2011), a montré une diminution de son expression pour les cellules issues de biopsies mammaires tandis qu'une autre étude n'a observé qu'une tendance à la diminution de cette expression pour les CEM isolées du lait sans effet observé dans les biopsies mammaire (Hervé et al. 2019). L'utilisation des CEM isolées du lait dont l'ARN est de qualité suffisante afin de déterminer les niveaux d'expression des gènes au sein du tissu mammaire, s'est révélée pertinente dans une étude de Boutinaud et al (2015)

Une dernière hypothèse concernant l'absence d'effet sur l'expression des gènes serait liée au moment de l'observation du phénomène. Nous avons étudié l'expression des gènes au bout de 3 semaines de traitement (21 jours) alors que l'effet sur FASN dans l'étude de Tsiplakou (2015) est observé après un traitement alimentaire de longue durée (60 jours). La durée du traitement pourrait aussi avoir un impact sur les niveaux d'expression des gènes impliqués dans la synthèse des constituants du lait. Notre hypothèse est qu'au bout de 3 semaines, seule l'activité des enzymes impliquées dans la synthèse est boostée en lien avec l'afflux supplémentaire de nutriments. En revanche, sur une durée plus longue de traitement, les enzymes pourraient devenir limitantes nécessitant une modification du niveau d'expression des gènes. De plus, le moment de l'analyse de l'expression des gènes peut avoir son importance.

Étant donné que les niveaux d'expression des gènes n'expliquent les variations observées des synthèses des constituants du lait, nous pouvons imaginer que d'autres phénomènes peuvent être impliqués. Les variations observées dans notre étude concernant la synthèse des constituants du lait peuvent être induites par une augmentation du nombre de CEM dans le tissu mammaire selon un processus de prolifération. Ceci pourrait expliquer l'augmentation de l'ensemble des synthèses des constituants du lait et notamment celle de la synthèse de la matière grasse et du lactose (augmentation des taux butyreux et de lactose) sans pour autant augmenter la production par cellule. C'est notamment ce qui est observé dans l'étude de Nørgaard (2008) qui montre une corrélation du taux butyreux avec l'indicateur utilisé pour mesurer la prolifération cellulaire.



On s'attendrait cependant à une diminution du nombre de CEM exfoliées qui témoignerait d'une augmentation du ratio prolifération/apoptose au sein du tissu mammaire. Or dans notre étude, ce nombre ne varie pas significativement avec l'apport de concentré. Seule une légère augmentation numérique du nombre de cellules exfoliées a été observée avec l'ajout de concentré dans la ration. Ce résultat est associé à une forte variabilité animale, et cette variation interindividuelle pourrait masquer un effet significatif. Ces observations sont en contradiction avec d'autres études qui constatent une augmentation du taux d'exfoliation des CEM (Herve et al. 2019) avec la diminution de la production laitière ou une élévation des phénomènes d'apoptoses des CEM (Dessaige et al. 2011) induit par une restriction alimentaire chez la vache laitière.

Il apparaît que l'approche transcriptomique utilisée pour étudier l'activité de synthèse du lait à partir de cellules isolées du lait n'est généralement pas adaptée pour observer les effets de l'alimentation. Les limitations liées à la qualité des échantillons, au moment des prélèvements et à l'absence de régulation à cette échelle, sont trop nombreuses.

Le deuxième objectif de cette étude est de déterminer les potentiels effets toxiques de l'apport de concentré sur les différents statuts des CEM (viabilité, statut redox et expression des gènes) et l'intégrité de l'épithélium mammaire.

La viabilité des CEM isolées du lait déterminée par comptage ViCell n'a pas été affectée par les variations de niveau de concentré dans la ration. De même façon, la viabilité des CEM analysée par cytométrie en flux après marquage au CD49f n'a pas variée avec le niveau d'apport. Les taux de nécrose ou d'apoptose des CEM isolées du lait, obtenus grâce au marquage à l'Annexin V, n'ont également pas varié avec l'apport de concentré. Malgré l'absence d'effets sur les différents indicateurs de viabilité, il est important de noter que les niveaux de viabilité ne sont pas les mêmes selon la méthode d'analyse. Nous pouvons faire l'hypothèse que ces différences proviennent notamment de la séparation immunomagnétique des CEM du reste des cellules. En effet, la première méthode utilise une séparation immunomagnétique des CEM pour laquelle nous faisons l'hypothèse que la séparation s'effectue principalement sur des cellules entières, ce qui signifie que les débris des CEM sont probablement éliminés au cours du processus. En revanche, la deuxième méthode repose sur le marquage au CD49f réalisé sur l'ensemble des cellules isolées du lait par simple centrifugation du lait. Cette méthode ne nécessite pas de séparation immunomagnétique. Dans ce cas, on peut supposer que le marqueur CD49f se fixe non seulement sur les cellules épithéliales mammaires entières, mais aussi sur les débris cellulaires qui ont été décrit comme nombreux chez la chèvre (De Cremoux 2013b). Lors de l'évaluation de la viabilité cellulaire, cette méthode inclut donc un mélange de CEM entières et de débris qui sont par définition non viables.

Tableau 10 : Valeurs de viabilité des CEM obtenues selon deux méthodes différentes.

	<b>Moyennes marginales calculées selon traitement</b>			
	<b>C0</b>	<b>C400</b>	<b>C800</b>	<b>SEM</b>
Viabilité méthode 1*	56,5	57,0	58,7	2,26
Viabilité méthode 2**	13,3	13,8	14,3	1,41

\*Viabilité des CEM obtenue par comptage cellulaire ViCell sur une solution de CEM purifiée par séparation immunomagnétique

\*\*Viabilité des CEM obtenue par cytométrie en flux sur une solution de cellules isolées du lait dont les CEM sont marquées au CD49f

Cela pourrait expliquer pourquoi la première méthode montre des taux de viabilité plus élevés par rapport à la deuxième méthode (cf. tableau 10)

Un autre indicateur pour étudier le statut des CEM a été la proportion de CEM produisant des espèces réactives de l'oxygène. Cette mesure permet de détecter des effets éventuellement toxiques. Il semble que, contrairement à notre hypothèse, la proportion de CEM produisant du ROS n'est pas affectée par le niveau d'apport de concentré dans la ration. Malgré l'absence de variation significative, notre étude montre que l'analyse de la proportion de CEM produisant du ROS est possible à partir d'un culot de cellules isolées du lait. Il serait intéressant de réaliser un essai avec des niveaux d'apport de concentré plus élevé. En effet, dans notre étude, le niveau maximum de ce dernier est de 800g, ce qui est assez éloigné des apports pratiqués en élevage caprins puisqu'en France, la consommation moyenne annuelle de concentré est établie à 383 kg de MS par chèvre soit environ 1 kg par jour et par chèvre (Bossis, Jost 2016).

En cohérence avec les résultats sur la viabilité, le taux d'expression du gène BAX lié à la mort cellulaire et analysé dans les CEM isolées du lait n'a pas varié avec l'apport de concentré dans la ration. Une des hypothèses, au-delà de celles mentionnées auparavant sur les autres gènes, est que nous intervenons trop tard dans l'analyse des niveaux d'expression du gène BAX. Cette hypothèse a également été mentionnée dans une étude qui constate une régulation négative du niveau d'expression du gène BAX après 16h de jeun alimentaire chez des vaches laitières (Seymour et al. 2024).

Pourtant, dans cette même étude, aucun effet sur BAX n'a été constaté après 14 jours de restriction alimentaire à hauteur de 40% de leur ingestion *ad libitum* (Seymour et al. 2024). Ceci montre à quel point l'analyse de l'effet d'un traitement alimentaire à l'échelle de la transcription est labile. Par ailleurs, contrairement à notre étude, le taux d'expression du gène ELF5, activateur de la transcription, a montré une augmentation durant une courte restriction alimentaire chez la vache laitière en début de lactation (Sigl, Meyer, Wiedemann 2014). Au-delà de l'éventuelle mise en cause de la quantité et la qualité des échantillons d'ARN, l'absence globale d'effet observé dans notre étude n'est pas complètement aberrante car également observée dans d'autres études de restriction.

Dans le but d'analyser les répercussions de notre traitement sur la santé de l'épithélium nous avons étudié l'intégrité de l'épithélium. L'étude a permis d'observer une augmentation significative de la concentration en  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  du lait avec l'apport de concentré dans la ration. Selon certaines études, les variations de l'intégrité de l'épithélium peuvent coïncider avec des changements dans le taux d'exfoliation des CEM (Ben Chedly et al. 2013 ; Hervé et al. 2016 ; 2019), ce qui n'a pas été observé dans notre étude.



Cette hausse du ratio  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  du lait est corroborée par un autre indicateur d'intégrité de l'épithélium mammaire : le ratio caséines/protéines solubles. Les protéines solubles dans le lait sont majoritairement l' $\alpha$ -lactalbumine et la  $\beta$ -lactoglobuline, mais le lait peut également contenir des protéines solubles d'origine sérique. Si la teneur en protéines solubles est plus élevée que la teneur en caséines, cela peut être lié à un transfert accru des protéines provenant de la circulation sanguine vers le lait lors d'une rupture de l'intégrité de l'épithélium. Dans cette étude, la diminution de ce ratio avec l'augmentation du niveau de concentré dans la ration, indique donc une perte d'intégrité de l'épithélium mammaire conformément aux observations sur le ratio  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . Or, dans plusieurs études, une rupture d'intégrité de l'épithélium mammaire est accompagnée d'une diminution du taux de lactose engendré par le passage du lactose dans la circulation sanguine (Ben Chedly et al. 2013). Il semble ici que l'effet du niveau d'apport de concentré sur le taux de lactose dans le lait est tellement important que l'on ne peut observer la baisse du taux de lactose généralement présente en cas de rupture d'intégrité de l'épithélium.

La mesure de la concentration plasmatique en lactose et/ou en  $\alpha$ -lactalbumine aurait permis de confirmer ou non cette rupture d'intégrité de l'épithélium mammaire. Or, ces indicateurs nécessitent de réaliser des prises de sang, remettant en question le côté non invasif de l'expérimentation appliquée ici et qui nécessite une autorisation parfois longue à obtenir. Afin de confirmer l'effet d'un niveau d'apport variable de concentré dans la ration chez les chèvres sur l'intégrité de l'épithélium mammaire, il serait préférable de mesurer l'intégrité de l'épithélium et le niveau d'exfoliation des CEM dans un essai avec un plus grand nombre de chèvres pour limiter les répercussions des variations interindividuelles en associant une analyse du taux de lactose sanguin.

Le dernier objectif de cette étude est d'analyser l'effet période sur l'ensemble des variables étudiées. Cet objectif n'était pas prévu initialement. Il a été ajouté étant donné que peu d'effet « traitement » ont été observés. Dans notre étude, l'effet période pourrait s'apparenter à l'effet « avancée de la lactation » puisqu'en moyenne en P1, P2 et P3 les chèvres sont respectivement à 74 +/- 1,31 , 96 +/- 1,31 , 117 +/- 1,31 jours de lactation, ce qui correspond à des jours au-delà du pic de lactation chez la chèvre (pic situé en général autour de 30 à 60 jours de lactation). Ainsi, nous pouvons évaluer si l'étude des CEM isolées de lait pourrait être pertinente pour étudier l'effet avancée de la lactation

Contrairement à la littérature scientifique (Olechnowicz, Sobek 2008), nous n'avons pas observé de diminution significative de la production laitière avec le changement de période. Ces contradictions peuvent s'expliquer par les différents rangs de lactation pouvant masquer les évolutions de la courbe de lactation classiquement observées en élevage (Bidan et al. 2022).



L'étude de l'effet période a montré une diminution du TB entre la période 1 et 2 suivie d'une augmentation à la période 3 ainsi qu'une diminution du taux de lactose entre les deux dernières périodes. Ces observations pourraient s'expliquer par l'avancée dans le stade de lactation. En effet, plusieurs études ont montré une augmentation du taux butyreux (Akshit et al. 2024 ; Soryal et al. 2005) et une diminution du taux de lactose en fin de lactation (Akshit et al. 2024). Concernant le TP, celui-ci augmente en période 2 sans varier par la suite ce qui n'est cohérent ni avec les effets sur les TB et le lactose ni avec les données de la littérature (Soryal et al. 2005). Les effets période dans le cadre de notre étude sont à prendre avec précaution puisqu'il peut y avoir un effet rémanent des traitements sur la période suivante et notamment en termes de niveau d'ingestion du foin. Le schéma expérimental a été construit pour étudier l'effet du traitement en se dédouanant de l'effet rémanent à l'aide d'un double carré latin. Afin d'étudier l'effet de l'avancée de lactation, il aurait fallu maintenir un niveau constant d'apport de foin. Ces effets sur la composition du lait ne sont pas associés à des variations d'expression des gènes impliqués dans la synthèse de lait suggérant à nouveau que les régulations des synthèses de lait ne se déroulent pas à l'échelle de la transcription.

Concernant le statut des CEM, les effets de la période sont plus marqués que les effets du traitement. En effet, on observe une diminution du nombre de CEM exfoliées entre la période 1 et la période 3, cohérent avec l'augmentation de la production laitière (Hervé et al. 2016) Toutefois, il existe une variabilité significative entre les animaux nécessitant un plus grand nombre d'animaux pour une fiabilité optimale des résultats.

La diminution observée du nombre de CEM exfoliées dans le lait avec le changement de période concerne davantage des CEM en voie d'apoptose. Cependant, ces observations ne vont pas dans le sens des indicateurs d'intégrité de l'épithélium mammaire. En effet, les ratios  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  et caséines/protéines solubles n'ont pas varié significativement avec le changement de période. Pour être cohérent avec les données d'exfoliations, nous aurions pu nous attendre une baisse du ratio  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  en période 3.

Concernant le potentiel effet toxique du changement de période, observé dans le cas présent via le statut redox des cellules isolées du lait, seule la proportion de cellules produisant du ROS chez les cellules mortes, qu'il s'agisse de CEM ou de leucocytes, a diminué. Cet effet suggère une meilleure santé de l'épithélium mammaire avec l'avancée des périodes et pourrait éventuellement expliquer l'augmentation de la production laitière.



## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le volume de lait et les synthèses des constituants ont augmenté avec le niveau d'apport de concentré dans la ration. Ces effets n'ont pas été accompagnés de variation de l'activité des CEM (viabilité cellulaire, apoptose, proportion de CEM produisant des ROS) ou du niveau d'expression des gènes. Cependant, une détérioration de l'intégrité de l'épithélium mammaire a été identifiée sans pour autant affecter le taux d'exfoliation des CEM dans le lait. Ces travaux suggèrent qu'il existe des mécanismes de régulation alternatifs à l'expression des gènes et à la transcription. En effet, des études antérieures (Nichols et al. 2017; Mobuchon et al. 2015) indiquent que des régulations par des microARN, ainsi que d'autres gènes ou mécanismes liés à la traduction, pourraient jouer un rôle significatif.

Il est important de noter qu'aucun effet des apports de concentré sur la proportion des cellules isolées du lait produisant des ROS n'a été observé, ni sur la viabilité cellulaire ou l'apoptose. Cependant, un impact sur l'intégrité de l'épithélium mammaire a été identifié, et il conviendra de confirmer ce résultat à l'aide d'un échantillon plus large de gènes et d'analyses complémentaires dans des études futures.

Les recherches à venir devraient se concentrer sur l'évaluation d'autres mécanismes de régulation mais également sur l'élaboration d'autres méthodes d'analyses de l'expression des gènes. L'investigation des microARN, ainsi que l'exploration des mécanismes de sécrétion en utilisant des indicateurs et des marqueurs cellulaires (Chanat et al. 2020), permettraient d'approfondir notre compréhension des processus sous-jacents. Il serait également pertinent d'évaluer des apports de concentré plus élevés afin de s'approcher des quantités réellement distribuées dans les élevages, ce qui pourrait révéler des effets jusqu'alors non détectés. Cela pourrait également entraîner des effets plus marqués sur l'intégrité de l'épithélium, accompagnés d'un impact sur l'exfoliation des CEM. Cela pourrait indiquer un effet à long terme sur la santé mammaire et la production laitière, en raison de la perte de cellules dans le tissu.

Enfin, l'application des méthodes employées dans cette étude, notamment l'utilisation du marqueur Cellrox, pourrait être étendue à d'autres thématiques telles que le stress hydrique ou le stress thermique. Cela ouvrirait de nouvelles voies de recherche pour mieux comprendre les réponses physiologiques du tissu mammaire face à divers stress environnementaux et nutritionnels chez diverses espèces.



## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AKSHIT, F. N. U. et al., 2024a. Global comprehensive review and meta-analysis of goat milk composition by location, publication year and lactation stage. *Journal of Food Composition and Analysis*. Vol. 127, p. 105973. DOI [10.1016/j.jfca.2024.105973](https://doi.org/10.1016/j.jfca.2024.105973).

ALAIS, C., RIBADEAU DUMAS, B. et SAINT-LEBE, L., 1961. Etude de la réaction des protéines du lait avec le « noir amido », application au dosage rapide des matières azotées du lait. *Le Lait*. Vol. 41, no 405\_406, pp. 241-273.

ALBERT, Fanny et LAGRIFFOUL, Gilles, 2019. *Qualité nutritionnelle et spécificités du lait et produits laitiers de brebis - Institut de l'Elevage*. .

ALTSCHUL, S. F. et al., 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. Vol. 215, no 3, pp. 403-410. DOI [10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2).

ANDERSEN, J. B et al., 2003. The effects of low vs. high concentrate level in the diet on performance in cows milked two or three times daily in early lactation. *Livestock Production Science*. Vol. 81, no 2, pp. 119-128. DOI [10.1016/S0301-6226\(02\)00303-2](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(02)00303-2).

ASSMANN, Leila, 2021. *Caprins 2021 Productions lait et viande* [en ligne]. Institut de l'Elevage et CNE. Les chiffres clés du GEB. Disponible à l'adresse : [https://idele.fr/?eID=cmis\\_download&oID=workspace%3A%2F%2FSpacesStore%2F0816d5ed-2bb0-4e2c-aba5-a7db5941ade0&cHash=637d734ba98e60716ee1f5a036506660](https://idele.fr/?eID=cmis_download&oID=workspace%3A%2F%2FSpacesStore%2F0816d5ed-2bb0-4e2c-aba5-a7db5941ade0&cHash=637d734ba98e60716ee1f5a036506660) [consulté le 30 août 2024].

BAHRI, Asma, 2013. *Stabilité des micelles de caséines réticulées par la génipine* [en ligne]. Centre International d'Etudes Supérieures Agronomiques. Disponible à l'adresse : <https://hal.science/hal-01209481> [consulté le 21 août 2024].

BARŁOWSKA, Joanna et al., 2012. Milk Proteins' Polymorphism in Various Species of Animals Associated with Milk Production Utility. In : *Milk Protein*. IntechOpen. ISBN 978-953-51-0743-9. DOI [10.5772/50715](https://doi.org/10.5772/50715).

BEN CHEDLY, H. et al., 2011. Use of milk epithelial cells to study regulation of cell activity and apoptosis during once-daily milking in goats. *Animal: An International Journal of Animal Bioscience*. Vol. 5, no 4, pp. 572-579. DOI [10.1017/S1751731110002284](https://doi.org/10.1017/S1751731110002284).

BEN CHEDLY, H. et al., 2013. The decrease in milk yield during once daily milking is due to regulation of synthetic activity rather than apoptosis of mammary epithelial cells in goats. *Animal*. Vol. 7, no 1, pp. 124-133. DOI [10.1017/S1751731112001176](https://doi.org/10.1017/S1751731112001176).

BEN CHEDLY, Hedi, 2009. *Dynamique et activité des cellules épithéliales mammaires lors de la monotraite chez la chèvre : implication de l'ouverture des jonctions cellulaires* [en ligne]. These de doctorat. Rennes, Agrocampus Ouest.

Disponible à l'adresse : <https://theses.fr/2009NSARI053> [consulté le 21 juin 2024].

BERNARD, L., LEROUX, C. et CHILLIARD, Y., 2008. Expression and Nutritional Regulation of Lipogenic Genes in the Ruminant Lactating Mammary Gland. In : BÖSZE, Zsuzsanna (éd.), *Bioactive Components of Milk*, pp. 67-108. New York, NY : Springer. ISBN 978-0-387-74087-4. DOI [10.1007/978-0-387-74087-4\\_2](https://doi.org/10.1007/978-0-387-74087-4_2).

BIDAN, Fabrice et al., 2022. Caractérisation des courbes de production des chèvres en lactation longue. In : *Rencontre Recherche Ruminants* [en ligne]. Paris. décembre 2022. Disponible à l'adresse : <https://hal.inrae.fr/hal-04087456v1/document>

BLOCK, Elliot, 1998. *L'URÉE DU LAIT : LES SOURCES DE VARIATION ET LES IMPLICATIONS* [en ligne]. Disponible à l'adresse : <https://www.agrireseau.net/bovinslaitiers/Documents/bov66.pdf>

BLUET, Bertrand et BOSSIS, Nicole, 2022. En élevage caprin, des solutions pour maîtriser son coût alimentaire. *Institut de l'Élevage* [en ligne]. 29 mars 2022. Disponible à l'adresse : <https://idele.fr/detail-article/en-elevage-caprin-des-solutions-pour-maitriser-son-cout-alimentaire> [consulté le 21 août 2024].

BOSSIS, Nicole et al., 2024. Economie de l'élevage. *Dossier annuel Caprins*. No 548.

BOSSIS, Nicoles et JOST, Jérémie, 2016. *Observatoire de l'alimentation des chèvres laitières françaises.pdf* [en ligne]. Disponible à l'adresse : [https://redcap.terredeschèvres.fr/IMG/pdf/observatoire\\_alimentation.pdf](https://redcap.terredeschèvres.fr/IMG/pdf/observatoire_alimentation.pdf) [consulté le 20 juin 2024].

BOUTINAUD, M. et al., 2008. Milking and Feed Restriction Regulate Transcripts of Mammary Epithelial Cells Purified from Milk. *Journal of Dairy Science*. Vol. 91, no 3, pp. 988-998. DOI [10.3168/jds.2007-0587](https://doi.org/10.3168/jds.2007-0587).

BOUTINAUD, Marion et al., 2013. *Exfoliation of mammary epithelial cells in milk is linked with lactation persistency in dairy cows* [en ligne]. août 2013. Disponible à l'adresse : <https://hal.science/hal-01210534> [consulté le 21 août 2024]. Presenters: n1301 Published: 64. Annual Meeting of the European Federation of Animal Science (EAAP)

BOUTINAUD, Marion, GUINARD-FLAMENTA, Jocelyne et JAMMES, Hélène, 2004. The number and activity of mammary epithelial cells, determining factors for milk production. *Reproduction, Nutrition, Development*. Vol. 44, no 5, pp. 499-508.

BOUTINAUD, Marion, HERVE, Lucile et LOLLIVIER, Vanessa, 2015. Mammary epithelial cells isolated from milk are a valuable, non-invasive source of mammary transcripts. *Frontiers in Genetics*. Vol. 6, p. 323. DOI [10.3389/fgene.2015.00323](https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00323).

BRODY, Lawrence, 2024. Gene Expression. *Courtesy: National Human Genome Research Institute* [en ligne]. 2024. Disponible à l'adresse : <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Gene-Expression> [consulté le 20 juin 2024].

CAPUCO, A. V. et al., 2001. Mammary Cell Number, Proliferation, and Apoptosis During a Bovine Lactation: Relation to Milk Production and Effect of bST1. *Journal of Dairy Science*. Vol. 84, no 10, pp. 2177-2187. DOI [10.3168/jds.S0022-0302\(01\)74664-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74664-4).

CEREIJIDO, Marcelino et al., 1998. ROLE OF TIGHT JUNCTIONS IN ESTABLISHING AND MAINTAINING CELL POLARITY. *Annual Review of Physiology*. Vol. 60, no Volume 60, 1998, pp. 161-177. DOI [10.1146/annurev.physiol.60.1.161](https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.60.1.161).

CHANAT, Eric et al., 2020. Methionine balanced diet improves performances and biosynthetic traffic in mammary epithelial cell. In : *71. Annual Meeting of the European Federation of Animal Science (EAAP)* [en ligne]. Wageningen Academic Publishers. 1 décembre 2020. Disponible à l'adresse : <https://hal.inrae.fr/hal-03051421> [consulté le 26 août 2024].

CIAPPESONI, G. et al., 2004. Factors affecting goat milk yield and its composition. *CZECH JOURNAL OF ANIMAL SCIENCE*. Vol. 49, no 11, pp. 465-473. DOI [10.17221/4333-CJAS](https://doi.org/10.17221/4333-CJAS). Web of Science ID: WOS:000226598800001

COLITTI, M., ALLEN, S. P. et PRICE, J. S., 2005. Programmed cell death in the regenerating deer antler. *Journal of Anatomy*. Vol. 207, no 4, pp. 339-351. DOI [10.1111/j.1469-7580.2005.00464.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2005.00464.x).

CONLON, Ian et RAFF, Martin, 1999. Size Control in Animal Development. *Cell*. Vol. 96, no 2, pp. 235-244. DOI [10.1016/S0092-8674\(00\)80563-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80563-2).

DAS, Mainak et SINGH, Mahendra, 2000. Variation in blood leucocytes, somatic cell count, yield and composition of milk of crossbred goats. *Small Ruminant Research*. Vol. 35, no 2, pp. 169-174. DOI [10.1016/S0921-4488\(99\)00088-7](https://doi.org/10.1016/S0921-4488(99)00088-7).

DE CREMOUX, Renée, 2013b. Que sont les cellules? In : *Maitrise de la teneur en cellules des laits de troupeaux en élevages caprins* [en ligne]. L'Essentiel. Disponible à l'adresse : [https://www.idele.fr/?eID=cmis\\_download&oID=workspace://SpacesStore/8d70e481-c7cd-4204-b1bf-9d1be1bf5a3c](https://www.idele.fr/?eID=cmis_download&oID=workspace://SpacesStore/8d70e481-c7cd-4204-b1bf-9d1be1bf5a3c) [consulté le 23 mai 2024].

DE CREMOUX, Renée, 2013a. Concentrations cellulaires du lait chez la chèvre : savoir les interpréter pour mieux les maîtriser. In : *Maitrise de la teneur en cellules des laits de troupeaux en élevages caprins* [en ligne]. L'Essentiel. Disponible à l'adresse : [https://www.idele.fr/fileadmin/medias/Documents/Interpretation\\_des\\_cellules\\_in\\_dividuelles\\_Article\\_La\\_Chevre\\_V2013.pdf](https://www.idele.fr/fileadmin/medias/Documents/Interpretation_des_cellules_in_dividuelles_Article_La_Chevre_V2013.pdf)

DESJEUX, Jf, 1993. Valeur nutritionnelle du lait de chèvre. *Le Lait*. Vol. 73, no 5\_6, pp. 573-580.

DESSAUGE, F. et al., 2011. Effects of nutrient restriction on mammary cell turnover and mammary gland remodeling in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. Vol. 94, no 9, pp. 4623-4635. DOI [10.3168/jds.2010-4012](https://doi.org/10.3168/jds.2010-4012).

DIEUDONNE, Marie-Noelle et al., 2002. Leptin mediates a proliferative response in human MCF7 breast cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research*

*Communications*. Vol. 293, no 1, pp. 622-628. DOI [10.1016/S0006-291X\(02\)00205-X](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)00205-X).

DJURIC, Z. et al., 1992. Oxidative DNA damage levels in rats fed low-fat, high-fat, or calorie-restricted diets. *Toxicology and Applied Pharmacology*. Vol. 115, no 2, pp. 156-160. DOI [10.1016/0041-008x\(92\)90318-m](https://doi.org/10.1016/0041-008x(92)90318-m).

DJURIC, Zora et al., 2002. Effect of Varying Caloric Restriction Levels on Female Rat Growth and 5-Hydroxymethyl-2'-deoxyuridine in DNA. *Toxicological Sciences*. Vol. 66, no 1, pp. 125-130. DOI [10.1093/toxsci/66.1.125](https://doi.org/10.1093/toxsci/66.1.125).

DOYON, Audrey, 2005. Influence de l'alimentation sur la composition du lait de chèvre : revue des travaux récents. In : *L'innovation, un outil de croissance!* [en ligne]. Saint-Hyacinthe. 2005. Disponible à l'adresse : [https://www.doc-developpement-durable.org/file/Elevages/Chevres-Caprins/Doyon\\_Audrey\\_final.pdf](https://www.doc-developpement-durable.org/file/Elevages/Chevres-Caprins/Doyon_Audrey_final.pdf)

DURONIO, Robert J. et XIONG, Yue, 2013. Signaling Pathways that Control Cell Proliferation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. Vol. 5, no 3, p. a008904. DOI [10.1101/cshperspect.a008904](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008904).

