



HAL
open science

Caractérisation de l'adaptation de la glande mammaire des vaches laitières à l'allongement de l'intervalle entre traites

Clémentine Charton

► **To cite this version:**

Clémentine Charton. Caractérisation de l'adaptation de la glande mammaire des vaches laitières à l'allongement de l'intervalle entre traites. Biologie animale. Agrocampus Ouest, 2017. Français. NNT : 2017NSARB292 . tel-01661382

HAL Id: tel-01661382

<https://theses.hal.science/tel-01661382>

Submitted on 11 Dec 2017

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

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

UNIVERSITE

BRETAGNE

LOIRE

AGRO
CAMPUS

OUEST

Clémentine CHARTON • 24 janvier 2017

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

ÉCOLE DOCTORALE • Vie - Agro - Santé (VAS)

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

Caractérisation de l'adaptation de la glande mammaire des vaches laitières à l'allongement de l'intervalle entre traites

Pierre Guy MARNET

Professeur, AGROCAMPUS OUEST, UP SPA / *président*

Didier BOICHARD

Directeur de recherche, INRA Jouy-en-Josas / *rapporteur*

Philippe LESCOAT

Professeur, AgroParisTech / *rapporteur*

Dominique POMIES

Ingénieur de recherche, INRA Clermont-Ferrand / *examineur*

Jocelyne FLAMENT

Maître de conférences, AGROCAMPUS OUEST, UMR INRA/AO
PEGASE / *directeur de thèse*

Hélène LARROQUE

Ingénieure de recherche, INRA Toulouse / *co-directrice de thèse*

.....
Nicolas FRIGGENS

Directeur de recherche, AgroParisTech / *membre invité*



THESE / AGROCAMPUS OUEST

Sous le label de l'Université Européenne de Bretagne
pour obtenir le diplôme de :

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

Spécialité : Biologie et Agronomie

Ecole Doctorale : Vie – Agro – Santé (VAS)

présentée par :

Clémentine CHARTON

**Caractérisation de l'adaptation de la glande mammaire des vaches laitières
à l'allongement de l'intervalle entre traites**

soutenue le 24 janvier 2017 devant la commission d'Examen

Composition du jury :

Didier BOICHARD, Directeur de recherches, INRA, Jouy-en-Josas
Philippe LESCOAT, Professeur, AgroParisTech, Paris
Pierre-Guy MARNET, Professeur, Agrocampus-Ouest, Rennes
Dominique POMIES, Ingénieur de recherches, INRA, Clermont-Ferrand
Nicolas FRIGGENS, Directeur de recherches, AgroParisTech, Paris
Jocelyne FLAMENT, Agrocampus-Ouest, Rennes
Hélène LARROQUE, INRA, Toulouse

Rapporteur
Rapporteur
Membre du jury
Membre du jury
Membre invité
Directrice de thèse
Co-directrice de thèse



Remerciements

En premier lieu, merci Jocelyne et Hélène pour votre encadrement. J'ai particulièrement apprécié de travailler avec vous à la fois pour votre rigueur scientifique et votre esprit bienveillant. Merci à toi Jocelyne pour ton soutien inconditionnel et pour ton esprit prolifique. Merci à toi Hélène pour ta patience et ton esprit de synthèse. J'ai eu de la chance d'avoir 2 directrices de thèse aussi impliquées que vous (en particulier lors de la dernière et douloureuse ligne droite !) et qui s'entendaient bien entre elles (un travail sans tension, la clef du succès !). Merci d'avoir 1) supporté une doctorante qui avait quand même un sérieux problème avec les deadlines (je vous jure que j'ai essayé jusqu'au bout de m'améliorer, mais je crois que j'ai encore du travail... beaucoup de travail ;-) et 2) d'avoir fait l'effort de vous rendre aussi disponibles malgré vos emplois du temps chargés ! Bref, je me répète, mais grâce à vous j'ai vécu ce travail de thèse davantage comme un travail d'équipe que comme une course en solitaire et ça, c'était le plus important pour moi !

Je remercie ensuite vivement Didier Boichard de l'INRA de Jouy-en-Josas et Philippe Lescoat d'AgroParisTech d'avoir accepté de consacrer du temps à l'évaluation de mon travail en tant que rapporteurs de cette thèse, ainsi que Dominique Pomiès de l'INRA de Clermont-Ferrand, Pierre-Guy Marnet d'Agrocampus-Ouest et Nicolas Friggens d'AgroParisTech d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je remercie également les membres de mon comité de thèse : Nicolas Friggens, Hélène Leclerc, Dominique Pomiès et mon tuteur, Mathieu Emily pour leurs conseils avisés, ainsi que pour les discussions constructives que nous avons eu lors de ces temps d'échange.

Merci à Jaap van Milgen et à Xavier Fernandez, D.U. respectifs des UMR PEGASE et GenPhySE pour m'avoir accueillie, ainsi qu'à Hélène Quesnel et Carole Moreno, responsables des équipes Lactation et GeSPR. Merci à vous de m'avoir notamment permis de participer à des congrès !

Je remercie l'INRA et la Région Bretagne pour le financement de ce travail de thèse, ainsi que l'association GALA.

La 1^{ère} série de données utilisée dans cette thèse est issue d'expérimentations menées à l'IE Vache Laitière de Méjusseaume. Je tiens donc à remercier toute l'équipe de Méjusseaume et en particulier Jacques Lassalas pour avoir permis la réalisation de cette série d'essais. Cette série d'expérimentation étant déjà achevée lors de mon arrivée en thèse, je n'ai pas eu l'occasion de fréquenter les personnes ayant contribué à la génération de mes données, qu'il s'agisse des données issues directement de l'élevage ou des dosages. Je remercie néanmoins vivement toutes les personnes qui ont contribué à la

réussite de ces essais. J'ai une pensée particulière pour Ginette T. et Michel F., que j'ai sollicités à de nombreuses reprises pour l'extraction de données ou pour des détails techniques. Merci pour votre patience et votre gentillesse !

La 2^{ème} série d'expérimentations utilisée lors de cette thèse a été mise en place à l'UE du Pin au Haras. Je remercie Yves Gallard pour avoir permis la réalisation de cette 2^{ème} série d'essais et pour m'avoir donné la chance de participer à la dernière série de ces expérimentations. Merci à Sarah Barbey et à tous les animaliers que j'ai pu côtoyer, en particulier merci de votre patience et de votre implication lors de la traite car l'expérimentation a quand même nécessité la collecte d'une quantité impressionnante d'échantillons ! Merci également à toutes les personnes ayant contribué aux dosages effectués sur ces échantillons.

Merci à Samuel et à Pierre-Alexandre, les 2 stagiaires qui ont travaillé sur mes données. Samuel, merci pour le dépouillement des données « taux de sécrétion ». Pierre-Alexandre (« le Bizuth ! »), merci pour ton travail sur les données du Pin. Cela a été un plaisir de travailler avec vous (et vous avez bien animé les pauses café également !).

Un grand merci également à Rachel Lefebvre de l'UMR GABI pour son aide apportée pour la partie génétique de ma thèse : merci d'avoir consacré du temps pour m'expliquer le fonctionnement de la chaîne de détection de QTL et merci d'avoir vaillamment supporté mon harcèlement mailistique !

Merci à Isabelle Paillet de la Chambre d'Agriculture du Finistère et aux éleveurs du groupe d'échange « monotraite » pour m'avoir permis de participer à une journée d'échange. Ce moment m'a vraiment permis de prendre conscience des enjeux autour de la pratique de la monotraite.

Je tiens à exprimer ma gratitude envers mes nouveaux collègues de l'ENSAT pour m'avoir permis d'aménager mon emploi du temps et de survivre à la gestion en parallèle du début des cours à l'ENSAT et de la fin de rédaction du manuscrit de thèse. Un merci tout particulier à Cécile, qui m'a sauvée sur la mise en page finale du manuscrit lors d'un épisode de mort cérébrale, à Amandine de m'avoir remplacée pour une relecture de rapports et à Corine pour m'avoir aidée sur la préparation d'un cours ! Merci également à Zulma, Hervé, Hélène, Nathalie, Katia et Corinne.

Ayant eu la chance d'effectuer ma thèse sur 2 sites, je peux également remercier 2 équipes de secrétaires de choc : tout d'abord l'équipe de Rennes, en particulier Laurence (pardon pour mes oublis répétés de badgeuse ... heureusement que mon départ à Toulouse y a mis un terme !!), merci à Christine puis à Laetitia pour avoir géré à distance mes déplacements ! Pour l'équipe de Toulouse, merci à Nancy pour la gestion de mes déplacements, à Viviane puis à Evelyne et enfin merci à Florence.

Merci à toute l'équipe de Rennes, que je connais depuis un petit moment maintenant (10 ans si les comptes sont bons). Merci particulièrement à Yannick et Luc : si vous ne m'aviez pas prise en stage à l'époque je n'aurais peut-être pas fait cette thèse ! Merci également à toute l'équipe d'Agrocampus : Clara, Marie-Emmanuelle, Arlette, Lucile, Vanessa, Justine, Jean-François, Catherine, Pierre-Guy : cette année à Rennes aura été très sympa, en grande partie grâce à vous. Anne-Lise, merci pour ces nombreuses soirées couture et séries ! Jacques merci pour ces moments de détente au labo (j'aurais aimé pouvoir faire des cupules en fin de thèse pour me détendre !) ; par contre j'ai développé une phobie pour les bombes à marquer les vaches, je ne me rappelle plus pourquoi ;-).

Nico (alias Bédère !), ça a vraiment été un plaisir de partager ton bureau pendant un an, même s'il est probable ($P < 0,05$) que nos efficacités respectives aient un chouia souffert (enfin ça c'était quand même amélioré quand j'ai compris que tu avais des conversations avec ton ordi). Merci d'avoir considérablement enrichi mon vocabulaire par des expressions fleuries (la Vendée, forcément ;-)), dont la principale « la pitié, c'est dégueulasse ! » a par la suite été largement diffusée à Toulouse !

Merci à toutes les personnes de Saint-Gilles que j'ai eu l'occasion de côtoyer lors de cette thèse. Les autres doctorants de Saint-Gilles : Amélie, Elise, Auriane, Lucile, Alice, Séverine, Magdalena et Arnaud (je suis sûre que j'oublie du monde, c'est la cata !) j'ai moins eu l'occasion de vous voir mais en tous cas, merci pour l'EAAP (et pour le mythique groupe facebook), c'était génial !

Hop, c'est parti pour Toulouse ! Merci à toutes les personnes qui ont pu m'aider au cours de cette thèse : je pense particulièrement à Christèle (Robert-Granié) : merci beaucoup pour ton aide en statistique ! Merci également à Rachel et à Carole pour votre aide sur l'interprétation des QTL !

Et maintenant, c'est le tour des doctorants (ou plutôt les « jeunes » (je sais que le choix du terme peut prêter à polémique ;-)) de Toulouse (allez, c'est parti, j'essaie de n'oublier personne) ! Momo, pour m'avoir permis de griller quelques adipocytes de manière ludique et pour m'avoir permis de sauvegarder mon dernier neurone le jour de la remise de manuscrit (il se porte bien depuis). Marjorie C. (Marjo) et (toujours) Momo, merci également pour votre aide précieuse à l'impression !! Mathilde, merci de m'avoir invité à une 1^{ère} soirée dès mon arrivée à Toulouse, c'était vraiment très cool ! Merci aussi pour toute cette émulation positive sur nos derniers mois de thèse (bon, pour la version non-officielle, pour avoir partagé des moments intenses à essayer de déterminer qui était dans la moins bonne posture (à présent je peux l'affirmer, c'était moi !). Merci à tous les autres jeunes « non lapins » : Pauline (merci encore pour mon bocal de cornichons polonais !), Charlotte, Valérie, Valentin, Marjorie (Momo la Frite), Céline, Yoannah, Sophie B., Maxime, Mathieu (merci pour les clustering !), Marc, Hung, Sophie A, Claire.

Pour les personnes du « couloir des lapins » : Béa (la sauveuse de mon litchi !), Mumu, Laurent (Maître Cauquil !), Caroline, Olivier, Sylvie, Géraldine, Laurence, Carole, Thierry : merci beaucoup de m'avoir acceptée durant les pauses café et les midis ! C'était vraiment chouette, et je compte bien continuer de venir vous embêter ! Tehya, merci pour le coaching sportif (et pour m'avoir définitivement convaincue que les leggings, c'est pas possible !). Grâce à toi j'ai réussi les 8 kilomètres et ça c'était pas gagné ! Yayu, je te souhaite une bonne dernière année de thèse ! Célinou (Félinra ;-)) tu m'as bien fait rire (et j'espère que ça va continuer) plein de bonnes choses pour 2017 ! Manuela (même si tu n'es pas du couloir des lapins à proprement parler, merci pour les midis quand même !). Malo, merci pour ces quelques pauses café !

Héloïse Legendre (is Legend ! oui c'était absolument nécessaire) je n'oublierai jamais que ton soutien m'a permis d'assumer jusqu'au bout une présentation vantant les mérites de la montraite à l'aide de slogans d'un goût douteux (« avec la montraite, j'ai besoin de moins de bras »). Je te souhaite tous les plus beaux parasites (avec des sombreros, bien entendu ;-))

Christelle, CK, mon petit ahlala, que dire de toi ? Merci pour tout (il y a trop de choses à dire donc je ne détaillerai pas ; je crois que « Gnéeéééé » résume à peu près tout). Promis, je ne dirai plus devant un public non averti que je travaille sur la « mamelllllle ! ». Par contre le « J'ai un sushi, je crois que je te nem beaucoup #hyéroglyphehyéroglyphe » va rester... Cette dernière phrase est également valable pour ton acolyte de bureau, Davi ! Davi merci également pour avoir consacré du temps à relire la partie « adaptabilité » de ma thèse. C'était vraiment sympa.

Merci aux amies, Marie, Clarisse, Mélanie, Clélia et en particulier à toi, Marianne. J'ai lu l'autre jour sur Yahoo actualités (c'est dire si la source est sûre) qu'une amitié qui dure plus de 7 ans est susceptible de durer toute la vie, donc ça se tente !

그리고, 순호, 고마워 ! 이제 한국어 공부할거야 (많이 많이), 약속해 !

Enfin, merci à toute la famille et plus particulièrement à mes parents et à ma soeur ! Les remerciements de thèse sont la 1^{ère} (et seront sans doute la seule) occasion que j'aurai d'effectuer ce genre d'exercice, mais franchement, oulàlà, c'est pas facile ! Merci pour votre soutien depuis 28 ans (non pas bientôt 29, je suis à l'âge où on commence à essayer de ralentir le temps) ! Merci de m'avoir donné tous les éléments qui m'ont permis d'en arriver là aujourd'hui ! Sophie, je tenais à te dire que tu peux être fière de tout ce que tu as réussi à accomplir jusqu'à présent, et que ce n'est que le début (j'attends de pied ferme de te voir parler en luxembourgeois, même si je ne vais pas comprendre grand-chose) ! Je remercie mes 2 fidèles relectrices pour leur travail acharné (oui oui, c'est bien vous !) ; promis, vous n'aurez plus un tel parpaing au contenu plus ou moins obscur à relire ! Bon, et comme je

sais que ça va être dur parce que vous vous y êtes habitués, je préfère vous préparer psychologiquement au fait que je risque de vous parler moins fréquemment de glande mammaire et de monotraite. Enfin, qui sait ?!

« Tenter, c'est prendre le risque d'échouer, mais ne rien tenter, c'est choisir d'échouer ».

Pensées de la douche, J-9 avant la remise de manuscript, 23h11

Arrivée à ce stade, je prends la liberté - non rigoureuse d'un point de vue scientifique mais parfaitement assumée - de ne pas vérifier 1) que cette phrase soit vraiment logique et 2) (encore moins excusable), que quelqu'un de connu ne l'a pas formulée avant moi.

Ces travaux de thèse ont fait l'objet des publications et communications suivantes :

Articles scientifiques de rang A

Accepté

CHARTON C., LARROQUE H., ROBERT-GRANIE C., POMIES D., CROISEAU-LECLERC H., FRIGGENS N. et GUINARD-FLAMENT J., 2016. Individual responses of dairy cows to a 24h milking interval., *Journal of Dairy Science*, Vol. 99 No. 4, pp 3103-3112.

En préparation

CHARTON C., LARROQUE H., POCHET S., GERMON P., LEQUEUX G. et GUINARD-FLAMENT J. Response profiles of dairy cows to a single 24h milking interval in relation with milk proteolysis, udder compliance and immune traits.

Estimation of genetic parameters for milk production traits in response to a 3-wk once-daily milking period in crossbred Holstein × Normande dairy cows.

A GWAS study for milk production traits in response to a 3-wk once-daily milking period in crossbred Holstein × Normande dairy cows.

Communications en congrès internationaux

CHARTON C., LARROQUE H., ROBERT-GRANIE C., POMIES D., CROISEAU-LECLERC H., FRIGGENS N. et GUINARD-FLAMENT J. Assessment of the mammary gland elasticity in dairy cows by using a single day once-daily milking, EAAP, 31 août – 4 septembre 2015, Varsovie.

CHARTON C., LARROQUE H. et GUINARD-FLAMENT J. Profiles of mammary gland adaptability and associated traits in dairy cows when using a 24-h extended milking interval, EAAP, 29 août – 2 septembre 2016, Belfast.

Autres communications

CHARTON C. Characterization and modelling of dairy cows' mammary gland adaptation to extended milking intervals. 17ème séminaire des thésards du Département de Génétique Animale, 23 et 24 avril 2014, INRA Centre de Jouy-en-Josas , poster.

CHARTON C., FLAMENT J., LARROQUE H., Adaptation de la glande mammaire des vaches laitières à l'allongement de l'intervalle entre traites ; XIVème Journée de l'Animation transversale « Glande mammaire, lait », 17 novembre 2015, Paris ; présentation d'une communication orale.