ESPINOSA, Sophie. La filière caprine. *FNEC* [en ligne]. Disponible à l'adresse : <https://fnec.fr/la-filiere-caprine/> [consulté le 30 août 2024].

FOISNON, Benoît, 2016. *Des fourrages de qualités pour limiter les concentrés* [en ligne]. Disponible à l'adresse : [https://idele.fr/inosys-reseaux-elevage/?eID=cmis\\_download&oID=workspace%3A%2F%2FSpacesStore%2F978d4e7a-7727-4196-a297-1f3a27cbf8a4&cHash=797c1533e8de1f708d4cb7c51cfd8ae2](https://idele.fr/inosys-reseaux-elevage/?eID=cmis_download&oID=workspace%3A%2F%2FSpacesStore%2F978d4e7a-7727-4196-a297-1f3a27cbf8a4&cHash=797c1533e8de1f708d4cb7c51cfd8ae2)

FRANÇA, Barbara et BLUET, Bertrand, 2022. *JPO Pradel 2022 - Atelier 6 - Alimentation des chèvres : de la stratégie globale à la pratique quotidienne* [en ligne]. JPO Le pradel 2022, Mirabel. 29 septembre 2022. Disponible à l'adresse : [https://www.idele.fr/?eID=cmis\\_download&oID=workspace%3A%2F%2FSpacesStore%2Fbe8924b5-e10e-4b32-bebf-e3b1c7bb3d8f&cHash=cb1eca9ec4a4ff39a2173be609f3d7ce](https://www.idele.fr/?eID=cmis_download&oID=workspace%3A%2F%2FSpacesStore%2Fbe8924b5-e10e-4b32-bebf-e3b1c7bb3d8f&cHash=cb1eca9ec4a4ff39a2173be609f3d7ce) [consulté le 20 juin 2024]. Presenters: \_:n375

GIL-PUIG, C. et al., 2005. Pit-1 is expressed in normal and tumorous human breast and regulates GH secretion and cell proliferation. *European Journal of Endocrinology*. Vol. 153, no 2, pp. 335-344. DOI [10.1530/eje.1.01962](https://doi.org/10.1530/eje.1.01962).

HAENLEIN, G. F. W. et CACCESE, R., 1984. *Goat milk versus cow milk*. G.F.W. Haenlein and D.L. Ace. Washington, D.C. Extension Goat Handbook.

HE, Long et al., 2017. Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. *Cellular Physiology and Biochemistry*. Vol. 44, no 2, pp. 532-553. DOI [10.1159/000485089](https://doi.org/10.1159/000485089).

HENGARTNER, Michael O., 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. Vol. 407, no 6805, pp. 770-776. DOI [10.1038/35037710](https://doi.org/10.1038/35037710).

HERBER, Manuela et al., 2012. Sensitive Detection and Analysis of Plasma Cells by Seven-Color Phenotyping with Combined Intracellular Solid Phase Staining on the Macsquant Analyzer. *CYTOMETRY PART B-CLINICAL CYTOMETRY*. Vol. 82B, no 6, pp. 413-413. Web of Science ID: WOS:000310386300097

HERVÉ, L. et al., 2016. Regulation of cell number in the mammary gland by controlling the exfoliation process in milk in ruminants. *Journal of Dairy Science*. Vol. 99, no 1, pp. 854-863. DOI [10.3168/jds.2015-9964](https://doi.org/10.3168/jds.2015-9964).

HERVÉ, L. et al., 2019. Milk yield loss in response to feed restriction is associated with mammary epithelial cell exfoliation in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. Vol. 102, no 3, pp. 2670-2685. DOI [10.3168/jds.2018-15398](https://doi.org/10.3168/jds.2018-15398).

HERVÉ, Lucile, 2017. *L'exfoliation des cellules épithéliales mammaires : mécanismes de régulation, rôle dans la détermination du nombre de cellules dans la glande mammaire et influence sur la production laitière* [en ligne]. These de doctorat. Rennes, Agrocampus Ouest. Disponible à l'adresse : <https://theses.fr/2017NSARB304> [consulté le 20 juin 2024].

HOSTE, H. et al., 2012. Recherche en pathologie caprine: applications et perspectives. *INRAE Productions Animales*. Vol. 25, no 3, pp. 245-258. DOI [10.20870/productions-animales.2012.25.3.3213](https://doi.org/10.20870/productions-animales.2012.25.3.3213).

IGHODARO, Osasenaga et AKINLOYE, Oluyemi, 2018. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*. Vol. 54, no 4, pp. 287-293. DOI [10.1016/j.ajme.2017.09.001](https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001).

INGLINGSTAD, R. A. et al., 2014. Grazing season and forage type influence goat milk composition and rennet coagulation properties. *JOURNAL OF DAIRY SCIENCE*. Vol. 97, no 6, pp. 3800-3814. DOI [10.3168/jds.2013-7542](https://doi.org/10.3168/jds.2013-7542). Web of Science ID: WOS:000336192100055

JAKOBSSON, Andreas, WESTERBERG, Rolf et JAKOBSSON, Anders, 2006. Fatty acid elongases in mammals: Their regulation and roles in metabolism. *Progress in Lipid Research*. Vol. 45, no 3, pp. 237-249. DOI [10.1016/j.plipres.2006.01.004](https://doi.org/10.1016/j.plipres.2006.01.004).

JENNESS, Robert, 1959. *Principles Of Dairy Chemistry* [en ligne]. London. Chapman & Hall, Limited. Disponible à l'adresse : [http://archive.org/details/unset0000unse\\_i2k8](http://archive.org/details/unset0000unse_i2k8) [consulté le 28 juin 2024].

JOURNET, M, VERITE, R et VIGNON, B, 1975. L'azote non protéique du lait : facteurs de variation. In : *Le lait*, pp. 212-223 [en ligne]. Le Lait. Disponible à l'adresse : <https://hal.science/file/index/docid/928687/filename/hal-00928687.pdf>

KERR, J. F., WYLLIE, A. H. et CURRIE, A. R., 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*. Vol. 26, no 4, pp. 239-257. DOI [10.1038/bjc.1972.33](https://doi.org/10.1038/bjc.1972.33).

KNIGHT, C.H. et PEAKER, M., 1984. Mammary development and regression during lactation in goats in relation to milk secretion. *Quarterly Journal of Experimental Physiology*. Vol. 69, no 2, pp. 331-338. DOI [10.1113/expphysiol.1984.sp002809](https://doi.org/10.1113/expphysiol.1984.sp002809).

KNIGHT, Christopher H. et WILDE, Colin J., 1993. Mammary cell changes during pregnancy and lactation. *Livestock Production Science*. Vol. 35, no 1, pp. 3-19. DOI [10.1016/0301-6226\(93\)90178-K](https://doi.org/10.1016/0301-6226(93)90178-K).

LAROUSSE, Éditions, 2024. Définitions : lait - Dictionnaire de français Larousse. [en ligne]. 3 mai 2024. Disponible à l'adresse : <https://www.larousse.fr/dictionnaires/francais/lait/45975> [consulté le 3 mai 2024].

LEDUC, Antoine et al., 2021. Effect of feed restriction on dairy cow milk production: a review. *Journal of Animal Science*. Vol. 99, no 7, p. skab130. DOI [10.1093/jas/skab130](https://doi.org/10.1093/jas/skab130).

LEFRILEUX, Y., MORAND-FEHR, Pierre et POMMARET, A., 2012. Aptitude des chèvres hautes productrices de lait à valoriser les prairies temporaires au pâturage. *INRA Productions Animales*. Vol. 25, no 3, pp. 277-290.

LEITNER, Gabriel et al., 2012. Effects of intra-mammary bacterial infection with coagulase negative staphylococci and stage of lactation on shedding of epithelial cells and infiltration of leukocytes into milk: Comparison among cows, goats and sheep. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. Vol. 147, no 3, pp. 202-210. DOI [10.1016/j.vetimm.2012.04.019](https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.04.019).

LEMOSQUET, Sophie et al., 2020. Methionine supplementation at low and adequate net energy supply in lactating dairy goats. In : *2020 American Dairy Science Association (ADSA) Annual Meeting* [en ligne]. 22 juin 2020. Disponible à l'adresse : <https://hal.inrae.fr/hal-02917126> [consulté le 26 août 2024].

LESSOR, T. J. et al., 2000. Ectopic expression of the ErbB-3 binding protein ebp1 inhibits growth and induces differentiation of human breast cancer cell lines. *Journal of Cellular Physiology*. Vol. 183, no 3, pp. 321-329. DOI [10.1002/\(SICI\)1097-4652\(200006\)183:3<321::AID-JCP4>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(200006)183:3<321::AID-JCP4>3.0.CO;2-O).

LOBODA, Agnieszka et al., 2016. Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences*. Vol. 73, no 17, pp. 3221-3247. DOI [10.1007/s00018-016-2223-0](https://doi.org/10.1007/s00018-016-2223-0).

LOKTIONOV, Alexandre, 2011. Exfoliation of Cells. In : SCHWAB, Manfred (éd.), *Encyclopedia of Cancer*, pp. 1357-1360. Berlin, Heidelberg : Springer. ISBN 978-3-642-16483-5. DOI [10.1007/978-3-642-16483-5\\_2056](https://doi.org/10.1007/978-3-642-16483-5_2056).

LÓPEZ-ABENTE, Gonzalo, MISPIRETA, Sergio et POLLÁN, Marina, 2014. Breast and prostate cancer: an analysis of common epidemiological features in mortality trends in Spain. *BMC cancer*. Vol. 14, p. 874. DOI [10.1186/1471-2407-14-874](https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-874).

LUO, Ming et al., 2018. Targeting Breast Cancer Stem Cell State Equilibrium through Modulation of Redox Signaling. *Cell Metabolism*. Vol. 28, no 1, pp. 69-86.e6. DOI [10.1016/j.cmet.2018.06.006](https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.06.006).

MAIGRET, Corrine, 2023. *Caprins 2023 Productions lait et viande* [en ligne]. Institut de l'Élevage et CNE. Les chiffres clés du GEB. Disponible à l'adresse : [https://idele.fr/?eID=cmis\\_download&oID=workspace%3A%2F%2FSpacesStore%2F7f9fb3e-5de9-433f-9b3c-8b7d52a65425&cHash=a5c6b07d4a6e9d3a4dc2c705a14dd166](https://idele.fr/?eID=cmis_download&oID=workspace%3A%2F%2FSpacesStore%2F7f9fb3e-5de9-433f-9b3c-8b7d52a65425&cHash=a5c6b07d4a6e9d3a4dc2c705a14dd166) [consulté le 30 août 2024].

MARTIGNANI, E. et al., 2009. Functional identification of bovine mammary epithelial stem/progenitor cells. *Veterinary Research Communications*. Vol. 33, no 1, pp. 101-103. DOI [10.1007/s11259-009-9254-z](https://doi.org/10.1007/s11259-009-9254-z).

MASOTTI, Andrea et PRECKEL, Tobias, 2006. Analysis of small RNAs with the Agilent 2100 Bioanalyzer. *Nature Methods*. Vol. 3, no 8, pp. 658-658. DOI [10.1038/nmeth908](https://doi.org/10.1038/nmeth908).

MATHER, Ian H. et KEENAN, Thomas W., 1998. Origin and Secretion of Milk Lipids. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. Vol. 3, no 3, pp. 259-273. DOI [10.1023/A:1018711410270](https://doi.org/10.1023/A:1018711410270).

MCMANAMAN, James L et NEVILLE, Margaret C, 2003. Mammary physiology and milk secretion. *Advanced Drug Delivery Reviews*. Vol. 55, no 5, pp. 629-641. DOI [10.1016/S0169-409X\(03\)00033-4](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(03)00033-4).

MEKMENE, Omar, 2010. *Comportement de la fraction minérale laitière en fonction des conditions physico-chimiques : de la précipitation des sels de phosphates de calcium à la prédiction des équilibres minéraux du lait* [en ligne]. phdthesis . AGROCAMPUS OUEST. Disponible à l'adresse : <https://hal.inrae.fr/tel-02823628> [consulté le 23 mai 2024].

MOBUCHON, Lenha et al., 2015. Food deprivation affects the miRNome in the lactating goat mammary gland. *PLoS ONE*. Vol. 10, no 10, p. 20 p. DOI [10.1371/journal.pone.0140111](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140111).

MORAND-FEHR, P. et SAUVANT, D., 1980. Composition and Yield of Goat Milk as Affected by Nutritional Manipulation1. *Journal of Dairy Science*. Vol. 63, no 10, pp. 1671-1680. DOI [10.3168/jds.S0022-0302\(80\)83129-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(80)83129-8).

MU, Tong et al., 2021. Regulation of Key Genes for Milk Fat Synthesis in Ruminants. *FRONTIERS IN NUTRITION*. Vol. 8, p. 765147. DOI [10.3389/fnut.2021.765147](https://doi.org/10.3389/fnut.2021.765147). Web of Science ID: WOS:000728962400001

NGUYEN, H.N. et al., 2011. *Détermination de la composition en minéraux du lait au moyen d'un appareil proche infrarouge et de la chimie analytique* [en ligne]. Journée 3R . 2011. Disponible à l'adresse : <https://www.bing.com/ck/a?!&&p=cb98c888da1ea26bJmltdHM9MTcxODkyODAwMCZpZ3VpZD0yNzgxYmM0Ni1iNjg0LTYYzjQtMWIyNi1hODA4YjczZDYzY2UmaW5zaWQ9NTI4Nw&pptn=3&ver=2&hsh=3&fclid=2781bc46-b684-62f4-1b26-a808b73d63ce&psq=dosage+des+min%3%a9raux+du+lait+m%3%a9thode&u=a1aHR0cHM6Ly93d3cuY3JhLndhbGxvbmllLmJlL3VwbG9hZHMvMjAxMS8wMS8yMDEyMDQxMTIhNGIxNGEzLnBkZg&ntb=1>Presenters: \_\_: n608

NICHOLS, K. et al., 2017. Exogenous essential amino acids stimulate an adaptive unfolded protein response in the mammary glands of lactating cows. *Journal of Dairy Science*. Vol. 100, no 7, pp. 5909-5921. DOI [10.3168/jds.2016-12387](https://doi.org/10.3168/jds.2016-12387).