Glossaire

24h-MI : 24-hour Milking Interval (intervalle de traite unique de 24 h)

ACP : Analyse en Composante Principale (=PCA : Principal Component Analysis)

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AG : Acide Gras

AI-REML : Average Information REstricted Maximum Likelihood

ANOVA : ANalysis Of Variance (analyse de variance)

ARNm : Acide RiboNucléique messenger

Bax : protein Bcl-2 associated X (protéine pro-apoptotique de la famille de Bcl-2, gène = *BAX*)

Bcl-2 : protein B-cell lymphoma 2 (protéine du lymphome à cellules B 2, protéine anti-apoptotique de la famille de Bcl-2, gène = *BCL2*)

BCLEO : Bretagne Conseil ELevage Ouest

BHBA : β -hydroxybutyrate (= acide β -hydroxybutyrique)

BLUP : Best Linear Unbiased Prediction (meilleure prédiction linéaire sans biais)

BSA : Bovine SerumAlbumine (sérumalbumine bovine)

BTSA : Brevet de Technicien Supérieur Agricole

CCS : Comptage des Cellules Somatiques

CEM : Cellules Epithéliales Mammaires

CSN1S1 : Gène codant pour la caséine α S1

cTDM : control Twice-Daily Milking (moyenne des valeurs sur la semaine précédant la monotraite)

CV : Coefficient de Variation

DL : Déséquilibre de Liaison

DGAT1 : Gène codant pour la diacylglycérol O-acyltransférase

EBE : Excédent Brut d'Exploitation

ECM : ExtraCellular Matrix (matrice extracellulaire)

EGTA : Ethylene Glycol-bis(β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-Tetraacetic Acid (agent chélateur de cations, en particulier de Ca^{2+})

ET : Ecart-Type

FAK : Focal Adhesion Kinase (protéine cytoplasmique, activée par les intégrines et qui permet l'adhésion des protéines du complexe d'adhérence)

Fas : protein Apoptosis Stimulation Fragment (protéine fragment inducteur d'apoptose)

FIL : Feedback Inhibitor of Lactation (facteur inhibiteur de la lactation)

GH : Growth Hormone (hormone de croissance)

Holstein : Prim'Holstein

IE : Installation Expérimentale

IFN- γ : InterFeroN gamma (interféron gamma)

IGF-1 : Insulin-like Growth Factor-1 (facteur de croissance 1 ressemblant à l'insuline)

IL-8 : InterLeukin-8 (interleukine-8)

LA : Linkage Analysis (analyse de liaison)

LD : Linkage Disequilibrium analysis (analyse du déséquilibre de liaison)

LDLA : Linkage Disequilibrium Linkage Analysis

LIC : Livestock Improvement Corporation

MG : quantité de Matières Grasses

MMP : Matrix MetalloProteases (métalloprotéases de la matrice)

MP : quantité de Matières Protéiques

MSI : Matière Sèche Ingérée

NEC : Note d'Etat Corporel

NFS : Numération Formule Sanguine

ODM : Once-Daily Milking (moyenne des valeurs sur la période de monotraite)

PMN : PolyMorphonucléaires Neutrophiles

PRL : PRLactine

pTDM2 : post Twice-Daily Milking (moyenne des valeurs sur la deuxième semaine après le retour à deux traites par jour)

QTL : Quantitative Trait Locus(i) (loci impliqués dans la variation des caractères quantitatifs)

REML : REstricted Maximum Likelihood (maximum de vraisemblance restreinte)

SCS : Somatic Cell Score (score de cellules somatiques)

SEM : Standard Error of the Mean (erreur-type de la moyenne)

SNP : Single Nucleotide Polymorphism (polymorphisme mononucléotidique)

STAT5A : Signal Transducer and Activator of Transcription 5A (gene codant pour le facteur de transcription *STAT5A*)

STAT5B : Signal Transducer and Activator of Transcription 5B (gene codant pour le facteur de transcription *STAT5B*)

TB : Taux Butyreux

TGF β -3 : Transforming Growth Factor β -3 (facteur de croissance transformant de type β)

THS : Taux Horaire de Sécrétion

TP : Taux Protéique

UDP-galactose : Uridine DiPhosphate-galactose

UE : Unité Expérimentale

Sommaire

Introduction générale	1
Synthèse bibliographiques	7
Chapitre 1 : Adaptabilité : étude des processus adaptatifs	9
1. Définition des concepts	9
2. Représentations de l'adaptabilité dans le cadre de la modélisation	10
3. Quantification de l'adaptabilité d'un animal	13
Chapitre 2 : Anatomie de la glande mammaire et synthèse du lait	19
1. Anatomie de la glande mammaire : structure et fonction des différents tissus	19
2. La synthèse du lait	22
3. Déroulement d'un cycle de lactation et régulations hormonales sous-jacentes.....	30
Chapitre 3 : Intervalles de traites allongés et monotraite	35
1. Quelles pratiques ? Quelle représentativité en France et ailleurs ?	35
2. Effets moyens de la monotraite selon sa durée d'application et la conduite alimentaire	36
3. Etude de la variabilité interindividuelle des réponses à la monotraite	46
Chapitre 4 : Mécanismes mis en jeu lors de l'allongement de l'intervalle entre traites	51
1. Phase aiguë d'adaptation et réponses précoces	51
2. Phase chronique d'adaptation et mécanismes impliqués	56
Objectifs et démarche de la thèse	61
Choix du modèle de perturbation de la glande mammaire	64
Choix des critères utilisés pour décrire la réponse adaptative des animaux	65
1. Composantes de la réponse adaptative	65
Etude des facteurs phénotypiques et génétiques de l'adaptabilité de la glande mammaire	66
1. Facteurs phénotypiques	66
2. Facteurs génétiques.....	68
Dispositifs expérimentaux	69
1. Intervalle de traite unique de 24h	71
2. Trois semaines de monotraite : étude du déterminisme génétique	72
Résultats expérimentaux	77
Partie 1 : Caractérisation des réponses à un intervalle de traite unique de 24h et identification de déterminants de cette réponse	79
1. Réponses moyennes et variabilité individuelle des réponses des vaches laitières à un intervalle de traite unique de 24h	80
2. Repérage de nouveaux phénotypes prédicteurs et profils adaptatifs.....	91

Partie 2 : Caractérisation des réponses à trois semaines de monotraite, étude du déterminisme génétique et de la représentativité du premier intervalle de 24 h.....	107
Préambule : Quelques notions de génétique quantitative.....	108
1. Déterminisme génétique des réponses à trois semaines de monotraite et représentativité du premier intervalle de traite de 24 h	120
2. Identification de régions du génome impliquées dans les réponses à 3 semaines de monotraite	135
3. Profils adaptatifs des réponses à trois semaines de monotraite.....	155
Discussion générale.....	159
Partie 1 : Mise en évidence de différents profils adaptatifs de la glande mammaire	162
1. L'allongement de l'intervalle entre traites de 24 h est-il un modèle de perturbation pertinent pour étudier l'adaptabilité de la glande mammaire ?.....	162
2. L'allongement de l'intervalle de traite permet-il de discriminer des profils types de réponse ?	163
3. Les mêmes types de profils adaptatifs sont-ils observés selon les deux modalités de perturbation testées : intervalle de 24 h unique ou répété ?.....	163
4. La glande mammaire est-elle un système déformable de type élastique, flexible ou plastique ? . ..	166
Partie 2 : Les profils adaptatifs sont-ils explicables à l'aide d'indicateurs phénotypiques ?.....	167
1. Contexte.....	167
2. Choix des phénotypes étudiés	168
3. Quel est le lien entre les réponses de production laitière et le niveau initial de production ainsi que la composition du lait ?	170
4. Quelle est l'influence du stade physiologique sur les réponses ?	171
5. Influence des phénotypes complémentaires sur les réponses adaptatives de la glande mammaire	173
Partie 3 : Des réponses adaptatives en partie génétiquement contrôlées.....	176
1. A quel point la génétique de l'animal détermine-t-elle le niveau de production laitière lors de l'allongement de l'intervalle entre traites, et les réponses adaptatives ?	176
2. Les zones génomiques identifiées à deux traites par jour ont-elles le même impact lors de la monotraite ? Qu'en est-il des réponses adaptatives ?	177
3. Existe-t-il des prédicteurs génétiques à l'adaptabilité de la glande mammaire ?	179
Conclusions et perspectives	183
Références	189
Annexes	209
Annexe 1 : Omission d'une traite et taux horaire de sécrétion jour-nuit.....	211
Annexe 2 : Débit moyen d'émission du lait à la traite et de la lactosémie lors de la monotraite	220

Liste des tableaux

Synthèse bibliographique

Chapitre 2 : Anatomie de la glande mammaire et synthèse du lait

Tableau 1. Comparaison de la composition du lait de plusieurs espèces de mammifères.	23
Tableau 2. Composition en lipides du lait de vache.	24
Tableau 3. Composition du lait de vache en protéines.	25
Tableau 4. Principales hormones impliquées dans le contrôle du développement de la glande mammaire. (Jammes and Djiane, 1988)	31

Chapitre 3 : Intervalles de traites allongés et monotraite

Tableau 5. Synthèse des variations de production laitière et de la composition du lait sous l'effet de la monotraite, en fonction du stade de lactation, de la durée d'application et des spécificités de l'essai.	38
--	----

Résultats expérimentaux

Partie 1 : Caractérisation des réponses à un intervalle de traite unique de 24 et identification de déterminants de cette réponse

Article 1

Table 1. Number of observations, year, month, feeding conditions, parity and stage of lactation per cohort.....	82
Table 2. Milk absolute and relative loss when switching from twice-daily milking control period to 24h milking interval, milk recovery and rate of milk recovery when switching back from 24h-MI to twice-daily milking.....	85
Table 3. Least Square Means of period effect in model 1 on corrected milk yield and composition corrected from variations expected in the course of lactation.....	85
Table 4. Pearson correlations between milk yields during experimental periods, and milk yield losses or recoveries and recovery:loss ratio expressed as absolute or relative variations.....	86
Table 5. Effect of cow's potential milk yield level on absolute and relative milk yield loss, milk recovery and rate of milk recovery.....	88
Table 6. Effects of the interactions between stage of lactation and parity on absolute and relative milk yield loss and milk yield recovery.....	88
Table 7. Effects of stage of lactation and parity on milk yield recovery:loss ratio.....	89

Article 2

Table 1. Number of data for each trait per cohort and measured trait groups.....	93
Table 2. Effect on traits of 24h milking interval compared to control period twice-daily milking.....	97
Table 3. Estimates and effects of relative increase in sum of teat distances, initial evening milk average flow rate and increase in evening milk average flow rate on absolute and relative milk yield loss and recovery corrected for stage of lactation, parity, potential milk yield level and effect of the cow.....	98

Table 4. Characteristic yield responses and associated environmental factors, qualitative traits and quantitative traits of the three cow profiles identified by clustering the yield responses.....	100
---	-----

Partie 2 : Caractérisation des réponses à 3 semaines de monotraite, étude du déterminisme génétique et de la représentativité du 1^{er} intervalle de 24h

Article 3

Table 1. Mean and standard deviations of milk yield and composition and milk yield variations when switching cows from control twice-daily milking period to once-daily milking and switching them back to twice-daily milking.....	124
--	-----

Table 2. Least square means of experimental period control twice-daily milking period, once-daily milking and post twice-daily milking on milk yield and composition traits.....	125
---	-----

Table 3. Estimates of genetic variance, coefficient of genetic variation and heritability for milk yield and composition during control twice-daily milking period, d1 and 3-wk of once-daily milking and second wk after resuming twice-daily milking with their respective standard errors of the mean.....	126
--	-----

Table 4. Phenotypic and genetic correlations of each trait measured between control twice-daily milking and 3-wk once-daily milking, between 3-wk ODM and wk 2 after resuming twice-daily milking and between cTDM and PTDM2.....	127
--	-----

Table 5. Estimates of genetic variance, coefficient of genetic variation and heritability for milk yield loss when switching cows from twice-daily milking control period to once-daily milking and for milk recovery and milk recovery:loss ratio when switching cows back to twice-daily milking.....	127
--	-----

Table 6. Estimates of genetic and phenotypic correlations for milk yield responses traits when switching cows from control twice-daily milking period to 3-wk once-daily milking and switching them back to twice-daily milking.....	128
---	-----

Table 7. Estimates of phenotypic and genetic correlations between milk yield and composition during control twice-daily milking period and between cTDM milk yield and milk yield responses to once-daily milking.....	128
---	-----

Table 8. Phenotypic and genetic correlations between milk yield and composition during d1 of once-daily milking and milk yield and composition during control twice-daily milking period or 3-wk once-daily milking.....	129
---	-----

Table 9. Phenotypic and genetic correlations between d1 of once-daily milking and 3-wk ODM absolute milk yield losses and between ODM d1 and 3-wk ODM relative milk yield losses.....	129
--	-----

Article 4

Table 1a. Milk yield and composition variations during control twice-daily milking period, the first day of once-daily milking, the 3-wk once-daily milking period and wk-2 post resuming twice-daily milking.....	138
---	-----

Table 1b. Milk yield loss and recovery when switching cows from twice-daily milking to 3-wk once-daily milking and when switching them back to TDM, respectively.....	138
--	-----

Table 2. Significant chromosomic regions detected from GWAS for milk yield during experimental periods.....	139
--	-----

Table 3. Significant chromosomic regions detected from GWAS for milk fat content during experimental periods.....	141
Table 4. Significant chromosomic regions detected from GWAS for milk protein content during experimental periods.....	143
Table 5. Significant chromosomic regions detected from GWAS for milk lactose content during experimental periods.....	145
Table 6. Significant chromosomic regions detected from GWAS for milk yield responses to once-daily milking..	147

Profils adaptatifs des réponses à 3 semaines de monotraite

Tableau 1. Caractéristiques des groupes de profils de réponse de production laitière à une période de monotraite de 3 semaines.....	157
--	-----

Liste des figures

Synthèse bibliographique

Chapitre 1 : Adaptabilité et étude des processus adaptatifs

- Figure 1.** L'articulation homéorhèse-homéostase dans l'espace des paramètres physiologiques, aspects dynamiques (d'après Martin, 2009)..... 11
- Figure 2.** L'articulation homéorhèse-homéostase dans l'espace des paramètres physiologiques, vue statique (ou en coupe) et principe de la gouttière..... 11
- Figure 3.** Représentation schématique des types de trajectoires adaptatives : variation au cours du temps de la réponse comportementale et/ou physiologique du système sous l'effet d'une contrainte (d'après Alcaras et Lacroux, 1999)..... 12
- Figure 4.** Illustration de 2 scénarios de compromis entre fonctions biologiques, dû : A) à une ressource environnementale limitée, B) à l'atteinte d'un plafond physiologique (Phocas et al. (2014) adapté de Friggens and van der Waaij (2009))..... 16

Chapitre 2 : Anatomie de la glande mammaire et synthèse du lait

- Figure 5.** Anatomie de la glande mammaire de vache. 19
- Figure 6.** Structure de l'alvéole mammaire. D'après (Delouis et Richard, 1991). 20
- Figure 7.** Représentation schématique d'une cellule épithéliale mammaire. 22
- Figure 8.** Evolution de la balance prolifération / apoptose et de l'activité des MMP (matrix Metalloproteases) au cours d'une lactation. D'après (Stefanon et al., 2002). ECM : Matrice extracellulaire. 28
- Figure 9.** Facteurs influençant l'apoptose mammaire durant la lactation et l'involution. D'après (Stefanon et al., 2002) 29
- Figure 10.** Schéma du développement de la glande mammaire au cours de la vie de l'animal. D'après (Jammes et Djiane, 1988) 31
- Figure 11.** Relation entre la durée de la période de monotraite, appliquée dès le vêlage, et la perte de matières grasses et protéiques du lait (pourcentage de la production en traite biquotidienne. (Stelwagen et al., (2013) d'après les données de Phyn et al., (2010)) 40

Chapitre 4 : Mécanismes mis en jeu lors de l'allongement de l'intervalle entre traites

- Figure 12.** Mécanismes impliqués dans la diminution de la production laitière et les changements de composition du lait en réponse à l'allongement de l'intervalle entre traites. Adapté d'après Davis et al., (1999) 52
- Figure 13.** Quantités de lait alvéolaire et citernal dans les glandes mammaires de vaches soumises à 4 intervalles de traite différents. (Davis et al., 1999) 53

Objectifs et démarche de thèse

Figure 14. Pertes de lait (en kg/j et % (groupes de couleur)) au passage en monotraite en fonction de la production laitière initiale (d'après (Rémond and Pomiès, 2005)). 66

Dispositifs expérimentaux

Figure 15. Schéma expérimental de l'expérimentation « omission d'une traite sur une seule journée ». 71

Figure 16. Schéma du dispositif expérimental de détection de QTL en croisement Holstein x Normande de l'UE du Pin au Haras et positionnement des animaux de l'expérimentation monotraite. 74

Figure 17. Schéma expérimental des 2 phases de l'expérimentation monotraite effectuée à l'UE du Pin au Haras. 75

Résultats expérimentaux

Partie 1 : Caractérisation des réponses à un intervalle de traite unique de 24 et identification de déterminants de cette réponse

Article 1

Figure 1. Individual milk yield loss and recovery of cows 2 weeks after a 24h-MI87

Figure 2. Time course of milk yield according to stage of lactation during experimental periods89

Article 2

Figure 1. Variables factor map of the PCA built on the control period milk yield and on milk yield responses to the 24h milking interval.....99

Figure 2. Clustering of cows based on the results of the PCA.....99

Partie 2 : Caractérisation des réponses à 3 semaines de monotraite, étude du déterminisme génétique et de la représentativité du 1^{er} intervalle de 24h

Préambule

Figure 18. Les composantes du génotypes d'après Minvielle (1990). Deux paires de chromosomes sont représentés portant pour l'un 2 gènes (P et R, existant sous 2 formes alléliques, 1 et 2) et pour l'autre 1 gène (Q, existant sous une forme allélique). 110

Figure 19. Héritabilité de la production laitière, des quantités et des taux de matières grasses et de protéines du lait et des comptages cellulaires du lait au cours des 3 premières lactations, d'après Druet et al. (2005) 116

Figure 20. Dispositifs de recherche de QTL à l'aide de marqueurs. (Boichard et al., 1998) 119

Article 4

Figure 1. Chromosome-wide plot of the SNPs on chromosome 14 for milk yield during experimental periods....140

Figure 2. Chromosome-wide plot of the SNPs on chromosome 14 for milk fat content during experimental periods142

Figure 3. Chromosome-wide plot of the SNPs on chromosome 14 for milk protein content during experimental periods144

Figure 4. Chromosome-wide plot of the SNPs on chromosome 6 for milk lactose content during experimental periods146

Figure 5. Genome-wide manhattan plot of the SNPs for milk yield responses to 3-wk ODM148

Profils adaptatifs des réponses à 3 semaines de monotraite

Figure 1. Cercle des corrélations de l'ACP dans le plan des composantes 1 et 2 et des composantes 3 et 4156

Figure 2. Clusters obtenus à partir de la classification hiérarchique réalisées sur les résultats de l'ACP156

Discussion générale

Figure 21. Différents profils adaptatifs observés lors de l'intervalle de traite unique de 24h.. 165

Figure 22. Différents profils adaptatifs observés lors de 3 semaines de monotraite. 165

Introduction générale

Au cours des Trente Glorieuses, l'intensification de l'agriculture dans un but d'augmentation des productions s'est traduite par le développement de techniques et de conduites d'élevage visant à contrôler et optimiser les conditions de milieu afin de maximiser l'expression du potentiel des animaux notamment des vaches laitières (Béguin et al., 2011). En d'autres termes, la pérennité de ces systèmes d'élevage reposait sur leur affranchissement vis-à-vis des aléas du milieu environnant afin de maximiser les performances de production des animaux et les performances technico-économiques de l'exploitation. Ces systèmes sont aujourd'hui remis en cause à la fois en raison de leur impact environnemental (rejets d'effluents d'élevage, de CO₂, déforestation au Brésil pour assurer la production de soja...), mais également en raison d'un contexte fluctuant aussi bien d'un point de vue économique (volatilité du cours de matières premières, dont des concentrés et correcteurs azotés), que climatique (multiplication d'aléas climatiques intenses tels que sécheresses ou inondations) et sociologique (conditions de travail de l'éleveur, attentes des consommateurs) (Sidot et al., 2005; Delaby et Peyraud, 2009; Aubron et al., 2010). En d'autres termes, la maximisation de la production laitière, notamment via l'emploi de rations à haute densité énergétique ne garantit pas ou plus l'amélioration du revenu des exploitations, et les systèmes consistant à adapter le milieu à l'animal ont rencontré leurs limites (Delaby and Peyraud, 2009). A côté, d'autres systèmes d'élevage, souvent à bas intrants, se sont développés. Ils ont montré leur capacité à allier performances économiques et environnementales (Grignard et al., 2013; Monteix et al., 2015). Ces systèmes à bas intrants reposent surtout sur des logiques d'autonomie et/ ou de minimisation des coûts de production. Pour ces systèmes, l'expression du potentiel productif n'est pas une fin en soi et les pratiques et conduites évoluent selon des perturbations (climatiques, économiques, sanitaires, sociales) peu ou pas prévisibles qui peuvent se répéter et se cumuler dans le temps (Blanc et al., 2013). En fonction de l'occurrence de ces perturbations, deux cas de figure peuvent alors se présenter. Dans le cas où la diversité et l'intensité des perturbations subies par l'élevage sont faibles, la pérennisation de l'activité d'élevage sera maximale avec un troupeau homogène, composé de vaches adaptées à ces perturbations. En revanche, si la gamme de perturbations subies par l'élevage est variée, disposer d'animaux correspondant à différents types ou profils adaptatifs au sein du troupeau permettra de tamponner les variations de production à l'échelle du troupeau et constituera donc une source de robustesse pour l'élevage (Blanc et al., 2013). Dans les deux cas de figure, évaluer l'adaptabilité à l'échelle de l'animal est un prérequis fondamental à l'évaluation de la robustesse du troupeau et de l'élevage (Blanc et al., 2013).