NOLAN, Tania, HANDS, Rebecca E. et BUSTIN, Stephen A., 2006. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protocols*. Vol. 1, no 3, pp. 1559-1582. DOI [10.1038/nprot.2006.236](https://doi.org/10.1038/nprot.2006.236).

NØRGAARD, J. V. et al., 2008. Effect of pregnancy and feeding level on cell turnover and expression of related genes in the mammary tissue of lactating dairy cows. *Animal*. Vol. 2, no 4, pp. 588-594. DOI [10.1017/S1751731108001626](https://doi.org/10.1017/S1751731108001626).

OLECHNOWICZ, J. et SOBEK, Z., 2008. Factors of variation influencing production level, SCC and basic milk composition in dairy goats. *Journal of Animal and Feed Sciences*. Vol. 17, no 1, pp. 41-49. DOI [10.22358/jafs/66468/2008](https://doi.org/10.22358/jafs/66468/2008).

OLLIER, Séverine et al., 2007. Mammary Transcriptome Analysis of Food-Deprived Lactating Goats Highlights Genes Involved in Milk Secretion and Programmed Cell Death<sup>1,2</sup>. *The Journal of Nutrition*. Vol. 137, no 3, pp. 560-567. DOI [10.1093/jn/137.3.560](https://doi.org/10.1093/jn/137.3.560).

OSKOUJIAN, B., 2000. Overexpression of fatty acid synthase in SKBR3 breast cancer cell line is mediated via a transcriptional mechanism. *Cancer Letters*. Vol. 149, no 1-2, pp. 43-51. DOI [10.1016/s0304-3835\(99\)00342-0](https://doi.org/10.1016/s0304-3835(99)00342-0).

PALMQUIST, D. L. et HARVATINE, K. J., 2020. Origin of Fatty Acids and Influence of Nutritional Factors on Milk Fat. In : MCSWEENEY, Paul L. H., FOX, Patrick F. et O'MAHONY, James A. (éd.), *Advanced Dairy Chemistry, Volume 2: Lipids*, pp. 33-66. Cham : Springer International Publishing. ISBN 978-3-030-48686-0. DOI [10.1007/978-3-030-48686-0\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-030-48686-0_2).

PATON, Chad M. et NTAMBI, James M., 2009. Biochemical and physiological function of stearoyl-CoA desaturase. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*. Vol. 297, no 1, pp. E28-37. DOI [10.1152/ajpendo.90897.2008](https://doi.org/10.1152/ajpendo.90897.2008).

PERIS, S. et al., 1997. Influence of kid rearing systems on milk composition and yield of Murciano-Granadina dairy goats. *JOURNAL OF DAIRY SCIENCE*. Vol. 80, no 12, pp. 3249-3255. DOI [10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76299-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76299-4). Web of Science ID: WOS:000071106100022

RAFF, Martin C., 1992. Social controls on cell survival and cell death. *Nature*. Vol. 356, no 6368, pp. 397-400. DOI [10.1038/356397a0](https://doi.org/10.1038/356397a0).

SADOVNIKOVA, Anna, GARCIA, Sergio C. et HOVEY, Russell C., 2021. A Comparative Review of the Extrinsic and Intrinsic Factors Regulating Lactose Synthesis. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. Vol. 26, no 2, pp. 197-215. DOI [10.1007/s10911-021-09491-6](https://doi.org/10.1007/s10911-021-09491-6).

SAUVANT, D. et al., 2012. Actualisation des recommandations alimentaires pour les chèvres laitières. *INRA Productions Animales*. No 3.

SEYMOUR, D. J. et al., 2024. Feed restriction of lactating cows triggers acute downregulation of mammary mammalian target of rapamycin signaling and chronic reduction of mammary epithelial mass. *Journal of Dairy Science*. Vol. 107, no 8, pp. 5667-5680. DOI [10.3168/jds.2023-24478](https://doi.org/10.3168/jds.2023-24478).

SHAMAY, A. et al., 2005. Expression of Albumin in Nonhepatic Tissues and its Synthesis by the Bovine Mammary Gland. *Journal of Dairy Science*. Vol. 88, no 2, pp. 569-576. DOI [10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72719-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72719-3).

SIGL, T., MEYER, H. H. D. et WIEDEMANN, S., 2014. Gene expression analysis of protein synthesis pathways in bovine mammary epithelial cells purified from milk during lactation and short-term restricted feeding. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. Vol. 98, no 1, pp. 84-95. DOI [10.1111/jpn.12039](https://doi.org/10.1111/jpn.12039).

SINGH, Manju et al., 2019. Profiling and distribution of minerals content in cow, buffalo and goat milk. *Indian Journal of Dairy Science* [en ligne]. Vol. 72, no 5. Disponible à l'adresse : <https://epubs.icar.org.in/index.php/IJDS/article/view/87460> [consulté le 13 mai 2024].

SNAPPE, Jean-Jacques, LEPOUDERE, Anne et SREDZINSKI, Natacha, 2010. Protéines dans le lait. *Techniques de l'Ingénieur* [en ligne]. Disponible à l'adresse : <https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/procedes-chimie-bio-agro-th2/additifs-et-adjuvants-alimentaires-42426210/proteines-laitieres-f4820/proteines-dans-le-lait-f4820niv10002.html> [consulté le 21 août 2024].

SORENSEN, B. A., MUIR, D. D. et KNIGHT, C. H., 2001. Thrice-daily milking throughout lactation maintains epithelial integrity and thereby improves milk protein quality. *The Journal of Dairy Research*. Vol. 68, no 1, pp. 15-25. DOI [10.1017/s0022029900004593](https://doi.org/10.1017/s0022029900004593).

SORYAL, K. et al., 2005. Effect of goat breed and milk composition on yield, sensory quality, fatty acid concentration of soft cheese during lactation. *Small Ruminant Research*. Vol. 58, no 3, pp. 275-281. DOI [10.1016/j.smallrumres.2004.11.003](https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2004.11.003).

SRAMEK, Agnes et al., 2018. The effect of udder health on mineral concentrations and fatty acid composition of alpine goat milk. *ANIMAL SCIENCE PAPERS AND REPORTS*. Vol. 36, no 4, pp. 383-392. Web of Science ID: WOS:000452398300004

STANGEGAARD, Michael, DUFVA, Inge Høgh et DUFVA, Martin, 2006. Reverse transcription using random pentadecamer primers increases yield and quality of resulting cDNA. *BioTechniques*. Vol. 40, no 5, pp. 649-657. DOI [10.2144/000112153](https://doi.org/10.2144/000112153).

STELWAGEN, K. et al., 2000. Short Communication: Effects of Isolation Stress on Mammary Tight Junctions in Lactating Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*. Vol. 83, no 1, pp. 48-51. DOI [10.3168/jds.S0022-0302\(00\)74853-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)74853-3).

STRASSER, A., HARRIS, A. W. et CORY, S., 1991. bcl-2 transgene inhibits T cell death and perturbs thymic self-censorship. *Cell*. Vol. 67, no 5, pp. 889-899. DOI [10.1016/0092-8674\(91\)90362-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90362-3).

SUZANNE, Magali et STELLER, Hermann, 2009. Letting go: modification of cell adhesion during apoptosis. *Journal of Biology*. Vol. 8, no 5, p. 49. DOI [10.1186/jbiol152](https://doi.org/10.1186/jbiol152).

SZABO, S. E. et al., 2004. Evaluation of an automated instrument for viability and concentration measurements of cryopreserved hematopoietic cells. *Laboratory Hematology: Official Publication of the International Society for Laboratory Hematology*. Vol. 10, no 2, pp. 109-111. DOI [10.1532/LH96.04020](https://doi.org/10.1532/LH96.04020).

TRACHOOTHAM, Dunyaporn et al., 2008a. Redox Regulation of Cell Survival. *Antioxidants & Redox Signaling*. Vol. 10, no 8, pp. 1343-1374. DOI [10.1089/ars.2007.1957](https://doi.org/10.1089/ars.2007.1957).

TRUCHET, S. et OLLIVIER-BOUSQUET, M., 2009. Mammary gland secretion: hormonal coordination of endocytosis and exocytosis. *Animal*. Vol. 3, no 12, pp. 1733-1742. DOI [10.1017/S1751731109990589](https://doi.org/10.1017/S1751731109990589).

TSIPLAKOU, E. et al., 2015. The effect of long term under- and over-feeding on the expression of genes related to lipid metabolism in the mammary tissue of goats. *Livestock Science*. Vol. 173, pp. 32-37. DOI [10.1016/j.livsci.2014.12.010](https://doi.org/10.1016/j.livsci.2014.12.010).

TSIPLAKOU, E. et al., 2016. The effect of long-term under- and overfeeding on the expression of six major milk proteins' genes in the mammary tissue of goats. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. Vol. 100, no 3, pp. 422-430. DOI [10.1111/jpn.12394](https://doi.org/10.1111/jpn.12394).

TSUGAMI, Yusaku et al., 2020. Establishment of an in vitro culture model to study milk production and the blood-milk barrier with bovine mammary epithelial cells. *Animal Science Journal*. Vol. 91, no 1, p. e13355. DOI [10.1111/asj.13355](https://doi.org/10.1111/asj.13355).

WAKIL, SALIH J., 1960. The Mechanism of Fatty Acid Synthesis. *The American Journal of Clinical Nutrition*. Vol. 8, no 5, pp. 630-644. DOI [10.1093/ajcn/8.5.630](https://doi.org/10.1093/ajcn/8.5.630).

WANG, Haiyan et al., 2013. Temozolomide-mediated DNA methylation in human myeloid precursor cells: differential involvement of intrinsic and extrinsic apoptotic pathways. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. Vol. 19, no 10, pp. 2699-2709. DOI [10.1158/1078-0432.CCR-12-2671](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-2671).

WANG, Yu et al., 2022. Acetyl-CoA Carboxylases and Diseases. *Frontiers in Oncology*. Vol. 12. DOI [10.3389/fonc.2022.836058](https://doi.org/10.3389/fonc.2022.836058).

XUE, Chengsen et al., 2006. ErbB3-dependent motility and intravasation in breast cancer metastasis. *Cancer Research*. Vol. 66, no 3, pp. 1418-1426. DOI [10.1158/0008-5472.CAN-05-0550](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0550).

ZHANG, Jing et al., 2021. Pterostilbene inhibits deoxynivalenol-induced oxidative stress and inflammatory response in bovine mammary epithelial cells. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*. Vol. 189, pp. 10-18. DOI [10.1016/j.toxicon.2020.11.002](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.11.002).

ZHANG, Yinzhi et al., 2018. GLUT1 and lactose synthetase are critical genes for lactose synthesis in lactating sows. *Nutrition & Metabolism*. Vol. 15, no 1, p. 40. DOI [10.1186/s12986-018-0276-9](https://doi.org/10.1186/s12986-018-0276-9).

ZHAO, F. -Q. et KEATING, A. F., 2007. Expression and Regulation of Glucose Transporters in the Bovine Mammary Gland1. *Journal of Dairy Science*. Vol. 90, pp. E76-E86. DOI [10.3168/jds.2006-470](https://doi.org/10.3168/jds.2006-470).

ZHAO, Ting et al., 2016. Inhibition of histone deacetylase 6 restores innate immune cells in the bone marrow in a lethal septic model. *JOURNAL OF TRAUMA AND ACUTE CARE SURGERY*. Vol. 80, no 1, pp. 34-41. DOI [10.1097/TA.0000000000000897](https://doi.org/10.1097/TA.0000000000000897). Web of Science ID: WOS:000367544400005

ZHONG, Heju et al., 2019. Mammary Protein Synthesis upon Long-Term Nutritional Restriction Was Attenuated by Oxidative-Stress-Induced Inhibition of Vacuolar H<sup>+</sup>-Adenosine Triphosphatase/Mechanistic Target of Rapamycin Complex 1 Signaling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 67, no 32, pp. 8950-8957. DOI [10.1021/acs.jafc.9b02170](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b02170).

ZHOU, Fangting et al., 2023. Molecular Characteristics and Polymorphisms of Buffalo (*Bubalus bubalis*) ABCG2 Gene and Its Role in Milk Fat Synthesis. *Animals*. Vol. 13, p. 3156. DOI [10.3390/ani13193156](https://doi.org/10.3390/ani13193156).

,

## **ANNEXES**

ANNEXE 1 : DONNEES ZOOTECHNIQUES MOYENNES PENDANT LA PÉRIODE DE RÉFÉRENCE

ANNEXE 2 : MODE OPERATOIRE DU DOSAGE DES MINERAUX DU LAIT

ANNEXE 3 : PREPARATION, ISOLATION ET PURIFICATION DES CELLULES DU LAIT

ANNEXE 4 : EXTRACTION DE L'ARN DES CEM

ANNEXE 5 : PROTOCOLE DE RETRO-TRANSCRIPTION

ANNEXE 6 : PROTOCOLE DE VERIFICATION DE L'EFFICACITE

ANNEXE 7 : PROTOCOLE DE MARQUAGES CD49F, CELLROX ET IODURE DE PROPIDIUM

ANNEXE 8 : PROTOCOLE DE MARQUAGE ANNEXIN V

ANNEXE 9 : TABLEAU DES ANALYSES DE VARIANCES SELON LE NIVEAU DE CONCENTRE, LA PERIODE ET L'ANIMAL

ANNEXE 10 : TABLEAUX DES ANALYSES DE VARIANCES, MOYENNES MARGINALES ET CONTRASTES SELON LE NIVEAU DE CONCENTRE

ANNEXE 11 : TABLEAUX DES ANALYSES DE VARIANCES, MOYENNES MARGINALES ET CONTRASTES SELON LA PERIODE

ANNEXE 12 : TABLEAU DES P\_VALUES ET DES DIRECTIONS DE LA RELATION LINEAIRE ENTRE LES VALEURS DE NIVEAU D'EXPRESSION DES GENES ET DES DONNEES ZOOTECHNIQUES ET PHYSIOLOGIQUES