La caractérisation de l'adaptabilité d'un animal est un préalable à l'identification puis à la sélection d'animaux adaptables. Cette caractérisation n'est néanmoins pas aisée en raison de la complexité des

organismes animaux. En effet, l'adaptabilité d'un animal d'élevage résulte de l'adaptabilité de chacune des différentes fonctions exprimées chez cet animal (telles que la production de lait, la croissance, la reproduction, ou la santé), fonctions qui dépendent elles-mêmes de mécanismes physiologiques complexes à différentes échelles (organes, cellules, métabolites). De plus, lorsque les ressources (souvent alimentaires) sont insuffisantes pour assurer de manière concomitante l'expression de l'intégralité du potentiel de production et la préservation des fonctions vitales, on observe des compromis entre les différentes fonctions (par exemple entre la fonction de reproduction et la fonction de lactation chez la vache laitière) (Phocas et al., 2014). La connaissance de ces compromis, qui évoluent au cours de la vie des animaux est encore à l'heure actuelle très imparfaite (Phocas et al., 2014) et limite le développement d'approches intégrées de type modélisation systémique pour estimer la capacité adaptative d'un animal.

Une autre stratégie consiste à aborder partiellement l'adaptabilité de l'organisme *via* la description de l'adaptabilité de la fonction pour laquelle les animaux ont fait l'objet d'une sélection spécifique (exemple : la lactation chez la vache laitière) en raison de son caractère prioritaire pour l'organisme. Il s'agit alors de décrire la diversité des réponses adaptatives individuelles possibles, d'une part par la détermination des bornes maximales de déformation et de résilience de cette fonction (limites adaptatives), et d'autre part par la caractérisation de la répartition des réponses dans l'espace défini par ces bornes. La glande mammaire étant l'organe responsable de la production du lait, chez la vache laitière, l'adaptabilité de la fonction de lactation repose en grande partie sur la capacité de cet organe à se déformer lors de perturbations.

Il est possible de caractériser le potentiel adaptatif en perturbant le fonctionnement du système concerné, dans notre cas la glande mammaire, à l'aide d'un challenge. Pour être efficace, cette perturbation doit permettre de générer des réponses importantes et variables d'un individu à l'autre afin de pouvoir discriminer ces derniers. Nous avons fait l'hypothèse (dont les raisons seront explicitées ultérieurement dans ce document) que la monotraite serait une perturbation correspondant à ces attentes. La monotraite consiste en une réduction de la fréquence de traite à une fois par jour, cette dernière étant traditionnellement réalisée deux fois par jour.

L'objectif de cette thèse débutée en novembre 2013 était de caractériser l'adaptabilité de la glande mammaire des vaches laitières puis d'identifier les éventuels déterminants de cette adaptabilité en utilisant la monotraite en tant que perturbation. Ce travail est présenté en quatre parties dans ce document.

La partie bibliographique resitue tout d'abord les différentes notions liées au concept d'adaptabilité ainsi que les enjeux autour de son évaluation. La partie suivante rappelle les notions de base sur

l'anatomie de la glande mammaire et la synthèse du lait, nécessaires à la compréhension du document. Le troisième chapitre présente les effets moyens et la variabilité de la production de lait en réponse à la monotraite, afin de justifier le choix de cette perturbation dans l'évaluation de l'adaptabilité de la glande mammaire. Enfin, le quatrième chapitre de cette bibliographie dresse un état des lieux des connaissances sur les mécanismes impliqués dans la réponse de la glande mammaire à la monotraite.

Après la définition des objectifs de la thèse et des stratégies expérimentales mises en place, la première partie des résultats caractérise l'adaptabilité de la glande mammaire et de la production laitière à un unique intervalle de traite de 24 h. Les critères phénotypiques associés à la variabilité de cette adaptabilité (« profils adaptatifs ») sont également décrits. Ces résultats sont présentés sous la forme de deux articles, dont le premier est paru dans la revue américaine *Journal of Dairy Science* et dont le second est à soumettre.

La deuxième partie des résultats présente les réponses adaptatives et l'étude du déterminisme génétique des réponses de la glande mammaire à trois semaines de monotraite, ainsi qu'une première identification de régions génomiques impliquées dans ces réponses. Ces résultats font l'objet de deux articles à soumettre et de résultats complémentaires.

Le document s'achève par une discussion générale qui reprend les principaux résultats obtenus pendant ces trois années et les met en perspective.

Synthèse bibliographique

Chapitre 1 : Adaptabilité : étude des processus adaptatifs

La notion d'adaptation se décline de multiples façons et fait appel à des concepts et méthodologies différentes. Les objectifs de cette partie sont de resituer ces différents concepts, d'exposer des représentations possibles de l'adaptabilité et finalement de présenter les différentes facettes de son estimation.

1. Définition des concepts

Les notions d'adaptabilité, de robustesse et de rusticité sont des notions voisines, parfois utilisées de manière interchangeable et pour lesquelles plusieurs définitions ont été proposées. Le but est ici de clarifier l'usage au sens large de ces définitions, puis de les appliquer au cas particulier des animaux d'élevage.

Deux grandes définitions de la notion d'adaptabilité ont été proposées. La première est directement liée à la notion de sélection naturelle. En effet, au sens évolutionniste du terme, l'adaptabilité au milieu désigne l'adéquation de l'organisme à son environnement en tant que faculté essentielle à sa survie. Comme l'exprimait Charles Darwin : *"It is not the strongest of the species that survives, or the most intelligent; it is the most capable of change"*. L'adaptabilité est donc considérée comme un résultat, ou une sanction de la sélection naturelle. Une deuxième définition considère l'adaptabilité comme un processus constitué d'un ensemble de transformations s'opérant au niveau de l'individu ou de l'espèce et qui vont permettre l'adéquation de l'organisme à son milieu (Alcaras and Lacroux, 1999; Blanc et al., 2010). C'est cette deuxième signification, focalisée sur la capacité des systèmes à se déformer pour répondre aux contraintes environnementales, que nous privilégierons dans cette thèse.

Les termes « robuste » et « rustique » sont quant à eux employés pour résumer les caractéristiques adaptatives d'un système. Le terme de « robustesse » a fait l'objet de nombreuses définitions allant des plus pragmatiques (mais simplistes) aux plus exhaustives (mais non opérationnelles) (Phocas et al., 2014). La robustesse est liée à une notion de survie de l'animal dans son milieu environnant : dans le cas des animaux sauvages, la notion de robustesse va s'appliquer aux individus qui seront capables de survivre (maintenir leur santé) et de se reproduire. Chez les animaux d'élevage, Knap (2005) définit la robustesse comme la capacité pour un animal d'exprimer son potentiel de production dans une large gamme d'environnements sans pour autant compromettre sa reproduction, sa santé et son bien-être. En d'autres termes, la survie de l'animal dans un système d'élevage est non seulement déterminée par son aptitude à se reproduire et à maintenir sa santé dans des conditions environnementales fluctuantes, mais également à assurer un niveau de production compatible avec les exigences du système de production (économique, technique...). La robustesse peut aussi se décliner à l'échelle

beaucoup plus restreinte d'un caractère de production (exemple : quantité d'œufs ou de lait produite) (Phocas et al., 2014).

Enfin, un animal rustique fait référence à un animal peu affecté par des contraintes extérieures en raison de son faible niveau d'exigences (Sauvant and Martin, 2010). A l'inverse de la notion de robustesse appliquée aux animaux d'élevage, la notion de rusticité ne comporte pas de référence au maintien d'un niveau de production par l'animal.

2. Représentations de l'adaptabilité dans le cadre de la modélisation

Quel que soit leur niveau d'échelle, les systèmes (exploitation agricole ou organisme biologique : animal, organe, cellule...) peuvent être caractérisés par leur structure (frontière, éléments qui le composent et interactions), par leur finalité (ou stratégie), par leur état (statique ou dynamique) et par les flux qui les traversent. Chaque caractère d'un système (par exemple la production de lait ou la croissance dans le système « vache laitière ») possède sa propre trajectoire de réponse au cours du temps. Ces trajectoires de réponse sont définies par les forces d'homéostasie et d'homéorhèse. Par définition, l'homéostasie désigne les processus physiologiques impliqués dans le maintien de la constance du milieu intérieur d'un organisme vivant pouvant être soumis à des perturbations externes. L'homéorhèse (aussi nommée téléophorhèse) traduit l'aptitude de l'organisme à réguler les flux métaboliques en fonction de besoins physiologiques, cette régulation suivant une trajectoire d'équilibre génétiquement déterminée. L'homéorhèse est impliquée dans les flux nécessaires à la mise en place et au maintien des fonctions de production (croissance, production de lait, d'œufs...) chez les animaux d'élevage. Contrairement à l'homéostasie, impliquée dans les régulations de l'organisme à court terme (maintien de la glycémie par exemple), l'homéorhèse est une régulation à plus long terme.

Une première représentation de l'adaptabilité consiste à étudier les réponses adaptatives sous l'angle de l'articulation au cours du temps entre l'homéostasie et l'homéorhèse dans l'espace des paramètres physiologiques qui caractérise le système (Figure 1).

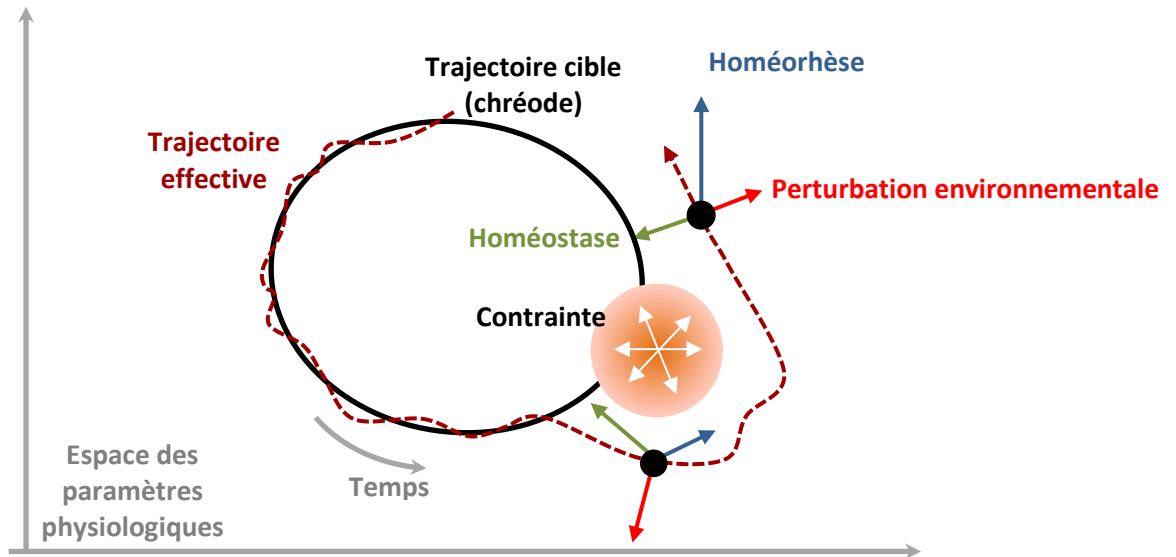


Figure 1. L’articulation homéorhèse-homéostasie dans l’espace des paramètres physiologiques, aspects dynamiques (d’après Martin, 2009).

En l’absence de perturbation majeure, le système évolue sur une trajectoire génétiquement définie (*i.e.* des changements d’état au cours du temps dont le support est l’expression des gènes de l’animal), nommée « chréode » (Waddington, 1957), préservée par les forces d’homéorhèse. En cas de perturbation, le système s’éloigne transitoirement de cette trajectoire et sa réponse adaptative sera définie par son retour à la trajectoire sous l’effet des forces d’homéostasie et d’homéorhèse. Une autre représentation possible de ces processus d’homéostasie et d’homéorhèse consiste à se placer de manière orthogonale à la trajectoire générée par l’homéorhèse. La chréode apparaît alors sous la forme d’une gouttière définissant le domaine physiologique dans lequel le système, représenté par un point mobile, évolue (Figure 2).

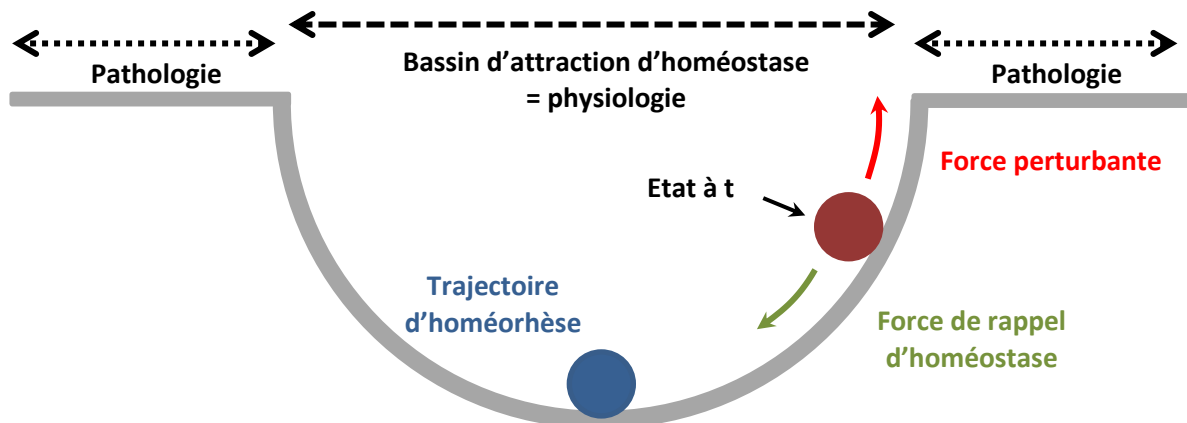


Figure 2. L’articulation homéorhèse-homéostasie dans l’espace des paramètres physiologiques, vue statique (ou en coupe) et principe de la gouttière (d’après Martin, 2009).

En l'absence de perturbation, le système suit la trajectoire d'homéorhèse. Sous l'effet de forces de perturbation, le système oscillera dans la gouttière, mais sera rappelé vers la trajectoire d'homéorhèse par les forces d'homéostasie. Toute sortie de la gouttière sous l'effet d'une perturbation constituera une rupture du système, pouvant éventuellement aboutir à la mise en place d'une nouvelle trajectoire. Du point de vue physiologique, une sortie de gouttière peut correspondre à une atteinte des limites physiologiques, à un état pathologique, comme on peut l'observer en cas d'adaptation à des températures ou en réaction à une maladie infectieuse (Sauvant et Martin, 2010).

La trajectoire de réponse d'un système ou d'un caractère de production peut également être représentée sous la forme plus simple d'une réponse dynamique. Cette représentation permet de visualiser l'amplitude et la durée des réponses à la perturbation et à évaluer si le système retourne à l'état initial lorsque la perturbation a cessé d'être appliquée. La perturbation d'un système va entraîner, après un délai variable, une réponse du système dont l'amplitude dépend à la fois de l'intensité de la perturbation et de la résistance du système (Sauvant et Martin, 2010). Les trajectoires de réponse du système dépendent des caractéristiques de ce dernier. Les trajectoires peuvent être classées selon trois grands « types » d'adaptation des systèmes aux perturbations : une absence de déformation, une déformation ou une transformation (Alcaras et Lacroux, 1999, Figure 3).

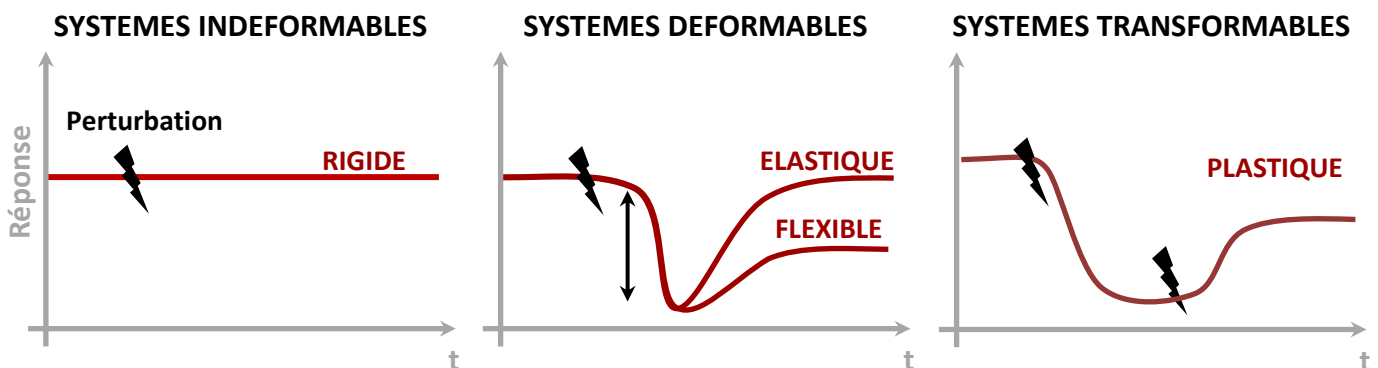


Figure 3. Représentation schématique des types de trajectoires adaptatives : variation au cours du temps de la réponse comportementale et/ ou physiologique du système sous l'effet d'une contrainte (d'après Alcaras et Lacroux, 1999).

La résistance concerne les systèmes indéformables, que l'on qualifie de rigides ou de résistants : ces systèmes réagissent en ne s'adaptant pas aux contraintes, c'est-à-dire en ne modifiant ni leur forme ni leur finalité, leur résistance permettant leur survie. En cas de contrainte d'une intensité supérieure à la résistance du système, ce dernier peut aller jusqu'à la rupture (à l'extrême, la mort de l'animal) (Alcaras et Lacroux, 1999; Blanc et al., 2010; Sauvant et Martin, 2010).

Les systèmes flexibles sont des systèmes capables de se déformer sous l'action d'une contrainte. La flexibilité du système peut entraîner une déformation irréversible de la structure ou des finalités de ce dernier. Lorsque les effets sont réversibles, c'est-à-dire que le système est capable de revenir à sa

finalité sous l'effet des forces d'homéostasie lorsque la contrainte a cessé d'être appliquée, on parle de système élastique. Ces systèmes élastiques modifient transitoirement leur structure et présentent une résilience égale à leur déformation maximale (Alcaras et Lacroux, 1999; Blanc et al., 2010; Sauvant and Martin, 2010).

Enfin, les systèmes dits plastiques correspondent à des animaux matures (*i.e.* ayant achevé leur développement) capables de se transformer sous l'effet d'une perturbation. Les systèmes plastiques combinent donc à la fois les aptitudes à la flexibilité et à l'élasticité. La plasticité consiste en un remaniement de la structure des systèmes vivants de telle sorte que ces derniers disposent de nouvelles facultés d'adaptation (Alcaras et Lacroux, 1999; Blanc et al., 2010; Sauvant et Martin, 2010).

3. Quantification de l'adaptabilité d'un animal

Si des cadres théoriques et concepts rattachés à la représentation et la description des processus adaptatifs ont été établis, ces approches n'ont à l'heure actuelle pas permis de quantifier aisément la capacité adaptative d'un animal (Blanc et al., 2013). Cette quantification est néanmoins nécessaire à la fois pour pouvoir relier les caractères de production à la robustesse des animaux (Friggens et al., 2010) et pour pouvoir sélectionner les individus capables de vivre dans un environnement variable (Bodin et al., 2010).