**ANNEXE 1 : DONNEES ZOOTECHNIQUES MOYENNES PENDANT LA PERIODE DE REFERENCE**

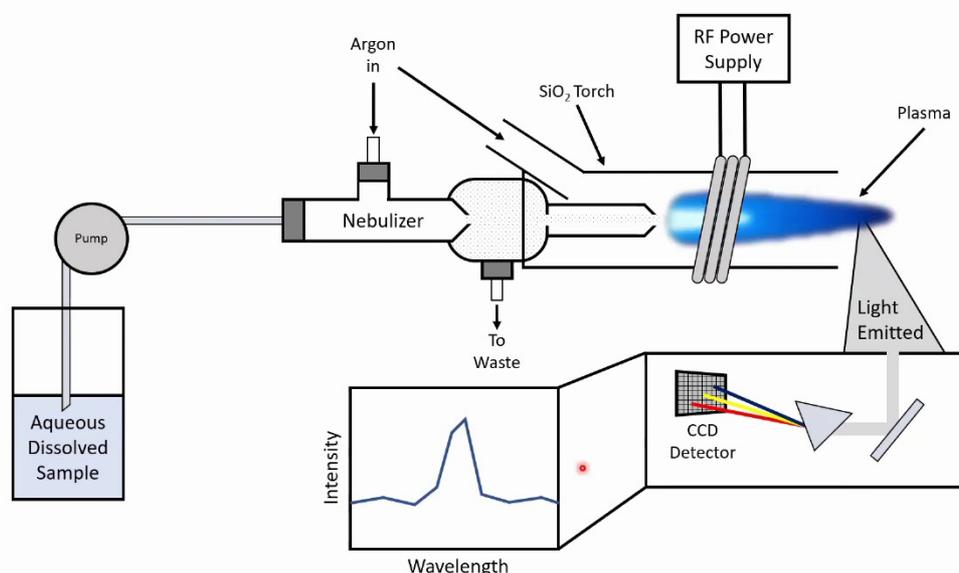
	<b>Rang</b>	<b>PL moyenne (mL)</b>	<b>TB moyen (g/L)</b>	<b>TP moyen (g/L)</b>	<b>SCC (x10<sup>6</sup>)</b>	<b>PV moyen (kgPV)</b>
Lot 1	3,0	2748,8	35,3	29,1	304,9	57,9
Lot 2	3,3	2602,5	37,9	31,2	69,9	55,5
Lot 3	2,7	2673,3	34,5	29,0	59,7	51,0
Lot 4	2,3	2767,1	38,6	30,5	62,1	52,4
Lot 5	2,7	2662,1	36,2	29,3	65,4	51,1
Lot 6	2,7	2694,2	38,3	31,1	89,7	54,2
<b>Moyenne</b>	<b>2,8</b>	<b>2691,3</b>	<b>36,8</b>	<b>30,0</b>	<b>108,6</b>	<b>53,7</b>

## ANNEXE 2 : MODE OPERATOIRE DU DOSAGE DES MINERAUX DU LAIT

<b>Référence du MO :</b>	MO-LAB-032, Version 1, 08/08/23
<b>Methode :</b>	Technique analytique à plasma
<b>Référence de la méthode :</b>	Norme ISO / DIS 15151 ; 2018
<b>Validation de la méthode :</b>	validé en 2020 selon la méthode du profil d'exactitude (Feinberg, 1996)
<b>Appareils :</b>	ICP-AES (Inductively Coupled Plasma, Spectromètre à émission atomique)
<b>Matrice :</b>	Lait, urine, solide

### Principe:

Cette méthode consiste à introduire un échantillon dans une source ICP qui excite les atomes de l'échantillon, Dans notre cas, l'échantillon est plongé dans un plasma d'argon, ainsi les atomes de l'échantillon sont transformés en ions, L'échantillon produit des lignes d'émission caractéristiques basées sur la structure atomique de chaque élément présent, Ces lignes d'émission peuvent ensuite être mesurées et analysées pour déterminer la concentration de chaque élément dans l'échantillon,



### Mode opératoire

#### Préparation des réactifs

Acide nitrique HNO<sub>3</sub> à 10%

Dans une fiole de 2L, remplir au 3/4 d'eau déminéralisée

Introduire 307,7 ml d'acide nitrique à 65% ( à réaliser sous sorbonne )

Compléter la fiole avec de l'eau déminéralisée

Triton X-100 à 0,01%

Rincer un bécher 3 fois avec de l'eau déminéralisée

Cette étape permet de n'avoir aucune contamination de minéraux dans le bécher

Peser 0,10 g de Triton X-100 dans le bécher

Introduire les 0,10g de Triton dans une fiole de 1L

Rincer plusieurs fois le bécher avec de l'eau déminéralisée ( on introduit ces rinçages dans la fiole pour récupérer tout le Triton qui est visqueux )

Ajuster la fiole avec de l'eau déminéralisée

Le Triton est un agent tensioactif non ionique qui fait diminuer la viscosité du lait et va favoriser la nébulisation

Etalon de calibration standard ICP-AES Potassium (K) 1000µg/mL

Etalon de calibration standard ICP-AES Sodium (Na) 1000µg/mL

Tableau de dilution des étalons, à réaliser dans des fioles de 50mL (rincées 3 fois à l'eau déminéralisée)

	Fiole 1 (blanc)	Fiole 2	Fiole 3	Fiole 4	Fiole 5	Fiole 6
K	0	50µL	250µL	750µL	1000µL	1250µL
Na	0	50µL	250µL	750µL	1000µL	1250µL
Triton X-100 à 0,01%	2,5 mL					
HNO3 65%	7,5 mL					
Eau déminéralisée	QSP 50mL					

	Concentration des gammes d'étalonnage (en mg/L)						Longueur d'onde avec l'ICP (nm ppm)
	Fiole 1 (blanc)	Fiole 2	Fiole 3	Fiole 4	Fiole 5	Fiole 6	
K	0	1	5	15	20	25	766,491
Na	0	1	5	15	20	25	589,592

ERM-BD151 ( European Reference Materials ) : L'ERM est une poudre de lait servant de référence

Préparation de l'ERM dans une fiole de 500mL (rincées 3 fois à l'eau déminéralisée)

ERM-BD151	0,200g
HNO3 65%	76,9mL
Triton X-100	25 mL
Eau milli-Q	Compléter à moitié la fiole
Bain à ultrasons	15 min à 30°C
Eau déminéralisée	QSP 500mL

Réaliser la mesure de la matière sèche de l'ERM avec 1g de poudre

#### Préparation des échantillons

Décongeler les échantillons au bain marie à 37°C (Température qui permet d'homogénéiser la matière grasse)

Rincer des fioles de 50mL à l'eau déminéralisée ( 3 fois ) Cette étape permet de n'avoir aucune contamination de minéraux dans les fioles

Mettre 20 mL d'eau déminéralisée dans chaque fiole

Peser 500µL de lait ou 200µL de colostrum dans les fioles

Les échantillons doivent être revenus à T° ambiante

Les échantillons seront dosés en simple

Ajouter 2,5 mL de Triton X-100

Etape qui fait diminuer la viscosité du lait et va favoriser la nébulisation

Ajouter 7,5 mL d'HNO3 à 65%

Solubilise les éléments à analyser,

Ajuster la fiole avec de l'eau déminéralisée

#### **Préparation des échantillons dans une fiole de 50mL (rincées 3 fois à l'eau déminéralisée)**

	<b>Colostrum</b>	<b>Lait</b>
Eau milli-Q	20 mL	
Echantillon	200µL	500µL
HNO3 65%	7,5 mL	
Triton X-100	2,5 mL	
Eau milli-Q	QSP 50 mL	

Toutes les mesures sont faites automatiquement par l'appareil ICP :

Réaliser la gamme d'étalonnage

Réaliser le dosage de Na et K pour les contrôles (ERM)

Réaliser le dosage de Na et K pour les échantillons

L'ERM est à redoser 2 fois tous les 18 échantillons

Pour le lait et le colostrum, les échantillons sont ajoutés au fur et à mesure ( ils faut les homogénéiser pour éviter une obstruction de l'appareil)

Pour éviter les obstructions on peut également réaliser un rétro-pédalage de l'appareil

Il faut veiller à ce que le snoot soit allumé lors des dosages

Dans notre cas, il n'y a pas de CV, car les échantillons sont dosés en une seule fois,

Les résultats sont exprimés en mg/L par l'ICP,

Les résultats des échantillons sont ensuite exprimés en mg/kg,

$$Teneur\ en\ minéral\ (mg/kg) = \frac{(Valeur\ donnée\ par\ l'ICP(mg/L) \times Volume\ de\ la\ fiole\ (mL))}{(Poids\ de\ l'ERM\ (g) \times teneur\ en\ MS(g/g))} \times 1\ 000$$

Les résultats des ERM contrôles sont ensuite exprimés en mg/kg,

$$Teneur\ en\ minéral\ (mg/kg) = \frac{(Valeur\ donnée\ par\ l'ICP(mg/L) \times Volume\ de\ la\ fiole\ (mL \times 10^3))}{Poids\ de\ l'échantillon\ (g \times 10^3)}$$

On exprime ensuite le sodium et le potassium sous forme de ratio,

$$\frac{NA}{K} = \frac{Teneur\ en\ Sodium\ (mg/kg)}{Teneur\ en\ Potassium\ (mg/kg)}$$

### **ANNEXE 3 : PREPARATION, ISOLATION ET PURIFICATION DES CELLULES DU LAIT**

La préparation des cellules du lait a été réalisée après chaque prélèvement soit les derniers jeudis et vendredis de chaque période expérimentale, Le lait de chaque chèvre a été aliquoté dans 4 tubes de 233g de lait chacun, Les 4 tubes par chèvre ont été ensuite centrifugé pendant 15 minutes à 4°C et 1500G, La crème s'étant trouvée en surface du lait à la suite de la centrifugation, elle a été retirée à l'aide d'une spatule, Le lait écrémé a été retiré et conservé pour d'autres analyses de telle sorte à ne conserver que le culot cellulaire qui a été remis en suspension avec environ 3mL de PBS, Tous les culots cellulaires des 4 tubes sont rassemblés en un seul et unique tube dont la quantité est ajustée avec 225 mL de PBS et pesé pour obtenir 225g, Le tube est centrifugé une seconde fois à 1000G pendant 10 mn et à 4°C afin de pouvoir retirer le surnageant,

Le culot cellulaire est remis en suspension à l'aide de 3mL de PBS puis filtré sur membrane de nylon (200µm) dans un tube Falcon de 50mL, Le niveau est réajusté à 50mL de PBS soit 50g, Le tube est à nouveau centrifugé à 1000G pendant 10 minutes et à 4°C puis débarrassé du surnageant, Le culot est remis en suspension et le volume est ajusté à l'aide de PBS 1% BSA pour 1mL final de solution cellulaire, Seulement 20µL de cette solution est transvasé dans un eppendorf contenant 280µL de PBS, Cette pré-dilution permet de déterminer la concentration cellulaire à l'aide d'un appareil de comptage, (TC20 Automated Cell Counter BIO RAD), Une fois la concentration obtenue, une dilution optimale est réalisée à partir de la solution cellulaire initiale afin d'obtenir environ 400µL de solution avec une concentration de 2,4 millions de cellules par mL, Cette solution sera alors utilisée lors de la cytométrie en flux,

La séparation des cellules épithéliales mammaires des autres cellules isolées du lait s'est faite par purification immuno-magnétique à partir de la solution cellulaire initialement obtenue lors de l'étape précédente, La méthode a été très bien décrite par Boutinaud et al, en 2008,

## **ANNEXE 4 : EXTRACTION DE L'ARN DES CEM**

### **I, Objet et domaine d'application**

Cette méthode décrit l'extraction des ARN totaux par broyage mécanique au Turrax ou par billes et isolement, purification des ARN sur colonnes,

### **II, Références**

Notice d'utilisation du kit RNeasy Mini kit de chez QIAGEN (référence : 74104),

### **III, Principe**

L'utilisation d'un tampon de lyse (Trizol) associé à un broyage mécanique (à billes) permet de dilacérer les cellules du tissu afin de libérer les ARN, Les ARN sont ensuite isolés et purifiés sur le filtre d'une colonne, après lavages des ARN, ils sont récupérés,

### **IV. Réactifs**

- RNeasy Mini Kit (QIAGEN ref,74104)
- Trizol (Thermo Scientific ref,15596-018)
- Chloroforme (Thermo Scientific ref,C4920/08)
- Ethanol
- RNase-free DNase Set (QIAGEN ref,79254)

### **V. Appareillage**

- centrifugeuse de paillasse
- pipettes automatiques P100, P200
- broyeur à billes Precellys (DQ2368) situé dans le laboratoire 43

### **VII, Etalons ou témoins utilisés**

### **VIII, Mode opératoire**

*Remarques* : l'extraction des ARN se fait à température ambiante, sous hotte (manipulation de solvants et produits CMR) et les consommables utilisés (tubes, cônes de pipettes) ainsi que les solutions (eau et NaOH 1M) doivent être autoclavées,

#### **Lyse des cellules :**

##### **□ au Turrax :**

Décongeler le tissu dans le trizol, Transférer un morceau de tissu dans un tube 5 ml autoclavé contenant 1 ml de trizol,

#### **Etapas de lavages de la mèche de l'Ultra-Turrax (à effectuer entre chaque broyage) :**

Laver la mèche du turrax avec de l'eau autoclavée (conserver l'eau souillée dans un flacon « déchet ») puis détergent, Finir par un lavage au NaOH 1M, Rincer la mèche avec de l'eau autoclavée, Utiliser 500µl de trizol pour tremper la mèche et faire tourner le turrax dans un tube de trizol sans échantillon,

#### **Broyage du tissu :**

Broyer le tissu au Turrax pendant 1 minute, Transférer le broyat dans un microtube autoclavé,

Incuber l'échantillon 5 minutes à température ambiante, Ajouter 0,2 ml de chloroforme, Bien refermer les tubes, Mélanger les tubes vigoureusement à la main par retournement pendant 15 secondes et incuber à 15 - 30°C pendant 2 minutes, Centrifuger les échantillons à 12 000  $\times$  g pendant 15 minutes à 4°C (*Allumer la centrifugeuse pour qu'elle soit à température avant de lancer le broyage des échantillons*),

□ **au broyeur à Billes Precellys 24:**

Décongeler le tissu dans le trizol,  
Mettre 3 billes autoclavées dans un tube Precellys autoclavé, Transférer un morceau de tissu et ajouter sous la hotte 1 ml de trizol,

Broyage du tissu :

Broyer le tissu au broyeur à billes Precellys 24 (DQ2368) situé dans le laboratoire 43 pendant 1 minute avec le programme 1 (6000 rpm – 2x 15s), Transférer le broyat dans un microtube autoclavé,

Incuber l'échantillon 5 minutes à température ambiante, Ajouter 0,2 ml de chloroforme, Bien refermer les tubes, Mélanger les tubes vigoureusement à la main par retournement pendant 15 secondes et incuber à 15 - 30°C pendant 2 minutes, Centrifuger les échantillons à 12 000  $\times$  g pendant 15 minutes à 4°C (*Allumer la centrifugeuse pour qu'elle soit à température avant de lancer le broyage des échantillons*),

**Précipitation des ARN:**

Transférer la phase aqueuse dans un nouveau microtube, Ajouter 0,5 ml d'éthanol 70% pour précipiter les ARN, Mélanger vigoureusement (possibilité de vortexer),

**Utilisation du RNeasy mini kit (QIAGEN ref, 74104):**

*Remarque* : Reconstitution du buffer RPE : ajouter 44 ml d'EtOH (éthanol absolu)

Chargement des ARN sur colonne :

- Charger les ARN (35% EtOH) sur une colonne RNeasy (700 $\mu$ l par 700 $\mu$ l), placée au préalable sur un tube de collection 2ml (fourni avec le kit)
- Fermer les tubes et centrifuger 15 sec, à 8000g (10,000rpm sur centri Eppendorf)
- Eliminer le liquide sorti de la colonne (Flowthrough)
- Répéter l'opération de façon à ce que tout le volume d'ARN ait été chargé sur la colonne (ne pas pipeter le précipité s'il y en a un)

Préparation de la solution de DNase (kit RNase free DNase set – QIAGEN ref, 79254)

Ajouter 10  $\mu$ l de DNASE I à 70  $\mu$ l de tampon RDD (pour 1 échantillon)

Mélanger délicatement par inversion du tube (surtout ne pas vortexer)

Conserver dans la glace,

#### Digestion à la DNase sur colonne

- ❑ Déposer 350µl de tampon RW1 sur la colonne
- ❑ Centrifuger 15 sec, à 8000g et éliminer le liquide
- ❑ Déposer 80µl de la solution de DNase sur la colonne
- ❑ Incuber 15 min sur la paillasse
- ❑ Déposer de nouveau 350µl de tampon RW1 sur la colonne
- ❑ Centrifuger 15 sec, à 8000g et éliminer le liquide

#### Lavages de la colonne :

- ❑ Transférer la colonne dans un nouveau tube 2ml (fourni)
- ❑ Déposer 500µl de tampon RPE sur la colonne (1<sup>er</sup> lavage)
- ❑ Centrifuger 15 sec, à 8,000g et éliminer le liquide
- ❑ Déposer de nouveau 500µl de tampon RPE sur la colonne (2<sup>ème</sup> lavage)
- ❑ Centrifuger 15 sec, à 8000g et éliminer le liquide
- ❑ Placer la colonne dans un nouveau tube 2ml (pour éviter le carry-over) et centrifuger 1 minute à vitesse maximale pour assécher la colonne

#### Elution des ARN :

- ❑ Transférer la colonne dans un tube 1,5ml (fourni)
- ❑ Déposer 20µl d'eau BM (fournie) sur la colonne en visant le milieu du filtre (sans le toucher ni toucher les bords de la colonne)
- ❑ Fermer le tube et laisser en contact 1 minute
- ❑ Centrifuger 1 minute à 8,000g (10,000rpm)

Conserver les tubes d'ARN dans la glace,

Remarque : Toutes les étapes doivent être réalisées à 4°C pour éviter la dégradation des protéines (centrifugeuse réfrigérée + glace pendant toutes les étapes)

Les échantillons d'ARN sont conservés à -80°C,

#### **IX, Remarques**

#### **X, Calculs et expression des résultats**

#### **XI, Documents associés**

Protocole d'utilisation du broyeur à billes Precellys 24 (laboratoire 43) – Référent de l'appareil : Christine Trefeu poste 57,51

## **ANNEXE 5 : PROTOCOLE DE RETRO-TRANSCRIPTION**

### **I, Objet et domaine d'application**

Cette méthode décrit les étapes de rétrotranscription de l'ARN en ADN complémentaire avec le kit de RT Vilo Superscript,

### **II, Références**

Notice d'utilisation du produit Vilo Superscript fourni avec le produit par Thermo Scientific,

### **III, Principe**

L'ARN, biomolécule fragile et très sensible à la dégradation, est rétro-transcrit en ADN complémentaire, biomolécule plus résistante et robuste, afin d'analyser l'expression des gènes d'intérêt en PCR,

### **VI. Réactifs**

- Superscript Vilo cDNA Synthesis Kit de Invitrogen (Fisher) cat,11754-050

Constitué de 2 solutions:

- 10X superscript Enzyme mix (superscript III enzyme, RNaseOut ou Ribonuclease inhibitor) / **produit très sensible aux différences de températures, garder dans la glace**
- 5X Vilo reaction mix (Random primers, MgCl<sub>2</sub>, dNTPs et buffer)

### **V Prévention**

### **VII. Appareillage**

- centrifugeuse de paillasse
- pipettes automatiques P100, P200
- Appareil PCR classique Biorad (thermocycleur) situé dans le laboratoire PCR de Senah
- barrettes PCR autoclavées

### **VII, Etalons ou témoins utilisés**

## VIII, Mode opératoire

**Attention : toutes les étapes de la manipulation doivent se faire dans la glace pour éviter la dégradation des ARN,**

- Faire un mix des deux solutions du kit :

	Pour 1 échantillon plus)	Pour n échantillon (faire 10% de plus)
10X superscript Enzyme mix	1µl	n µl
5X Vilo reaction mix	2µl	n x2µl
DEPC-treated water	2µl	n x2 µl

- Dans une barrette, mettre 500ng d'ARN des échantillons dans les puits soit pour des ARN à [100µg/µl] : 5µl sinon calculer le volume d'ARN nécessaire pour 500ng et compléter à 5µL avec de l'eau RNase-DNase free
- Ajouter 5 µl du mix RT dans chaque puit,
- Vortexer doucement, centrifuger les barrettes et mettre les barrettes dans le thermocycleur BIORAD,

Selectionner le programme suivant :

temperature	25°C	42°C	85°C	4°C
<b>temps</b>	10 min	90 min	5 min	∞

- Récupérer les ADNc et diluer au 1/50<sup>e</sup> (dilution choisie à partir des résultats d'efficacité des primers)

## **ANNEXE 6 : PROTOCOLE DE VERIFICATION DE L'EFFICACITE**

L'efficacité des amorces étaient connus pour l'ensemble des gènes hormis le gène ELF5 dont l'efficacité n'avait pas été testé sur le tissu mammaire de chèvre, Pour se faire, une PCR a été réalisée avec une série de dilutions successives (1/10, 1/20, 1/50, 1/100, 1/200, 1/500, 1/1000, 1/2000) d'un produit de rétro-transcription issu de la glande mammaire d'une chèvre en lactation, Les efficacités des couples d'amorces ont été déterminées à partir des valeurs de Crossing Threshold (CT), qui représentent le nombre de cycles nécessaires pour mesurer la fluorescence du SYBRGreen, En traçant une courbe de calibration, avec les CT en ordonnée et les concentrations des RT en abscisse, l'efficacité a été calculée selon la formule :  $10^{(-1/a)}$  où a est la pente de la gamme étalon,

## ANNEXE 7 : PROTOCOLE DE MARQUAGES CD49F, CELLROX ET IODURE DE PROPIDIUM

L'échantillon dosé à 2,4 millions de cellules a été filtré à l'aide d'un filtre Miltenyi de 70µM puis lavé avec 1mL de PBS, Chaque solution a été filtrée directement dans un tube de cytométrie appelé NM (pour « non marqué»), Après centrifugation à 500G pendant 5 minutes et à 4°C des 9 tubes, les culots ont été repris dans 400µL de FACS buffer chacun, Une partie du contenu de chaque tube a été répartie dans 3 autres tubes : 95 µL dans un tube qui contenait les cellules marquées avec l'isotype CD49F (« FMO CD49F »), 95 µL dans un tube qui contenait les cellules marquées avec l'Anticorps CD49F (« Multi CD49F ») et enfin un tube « pool NM », A noter que le tube pool était le même pour tous les échantillons puisqu'il contient les cellules de tous les individus,

Une fois la répartition exercée, le tube « pool NM », contenant 95 µL de chaque tube NM, a été réparti de la façon suivante : 270 µL dans un tube « pool FMO CD49F » et 270 µL dans un tube « pool Multi CD49F »

Dans les tubes « FMO CD49F » et « Multi CD49F » ont été ajouté 10uL de FcR blocking et 30 µL dans les tubes « pool FMO CD49F » et « pool Multi CD49F), Le FcR blocking est utilisé pour bloquer les interactions non spécifiques en se fixant que les récepteurs Fc des cellules, A partir de cette étape, tous les tubes ont été conservé dans la glace et à l'abri de la lumière,

Dans les tubes « FMO CD49F » et « pool FMO CD49F » ont été ajouté 5 µL de l'isotype CD49F contre 8 µL de l'anticorps CD49F dans les tubes « multi CD49F » et « pool Multi CD49F », Les 30 tubes ont été incubés pendant 30 minutes dans la glace et à l'abri de la lumière puis lavés avec 1mL de FACS buffer pour tous les tubes sauf les pools qui ont été lavés avec 3mL, Ensuite, les tubes ont été centrifugés à 500G pendant 5 minutes et à 4°C pour pouvoir retirer le surnageant par retournement du tube sans perdre trop de cellules,

Une fois le surnageant retiré, les cellules ont été re-suspendues avec du PBS selon différentes quantités :

- 200 µL de PBS pour tubes « NM », « FMO CD49F » et « Multi CD49F
- 880 µL de PBS pour le tube « pool NM »
- 680 µL de PBS pour les tubes « pool FMO CD49F » et « pool Multi CD49F »

Le contenu des tubes a été réparti sur une plaque de cytométrie de 96 puits selon le plan suivant :

POOL	POOL ROS	POOL ROS efluor	Chèvre A	Chèvre B	Chèvre C	Chèvre D	Chèvre E	Chèvre F	Chèvre G	Chèvre H	Chèvre I
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
NM	NM ROS	NM ROS eflu	NM								
FMO	FMO ROS	FMO ROS eflu	FMO								
multi	Multi ROS	Multi ROS eflu	Multi ROS eflu	Multi ROS eflu	Multi ROS eflu	Multi ROS eflu	Multi ROS eflu	Multi ROS eflu	Multi ROS eflu	Multi ROS eflu	Multi ROS eflu
		NM eflu									

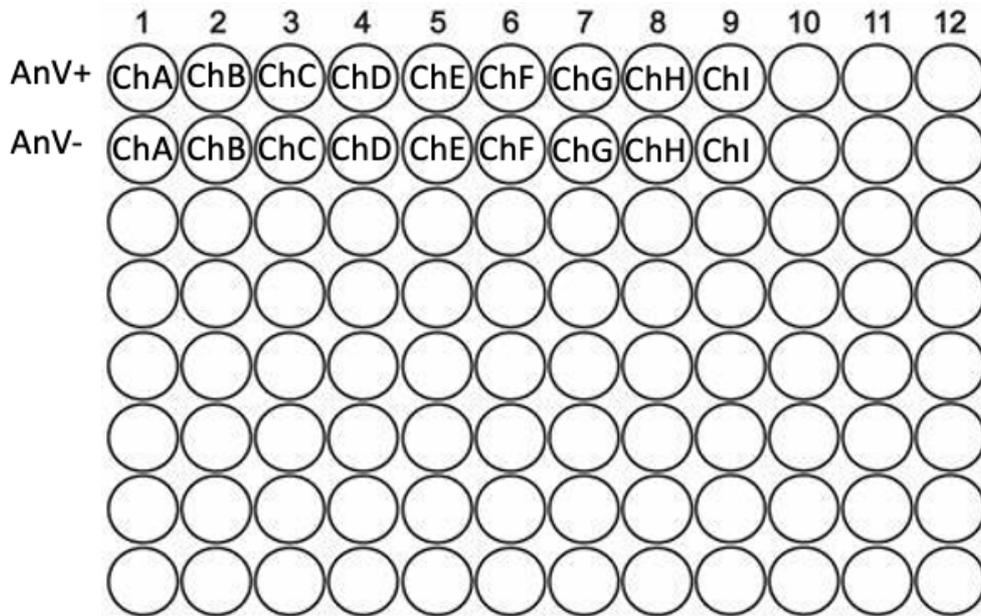
Dans les puits contenant « ROS » a été ajouté 1µL d'un mix de 1 µL de CellRox dans 9 µL de DMSI et 15 µL de PBS, La plaque a été incubée 15 minutes à 37°C,

Dans les puits contenant « efluor » a été ajouté 2,5 µL d'un mix réalisé à partir d'un 1µL d'efluor780 dans 99 µL de PBS, La plaque a été à nouveau incubée pendant 15 minutes à

37°C, Une fois l'incubation terminée, la plaque a été centrifugée pour retirer le surnageant puis re-suspendre les cellules dans 200 µL de PBS,

## ANNEXE 8 : PROTOCOLE DE MARQUAGE ANNEXIN V

Le marquage avec l'annexine V a été réalisé sur les échantillons de CEM, obtenus après séparation immuno-magnétique, Les tubes ont été centrifugés à 500G pendant 5 minutes et a 4°C, Une fois le surnagent retiré, les cellules ont été suspendues dans 60 µL d'un tampon AnV contenant 980 µL d'eau stérile et 20 µL de tampon du kit, Le contenu des tubes a été répartie sur une plaque de 96 puits selon le plan suivant :



Dans les puits marqués a été ajouté 25 µL de la solution de marquage contenant 270 µL de tampon, 27 µL de FITC et 5,4 µL d'IP,