Les êtres vivants en général, parmi lesquels les animaux d'élevage, sont assimilables à des systèmes complexes en raison de la multiplicité de niveaux d'organisation qu'ils comportent (Savant et Martin, 2010). La robustesse ou capacité adaptative d'un animal serait en grande partie déterminée par la génétique, et résulterait des propriétés adaptatives (flexibilité, élasticité, plasticité) de chacun de niveaux sous-jacents qui composent l'animal (fonction, organe, cellule...) (Savant et Martin, 2010; Blanc et al., 2013). Quantifier l'adaptabilité à l'échelle d'un animal est donc difficile.

a- L'adaptabilité à l'échelle d'un caractère ou d'une fonction de l'animal

Dans un premier temps, il peut être envisagé de restreindre l'étude de l'adaptabilité à un caractère ou à une fonction. A ce niveau d'analyse, les animaux au génotype « robuste » ou « adaptable » seront ceux pour lesquels la variabilité de l'environnement aura peu d'effet sur le caractère de production (phénotype) considéré (Bodin et al., 2010), par opposition aux animaux non robustes dont la production ne sera pas stable dans des environnement différents. Cette différence de sensibilité des individus au milieu pour le caractère (ou phénotype) donné dépend de l'interaction entre le génotype de l'individu considéré et le milieu. Les généticiens ont développé plusieurs modèles pour expliquer cette interaction, parmi lesquels :

- le modèle de « surdominance » : on suppose que les hétérozygotes possèdent une adaptabilité supérieure conférée par un plus grand choix de voies métaboliques dû à leur plus grande diversité d'allèles (Lerner (1954), Gillespie et Turelli (1988))
- le modèle « pléiotropique » : hypothèse d'une expression différentielle des gènes en fonctions du milieu (Falconer et Mackay (1966))
- et le modèle « épistatique » : les gènes déterminant l'expression d'un caractère sont partiellement modulés par des gènes sensibles aux variations du milieu (Lynch et Gabriel, 1987; Scheiner et Lyman, 1989).

i. Gestion de l'interaction génotype x environnement en sélection

L'interaction génotype x environnement est généralement négligée en sélection génétique où on considère le phénotype comme la somme des effets du génotype et de l'environnement ($P = G + E$). Négliger ce terme d'interaction ne pénalise en général pas la sélection si le nombre d'environnements différents est faible et si les reproducteurs sont évalués dans différents milieux. Toutefois, l'hétérogénéité des milieux pourrait s'accroître dans l'avenir avec l'usage de systèmes plus extensifs, donc davantage soumis aux aléas (par exemple climatiques). Des modèles mathématiques ont été développés pour prendre en compte les effets de cette interaction en sélection. Le premier d'entre eux, le modèle « multicaractères », s'applique lorsque les milieux différents sont peu nombreux, il consiste à estimer la valeur génétique des reproducteurs dans chaque environnement. Le modèle « norme de réaction » consiste à examiner, pour un génotype donné, la relation entre des gammes de variation de l'environnement (variation de température, d'énergie apportée par l'aliment...) et les variations phénotypiques associées (Blanc et al., 2013). Ces deux premiers modèles ont été utilisés en 2012 par Huquet et al. dans le but de détecter des interactions génétique x environnement en France pour les caractères de production laitière mesurés chez les vaches de race Holstein, Normande et Montbéliarde, sans en trouver. Enfin, un dernier type de modèle, qui concerne surtout le cas où les milieux ne sont pas caractérisés (les variations de température, de pluviométrie par exemple ne sont pas enregistrées), consiste à considérer de manière séparée le niveau de performance du caractère et sa variabilité, ce qui conduit à s'intéresser à la variabilité génétique de la variance résiduelle environnementale et amène à obtenir une estimation de l'héritabilité de la variabilité du caractère. La sélection sur l'adaptabilité d'un caractère peut reposer sur ce dernier type de modèle. La sélection sur la variabilité d'un caractère, ou canalisation, vise à homogénéiser un caractère vers un optimum biologique ou économique. En ce sens, la canalisation peut permettre d'obtenir *via* la sélection des animaux capables de tamponner les effets d'un environnement fluctuant.

ii. La sélection sur l'adaptabilité d'un caractère

Néanmoins, la prise en compte de la robustesse dans les objectifs de sélection est un processus récent, et pour lequel de nombreuses questions restent encore en suspens, en particulier en ce qui concerne les conséquences sur la variabilité génétique (Bodin et al., 2010). En pratique, sélectionner les animaux sur leur adaptabilité est difficile car dans certaines productions, en particulier en bovins laitiers, la sélection s'effectue généralement sur des animaux placés dans un environnement optimal leur permettant d'exprimer leur potentiel de production, ce qui ne permet donc pas d'évaluer leurs capacités adaptatives (Phocas et al., 2014). De plus, la sélection sur la robustesse d'un animal *via* le processus de canalisation de manière concomitante avec la sélection directionnelle pose encore certains problèmes, notamment au regard des pondérations à attribuer à la sélection sur la moyenne et à la sélection sur la variabilité (Bodin et al., 2010).

b- Estimation de l'adaptabilité à l'échelle de l'animal : notion de compromis

L'inconvénient du type d'approche « uni-fonction » ou « uni-caractère » présenté précédemment est d'ignorer les effets de la perturbation sur les autres fonctions biologiques de l'animal. En effet, on peut observer un antagonisme entre les fonctions de l'animal, correspondant à la mise en place d'un compromis (ou « trade-off ») généralement entre les fonctions liées à la production (comme la production laitière, ou la croissance) et celles liées à la survie en élevage (santé, reproduction). Ces compromis peuvent avoir deux origines. La plus fréquente est liée à une limitation des ressources (par exemple les nutriments). Dans ce cas, le maintien de l'expression d'une fonction (*via* une allocation préférentielle des ressources disponibles pour cette fonction) aura forcément un coût pour les autres fonctions, (Blanc et al., 2013; Phocas et al., 2014). Ce type de compromis est par exemple observé dans le cas des performances de production et de reproduction chez la vache laitière (**Figure 4, A**). En effet, la sélection sur la production laitière est restée sans impact négatif sur les performances de reproduction jusqu'à l'apparition d'une corrélation négative entre ces caractères, probablement due à l'atteinte des limites de l'apport énergétique permises par les capacités du rumen. L'autre type de compromis observé peut correspondre à l'existence d'un plafond physiologique à un caractère. Dans ce cas de figure, l'apport de ressources supplémentaires ne permet plus d'accroître les performances pour le caractère (Phocas et al., 2014) (**Figure 4, B**).

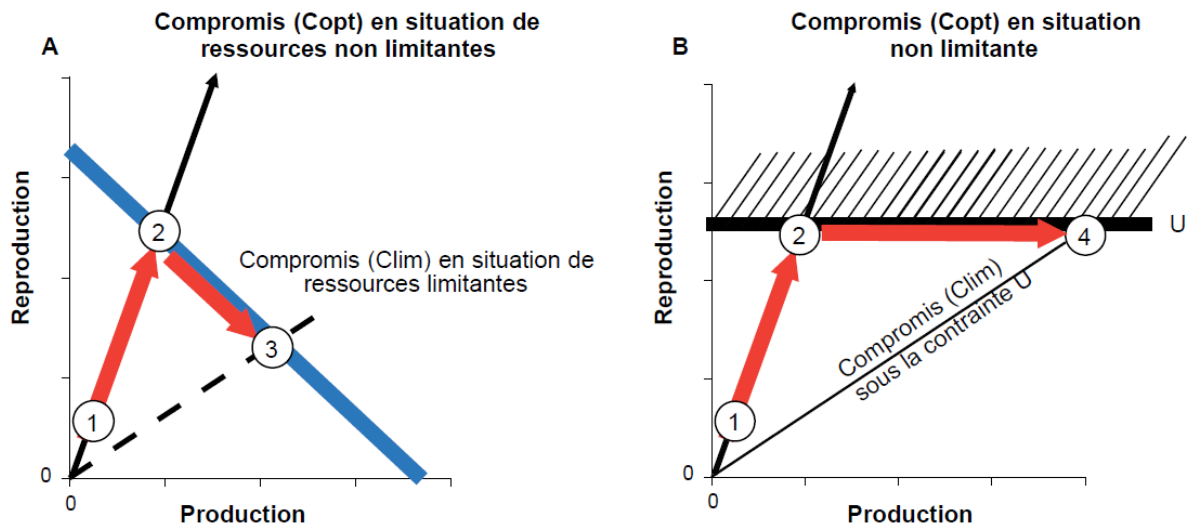


Figure 4. Illustration de deux scénarios de compromis entre fonctions biologiques, dû : A) à une ressource environnementale limitée, B) à l'atteinte d'un plafond physiologique (Phocas et al. (2014) adapté de Friggens et van der Waaij (2009)).

Dans ces graphiques, l'allocation des ressources entre deux fonctions biologiques, ici la Production (Prod) et la Reproduction (Repro), est indiquée par les droites passant par l'origine selon l'existence (droite Clim) ou non (droite Copt) d'une limite amenant à une nouvelle allocation des ressources entre les fonctions. L'allocation des ressources Copt est celle qui s'opère chez un animal robuste. Dans une situation non limitante, une sélection sur un caractère, par exemple Prod, permet une augmentation de performance sur ce caractère sans modifier la répartition optimale des ressources, assurant aussi une augmentation possible de performance sur le second caractère (cf. flèche allant de 1 à 2). Deux types de limites, décrits dans les scénarios A et B, finissent toutefois par ne plus permettre une sélection sans conséquence défavorable sur la robustesse et induisent un compromis entre fonctions aboutissant à une nouvelle allocation des ressources (Clim). Dans le scénario A, une limitation de la disponibilité des ressources environnementales oblige à réaliser un compromis au détriment de la réponse sur Repro quand la sélection se poursuit sur Prod (cf. flèche de 2 à 3). Dans le scénario B, la limitation est fonctionnelle ; il y a un plafond physiologique (U) à l'expression du trait Repro ne permettant plus (ou ne procurant aucun avantage sélectif) d'investir des ressources supplémentaires pour accroître le niveau de performance sur ce caractère : par conséquent, une sélection supplémentaire sur Prod engendre un nouveau compromis avec Repro et une réallocation des ressources entre fonctions biologiques (cf. flèche de 2 à 4).

i. Sources de variation des compromis entre fonctions

Les compromis observés résultent aussi partiellement de la sélection effectuée sur les caractères de production. Par exemple, le compromis entre les fonctions de lactation et de reproduction chez la vache laitière (qui se traduit par une corrélation génétique négative entre ces caractères) pourrait être une conséquence d'une sélection ayant favorisé l'allocation des nutriments vers la lactation au détriment des autres fonctions de l'animal (Royal et al., 2002). Le fait que la sélection puisse modifier l'expression des compromis chez les animaux implique que ces derniers puissent évoluer d'une génération à l'autre (Blanc et al., 2013). Toutefois, les compromis varient également de manière importante et intra-générationnelle en fonction des stades physiologiques des animaux, mais aussi en fonction de l'accumulation des expériences au cours de la vie de l'animal (Blanc et al., 2013). A l'heure actuelle, la connaissance des interrelations entre les fonctions biologiques est encore très imparfaite, limitant les possibilités d'évaluer l'adaptabilité des animaux de manière simple.

ii. Implications de l'existence de compromis sur la sélection

L'existence des compromis entre fonctions implique qu'il est difficile de sélectionner simultanément des animaux robustes pour toutes les fonctions biologiques et résistants à tout type de perturbation environnementale (Blanc et al., 2013). Concrètement, la présence de compromis entre les fonctions de production (production laitière) et les caractères liés à la survie (fonctionnels) sont gérés en sélection *via* l'intégration des caractères fonctionnels dans les objectifs de sélection (Colleau et Regaldo, 2001; Ducrocq et al., 2001). Actuellement, les caractères fonctionnels (cellules, fertilité, longévité, morphologie...) sont introduits de manière pondérée dans les index de synthèse utilisés pour la sélection des races laitières en France, ce qui peut être interprété comme le fait de choisir un compromis optimal entre les fonctions de production et de survie, en fonction des objectifs de sélection technico-économique pour l'éleveur (Phocas et al., 2013).

La robustesse et les capacités adaptatives sont donc des aptitudes complexes qui ne peuvent être décrites par des combinaisons simples de mesures directes. La compréhension et l'évaluation de la robustesse d'un animal nécessite de mettre en place des modèles intégratifs (comme par exemple celui développé par Martin et Sauvant (2010a, 2010b)), qui incluent l'existence et l'évolution des différents compromis entre fonctions dans une dimension temporelle. La mise en place de tels modèles nécessite une connaissance relativement exhaustive du phénotype des animaux dans les dimensions horizontales (nombreux individus et caractères), verticales (décomposition fine des caractères), et temporelles (Phocas et al., 2014).

Outre l'adaptabilité à l'échelle des fonctions et de l'animal, on peut également considérer l'adaptabilité à l'échelle du troupeau et du système d'élevage. Cette échelle a été peu étudiée en comparaison avec les échelles des fonctions biologiques et de l'animal (Blanc et al., 2013). Comme dans le cas de l'étude de l'adaptabilité des fonctions, l'adaptabilité du troupeau peut être analysée *via* les modèles de « normes de réaction » ou par l'analyse de la variabilité. Le troupeau est alors considéré comme une « boîte noire ». D'autres modèles consistent à considérer l'adaptabilité à l'échelle du troupeau comme la résultante des robustesses individuelles des individus qui le composent (Ollion et al., 2013; Puillet et al., 2013). En ce cas, l'évaluation de la robustesse nécessite de prendre en compte à la fois la stabilité de la performance du troupeau lors de modifications de l'environnement, mais également les types de robustesse individuelle présents au sein du troupeau. L'adaptabilité du troupeau va alors dépendre du type de perturbation subie par le troupeau. Lorsque la diversité des perturbations subies par le troupeau est faible, les résultats du système d'élevage sont plus stables avec un troupeau homogène composé de vaches adaptées à ces perturbations. En revanche, un troupeau soumis à une large gamme de perturbations sera plus robuste s'il dispose d'animaux

correspondant à différents types ou profils adaptatifs car cette diversité permettra de tamponner les variations de production à l'échelle du troupeau (Blanc et al., 2013).

En bref

L'adaptabilité et la robustesse sont des concepts qui peuvent se décliner selon de multiples définitions. Dans cette thèse, nous considérerons l'adaptabilité comme l'ensemble des processus qui vont permettre l'adéquation de l'organisme à son milieu et la robustesse comme la capacité pour la vache laitière d'exprimer son potentiel de production dans une large gamme d'environnements sans compromettre sa reproduction, sa santé et son bien-être.

L'adaptabilité à l'échelle d'un animal dépend de l'adaptabilité de chacune de ses fonctions biologiques (elles-mêmes dépendantes de l'adaptabilité des structures sous-jacentes (organes, cellules...)) mais également des relations entre chacune des fonctions biologiques, qui sont régies par l'existence de compromis. Toutefois, à l'heure actuelle, la connaissance de ces interrelations entre les fonctions biologiques est encore très limitée. La quantification de l'adaptabilité à l'échelle d'un animal, prérequis à la sélection des animaux adaptables, reste donc complexe à mettre en œuvre.

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à l'adaptabilité de la fonction de la production de lait chez la vache laitière pour son rôle dans l'expression de la fonction de lactation, primordiales chez les vaches laitières. Pour cela, nous avons choisi d'examiner les trajectoires adaptatives de la production laitière en analysant les réponses dynamiques de ce caractère à un challenge de monotraite. Ce type de représentation, simple, permet de visualiser les différentes modalités d'adaptation d'un système à une perturbation : absence de déformation, déformation et transformation.

Chapitre 2 : Anatomie de la glande mammaire et synthèse du lait

La glande mammaire est l'organe qui caractérise les mammifères. Sa structure particulière lui permet d'assurer conjointement la synthèse et la sécrétion du lait.

1. Anatomie de la glande mammaire : structure et fonction des différents tissus

a- Structure générale de la glande mammaire

Chez la vache, la glande mammaire est subdivisée en quatre quartiers fonctionnels et indépendants. Chaque quartier comporte du tissu sécréteur entouré de stroma, une citerne et un trayon. Le lait est drainé *via* les canaux galactophores, des alvéoles mammaires où sont localisées les cellules sécrétrices du lait, jusqu'à la citerne et le trayon (**Figure 5**). Lors de la tétée ou de la traite, le lait est éjecté hors de la mamelle par le trayon.

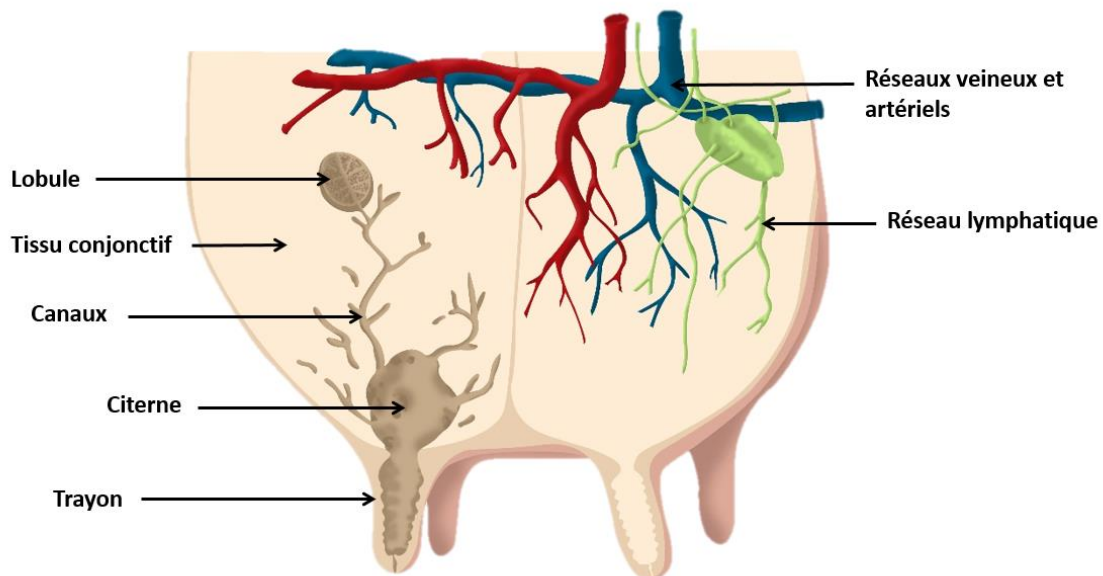


Figure 5. Anatomie de la glande mammaire de vache.

b- Le tissu sécréteur : les alvéoles mammaires

L'alvéole mammaire est l'unité fonctionnelle de la mamelle pour la production de lait. La fonction sécrétoire est assurée par des cellules spécialisées, nommées **cellules épithéliales mammaires (CEM)** (Jammes et Djiane, 1988). Les CEM sont jointes en un épithélium monocouche qui forme la structure sphérique de l'alvéole (**Figure 6**). Ces cellules reposent sur une lame basale et sont polarisées. Elles prélèvent les nutriments provenant du sang au niveau de leur pôle basal. Elles sécrètent les différents constituants du lait à leur pôle apical.