Dans les puits non marqués a été ajouté 25 µL du tampon du kit

**ANNEXE 9 : TABLEAU DES ANALYSES DE VARIANCES SELON LE NIVEAU DE CONCENTRE, LA PERIODE ET L'ANIMAL**

	p-value ANOVA		
	Traitement	Période	Chèvre
PL_jour	0,015x10 <sup>-4</sup>	0,039x10 <sup>-4</sup>	0,030x10 <sup>-5</sup>
PL_matin	0,007x10 <sup>-5</sup>	0,010	0,040x10 <sup>-7</sup>
PLm_matin	0,02x10 <sup>-8</sup>	0,026x10 <sup>-3</sup>	0,013x10 <sup>-9</sup>
PLm_soir	0,311	0,020x10 <sup>-1</sup>	0,417
TBm_matin	0,008	0,027x10 <sup>-13</sup>	0,007x10 <sup>-8</sup>
TBm_soir	0,008	0,020x10 <sup>-12</sup>	0,033x10 <sup>-9</sup>
TB_jour	0,011	< 2,2x10 <sup>-16</sup>	0,009x10 <sup>-10</sup>
MG_matin	0,03x10 <sup>-8</sup>	0,030x10 <sup>-3</sup>	0,014x10 <sup>-8</sup>
MG_soir	0,162	0,290	0,096
MG_jour	0,005x10 <sup>-4</sup>	0,026	0,022x10 <sup>-5</sup>
TPm_matin	0,055	0,010	<2x10 <sup>-16</sup>
TPm_soir	0,05555	0,010	<2x10 <sup>-16</sup>
TP_jour	0,352	0,005	<2x10 <sup>-16</sup>
MP_matin	0,006x10 <sup>-8</sup>	0,03x10 <sup>-4</sup>	0,013x10 <sup>-9</sup>
MP_soir	0,348	0,001	0,670
MP_jour	0,024x10 <sup>-4</sup>	0,011x10 <sup>-4</sup>	0,018x10 <sup>-4</sup>
TxCell_matin	0,884	0,004	0,022x10 <sup>-5</sup>
TxCellm_matin	0,427	0,014	0,006x10 <sup>-4</sup>
TxCell_soir	0,176	0,001	0,027x10 <sup>-5</sup>
TxCell_jour	0,362	0,002	0,031x10 <sup>-5</sup>
QtCell_matin	0,524	0,004	0,012x10 <sup>-6</sup>
QtCellm_matin	0,551	0,006	0,041x10 <sup>-6</sup>
QtCell_soir	0,455	0,001	0,04x10 <sup>-5</sup>
QtCell_jour	0,770	0,002	0,007x10 <sup>-5</sup>
Tx_lactose	0,009x10 <sup>-3</sup>	0,021x10 <sup>-3</sup>	0,035x10 <sup>-13</sup>
Qt_lactose	0,017x10 <sup>-6</sup>	0,037	0,010x10 <sup>-7</sup>
caseines	0,457	0,023x10 <sup>-3</sup>	<2,2x10 <sup>-16</sup>
protéines totales	0,007x10 <sup>-1</sup>	0,001	0,026x10 <sup>-14</sup>
protéines solubles	0,012x10 <sup>-5</sup>	0,426	0,031x10 <sup>-4</sup>
cas/prot	0,020x10 <sup>-5</sup>	0,189	0,04x10 <sup>-2</sup>
cas/prot sol	0,040x10 <sup>-3</sup>	0,138	0,060
prot sol/prot	0,020x10 <sup>-5</sup>	0,189	0,047x10 <sup>-2</sup>
Na	0,122	0,461	0,080x10 <sup>-10</sup>
K	0,347	0,118	0,013x10 <sup>-6</sup>
NaK	0,006	0,245	0,014x10 <sup>-9</sup>
viabilité_CEM	0,904	0,439	0,296
pourc_CEM	0,998	0,152	0,046
viabilité_totalcell	0,068	0,002	0,033
Viabilité_CEM_AnV	0,146	0,006	0,502
pourc_nécrosées	0,438	0,084	0,034

pourc_apoptotiques	0,389	0,353	0,030
pourc_Eapoptose	0,434	0,062x10 <sup>-5</sup>	0,134
pourc_sommeapoptose	0,146	0,001	0,087
nb_cellexfo_matin	0,129	0,020	0,045x10 <sup>-3</sup>
nb_cellexfo_apoptotiques	0,149	0,243	0,001
nb_cellexfo_Eapoptose	0,350	0,001	0,008
nb_cellexfo_sommeapop	0,216	0,002	0,005
%_CEM	0,356	0,020	0,442
CEM mortes	0,397	0,264	0,680
CEM mortes ROS+	0,332	0,020x10 <sup>-3</sup>	0,051
IF CEM mortes ROS+	0,843	0,238	0,994
CEM vivantes	0,845	0,020x10 <sup>-2</sup>	0,188
CEM vivantes ROS+	0,607	0,917	0,057
IF CEM vivantes ROS+	0,973	0,013x10 <sup>-2</sup>	0,313
%_Leuco	0,730	0,233	0,017
Leuco morts	0,376	0,020x10 <sup>-2</sup>	0,008
Leuco morts ROS+	0,777	0,016	0,030
IF leuco morts ROS+	0,953	0,013	0,102
leuco vivants	0,376	0,020x10 <sup>-2</sup>	0,008
Leuco vivants ROS+	0,658	0,117	0,023
IF leuco vivants ROS+	0,779	0,040x10 <sup>-2</sup>	0,408
viabilité	0,300	0,001	0,037
BAX	0,999	0,197	0,773
FASN	0,980	0,275	0,584
CASK	0,993	0,190	0,582
LALBA	0,989	0,163	0,561
SOD1	0,990	0,148	0,691
SLC2A1	0,991	0,228	0,665
ELF5	0,993	0,205	0,563
BAX (RIN>5)	0,793	0,212	0,725
FASN (RIN>5)	0,803	0,147	0,679
CASK(RIN>5)	0,838	0,136	0,632
LALBA(RIN>5)	0,828	0,124	0,594
SOD1(RIN>5)	0,810	0,131	0,729
SLC2A1(RIN>5)	0,823	0,175	0,658
ELF5(RIN>5)	0,847	0,127	0,656

**ANNEXE 10 : TABLEAUX DES ANALYSES DE VARIANCES, MOYENNES MARGINALES ET CONTRASTES SELON LE NIVEAU DE CONCENTRE**

	unité	Moyennes marginales calculées				p-value ANOVA	Contrastes des moyennes ajustées		
		C0	C400	C800	SEM	Traitement	C0-C400	C0-C800	C400-C800
PL_jour	kg	2,78	3,02	3,32	0,06	0,015x10 <sup>-4</sup>	0,020	<,0001	0,003
PL_matin	kg	1,71	1,95	2,11	0,04	0,007x10 <sup>-5</sup>	0,003x10 <sup>-1</sup>	<,0001	0,011
PLm_matin	kg	1,69	1,93	2,14	0,03	0,02x10 <sup>-8</sup>	<,0001	<,0001	0,002x10 <sup>-1</sup>
PLm_soir	kg	1,09	1,08	1,18	0,05	0,311	0,997	0,401	0,361
TBm_matin	g/kg	23,90	25,40	25,40	0,36	0,008	0,020	0,014	0,989
TBm_soir	g/kg	36,00	37,90	37,60	0,43	0,008	0,011	0,032	0,901
TB_jour	g/kg	28,60	29,90	29,70	0,31	0,011	0,015	0,036	0,934
MG_matin	g	39,90	48,50	54,00	1,04	0,03x10 <sup>-8</sup>	<,0001	<,0001	0,002
MG_soir	g	38,90	40,30	44,00	1,89	0,162	0,864	0,156	0,362
MG_jour	g	78,90	88,80	98,00	1,96	0,005x10 <sup>-4</sup>	0,003	<,0001	0,007
TPm_matin	g/kg	28,80	29,00	29,30	0,15	0,055	0,647	0,047	0,265
TPm_soir	g/kg	30,30	30,40	30,40	0,17	0,05555	0,987	0,934	0,979
TP_jour	g/kg	29,40	29,50	29,70	0,15	0,352	0,944	0,352	0,534
MP_matin	g	48,50	55,80	62,40	0,95	0,006x10 <sup>-8</sup>	<,0001	<,0001	0,000
MP_soir	g	33,10	32,80	35,70	1,52	0,348	0,992	0,452	0,387
MP_jour	g	81,60	88,60	98,10	1,86	0,024x10 <sup>-4</sup>	0,029	<,0001	0,003
TxCell_matin	10 <sup>6</sup> cellules/mL	107	100	102	1	0,884	0,875	0,949	0,984
TxCellm_matin	10 <sup>6</sup> cellules/mL	123	100	107	1	0,427	0,404	0,404	0,404
TxCell_soir	10 <sup>6</sup> cellules/mL	224	204	170	1	0,176	0,842	0,190	0,430
TxCell_jour	10 <sup>6</sup> cellules/mL	355	310	288	1	0,363	0,688	0,364	0,841
QtCell_matin	10 <sup>6</sup> cellules	174	186	209	1	0,524	0,932	0,549	0,763
QtCellm_matin	10 <sup>6</sup> cellules	199	186	224	1	0,551	0,904	0,785	0,525
QtCell_soir	10 <sup>6</sup> cellules	224	209	190	1	0,455	0,904	0,572	0,820
QtCell_jour	10 <sup>6</sup> cellules	436	407	427	1	0,770	0,856	0,981	0,935

	unité	Moyennes marginales calculées				p-value ANOVA	Contrastes des moyennes ajustées		
		C0	C400	C800	SEM	Traitement	C0-C400	C0-C800	C400-C800
Tx_lactose	dg/kg	4,26	4,32	4,38	0,01	0,009x10 <sup>-3</sup>	0,009	<,0001	0,005
Qt_lactose	dg	7,29	8,40	9,28	0,17	0,017x10 <sup>-6</sup>	0,001x10 <sup>-1</sup>	<,0001	0,002
caseines	g/kg	25,70	25,60	25,90	0,16	0,457	0,888	0,769	0,493
protéines totales	g/kg	27,30	27,90	28,40	0,20	0,007x10 <sup>-1</sup>	0,103	0,001	0,120
protéines solubles	g/kg	1,59	2,25	2,55	0,10	0,012x10 <sup>-5</sup>	0,001x10 <sup>-1</sup>	<,0001	0,083
cas/prot	%	94,30	92,00	91,10	0,34	0,020x10 <sup>-5</sup>	<,0001	<,0001	0,163
cas/prot sol		13,90	16,30	12,50	1,37	0,040x10 <sup>-3</sup>	0,408	0,736	0,122
prot sol/prot	%	5,66	8,01	8,90	0,34	0,020x10 <sup>-5</sup>	<,0001	<,0001	0,163
Na	mg/kg	290,00	293,00	301,00	3,27	0,122	0,763	0,053	0,206
K	mg/kg	2162,00	2132,00	2116,00	21,60	0,347	0,576	0,290	0,849
NaK	%	13,50	13,80	14,30	0,16	0,006	0,269	0,002	0,067
viabilité_CEM	%	56,50	57,00	58,70	2,26	0,904	0,990	0,785	0,849
pourc_CEM	%	18,40	18,40	18,40	3,40	0,998	1,000	1,000	1,000
viabilité_totalcell	%	51,20	51,80	57,40	2,08	0,068	0,974	0,095	0,144
Viabilité_CEM_AnV	%	44,60	53,80	48,90	3,66	0,146	0,149	0,651	0,585
pourc_nécrosées	%	-0,08	-0,17	-0,97	0,48	0,438	0,989	0,350	0,425
pourc_apoptotiques	%	21,00	17,70	22,10	2,68	0,389	0,622	0,946	0,446
pourc_Eapoptose	%	34,60	30,50	29,90	2,37	0,434	0,418	0,321	0,981
pourc_sommeapoptose	%	55,60	49,50	52,10	3,08	0,146	0,314	0,666	0,819
nb_cellexfo_matin	10 <sup>6</sup> cellules	12,6	18,2	19,5	1,18	0,129	0,248	0,153	0,946
nb_cellexfo_apoptotiques	10 <sup>6</sup> cellules	2,2	2,7	3,7	1,23	0,149	0,755	0,196	0,520
nb_cellexfo_Eapoptose	10 <sup>6</sup> cellules	3,9	5,4	5,5	1,27	0,350	0,609	0,551	0,998
nb_cellexfo_sommeapop	10 <sup>6</sup> cellules	692	794	102	1,25	0,216	0,892	0,418	0,689
%_CEM	%	9,70	8,06	7,76	1,02	0,356	0,485	0,360	0,966
CEM mortes	%	86,70	80,70	86,10	3,45	0,397	0,406	0,990	0,500
CEM mortes ROS+	%	41,40	37,40	42,20	2,60	0,332	0,498	0,973	0,386

		Moyennes marginales calculées				p-value ANOVA	Contrastes des moyennes ajustées		
	unité	C0	C400	C800	SEM	Traitement	C0-C400	C0-C800	C400-C800
IF CEM mortes ROS+		5,97	6,34	6,7	1,09	0,843	0,966	0,880	0,969
CEM vivantes	%	13,30	13,80	14,30	1,41	0,845	0,962	0,867	0,965
CEM vivantes ROS+	%	38,90	34,40	35,90	3,42	0,607	0,603	0,804	0,947
IF CEM vivantes ROS+		79,90	80,40	84,70	12,40	0,973	0,999	0,958	0,967
%_Leuco	%	77,50	79,10	79,00	1,70	0,730	0,314	0,666	0,819
Leuco morts	%	62,00	57,40	57,20	2,86	0,376	0,462	0,455	0,999
Leuco morts ROS+	%	13,80	12,00	12,60	1,89	0,777	0,758	0,898	0,965
IF leuco morts ROS+		2,71	2,64	2,58	0,22	0,953	0,969	0,901	0,978
leuco vivants	%	38,00	42,60	42,80	2,86	0,376	0,462	0,455	0,999
Leuco vivants ROS+	%	23,70	19,40	20,90	3,51	0,658	0,645	0,843	0,945
IF leuco vivants ROS+		3,02	2,81	2,83	0,21	0,779	0,760	0,803	0,998
viabilité	%	32,50	37,00	37,20	2,54	0,300	0,389	0,375	0,998
BAX	log	3,51	3,51	3,53	0,10	0,999	1,000	0,996	0,996
FASN	log	3,61	3,62	3,65	0,11	0,980	0,992	0,966	0,990
CASK	log	3,72	3,72	3,74	0,11	0,993	1,000	0,986	0,990
LALBA	log	3,72	3,73	3,75	0,11	0,989	0,997	0,978	0,992
SOD1	log	3,40	3,39	3,41	0,10	0,990	0,998	0,995	0,986
SLC2A1	log	3,53	3,53	3,56	0,10	0,991	1,000	0,983	0,985
ELF5	log	3,48	3,49	3,49	0,11	0,993	0,998	0,985	0,993
BAX (RIN>5)	log	3,70	3,35	3,62	0,16	0,793	0,337	0,938	0,457
FASN (RIN>5)	log	3,81	3,44	3,73	0,17	0,803	0,327	0,937	0,446
CASK(RIN>5)	log	3,91	3,55	3,83	0,16	0,838	0,321	0,922	0,459
LALBA(RIN>5)	log	3,92	3,56	3,84	0,16	0,828	0,332	0,931	0,460
SOD1(RIN>5)	log	3,57	3,23	3,50	0,16	0,810	0,344	0,937	0,467
SLC2A1(RIN>5)	log	3,71	3,35	3,63	0,16	0,823	0,333	0,935	0,457
ELF5(RIN>5)	log	3,68	3,31	3,59	0,17	0,847	0,328	0,904	0,491

**ANNEXE 11 : TABLEAUX DES ANALYSES DE VARIANCES, MOYENNES MARGINALES ET CONTRASTES SELON LA PERIODE**

	unité	Moyennes marginales calculées				p-value ANOVA	Contrastes des moyennes ajustées		
		P1	P2	P3	SEM	Période	P1 - P2	P1 - P3	P2 - P3
PL_jour	kg	2,76	3,25	3,11	0,06	0,039x10 <sup>-4</sup>	<,0001	0,001	0,224
PL_matin	kg	1,82	1,99	1,96	0,04	0,010	0,012	0,042	0,860
PLm_matin	kg	1,79	2,04	1,93	0,03	0,026x10 <sup>-3</sup>	<,0001	0,014	0,049
PLm_soir	kg	0,96	1,21	1,18	0,05	0,020x10 <sup>-1</sup>	0,003	0,010	0,906
TBm_matin	g/kg	29,00	21,50	24,20	0,36	0,027x10 <sup>-13</sup>	<,0001	<,0001	<,0001
TBm_soir	g/kg	41,60	33,00	36,80	0,43	0,020x10 <sup>-12</sup>	<,0001	<,0001	<,0001
TB_jour	g/kg	33,30	25,80	29,10	0,31	< 2,2x10 <sup>-16</sup>	<,0001	<,0001	<,0001
MG_matin	g	51,80	43,80	46,80	1,04	0,030x10 <sup>-3</sup>	<,0001	0,006	0,118
MG_soir	g	39,60	40,20	43,50	1,89	0,290	0,970	0,308	0,430
MG_jour	g	91,30	84,00	90,40	1,96	0,026	0,033	0,936	0,072
TPm_matin	g/kg	28,70	29,40	29,00	0,15	0,010	0,008	0,335	0,181
TPm_soir	g/kg	30,00	30,80	30,40	0,17	0,010	0,006	0,275	0,199
TP_jour	g/kg	29,10	29,90	29,50	0,15	0,005	0,003	0,212	0,175
MP_matin	g	51,40	59,80	55,50	0,95	0,03x10 <sup>-4</sup>	<,0001	0,012	0,009
MP_soir	g	28,60	37,30	35,60	1,52	0,001	0,001	0,007	0,707
MP_jour	g	80,00	97,10	91,10	1,86	0,011x10 <sup>-4</sup>	<,0001	0,001	0,075
TxCell_matin	10 <sup>6</sup> cellules/mL	107	132	759	1,12	0,004	0,438	0,084	0,005
TxCellm_matin	10 <sup>6</sup> cellules/mL	110	141	851	1,12	0,014	0,248	0,301	0,010
TxCell_soir	10 <sup>6</sup> cellules/mL	219	263	135	1,12	0,001	0,446	0,017	0,001
TxCell_jour	10 <sup>6</sup> cellules/mL	339	417	229	1,12	0,002	0,372	0,047	0,001
QtCell_matin	10 <sup>6</sup> cellules	186	251	144	1,13	0,004	0,187	0,235	0,005
QtCellm_matin	10 <sup>6</sup> cellules	186	275	158	1,12	0,006	0,056	0,602	0,005
QtCell_soir	10 <sup>6</sup> cellules	186	309	155	1,13	0,001	0,020	0,502	0,001
QtCell_jour	10 <sup>6</sup> cellules	398	603	324	1,12	0,002	0,041	0,390	0,001
Tx_lactose	dg/kg	4,36	4,34	4,26	0,01	0,021x10 <sup>-3</sup>	0,336	<,0001	0,001

	unité	Moyennes marginales calculées				p-value ANOVA	Contrastes des moyennes ajustées		
		P1	P2	P3	SEM	Période	P1 - P2	P1 - P3	P2 - P3
Qt_lactose	dg	7,96	8,66	8,35	0,17	0,037	0,016	0,220	0,413
caseines	g/kg	25,20	26,30	25,70	0,16	0,023x10 <sup>-3</sup>	<,0001	0,096	0,011
protéines totales	g/kg	27,30	28,40	27,90	0,20	0,001	0,002	0,104	0,199
protéines solubles	g/kg	2,13	2,03	2,23	0,10	0,426	0,778	0,722	0,336
cas/prot	%	92,40	93,00	92,00	0,34	0,189	0,476	0,717	0,145
cas/prot sol		13,90	16,30	12,50	1,37	0,138	0,001	0,01x10 <sup>-2</sup>	0,745
prot sol/prot	%	7,59	7,03	7,95	0,34	0,189	0,476	0,717	0,145
Na <sup>+</sup>	mg/kg	293	294	297	3,27	0,461	0,924	0,524	0,770
K <sup>+</sup>	mg/kg	2102	2150	2158	21,60	0,118	0,258	0,148	0,959
Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup>	%	14,00	13,70	13,80	0,16	0,245	0,463	0,771	0,861
viabilité_CEM	%	58,50	58,70	55,00	2,36	0,439	0,999	0,490	0,494
pourc_CEM	%	22,50	13,90	18,80	3,55	0,152	0,193	0,697	0,579
viabilité_totalcell	%	59,00	53,50	47,90	2,08	0,002	0,155	0,001	0,139
Viabilité_CEM_AnV	%	91,30	84,00	90,40	1,96	0,006	0,915	0,009	0,048
pourc_nécrosées	%	-1,10	-0,50	0,60	0,66	0,084	0,236	0,682	0,635
pourc_apoptotiques	%	18,30	19,60	22,90	2,92	0,353	0,938	0,367	0,645
pourc_Eapoptose	%	39,10	36,80	19,10	2,71	0,062x10 <sup>-5</sup>	0,784	<,0001	0,0001
pourc_sommeapoptose	%	57,40	57,80	42,00	3,52	0,001	0,995	0,001	0,004
nb_cellexfo_matin	10 <sup>6</sup> cellules	22	18	11	1,18	0,020	0,673	0,016	0,134
nb_cellexfo_apoptotiques	10 <sup>6</sup> cellules	3,09	3,16	2,34	1,73	0,243	0,999	0,514	0,578
nb_cellexfo_Eapoptose	10 <sup>6</sup> cellules	8,1	6,2	2,2	1,33	0,001	0,712	0,001	0,022
nb_cellexfo_sommeapop	10 <sup>6</sup> cellules	1230	1047	427	1,01	0,002	0,891	0,003	0,033
%_CEM	%	6,37	8,76	10,43	10,43	0,020	0,221	0,016	0,472
CEM mortes	%	83,60	88,90	80,90	3,45	0,264	0,519	0,826	0,228
CEM mortes ROS+	%	50,80	39,00	31,10	2,60	0,020x10 <sup>-3</sup>	0,007	<,0001	0,088
IF CEM mortes ROS+		7,82	5,80	5,39	1,09	0,238	0,385	0,240	0,959

		Moyennes marginales calculées				p-value ANOVA	Contrastes des moyennes ajustées		
	unité	P1	P2	P3	SEM	Période	P1 - P2	P1 - P3	P2 - P3
CEM vivantes	%	10,80	11,40	19,10	1,41	0,020x10 <sup>-2</sup>	0,942	0,04x10 <sup>-2</sup>	0,001
CEM vivantes ROS+	%	35,50	37,70	36,00	3,42	0,917	0,885	0,994	0,928
IF CEM vivantes ROS+		59,90	129,00	56,10	12,40	0,013x10 <sup>-2</sup>	0,001	0,972	0,001
%_Leuco	%	80,00	79,30	76,30	1,70	0,233	0,955	0,253	0,410
Leuco morts	%	65,00	63,40	48,30	2,86	0,020x10 <sup>-2</sup>	0,913	0,04x10 <sup>-2</sup>	0,002
Leuco morts ROS+	%	17,40	11,10	9,90	1,89	0,016	0,061	0,018	0,883
IF leuco morts ROS+		3,06	2,12	2,74	0,22	0,013	0,010	0,514	0,115
leuco vivants	%	35,00	36,60	51,70	2,86	0,020x10 <sup>-2</sup>	0,913	0,04x10 <sup>-2</sup>	0,002
Leuco vivants ROS+	%	24,60	23,90	15,40	3,51	0,117	0,988	0,143	0,201
IF leuco vivants ROS+		3,12	2,11	3,43	0,21	0,040x10 <sup>-2</sup>	0,005	0,540	0,03x10 <sup>-2</sup>
viabilité	%	30,00	32,70	44,10	2,54	0,001	0,731	0,001	0,008
BAX	log	3,63	3,39	3,53	0,10	0,197	0,213	0,736	0,588
FASN	log	3,71	3,50	3,66	0,11	0,275	0,332	0,939	0,514
CASK	log	3,80	3,58	3,80	0,11	0,190	0,298	1,000	0,308
LALBA	log	3,81	3,58	3,81	0,11	0,163	0,262	0,999	0,279
SOD1	log	3,49	3,25	3,47	0,10	0,148	0,212	0,987	0,271
SLC2A1	log	3,62	3,41	3,59	0,10	0,228	0,300	0,967	0,422
ELF5	log	3,56	3,35	3,57	0,11	0,205	0,342	0,996	0,300
BAX (RIN>5)	log	3,72	3,42	3,53	0,19	0,212	0,513	0,663	0,872
FASN (RIN>5)	log	3,83	3,49	3,67	0,20	0,147	0,462	0,786	0,688
CASK(RIN>5)	log	3,91	3,58	3,80	0,19	0,136	0,465	0,885	0,572
LALBA(RIN>5)	log	3,92	3,59	3,81	0,19	0,124	0,453	0,870	0,575
SOD1(RIN>5)	log	3,58	3,25	3,47	0,19	0,131	0,437	0,861	0,565
SLC2A1(RIN>5)	log	3,70	3,40	3,59	0,19	0,175	0,511	0,862	0,664
ELF5(RIN>5)	log	3,66	3,35	3,58	0,20	0,127	0,522	0,941	0,560

**ANNEXE 12 : TABLEAU DES P\_VALUES ET DES DIRECTIONS DE LA RELATION LINEAIRE ENTRE LES VALEURS DE NIVEAU D'EXPRESSION DES GENES ET DES DONNEES ZOOTECHNIQUES ET PHYSIOLOGIQUES**

	BAX		FASN		CSN3		LALBA		SOD1		SLC2A1		ELF5	
	p	cor	p	cor	p	cor								
pourc_apoptotiques	0,541	-0,090	0,315	-0,148	0,480	-0,104	0,493	-0,101	0,464	-0,108	0,643	-0,069	0,370	-0,132
pourc_Ecapoptose	0,474	0,107	0,713	0,055	0,907	0,017	0,919	0,015	0,816	0,035	0,786	0,041	0,902	0,018
pourc_sommeapop	0,831	0,032	0,690	-0,060	0,699	-0,058	0,702	-0,057	0,768	-0,044	0,952	-0,009	0,597	-0,079
nb_cellexfo_matin	0,723	-0,050	0,568	-0,081	0,514	-0,093	0,528	-0,090	0,505	-0,095	0,536	-0,088	0,456	-0,106
nb_cellexfo_apoptotiques	0,405	-0,124	0,152	-0,213	0,171	-0,203	0,182	-0,198	0,179	-0,200	0,293	-0,157	0,117	-0,232
nb_cellexfo_ECapoptose	0,888	-0,021	0,784	-0,042	0,696	-0,059	0,688	-0,061	0,679	-0,063	0,712	-0,056	0,645	-0,070
TBm_matin	0,287	0,149	0,340	0,134	0,363	0,128	0,358	0,129	0,287	0,149	0,411	0,115	0,421	0,113
Caséines	0,298	-0,146	0,518	-0,091	0,385	-0,122	0,358	-0,129	0,347	-0,132	0,269	-0,154	0,412	-0,115
protéines solubles	0,227	-0,169	0,227	-0,169	0,201	-0,179	0,250	-0,161	0,182	-0,186	0,183	-0,186	0,190	-0,183
protéines totales	0,232	-0,167	0,389	-0,121	0,285	-0,150	0,281	-0,151	0,252	-0,160	0,200	-0,179	0,300	-0,145
ratio caséines/protéines solubles	0,588	0,076	0,489	0,097	0,495	0,096	0,589	0,076	0,485	0,098	0,488	0,097	0,485	0,098
Taux lactose	0,637	0,066	0,814	0,033	0,819	0,032	0,762	0,043	0,982	0,003	0,782	0,039	0,973	0,005
CEM	0,737	-0,047	0,873	-0,022	0,995	-0,001	0,868	-0,023	0,993	0,001	0,970	-0,005	0,989	-0,002
Leuco	0,522	-0,090	0,592	-0,075	0,434	-0,110	0,511	-0,092	0,425	-0,112	0,467	-0,102	0,520	-0,090
CEM mortes	0,573	-0,079	0,577	-0,078	0,538	-0,086	0,531	-0,088	0,517	-0,091	0,572	-0,079	0,555	-0,083
CEM mortes ROS +	0,929	0,013	0,862	-0,025	0,958	-0,007	0,888	-0,020	0,959	0,007	0,936	0,011	0,827	-0,031
CEM vivantes	0,169	0,192	0,137	0,207	0,083	0,240	0,080	0,243	0,066	0,255	0,091	0,234	0,079	0,243
CEM vivantes ROS +	0,509	0,093	0,444	0,107	0,214	0,141	0,326	0,138	0,310	0,142	0,328	0,137	0,316	0,140
Leuco vivants	0,814	0,033	0,897	0,018	0,665	0,061	0,685	0,057	0,661	0,062	0,703	0,054	0,753	0,044
Leuco vivants ROS+	0,959	-0,007	0,520	-0,090	0,615	-0,071	0,644	-0,065	0,638	-0,066	0,839	-0,029	0,499	-0,095
Leuco morts	0,814	-0,033	0,897	-0,018	0,665	-0,061	0,685	-0,057	0,661	-0,062	0,703	-0,052	0,753	-0,044
Leuco morts ROS+	0,554	-0,083	0,224	-0,170	0,229	-0,168	0,236	-0,165	0,286	-0,149	0,406	-0,117	0,169	-0,192