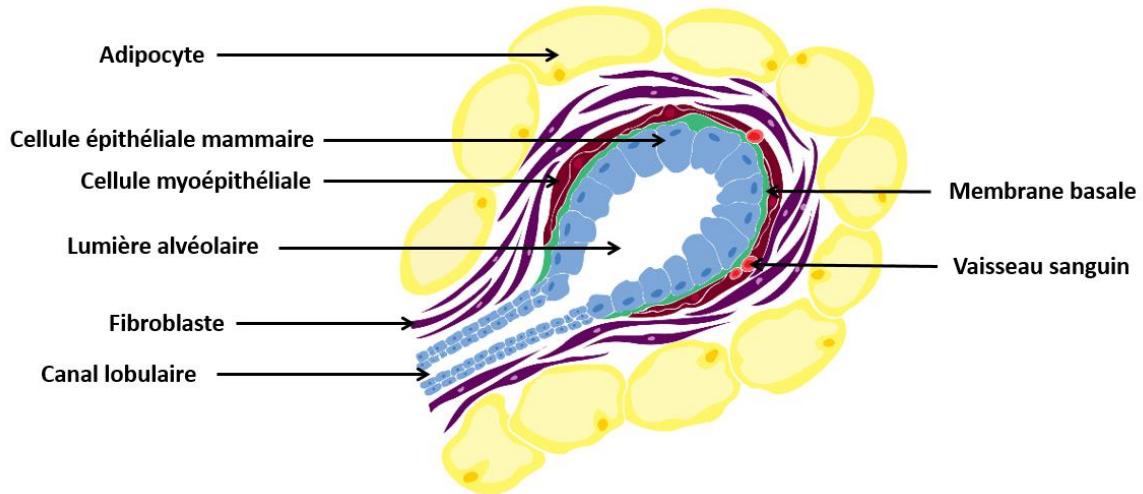


Figure 6. Structure de l'alvéole mammaire. D'après (Delouis et Richard, 1991).

c- Les tissus non sécréteurs

Le tissu non sécréteur, ou stroma englobe le tissu sécréteur de la mamelle avec lequel il entretient une relation étroite. Ce stroma est constitué de tissus conjonctifs, adipeux, musculaires et nerveux ainsi que de vaisseaux sanguins et lymphatiques.

Le tissu conjonctif. Le tissu conjonctif joue un rôle de maintien et de soutien de la glande mammaire. En effet, la mamelle pèse, à vide, entre 14 et 32 kg et peut dépasser les 50-60 kg chez les vaches fortes productrices (Billon, 2009), en raison de la forte quantité de lait qui y est stockée et du sang qui y circule en permanence. Elle nécessite donc des structures de soutien solides. Le tissu conjonctif est de deux types dans la mamelle : lâche et dense.

- Le tissu conjonctif lâche est constitué de cellules adipeuses entourées d'une matrice de fibres et de substance fondamentale. Présent en très grande quantité dans la glande mammaire, il enveloppe les alvéoles mammaires et les regroupe pour former des lobules (groupe de 10 à 100 alvéoles) puis des lobes (**Figure 5**). Chez la vache en lactation, outre son rôle d'enrobage du tissu sécréteur, ce tissu conjonctif lâche est aussi un réservoir énergétique pour la synthèse du lait.
- Le tissu conjonctif dense est principalement constitué des ligaments et tendons. Ses deux structures majeures sont le ligament médian et le ligament latéral. Le ligament médian, qui sépare le côté droit du côté gauche de la glande mammaire, est la structure de soutien la plus importante. Il est très épais et élastique, ce qui permet à la mamelle de s'adapter aux variations de quantité de lait. A l'inverse, le ligament latéral a une structure rigide. Ce dernier enveloppe toute la partie supérieure de la mamelle. Chacune de ces deux structures émet des prolongements dans le parenchyme mammaire qui contribuent au maintien de sa forme.

La peau joue également un rôle mineur dans le support et la stabilisation de la mamelle, et est maintenue au tissu conjonctif par des fibres élastiques. Les structures de soutien sont moins denses autour de l'implantation des trayons, ce qui explique que les trayons s'écartent les uns des autres lorsque le lait s'accumule dans la glande mammaire.

Le tissu musculaire. Les alvéoles et les canaux galactophores sont entourés d'un tissu musculaire lisse, le tissu myoépithélial (**Figure 6**). La contraction des cellules myoépithéliales sous l'effet de l'ocytocine, hormone pituitaire, est responsable de l'éjection du lait. Ce tissu musculaire joue également un rôle dans la forme et le maintien de la mamelle. A l'extrémité du trayon, des fibres musculaires circulaires forment un sphincter qui assure la fermeture du canal du trayon en dehors des traies et des tétées. Il constitue un obstacle physique à la progression des germes à l'intérieur de la mamelle.

Les vaisseaux sanguins. La vascularisation de la mamelle est dense. Elle permet d'apporter en continu tous les nutriments et hormones nécessaires à la synthèse et à l'éjection du lait et d'éliminer les déchets issus du métabolisme mammaire. L'artère pudique externe et l'artère périnéale se subdivisent en un réseau de plus en plus fin d'artérioles puis de capillaires, qui irriguent abondamment le tissu sécréteur : 500 litres de sang par kg de lait synthétisé (Guinard et al., 1994) (**Figure 5, Figure 6**).

Les vaisseaux lymphatiques. Le réseau lymphatique mammaire est constitué de vaisseaux lymphatiques et de ganglions, dont les principaux se situent près du canal inguinal (**Figure 5**). Les ganglions lymphatiques ont un double rôle immunitaire : ils ont à la fois une activité de filtre des corps étrangers et une activité de synthèse des cellules immunitaires (en particulier des lymphocytes et des macrophages). Les vaisseaux lymphatiques mammaires ont, quant à eux, trois fonctions principales : maintenir l'équilibre osmotique dans la mamelle en drainant les fluides interstitiels vers le réseau sanguin, transporter les cellules immunitaires produites par les ganglions au contact des éléments exogènes et transporter certains éléments, comme la vitamine K et certains lipides.

Le tissu nerveux. Comparée à d'autres tissus, la glande mammaire est peu innervée (Hebb et Linzell, 1970; Lefcourt et Akers, 1983). L'innervation de la mamelle est assurée par quatre nerfs issus des vertèbres lombaires (L1 : nerf ilio-hypogastrique, L2 : nerf ilio-inguinal, et L3/4 : nerf génito-fémoral) et sacrées (S2 à S4 : nerf pudique)).

Le tissu nerveux est surtout composé de nerfs afférents, qui transmettent les stimuli perçus au niveau de la glande mammaire au système nerveux central. Ces nerfs sensitifs sont les médiateurs du réflexe provoquant la décharge d'ocytocine (réflexe d'éjection du lait). Ils sont principalement localisés au niveau des trayons, où leur maillage est le plus dense. Néanmoins, des terminaisons nerveuses

sensibles à la pression sont également nombreuses au niveau de la peau, et seraient aussi présentes au niveau de la citerne et des grands canaux galactophores (Hebb et Linzell, 1970). Contrairement au réseau afférent, l'existence et le fonctionnement d'un système nerveux efférent au niveau de la mamelle sont controversés (Lefcourt et Akers, 1983). L'innervation du tissu sécréteur est lâche, voire inexistante : il n'y a pas de preuve d'une innervation directe des alvéoles mammaires ou des cellules myoépithéliales, ces dernières se contractant principalement sous l'effet de l'ocytocine (Lefcourt et Akers, 1983). Néanmoins, la dilatation des vaisseaux sanguins, très nombreux dans le parenchyme mammaire, pourrait être régulée par l'intermédiaire du tissu nerveux (Lefcourt et Akers, 1983).

2. La synthèse du lait

Le colostrum et le lait constituent l'unique ou principale source de nutriments permettant d'assurer la survie et la croissance du jeune après sa naissance. Leur composition varie selon les espèces en fonction des besoins du jeune. Nous ne nous intéresserons ici qu'à la synthèse du lait.

a- La cellule épithéliale mammaire

Chaque CEM est une unité autonome capable de synthétiser l'ensemble des constituants du lait. Le système lobulo-alvéolaire du tissu sécréteur se met en place progressivement à partir du 150^{ème} jour de gestation (Jammes et Djiane, 1988). Dans les dix derniers jours de la gestation, la lactogenèse, processus de différenciation cellulaire, permet aux CEM d'acquérir leur structure sécrétoire caractéristique avec 1) l'accroissement important du volume du cytoplasme, 2) la migration du noyau en position basale, 3) la présence de nombreuses mitochondries, d'un réticulum endoplasmique rugueux très développé et d'un appareil de Golgi profondément réticulé et vésiculé (**Figure 7**).

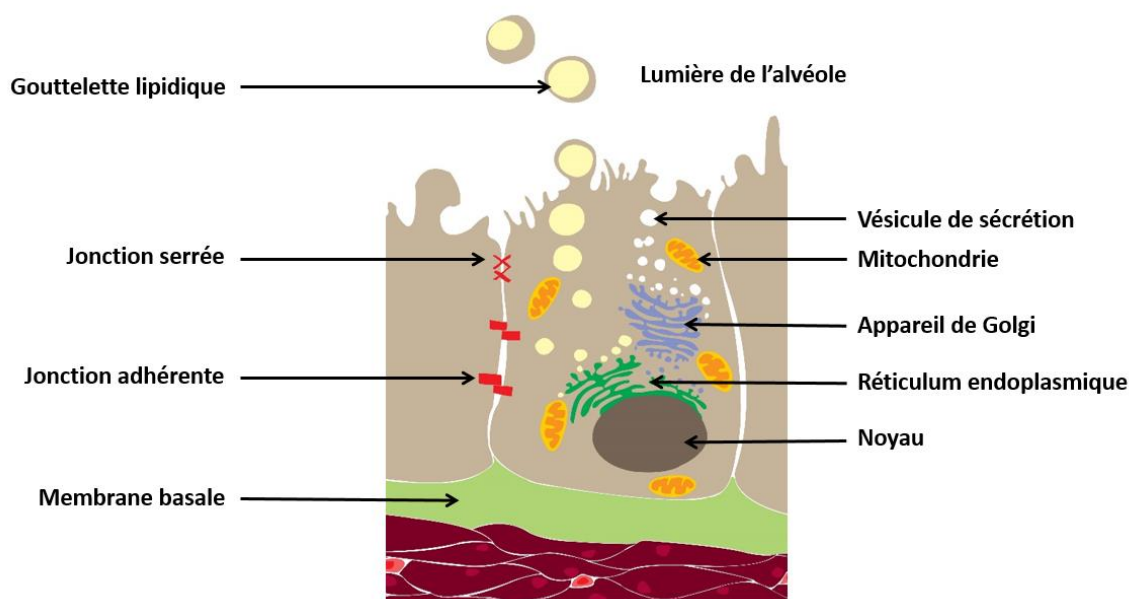


Figure 7. Représentation schématique d'une cellule épithéliale mammaire.

L'activité sécrétoire débute au moment de la parturition. Pendant la lactation, la cohésion de l'épithélium mammaire et sa perméabilité sont principalement assurées par les jonctions serrées situées entre les faces latérales des CEM (Niessen, 2007). Ces dernières sont constituées de protéines de la famille des occludines, des claudines et des molécules d'adhésion des jonctions. Les jonctions d'adhérence, les jonctions communicantes et les desmosomes assurent également des zones de contact entre les CEM, mais de manière plus lâche (Martinet et Houdebine, 1993). Ainsi, au cours de la lactation, les jonctions serrées constituent une barrière étanche entre les fluides interstitiels (lame basale) et le lait (lumière alvéolaire). Elles empêchent notamment les échanges entre les compartiments sanguin et alvéolaires.

b- Synthèse des différents constituants du lait

Le lait est constitué d'eau essentiellement, et de glucides, de matières grasses, de protéines, de minéraux et de vitamines (**Tableau 1**, Jenness, 1986). Les constituants du lait ont deux origines possibles, soit sanguine (eau, vitamines, minéraux, séralbumine, immunoglobulines...), soit mammaire via leur synthèse par les CEM à partir des nutriments issus du sang.

Tableau 1. Comparaison de la composition du lait de plusieurs espèces de mammifères.

	Eau	Lipides	Protéines	Lactose
Vache	87.3	3.9	3.2	4.6
Chèvre	86.7	4.5	3.2	4.3
Brebis	82.0	7.2	4.6	4.8
Rat	72.4	9.3	8.2	3.7
Porc	81.2	6.8	4.8	5.5
Humain	87.1	4.5	0.9	7.1

D'après Jenness (1986). Les valeurs sont exprimées en tant que pourcentage de la masse.

i. Glucides

Les glucides du lait, source d'énergie pour le veau, sont composés d'un glucide majeur et spécifique, le lactose, et de nombreux glucides mineurs, des monosaccharides (comme le glucose et le galactose), oligosaccharides ou sucres liés aux protéines ou aux lipides (Jenness, 1974; Gopal et Gill, 2000; Tao et al., 2009). Le lactose est un disaccharide formé d'une molécule de glucose et d'une molécule d'**UDP-galactose (Uridine DiPhosphate-galactose)**. Sa synthèse a lieu dans l'appareil de Golgi de la CEM. Elle est catalysée par la lactose transférase, complexe enzymatique formé de la galactosyltransférase et de l' α -lactalbumine, qui agit comme un cofacteur (Ley et Jenness, 1970; Kuhn et al., 1980; Lin et al., 2016). Le lactose est un des principaux agents osmotiques du lait (Holt, 1983). Son pouvoir osmotique élevé provoque par phénomène d'osmose des entrées d'eau dans les vésicules de Golgi afin de diluer le lactose nouvellement synthétisé. De fait, la teneur du lait en lactose est relativement constante et la

quantité de lactose synthétisée est un des principaux déterminants de la quantité de lait exportée par la glande mammaire.

ii. Lipides

Les lipides du lait, également source d'énergie pour le veau, se présentent sous forme de globules gras dans le lait, c'est-à-dire de gouttelettes lipidiques stabilisées dans la phase aqueuse du lait par une membrane dérivant de la membrane plasmique et d'une partie du contenu des CEM (Couvreur et Hurtaud, 2007). Les lipides du lait de vache sont à 98% des triglycérides, mais le lait contient aussi de très faibles quantités d'acides gras libres non-estérifiés, de lipides polaires (glycérophospholipides et sphingolipides), de stérols, de caroténoïdes et de vitamines liposolubles (**Tableau 2**). Chez la vache laitière, le taux de matière grasse du lait peut varier de façon importante, entre 30 et 60 g/L, mais reste habituellement compris entre 35 et 47 g/L.

Tableau 2. Composition en lipides du lait de vache.

	Teneur dans la matière grasse (g/100 g)	Teneur de la classe de lipides dans le globule gras (%)	
		Centre	Membrane
Glycérides	98.7		
<i>Triglycérides</i>	98.3	~100	+
<i>Diglycérides</i>	0.3	90 ?	10 ?
<i>Monoglycérides</i>	0.03	+	+
Acides gras libres	0.1	60	10 ?
Glycérophospholipides	0.8	-	65
<i>Lécithine</i>	0.26		
<i>Phosphatidyléthanolamine</i>	0.28		
<i>Phosphatidyl sérine</i>	0.03		
<i>Phosphatidylinositol</i>	0.04		
Sphingolipides	0.16		
<i>Sphingomyéline</i>	0.1	-	70
<i>Cérébrosides</i>	0.01	-	70 ?
<i>Gangliosides</i>	0.01		
Cholestérol	0.30	80	10
Caroténoïdes + vitamines A	0.002	95 ?	5 ?

D'après Walstra et al. (1999). Les points d'interrogation représentent des valeurs supposées mais pour lesquelles la valeur exacte n'est pas connue.

Les triglycérides sont formés dans le réticulum endoplasmique des CEM par estérification de trois molécules d'acides gras sur une molécule de glycérol. Ce glycérol est issu soit du glycérol sanguin libéré lors de l'hydrolyse des triglycérides plasmatiques par la lipoprotéine lipase au niveau de l'endothélium vasculaire, soit synthétisé à partir du glucose. Les acides gras sont, quant à eux, synthétisés dans les CEM (chaînes courte à moyenne, de 4 à 14-16 atomes de carbone) ou issus de l'hydrolyse des triglycérides plasmatiques (chaînes moyenne à longue, au minimum 12 atomes de carbone, Couvreur et Hurtaud, 2007). Chez les ruminants, la synthèse *de novo* des **acides gras (AG)** dans les CEM s'effectue à partir de l'acétate (85 % des AG synthétisés), du **BHBA (β -hydroxybutyrate)** (10 à 15 % des AG) et rarement à partir du propionate (traces) sanguin (Chilliard et al., 2001). Ce processus de synthèse

associé au phénomène d'hydrogénation (parfois incomplète) des acides gras insaturés dans le rumen génèrent une grande diversité d'AG : on dénombre en effet plus de 400 AG différents dans le lait, dont 15 majeurs (présent à plus de 1 % dans la matière grasse) (MacGibbon et Taylor, 2006). Les composés lipidiques plus complexes (glycérides, lipides polaires) sont synthétisés à partir des acides gras présents dans la CEM, de glucose et de glycérol. L'accumulation des composés lipidiques au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique génère la formation de gouttelettes lipidiques. Lors de leur relargage dans le cytosol, ces microgouttelettes entraînent avec elles la membrane externe du réticulum endoplasmique (Couvreur et Hurtaud, 2007). Elles migrent ensuite vers le pôle apical des CEM, en fusionnant entre elles, provoquant une augmentation de leur taille. Lors de leur libération dans la lumière alvéolaire, ces gouttelettes s'entourent d'une portion de la membrane cytoplasmique formant ainsi le globule gras (Keenan et Patton, 1995; Ollivier-Bousquet, 2002).

iii. Matières protéiques

La matière azotée du lait de vache comprend majoritairement des protéines mais aussi de l'azote non protéique à hauteur de 5-6 % de la matière azotée totale (Jensen, 1995). Le taux protéique du lait est peu variable : il varie approximativement de 30 à 35 g/kg (Jensen, 1995) (**Tableau 3**).

Tableau 3. Composition du lait de vache en protéines.

		Concentration (g/L)
Caséines	α_{s1}	10.0
	α_{s2}	2.6
	β	9.3
	κ	3.3
	γ	0.8
Protéines solubles	β -lactoglobuline	3.2
	α -lactalbumine	1.2
	BSA (Bovine SerumAlbumine)	0.4
	Immunoglobulines (G, A et M)	0.8
	Protéose peptones 8 (fragments de la caséine β)	0.5
	Lactophorine	0.3
	Lactoferrine	0.1
	Transferrine	0.1
	Membrane des globules gras	0.4

D'après Jensen (1995) page 919.

Parmi les protéines du lait, on distingue les caséines, protéines insolubles qui constituent la fraction majoritaire des protéines, et les protéines solubles (respectivement 78,5 et 16,5 % de la matière azotée totale du lait selon Jensen, 1995). Ce dernier groupe comprend un grand nombre de protéines dont 1) des protéines spécifiques du lait (la β -lactoglobuline et l' α -lactalbumine), 2) des produits issus de la dégradation des caséines (comme les protéoses-peptones qui dérivent principalement de l'hydrolyse

de la caséine β), 3) des enzymes provenant des CEM, du sang (comme la plasmine), des microorganismes du lait, des cellules somatiques du lait, en particulier les leucocytes (Blanc, 1982) et 4) d'autres protéines sériques (sérumalbumine, immunoglobulines...). Les protéines sériques transitent vers la lumière alvéolaire au travers des CEM par transcytose ou par voie paracellulaire (entre les CEM). Les caséines α_1 , α_2 , β et κ , la β -lactoglobuline et l' α -lactalbumine sont synthétisées *de novo* par les CEM au niveau des polysomes du réticulum endoplasmique rugueux à partir des acides aminés issus du plasma sanguin. Après leur synthèse et leur phosphorylation, voire glycosylation (caséine κ), les caséines α_1 , α_2 , β et κ sont transférées du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi, où elles s'agrègent entre elles pour former des micelles en présence de calcium et de phosphate inorganique. Elles rejoignent la lumière alvéolaire par exocytose. La caséine γ n'est pas synthétisée par les CEM. Elle résulte de l'hydrolyse de la caséine β dans sa partie C-terminale par la plasmine (Jensen, 1995).

iv. Vitamines et minéraux

Le lait est considéré comme une source non négligeable de vitamines A et D, les vitamines C, E et K sont également présentes mais en quantités plus faibles. Le lait contient aussi des minéraux dont les principaux sont les ions Ca^{2+} , P^+ , K^+ , Na^+ , Mg^{2+} et Cl^- (Fox et al., 2015). Parmi ceux-ci, le K^+ , Na^+ et Cl^- sont essentiellement présents sous forme dissoute, alors que deux tiers du Ca^{2+} , la moitié du P^+ et un tiers du Mg^{2+} sont associés aux caséines et constituent le liant des micelles de caséines (Müller-Buschbaum et al., 2007; Gaucheron, 2005).

Si le lait et le sang sont deux solutés iso-osmotiques, certains éléments solubles sont plus concentrés dans le lait par rapport au sang (K, Ca, lactose) et inversement moins concentrés dans le lait que dans le sang (Na et Cl) (Peaker, 1983). La composition ionique du lait n'est pas déterminée par des phénomènes de réabsorption des minéraux le long des canaux galactophores. Elle est déterminée au niveau des alvéoles mammaires et résulterait d'ajustements, fonction de la teneur en lactose du lait. Plus la concentration du lait en lactose est élevée, plus les concentrations en Na et K sont faibles dans le lait et inversement. Les mouvements de Na et K au niveau de la membrane apicale des CEM permettraient l'équilibrage final de la pression osmotique du lait (Peaker, 1983).

v. *Autres composants du lait : les cellules somatiques*

Le lait contient également des cellules somatiques. Ces cellules sont majoritairement des cellules immunitaires, les leucocytes, parmi lesquels on trouve les **PMN (PolyMorphonucléaires Neutrophiles)**, les lymphocytes et les macrophages (Poutrel et al., 1983). Chez la vache, les CEM sont minoritaires dans le lait (Herve et al., 2015), leur proportion relative dans la population cellulaire variant selon les études de 2 à 45 % chez la vache. La présence de cellules immunitaires dans le lait est un critère indicateur d'une inflammation mammaire (mammite), généralement d'origine infectieuse, et constitue à ce titre un critère d'évaluation de la santé de la mamelle et de la qualité du lait. Lors d'une infection de la mamelle, le système immunitaire recrute des leucocytes. Ce recrutement est responsable de l'augmentation des **CCS (Comptage des Cellules Somatiques)** (Leitner et al., 2000; Lindmark-Månsson et al., 2006). Cette augmentation des CCS dépend de l'agent pathogène responsable de l'inflammation. Pour un quartier dont l'analyse bactériologique est négative, la CCS moyenne est de 70 000 cellules.mL⁻¹, alors qu'elle se situe entre 110 000 et 150 000 cellules.mL⁻¹ pour un quartier infecté par un agent pathogène mineur et est supérieure à 350 000 cellules.mL⁻¹ pour un quartier infecté par un agent pathogène majeur (Djabri et al., 2002). Cette augmentation de la CCS lors d'une inflammation est associée à une modification du profil cellulaire des leucocytes présents dans le lait. D'une façon générale, le lait issu d'une mamelle saine contient un nombre réduit de PMN et des macrophages en plus grand nombre (Riollet et al., 2002). Lors d'une inflammation mammaire, il y a recrutement des PMN vers le site infectieux, notamment *via* l'intervention des interleukines 6 et 8, cytokines impliquées dans la phase aiguë de la réaction inflammatoire (Riollet et al., 2002; Yang et al., 2008). Ils peuvent alors représenter jusqu'à 95 % des cellules somatiques présentes dans le lait issu du quartier infecté lors de la phase aiguë d'une mammite (Yang et al., 2008).

Les cellules immunitaires arrivent probablement dans le lait *via* les espaces interstitiels entre les CEM. Burns et al (2000) ont montré que le transport des PMN au travers des jonctions serrées est possible sans que ces dernières soient impactées.

c- **Les déterminants intra-mammaire de la quantité de lait produit**

La quantité de lait produite par la mamelle à un instant t dépend du nombre et de l'activité des CEM ainsi que de l'organisation du tissu sécréteur. La diminution de l'activité de synthèse des CEM est un des leviers d'adaptation de la mamelle pour répondre à très court terme à des perturbations (exemple : diminution du taux de transcrits, du nombre et/ou de l'activité des enzymes). Au cours de la lactation, le déclin de la production de lait est dû à une diminution de l'activité mais surtout du nombre de CEM, les CEM survivantes conservant leur capacité sécrétoire (Knight et Peaker, 1984; Wilde et Knight, 1989; Boutinaud et al., 2004). La diminution de l'activité de synthèse des CEM pourrait être associée à une diminution de l'activité globale des CEM et/ ou du nombre d'alvéoles actives

(Boutinaud et al., 2004). La diminution du nombre de CEM dépend principalement des mécanismes régissant l'équilibre entre la prolifération et l'apoptose (mort cellulaire programmée) au cours de la lactation ainsi que l'organisation du tissu sécréteur.

i. Equilibre prolifération-apoptose

Le renouvellement cellulaire de la glande mammaire en lactation est assuré en continu par deux phénomènes : la prolifération et l'apoptose. Le nombre de CEM actives, et donc la production laitière découle de l'équilibre entre ces deux phénomènes, c'est-à-dire de la « balance prolifération-apoptose ». Cet équilibre varie au cours de la lactation (**Figure 8**).

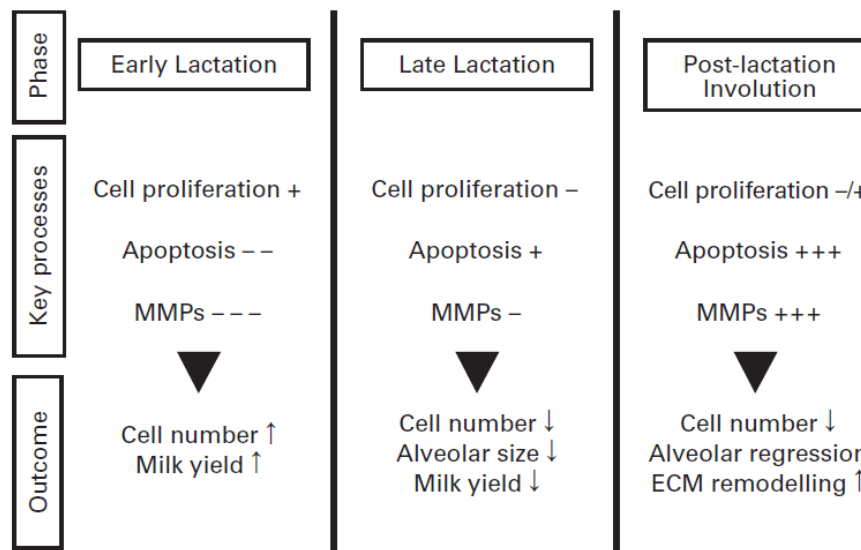


Figure 8. Evolution de l'équilibre prolifération/ apoptose et de l'activité des **MMP (Matrix MetalloProteases)** au cours d'une lactation. D'après Stefanon et al., (2002). **ECM : ExtraCellular Matrix**, matrice extracellulaire.

Au début de la lactation, le taux de prolifération cellulaire est supérieur au taux d'apoptose : le nombre de CEM augmente, et donc la production laitière aussi. Après le pic de lactation, la tendance s'inverse. Le taux d'apoptose devient supérieur au taux de prolifération cellulaire, provoquant une diminution du nombre de CEM, et par conséquent une diminution de la production laitière. Enfin, lors de l'involution, on observe conjointement des forts niveaux d'apoptose et un remodelage tissulaire.

Le processus apoptotique agit sur de nombreuses voies de signalisation et induit des modifications physiques et biochimiques qui entraînent une fragmentation de l'**ADN (Acide DésoxyriboNucléique)**, des changements majeurs au niveau des organites ainsi que de la membrane plasmique. La fréquence des processus apoptotiques dépend de l'équilibre entre des facteurs pro-apoptotiques (tels que l' α -lactalbumine, le **TGF β -3 (Transforming Growth Factor β -3)** ou encore la stase lactée) et des facteurs anti-apoptotiques, également nommés facteurs de survie, dont font partie les **IGF-1 et 2 (Insulin-like Growth Factor 1 and 2)** ou encore les intégrines. Un déséquilibre en faveur des facteurs pro-

apoptotiques est susceptible d'augmenter la fréquence apoptotique *via* l'inhibition des voies de signalisation qui répriment le signal d'apoptose. Néanmoins, comme reporté par Green et Streuli (2004), la régulation de l'apoptose est multifactorielle, et l'induction de l'apoptose nécessite l'inhibition de plusieurs voies de signalisation de manière simultanée, voies de signalisation dont les mécanismes d'action ne sont à l'heure actuelle pas complètement élucidés. Toutefois, en fonction des voies de signalisation concernées, on pourrait distinguer trois niveaux de régulation de l'apoptose dans la glande mammaire (Motyl et al, 2006). Il existe tout d'abord une régulation intrinsèque, à l'échelle de la CEM, qui implique l'intégrité des mitochondries. L'apoptose peut également être régulée de manière extrinsèque, mais interne à la glande mammaire en impliquant des communications autocrines et paracrines et *via* des récepteurs de mort cellulaire. Enfin, une régulation systémique de l'apoptose est également possible *via* des voies hormonales et les facteurs d'élevage. En particulier, le degré d'apoptose dépendrait de facteurs nutritionnels, hormonaux (comme décrit dans le paragraphe suivant), du statut reproductif et de la fréquence et de l'efficacité de la traite, *via* la distension alvéolaire et des rétrocontrôles chimiques (Stefanon et al., 2002) (Figure 9).

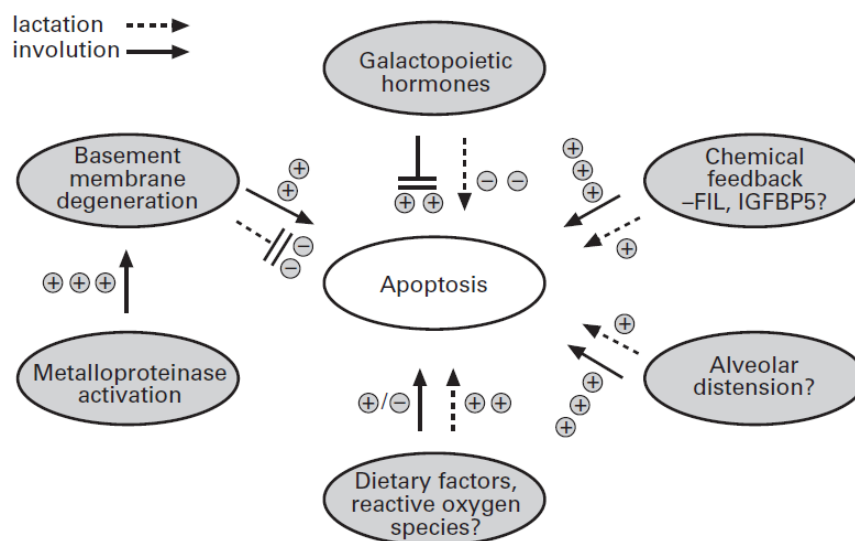


Figure 9. Facteurs influençant l'apoptose mammaire durant la lactation et l'involution. D'après Stefanon et al. (2002)

La part relative des différents processus au cours des phases de l'apoptose est indiquées par les + et les -. **FIL** : **Feedback Inhibitor of Lactation** ; IGFBP5 : Insulin Like Growth Factor Protein 5.

La prolifération cellulaire est un phénomène *a priori* limité en cours de lactation (Capuco et al., 2001). Il semble toutefois possible d'augmenter la prolifération des CEM en agissant sur la glande mammaire à des moments clés, comme en augmentant la fréquence de traite en début de lactation (Hale et al., 2003; Murney et al., 2015b). Le maintien d'une prolifération des cellules épithéliales mammaires serait possible par la présence de cellules souches. La présence d'une faible proportion de

cellules à haute capacité proliférative (10 % des cellules parenchymateuses totales, 50 % des cellules prolifératives) a été identifiée comme pouvant être cette potentielle population de cellules souches (Ellis et Capuco, 2002). La présence de ces cellules souches pourrait permettre d'expliquer l'aptitude de la glande mammaire à alterner des cycles de développement et de régression au cours des cycles de lactation/ gestation. En effet, durant l'involution de la glande mammaire suite à l'arrêt de la traite, on observe une élimination importante des CEM sénescents par apoptose. Lorsque l'involution est concomitante avec une fin de gestation, comme c'est souvent le cas dans les systèmes laitiers actuels, on observe de plus une prolifération cellulaire importante associée à un remodelage tissulaire intense afin d'assurer la lactation suivante (Capuco et al., 2003). On parle en ce cas d'involution régénératrice.

ii. Organisation du tissu sécréteur : intensité du remodelage tissulaire

La chute de production laitière observée en fin de lactation et lors de l'involution mammaire est liée à une réorganisation du tissu sécréteur. Ce remodelage, qui permet de renouveler les CEM sénescents, implique une dégradation par des métalloprotéases de la matrice extracellulaire associée à l'épithélium mammaire (**Figure 9**) et notamment de la lame basale sur laquelle les CEM reposent (Stefanon et al., 2002). Cette dégradation conduit à une perte d'adhésion d'une part entre les CEM et la membrane basale, d'autre part entre les CEM. Outre le fait de désorganiser la structure du tissu sécréteur, cette dégradation compromet la survie même des CEM. En effet, les interactions entre CEM, et entre les CEM et la membrane basale, constituent un facteur de survie primordial pour les CEM, et servent notamment à maintenir la stabilité du cytosquelette des CEM (Green and Streuli, 2004). En particulier, Pullan et al. (1996) ont montré que la membrane basale, *via* les intégrines $\beta 1$ aurait un rôle direct sur la survie des CEM.

3. Déroulement d'un cycle de lactation et régulations hormonales sous-jacentes

Chaque lactation est marquée par des étapes de prolifération cellulaire (mammogénèse), de différenciation cellulaire (lactogénèse), de sécrétion (galactopoïèse) et d'involution (**Figure 10**). La mise en place des structures mammaires et de la fonction de lactation est assurée par l'association de plusieurs hormones de manière simultanée ou séquentielle, dans des rapports de concentration définis. On parle de « complexe hormonal ». Ce ne sont pas forcément les mêmes hormones qui sont impliquées lors de la mammogénèse, de la lactogénèse, de la galactopoïèse et de l'involution (**Tableau 4**).

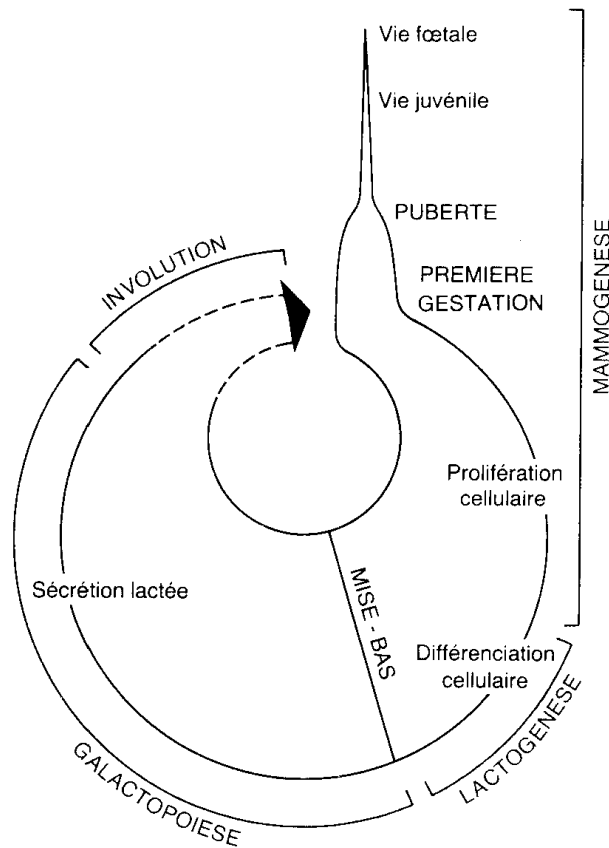


Figure 10. Schéma du développement de la glande mammaire au cours de la vie de l'animal (Jammes et Djiane, 1988).

Tableau 4. Principales hormones impliquées dans le contrôle du développement de la glande mammaire (Jammes and Djiane, 1988).

Organe responsable de la sécrétion	Hormone sécrétée	Fonction mammaire régulée
Hypophyse antérieure	Prolactine (PRL) Hormone de croissance (GH)	- Développement de la glande mammaire - Initiation et maintien de la lactation - Stimulation de la production laitière
Hypophyse postérieure	Ocytocine	- Contrôle de l'éjection du lait
Ovaires (follicules) (corps jaunes)	Oestradiol Progestérone	- Développement des canaux mammaires - Développement du système lobuloalvéolaire, inhibition de la lactogénèse
Surrénales (médullo-) (cortico-)	Epinéphrine ou Norépinéphrine Glucocorticoïdes Minéralocorticoïdes	- Inhibition de l'éjection du lait - Initiation et maintien de la lactation - Métabolisme minéral
Placenta	Progestérone Oestradiol Hormone placentaire lactogène	- cf stéroïdes ovariens - Développement de la glande mammaire bipotentialité (PRL et GH)
Thyroïde	Hormones thyroïdiennes (Thyroxine, triiodothyronine)	- Stimulation la synthèse protéique et de la production laitière
Pancréas	Insuline	- Contrôle du transport du glucose - Stimulation de la lactogénèse

Notre étude se déroulant pendant la lactation, nous ne présenterons que les mécanismes hormonaux impliqués dans la galactopoïèse.

La galactopoïèse décrit l'ensemble des processus conduisant au maintien de la lactation au cours du temps, c'est-à-dire la stabilité du nombre de CEM et de leur capacité de synthèse et l'efficacité du réflexe d'éjection du lait (Jammes and Djiane, 1988). Les principales hormones impliquées sont la **prolactine (PRL)**, l'hormone de croissance (**GH, Growth Hormon**) et l'ocytocine. Ces trois hormones sont sécrétées par l'axe hypothalamo-hypophysaire.

La PRL est indispensable à l'initiation de la sécrétion lactée car elle permet la différenciation des CEM et initie leur activité sécrétoire au moment de la parturition. Pendant la lactation, la libération de PRL par l'hypophyse est très fortement stimulée par la traite ou la tétée (Selmanoff et Selmanoff, 1983). Cette stimulation diminue au cours de la lactation. Les effets stimulants de la PRL sur la production de lait ont récemment été clairement mis en évidence chez les ruminants (Lacasse et al., 2016). La PRL participerait au maintien de l'activité de synthèse du lactose et des protéines notamment en favorisant l'expression des gènes à l'exemple de la caséine κ et l' α -lactalbumine (Boutinaud et al., 2012). En complément, la PRL exercerait également un contrôle sur le nombre de CEM empêchant la séquestration des IGF-1 (Flint et Knight, 1997; Hovey et al., 1999). Ces IGF-1 stimuleraient la prolifération cellulaire dans la glande mammaire, auraient des actions anti-apoptotiques et augmenteraient la production de lait (Green et Streuli, 2004; Trott et al., 2008).

Le rôle de la GH dans le maintien de la production laitière en cours de lactation serait dû à ses actions prolifératives et anti-apoptotiques, qui permettrait de maintenir le nombre de CEM en cours de lactation (Capuco et al., 2001). La GH n'agirait pas directement sur la glande mammaire, cette dernière ne possédant *a priori* pas de récepteur spécifique à la GH. En revanche, la GH stimulerait l'expression du facteur de croissance IGF-1 à la fois au niveau systémique dans le foie et localement dans le stroma de la glande mammaire. Par ailleurs, les effets de la GH sur les CEM seraient potentialisés par la PRL, qui, comme indiqué précédemment induirait des mécanismes empêchant la séquestration des IGF-1. La GH, en association avec le cortisol, est également impliquée dans la mobilisation des réserves corporelles, particulièrement cruciale au moment du pic de lactation car elle permet en partie de couvrir les besoins élevés en énergie. Plus précisément, la GH et le cortisol vont agir sur le tissu adipeux en stimulant la lipolyse et sur le foie en augmentant la néoglucogénèse, aboutissant à une redistribution des nutriments en faveur de la glande mammaire (Johnson et Hart, 1986). Enfin, l'action de la GH, associée à des hormones vasoconstrictrices (vasopressine, adrénaline, noradrénaline ou angiotensine II) ou vasodilatatrices (oxyde nitrique, peptide atrial natriurétique)

contribue à orienter massivement le flux sanguin vers la glande mammaire (Johnson et Hart, 1986; Svennersten-Sjaunja et Olsson, 2005).

L'ocytocine est sécrétée par l'hypophyse postérieure en réponse à la stimulation par la traite ou la tétée, des récepteurs localisés au niveau du trayon. Elle entraîne la contraction des cellules myoépithéliales localisées en périphérie des alvéoles mammaires et conditionne ainsi le réflexe d'éjection du lait. L'ocytocine joue ainsi un rôle dans la régulation de la production laitière en empêchant les stases lactées liées à l'accumulation du lait. Outre son action sur les cellules myoépithéliales, l'ocytocine serait aussi capable d'agir directement sur les CEM en provoquant une vidange intra-cellulaire des vésicules de sécrétion (Lollivier et al., 2002, 2006). En stimulant la sécrétion des différents constituants du lait et en accélérant les processus d'exocytose, elle permettrait d'augmenter la production laitière.

En bref

La glande mammaire est l'organe responsable de la production laitière. Le tissu sécréteur est organisé sous forme d'alvéoles mammaires constituées de cellules spécialisées dans la production du lait, les cellules épithéliales mammaires (CEM). Ces cellules sont polarisées. Leur pôle basal est en contact avec le reste de l'organisme, permettant la fourniture des éléments indispensables à la synthèse du lait. Leur pôle apical s'ouvre sur la lumière de l'alvéole, dans laquelle les CEM secrètent le lait.

Le lait est un liquide nutritif dont la fonction première est d'assurer la survie et la croissance du jeune après la naissance. Il est composé principalement d'eau, de glucides dont un spécifique, le lactose, de protéines (dont les caséines), de matières grasses (principalement des triglycérides) et de minéraux et vitamines. La proportion de chacun de ces constituants varie selon l'espèce considérée.

La production laitière est un processus cyclique qui se déclenche à la parturition et dont les cycles de développement et de régression s'enchaînent au rythme des cycles de reproduction. La glande mammaire en lactation est un organe dynamique, dont l'activité évolue au cours de la lactation. La quantité de lait produite par la glande mammaire et sa composition à un instant donné dépendent à la fois de l'activité de synthèse des CEM mais aussi de leur nombre. Ce nombre est déterminé par les mécanismes de prolifération et de mort cellulaire (apoptose). L'activité de synthèse des CEM ainsi que leur nombre sont partiellement sous le contrôle d'hormones, dont les plus importantes sont la prolactine (PRL), l'hormone de croissance (GH) et l'ocytocine.

Chapitre 3 : Intervalles de traites allongés et monotraite

La traite biquotidienne est la fréquence de traite habituellement pratiquée avec des intervalles diurnes: nocturnes de l'ordre de 10 h:14 h à 11 h:13 h (70 % des élevages sur 5 844 élevages enquêtés en Bretagne, Brocard et al., 2015). Parce que la traite représente environ 50 % de l'astreinte quotidienne pour les éleveurs laitiers (Chauvat et al., 2003), la réduction de la fréquence de traite peut constituer un levier essentiel pour réduire la charge de travail, améliorer les conditions de vie des éleveurs (libérer du temps pour la famille ou les loisirs) ou encore accroître la productivité du travail sous certaines conditions : libération de temps d'astreinte pour un autre poste (par exemple l'alimentation) ou au profit d'un autre atelier sur l'exploitation (transformation, cultures...) (Pomiès et al., 2008). Mais ces pratiques ne sont pas qu'un outil de gestion du travail en exploitation laitière, elles permettent aussi de piloter le troupeau et d'ajuster les résultats techniques en fonction d'objectifs zootechniques ou technico-économiques (Guinard-Flament et al., 2013). Parmi ces pratiques, se trouvent celles consistant à réduire la fréquence de traite, provoquant par conséquent un allongement de l'intervalle entre traites (Pomiès et al., 2008).

1. Quelles pratiques ? Quelle représentativité en France et ailleurs ?

Les intervalles de traite allongés peuvent être pratiqués de diverses manières. Ils impliquent ou non une modification de la fréquence de traite. Sans modification de la fréquence de traite, l'intervalle de traite situé après l'intervalle allongé est alors fortement raccourci. C'est le cas des traites en horaires décalés, avec l'exemple des deux traites réalisées le matin (Rémond et al., 2009; Brocard et al., 2015). Lorsque la fréquence de traite des animaux est diminuée, elle passe de deux traites par jour à trois traites en deux jours (16 h d'intervalle entre traites) ou encore à une traite par jour (24 h d'intervalle). Les intervalles de traites allongés peuvent survenir de manière isolée, pour répondre à des problèmes ponctuels sur l'exploitation (panne mécanique, indisponibilité du trayeur...). Mais l'éleveur peut également choisir de décaler ou d'omettre régulièrement une traite afin d'organiser ou d'alléger sa charge de travail : cas de l'omission d'une traite hebdomadaire (traite du dimanche soir) avec ou sans aménagement des intervalles de traites concomitants, et cas de la monotraite (une traite par jour sur des périodes allant de quelques jours à la lactation complète) (Meffe et al., 2003; Ayadi et al., 2003; Pomiès et al., 2008).

Peu de travaux recensent ces pratiques dans les pays producteurs de lait. En France, l'omission de la traite du dimanche soir, qui a connu un essor dans les années 1990, serait la modalité la plus couramment utilisée (Pomiès et al., 2008). En effet, en 2006, jusqu'à 17 % des éleveurs adhérant au Contrôle Laitier du Finistère, et 11 % pour l'ensemble de la Bretagne mettaient en place cette pratique (Portier et al., 2006; Michaud et al., 2007). En comparaison, la monotraite est une pratique bien moins

répandue : seulement 1 % des exploitations laitières bretonnes la pratiquaient en 2006 (Michaud et al., 2007).

La monotraite a initialement vu le jour et est plus fréquente dans les systèmes néo-zélandais, systèmes à bas intrants basés sur la valorisation de l'herbe pâturée, des vêlages groupés et des niveaux modérés de production par vache (5 000 kg/vache/lactation) (Clark et al., 2006a; Davis et al., 1999). Elle est majoritairement pratiquée durant les deux-trois derniers mois de lactation, afin de réduire les coûts de main d'œuvre et gérer les périodes de sécheresse. En revanche, la monotraite pratiquée sur toute la lactation est moins courante, puisqu'en 2014, seulement 5 % des troupeaux de Nouvelle-Zélande étaient en monotraite toute l'année (Stachowicz et al., 2014).

Ainsi, même si la monotraite présente de potentiels intérêts dans l'organisation du travail et la gestion du troupeau, elle reste une pratique marginale. Son utilisation est en effet limitée en raison de ses répercussions négatives sur les performances laitières. Nous allons à présent décrire les effets moyens observés sur la production et la composition du lait lors d'intervalles de traite allongés, et plus particulièrement lors de la monotraite.

2. Effets moyens de la monotraite selon sa durée d'application et la conduite alimentaire

a- Sur les performances laitières

i. Production laitière

De manière générale, les intervalles de traite allongés, et en particulier la monotraite sont associés à une diminution de la production laitière. Cette diminution peut être décrite par deux termes :

- Les pertes absolues exprimées en kilogramme par unité de temps et calculées soit par rapport à un lot témoin ou, en intra-lot, par rapport à une période initiale de référence
- Les pertes relatives exprimées en pourcents (pertes absolues / niveau de production initial ou du lot témoin x 100) afin d'exprimer les pertes indépendamment du niveau de production.

Chez les vaches laitières, le taux de sécrétion de lait diminue de manière curvilinéaire *i.e.* de plus en plus rapidement après 16 à 18 h d'accumulation du lait dans la glande mammaire. Plus l'intervalle de traite est long, plus les pertes de lait sont importantes. Lors du retour à deux traites par jour on peut décrire la production de lait regagnée par le gain de lait en kilogramme par unité de temps ou par la proportion de lait regagnée par rapport au lait perdu. De la même façon que pour la perte, plus l'intervalle de traite est long, plus les effets rémanents au retour à deux traites par jour (quantité de lait produite inférieure à ce qu'elle devrait être avec deux traites) sont importants (Elliott et al., 1960; Wheelock et al., 1966; Stelwagen et al., 2008). C'est ainsi que l'omission ponctuelle d'une traite (intervalle de traite de 24 h) est associée à une diminution non négligeable de la quantité de lait produite, avec une récupération graduelle au cours des deux jours suivant l'intervalle de traite de 24 h

(Labussière et Coindet, 1968; Radcliffe et al., 1973). Cette même forme de réponse est observée lors de l'omission d'une traite hebdomadaire. Dans ce cas, la diminution de la production laitière sur toute la durée de mise en œuvre de cette pratique peut aller jusqu'à 7,5 % si cette pratique est appliquée sur deux lactations (Labussière et Coindet, 1968), 13 % sur toute la lactation (Roguinsky et al., 1972), 3,5 % ou 10 % sur deux mois (Radcliffe et al., 1973; Pomiès et Rémond, 2000) et n'a pas d'impact lors des dix dernières semaines de lactation (O'Brien et al., 2002). Ces pertes, lorsqu'elles sont associées à l'omission ponctuelle d'une traite sur une journée, sont donc relativement faibles.

Davantage d'études ont été implémentées sur les réponses des vaches à la monotraite. Les diminutions moyennes de production laitière lors du passage en monotraite relevées dans la littérature sont synthétisées dans le **Tableau 5**. D'après les résultats de ces essais, la monotraite est toujours associée à une diminution de la production laitière, de l'ordre de 20 à 30 %. Toutefois, les pertes moyennes relevées dans ces études varient de manière très forte, puisque qu'en fonction de la durée d'application de la monotraite, du stade de lactation auquel elle est appliquée, de la race, de la parité ou encore de l'alimentation des vaches, elles peuvent osciller entre 8 et 50 %. Au-delà de cette variabilité observée d'un essai à l'autre, plusieurs auteurs reportent également une variabilité interindividuelle importante des pertes au sein d'un même essai (Davis et al., 1999; Guinard-Flament et al., 2011a). Cette variabilité est aussi observée lors des essais consistant à omettre ponctuellement une traite (Wheelock et al., 1966; Radcliffe et al., 1973). Cela sous-tend que certaines vaches seraient davantage capables de maintenir leur production en monotraite que d'autres. Ces facteurs de variation de la réponse individuelle des vaches à la monotraite feront l'objet du prochain chapitre.

Au retour à deux traites par jour, on observe généralement un regain, au moins partiel, de la production laitière. Ce regain a été moins décrit que les pertes de lait. Quand il a été décrit, ce sont les pertes résiduelles qui ont été évaluées en calculant la différence entre le niveau de production initial et le niveau de production au retour à deux traites par jour après une période de monotraite divisée par la production de lait initiale ($\times 100$). Ces pertes varieraient entre 2,6 % pour une période de monotraite d'une durée d'une semaine et 10 % pour sept à dix semaines de monotraite (Rémond et Pomiès, 2005). Une expérimentation observe l'absence de regain pour une période de monotraite supérieure à cinq mois (Claesson et al., 1959). La bibliographie suggère ainsi que plus la durée d'application de la monotraite est longue, plus les effets rémanents sur la production laitière au retour à deux traites par jour sont importants. Néanmoins, ces effets rémanents ne sont pas observés sur la lactation suivante (Claesson et al., 1959; Clark et al., 2006b; Pomiès et al., 2008; Ferris et al., 2008).

Références	Stade de lactation	Race	Particularités de l'essai	Résultats en fonction de la durée de l'essai														
				Production laitière (en %)			Taux butyreux (en g/kg)			Taux protéique (en g/kg)								
				Ctrl	≤ 1	≥ 1	≤ 1	≤ 1	≥ 1	≤ 1	≤ 1	≥ 1						
				kg/j	sem.	mois	sem.	mois	sem.	mois	sem.	mois	Cplt.	Lact.	Cplt.	Lact.	Cplt.	
Clackson 1959	Lactation		Primipares	12.6		-50			+1,2									+1,4
	1 ^{ère} moitié		Primipares sur la 1 ^{ère} ½ lactation	15.0		-45			-0,6									+0,3
	Lactation		2 ^{ème} lactation	16.7		-50			-1,1									+0,0
Holmes et al., 1992	Lactation	J, HF, JxHF		17.1		-35			+3,1									+1,6
Knutson et al., 1993	Fin	HF		14.5	-27				+2,7									+2,4
Carruthers et al., 1993a	Milieu	J	Haut taux protéique	12.3		-14			+0,2									-0,1
	Milieu	J	Bas taux protéique	15.0		-18			+0,7									+0,0
	Fin	HF		19.9		-18			-1,0									+0,3
	Fin	J	Haut taux protéique	9.3		-9			+1,3									+1,7
	Fin	J	Bas taux protéique	10.9		-12			+1,3									+1,1
	Fin	HF		14.4		-13			+1,3									+0,6
Carruthers et al., 1993b	Fin	J, HF		16.7		-5												
Kamoto et al., 1994	Fin	HF	Bas niveau de cellules	13.9		-14			+3,0									+2,1
	Fin	HF	Haut niveau de cellules	14.0		-26			+1,2									+2,3
Knight et Dewhurst, 1994	Fin	HF	Primipares et multipares	24.0	-23													
Stelwagen et al., 1994a	Fin	HF		13.3	-8				+0,4									-0,1
Lacy Hulbert 1995	Fin		Alimentation ad libitum	8.0		-16			+1,5									+2,6
	Fin		Alimentation restreinte	5.0		-15			+5,2									+1,8
Stelwagen, Lacy-Hulbert, 1996	Début			13.5	-15													
Stelwagen et al., 1997	Début			14.0	-15				-0,3									+2,6
Stelwagen et Knight, 1997	Début	HF	Demi-mamelle	16.0		-38												
	Fin	HF	Demi-mamelle	8.0		-28												
Auld et Prosser, 1998	Début	HF	Alimentation ad libitum	21.4	-20				+4,3									-0,1
	Début	HF	Alimentation restreinte	16.2	-14				+4,2									+0,1
Lacy-Hulbert et al., 1999	Fin	HF, HFxJ		6.4		-13			+3,3									+2,2
Rémond et al., 1999	Début	HF	Primipares, 3 1 ^{ères} sem. de lactation	20.9	-21				-1,3									+3,3
	Début	HF	Multipares, 3 1 ^{ères} sem. de lactation	29.8	-20				+5,9									+1,0
	Début	HF	Multipares, 6 1 ^{ères} sem. de lactation	36.6	-39				+3,7									+2,0
Rémond et al., 2002a	Début	HF	Alimentation ad libitum	26.3	-32				+3,3									+1,3
	Début	HF	Alimentation restreinte	24.4	-23				+1,6									-0,4

Tableau 5. Synthèse des variations de production laitière et de la composition du lait sous l'effet de la monotraite, en fonction du stade de lactation, de la durée d'application et des spécificités de l'essai.

ii. *La persistance de lactation*

Le **Tableau 5** révèle une grande diversité de situations testées (alimentation, parité, stade de lactation, race) sur des durées d'application très variées de la monotraite : inférieure ou égale à une semaine, inférieure ou égale à un mois, supérieure ou égale à un mois, toute la lactation. La perte moyenne est de 20 % pour la monotraite appliquée sur une durée inférieure à une semaine ($n = 13$), de 19 % pour une durée supérieure à une semaine mais inférieure à un mois ($n = 18$), de 24 % pour une application d'une durée supérieure à un mois ($n = 12$) et de 39 % pour une application sur toute la durée de la lactation ($n = 5$). Même si ces moyennes cachent une variabilité très importante (exemples : pertes allant de -5 à -39 % pour une durée inférieure à un mois et de -29 à -50 % pour une application sur la lactation complète), les pertes de lait semblent augmenter avec la durée d'application de la monotraite, et être maximales lorsque celle-ci est appliquée sur la totalité de la lactation.

Cette tendance est cohérente avec les résultats décrits par Hickson et al. (2006) montrant une moindre persistance de la lactation chez les vaches passées en monotraite, dans des conditions de pâturage. Ce résultat n'est toutefois pas systématiquement observé (cas d'animaux correctement alimentés ; Rémond et al., 2004). Stelwagen et al., (2013) ont émis l'hypothèse que l'augmentation de la perte de lait avec la durée d'application serait liée à une perte de l'aptitude sécrétoire de la glande mammaire. Cette hypothèse ainsi que les mécanismes impliqués seront présentés plus en détail dans le chapitre 4 de la bibliographie. De la même manière que la perte de production laitière, les pertes de matières solides du lait (matières grasses et protéiques) augmentent lorsque la durée de la monotraite augmente, comme le montre la **Figure 11**.

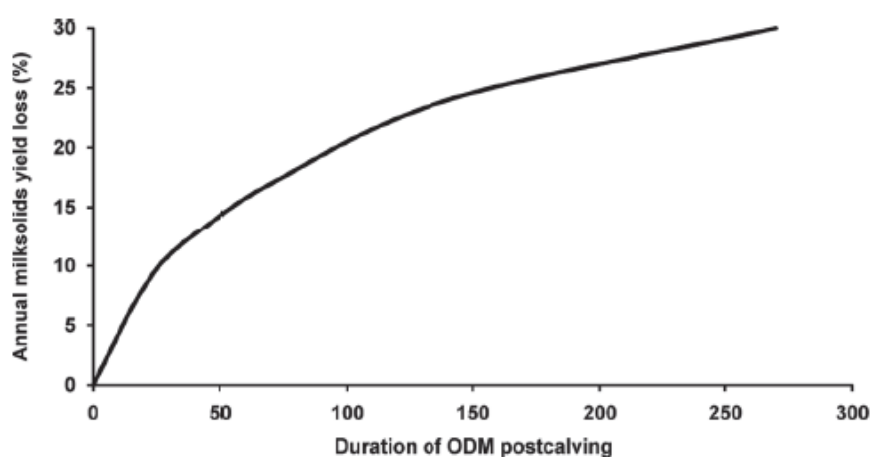


Figure 11. Relation entre la durée de la période de monotraite, appliquée dès le vêlage, et la perte de matières grasses et protéiques du lait (pourcentage de la production en traite biquotidienne. (Stelwagen et al., (2013) d'après les données de Phyn et al., (2010))

iii. L'alimentation

Les animaux passés en monotraite produisant moins de lait, il paraît cohérent d'ajuster leurs apports alimentaires journaliers. Néanmoins, l'alimentation et la fréquence de traite semblent avoir des effets indépendants et additifs ou partiellement additifs sur la production laitière (Guinard-Flament et al., 2007; Stelwagen et al., 2013). En situation de restriction alimentaire, l'utilisation de la monotraite provoque une perte additionnelle de production laitière (Auldist et Prosser, 1998; Kay et al., 2013). Ces pertes seraient néanmoins moins importantes chez les animaux restreints que chez les animaux correctement alimentés (-14 contre -21 % de lait chez des vaches restreintes à hauteur de 40 % de leur **MSI (Matière Sèche Ingérée)** en comparaison de vaches non restreintes) (Kay et al., 2013). Cette interaction « restriction alimentaire × réduction de la fréquence de traite » serait observée lorsque la capacité de la glande mammaire à stocker le lait est limitante, c'est-à-dire au pic et au milieu de lactation (Stelwagen et al., 2013). Cette hypothèse est confirmée par le fait qu'en fin de lactation, lorsque la capacité de stockage de la glande mammaire est normalement moins limitante qu'au pic ou au milieu de la lactation (Dewhurst et Knight, 1993), cette interaction entre l'alimentation et la fréquence de traite (monotraite) n'était plus visible, les pertes de lait associées à la monotraite étant alors inférieures à celles observées avec la restriction alimentaire. Toutefois les effets de l'alimentation sur la production laitière en monotraite sont multifactoriels et doivent dépendre non seulement de l'intensité de la restriction alimentaire opérée et du stade de lactation mais également d'autres facteurs tels que la **NEC (Note d'Etat Corporel)** des animaux.

iv. Composition du lait

Les intervalles de traite allongés, et la monotraite en particulier, induisent des variations de la teneur des composants majeurs et mineurs du lait (Davis et al., 1999). La majorité des études reportent une augmentation des taux butyreux et protéiques lors du passage en monotraite, associés à une diminution du taux de lactose.

La plupart de ces changements seraient dus à une augmentation de la perméabilité de l'épithélium mammaire en réponse à l'accumulation prolongée de lait dans la mamelle. La distension de la mamelle provoquerait le relâchement des jonctions serrées et une perte de l'imperméabilité de l'épithélium mammaire, permettant le passage de molécules de petite et grande taille, telles que le lactose, des ions (Na^+ , Cl^- , K^+), l' α -lactalbumine, la sérumalbumine et les immunoglobulines (Torres et al., 2016; Linzell et Peaker, 1971; Stelwagen et al., 1994c). Les globules gras et micelles de caséines du lait auraient en revanche une dimension trop importante pour passer du lait vers le milieu interstitiel *via* l'espace intercellulaire (Stelwagen et al., 1998). L'augmentation du taux butyreux lors de la monotraite est due à un effet de concentration, les matières grasses diminuant moins que la production de lait (Stelwagen et al., 2013). Les raisons de cet effet de concentration ne sont pas élucidées. La monotraite

réduit l'expression de gènes impliqués dans la synthèse des matières grasses (Grala et al., 2011) ainsi que le prélèvement dans le sang des nutriments nécessaires à la synthèse des matières grasses (Guinard-Flament et al., 2007). L'augmentation du taux protéique dans le lait pourrait être due à plusieurs phénomènes. Tout d'abord, la monotraite augmente parfois la concentration des caséines dans le lait (Claesson et al., 1959; Lacy-Hulbert et al., 1999; Rémond et al., 2004). Ce phénomène pourrait être dû à l'amélioration du bilan énergétique des animaux (Rémond et Pomiès, 2005). Par ailleurs, la réponse à la monotraite se caractérise majoritairement par une augmentation du taux de protéines solubles et une diminution du ratio caséines / protéines solubles (Auldist et Prosser, 1998). Ces protéines solubles seraient surtout d'origine sanguine, leur influx vers le lait étant favorisé par l'ouverture des jonctions serrées. Plus précisément, la monotraite augmenterait la concentration de β -lactoglobuline de 20 à 30 % (Knutson et al., 1993), et dans les mêmes proportions les concentrations de la sérumalbumine et des immunoglobulines (Stelwagen et al., 1994a; Stelwagen and Lacy-Hulbert, 1996; Auldist and Prosser, 1998). Elle augmenterait également l'activité protéolytique du lait *via* l'activation du système plasmine-plasminogène (Knutson et al., 1993; Stelwagen et al., 1994c). En revanche, la concentration de l' α -lactalbumine, cofacteur impliqué dans la synthèse du lactose, resterait inchangée lors du passage en monotraite (Knutson et al., 1993)

b- Sur les autres paramètres zootechniques

i. Nutrition

Ingestion. Peu d'études ont permis d'évaluer l'impact de la monotraite sur l'ingestion des vaches laitières, les vaches étant souvent au pâturage où la mesure de l'ingestion est difficile. Dans quelques études, les résultats semblent indiquer que la diminution de la production laitière observée lors du passage en monotraite n'est pas systématiquement associée à une diminution de l'ingestion des vaches laitières. Cette diminution dépendrait de la durée d'application de la monotraite et peut-être du stade de lactation. En effet, aucune variation de l'ingestion n'est reportée à court terme (après sept jours de monotraite) chez des vaches laitières en milieu de lactation (Delamaire et Guinard-Flament, 2006b; Guinard-Flament et al., 2007). Pour des périodes plus longues d'application, Holmes et al. (1992, monotraite sur toute la lactation au pâturage), Patton et al. (2006, quatre premières semaines de lactation) et Ferris et al. (2008, fin de lactation) ont reporté une diminution non significative de l'ingestion chez les vaches passées en monotraite. Seuls Rémond et al. (2004) et McNamara et al. (2008) ont mesuré une diminution de l'ingestion chez des vaches passées en monotraite en début de lactation (respectivement, -1,4 kg de MSI durant les quatre premières semaines de lactation et -1,3 à -2,0 kg de MSI à partir de la septième semaine de lactation et jusqu'à la quatorzième semaine de lactation).

Bilan énergétique. Mettre en place la monotraite en début de lactation (Rémond et al., 2002a, 2004; Schlamberger et al., 2010a), pour toute la durée de la lactation (Holmes et al., 1992) ou pour des durées

plus courtes, conduit à une augmentation du poids vif et de la note d'état corporel des animaux (à l'inverse de ce qui est observé en traite biquotidienne), du fait de l'amélioration de leur bilan énergétique. Cette amélioration de l'état nutritionnel des vaches laitières est confirmée par des concentrations plasmatiques inférieures d'acides gras non-estérifiés et de BHBA et des concentrations plasmatiques supérieures de glucose (McNamara et al., 2008; Schlamberger et al., 2010a; Kay et al., 2013). Elle est due à la faible voire absente diminution de l'ingestion alors que la production de lait chute fortement.

ii. Reproduction

Certains paramètres de fertilité ont été mesurés dans des études où la monotraite était appliquée à des stades divers et pour des durées différentes. La monotraite semble avoir un impact favorable ou neutre sur la fertilité (Stelwagen et al., 2013). Parmi les impacts favorables, la monotraite favoriserait la reprise de cyclicité après le vêlage (Rhodes et al., 1998; Patton et al., 2006) et pourrait augmenter la proportion de vaches gestantes lorsqu'appliquée sur une lactation complète (Rémond et al., 2004). Ces résultats sont néanmoins à nuancer : McNamara et al. (2008) n'ont rapporté aucun effet de quatre semaines de monotraite en début de lactation sur les performances de reproduction ; de plus, Patton et al. (2006) n'ont constaté aucune influence de la monotraite sur l'intervalle vêlage-vêlage, le taux de fécondation à la première ou deuxième insémination et sur le taux de gestation. L'effet potentiellement positif de la monotraite sur les performances reproductives des vaches pourrait être lié à la diminution de production laitière engendrée par cette pratique. En effet, la fonction de lactation est en concurrence avec la fonction de reproduction, particulièrement en début de lactation chez les animaux à haut potentiel laitier, lorsque le niveau d'ingestion ne permet pas d'assurer la couverture des besoins énergétiques pour la production de lait. La monotraite, en réduisant la quantité de lait produite et en améliorant la balance énergétique, permettrait une amélioration des performances reproductives à cette période (Stelwagen et al., 2013; Guinard-Flament et al., 2013).

iii. Santé, bien-être et comportement

Statut immunitaire de la vache. Quelques travaux ont caractérisé l'évolution du statut immunitaire des vaches laitières passées en monotraite. Toutefois, les effets observés ne sont pas clairs, notamment en ce qui concerne l'activation du système immunitaire spécifique. En effet, pour des conditions d'applications de la monotraite à peu près similaires (les 45 et 52 premiers jours de lactation, respectivement), O'Driscoll et al., (2012) ont observé une augmentation de la proportion de lymphocytes sanguins et une diminution de celle des monocytes et des PMN tandis que Gleeson et al., (2007) ont reporté des résultats complètement opposés (diminution de la proportion de lymphocytes et augmentation de celle des monocytes et des PMN). Le nombre de globules blancs totaux, les teneurs en protéines de la phase aiguë de l'inflammation et de la cytokine pro-inflammatoire **IFN- γ (InterFeroN**

gamma) n'étaient pas affectés par la monotraite dans l'étude de O'Driscoll et al. (2012). Llamas Moya et al. (2008) ont, quant à eux, observé une diminution de l'activité de phagocytose des PMN et du burst respiratoire chez les vaches où la monotraite était aussi appliquée pendant les sept premières semaines de lactation. Loisselle et al. (2009), qui ont étudié l'impact de la monotraite durant les sept premiers jours de la lactation seulement, n'ont pas constaté de modification du chimiotactisme, de la phagocytose, du burst respiratoire, de la prolifération des lymphocytes ou du taux de cytokines pro-inflammatoires, excepté pour les IFN- γ , qui ont augmenté transitoirement au jour 5. L'ensemble de ces résultats semble indiquer un faible impact de la monotraite sur le statut immunitaire des vaches laitières.

Santé métabolique. Bien que l'application de la monotraite en début de lactation soit associée à une amélioration du bilan énergétique, aucune étude n'a jusqu'à présent rapporté de modifications de l'incidence de maladies métaboliques telle que la cétose, l'hypocalcémie ou la lipidose hépatique dues à l'utilisation de la monotraite (Stelwagen et al., 2013).

Santé de la mamelle. La monotraite est perçue comme étant une pratique à risque pour la santé de la mamelle pour deux raisons principales : 1) la stase prolongée du lait dans la mamelle peut y favoriser la multiplication des germes pathogènes, 2) les écoulements de lait parfois observés entre les traites peut favoriser la pénétration des germes pathogènes dans la mamelle *via* le canal du trayon. Toutefois, la plupart des études ne rapportent pas d'augmentation de la fréquence des infections intramammaires et des mammites cliniques chez les vaches passées en monotraite (Holmes et al., 1992; Lacy-Hulbert et al., 2005; Rémond et Pomiès, 2005). Selon la bibliographie, la monotraite est associée à une augmentation plus ou moins marquée de la CCS. Cette augmentation serait davantage liée à une inflammation bénigne de la mamelle (absence d'infection), qui serait associée à une augmentation des PMN dans le lait, à l'activation du système immunitaire mammaire (Stelwagen et Lacy-Hulbert, 1996) et à l'exfoliation des CEM, probablement en lien avec la rupture des jonctions serrées survenant lors de l'accumulation de lait dans les alvéoles mammaires (Herve et al., 2015). Pour de courtes périodes, la monotraite entraînerait une augmentation rapide et transitoire (pendant quatre à cinq jours) de la CCS (Stelwagen et Lacy-Hulbert, 1996; Rémond et Pomiès, 2007). Selon Farr et al. (2002), la faible réaction inflammatoire provoquée par la monotraite augmenterait également le contenu du lait en molécules bioactives favorables, telle que la lactoferrine, des protéines de la phase aiguë de l'inflammation et des RNases. Sur des durées plus longues, le degré d'augmentation de la CCS dépendrait de la durée d'application de la monotraite et de l'état sanitaire initial des mamelles. Chez les vaches présentant initialement une faible (<150 000 cellules/mL) à très faible (<50 000 cellules/mL) numération cellulaire, la monotraite ne générerait pas de dépassement du seuil de 250 000 cellules/mL, seuil au-delà duquel des pénalités sont généralement appliquées en France

(Stelwagen et Lacy-Hulbert, 1996; Davis et al., 1999). En revanche, les vaches ayant déjà des niveaux cellulaires élevés avant le passage en monotraite auraient des CCS qui augmenteraient davantage lors du passage en monotraite (Kamote et al., 1994) et seraient susceptibles de dépasser le seuil de pénalités (Davis et al., 1999; Guinard-Flament et al., 2013).

Boiteries. Au pâturage, la monotraite en divisant par deux les trajets aller-retour de la pâture à la salle de traite et l'attente sur des sols bétonnés, pourrait réduire les problèmes d'onglons et de boiteries. Ainsi, O'Driscoll et al. (2010) ont observé une diminution de la fréquence des maladies des onglons chez les vaches en monotraite, malgré une plus forte érosion de ceux-ci, probablement due aux conditions humides de pâturage. *A contrario*, au pâturage, sur de longues distances, la locomotion des vaches pourrait être détériorée en raison de la distension plus forte de la glande mammaire, la vache étant obligée d'effectuer des mouvements anormaux des pattes arrières pour s'adapter au volume accru de la mamelle (Gleeson et al., 2007). Cet effet resterait limité au début de lactation. Les vaches en monotraite présentent en effet une meilleure locomotion en comparaison aux vaches traites deux fois par jour sur le reste de la lactation (O'Driscoll et al., 2010), ce qui suggère un impact global plutôt positif de la monotraite sur la locomotion.

Bien-être et comportement. La monotraite est associée à une plus grande fermeté de la glande mammaire, particulièrement au pic de lactation, chez des vaches fortes productrices et ayant une alimentation à haut niveau énergétique (apport de concentrés) (Gleeson et al., 2007). A l'inverse, à l'approche du tarissement, la différence de fermeté de la glande mammaire entre les animaux deux fois et une fois par jour, serait très faible ainsi que la différence du comportement de couchage (Tucker et al., 2007). Au pic de lactation, la monotraite est aussi associée à des fuites de lait plus nombreuses par les trayons et une adaptation du mouvement des pattes lors des déplacements, suggérant une gêne des animaux liée à la distension mammaire. Ces effets semblent toutefois être moins présents, voire absents chez les animaux ayant une alimentation de type pâturage sans supplémentation (Tucker et al., 2007). De plus, au pâturage, les vaches traites une fois par jour passent davantage de temps couchées que les vaches traites deux fois par jour, indiquant une non-détérioration de ce comportement (Tucker et al., 2007).

L'inconfort provoqué par le passage en monotraite semble disparaître dès la première semaine de réduction de la fréquence de traite : le nombre de fuites de lait et la fermeté de la glande mammaire redeviennent normales (Tucker et al., 2007; O'Driscoll et al., 2012). Les autres signes d'inconfort ou de comportements de stress ne sont plus observés : pas de vocalisations supplémentaires, pas d'altération du couchage, ni d'augmentation des concentrations fécales en glucocorticoïdes (Tucker et al., 2007). En conclusion, la monotraite semble avoir un impact limité sur le bien-être et le comportement des vaches laitières, mais quelques aménagements de la conduite, notamment une

réduction de l'apport en concentrés au pic de lactation chez les vaches fortes productrices, pourraient être bénéfiques pour les vaches en monotraite.

c- Sur le système d'élevage

Comme indiqué précédemment dans ce chapitre, la monotraite réduit la quantité de lait produite, ainsi que la quantité de matières solides du lait tout en provoquant l'augmentation des taux butyreux et protéiques. En complément, les vaches traites une fois par jour sur toute la lactation auraient une ingestion de matière sèche (MSI) inférieure à celle de vaches traites deux fois par jour (Holmes et al., 1992). Dans le cas des systèmes où l'alimentation et le logement des animaux ne sont pas des facteurs limitants, la baisse de production laitière pourrait être compensée par l'augmentation de la taille du troupeau afin de conserver le niveau de production laitière de l'exploitation (Stelwagen et al., 2013). En France, peu d'études ont été menées pour estimer l'impact économique de la monotraite. Toutefois, dans le contexte de 2003, Brunschwig et al. avaient estimé que pratiquer la monotraite entre une semaine et trois mois durant l'été sur des exploitations de taille moyenne (54 vaches en moyenne) en zone fromagère (Massif-Central) en association avec une augmentation inférieure à 5 % du cheptel permettrait d'augmenter de 0.6 à 6.8 % le temps disponible annuel, en ayant une diminution raisonnable de l'**Excédent Brut d'Exploitation (EBE)**. En revanche, en simulant une application de la monotraite sur toute la durée de la lactation, ces mêmes auteurs (Brunschwig et al., 2004) ont estimé à 39 % l'augmentation du cheptel nécessaire afin de conserver le niveau de production de l'exploitation. Dans ce cas, la monotraite ne serait pas associée à une diminution de la charge de travail. Sous l'hypothèse de maintien d'un cheptel constant, l'EBE serait alors fortement pénalisé puisqu'il diminuerait de 62 %.

Un équilibre pourrait probablement être trouvé en mettant en place un scénario intermédiaire (Portier et al., 2006). Ces auteurs ont montré qu'il serait possible de conserver une marge brute d'exploitation identique associée à une réduction du temps de travail de l'ordre de 17 % avec une monotraite appliquée sur l'ensemble de la lactation et un accroissement du cheptel de 27 %.

3. Etude de la variabilité interindividuelle des réponses à la monotraite

Pour rappel, les effets moyens de la monotraite sur la production et la composition du lait reportés dans le **Tableau 5** varient de manière très importante d'une expérimentation à l'autre. Les variations observées sont au moins pour partie liées à des conditions d'application de la monotraite et d'alimentation non homogènes. De la même façon, intra-expérimentation, tous les facteurs ne sont pas forcément homogènes (stade de lactation, parité différentes...). Le but de cette partie est de recenser et de décrire les facteurs physiologiques et génétiques connus qui influencent les réponses des vaches à l'allongement de l'intervalle entre traites.

i. Le statut sanitaire

L'influence du statut sanitaire de la vache et plus particulièrement de celui de la glande mammaire a été peu étudiée dans la littérature. Néanmoins, Holmes et al. (1996) ont reporté une diminution plus importante de la production laitière chez des vaches ayant des niveaux cellulaires initialement élevés dans le lait (14 % contre 26 % pour les vaches à faible et haut niveau cellulaire, respectivement). Selon ces auteurs, la monotraite amplifierait les effets dépressifs du niveau préexistant d'inflammation et / ou d'infection de la glande mammaire sur la production de lait.

ii. Le stade de lactation

Plusieurs études rapportent des pertes relatives de lait au passage en monotraite plus importantes lors d'une application en début ou au milieu de la lactation (Carruthers et al., 1993a; Stelwagen et Knight, 1997). Le stade de lactation lors de l'application de la monotraite aurait également un impact lors du retour à deux traites par jour. En effet, même pour des courtes périodes, la monotraite en début de lactation induit des effets rémanents et diminue durablement la production laitière au retour à deux traites par jour (Rémond et al., 1999; McNamara et al., 2008; Phyn et al., 2011; Kay et al., 2013).

iii. La parité

D'après Rémond et Pomiès (2005), les vaches primipares ont des pertes de lait relatives supérieures à celles des vaches multipares lorsque la monotraite est appliquée sur l'ensemble de la lactation (+10 % en primipares et +6 % en multipares pour chacune de deux expérimentations réalisées). Mais cet effet ne serait pas visible en cas de monotraite de courte durée (moins de trois semaines). En complément, en race Holstein, Clark et al. (2006b) ont reporté des pertes plus importantes chez les vaches en deuxième et troisième lactation (+14 et +11 %, respectivement) que chez les vaches en quatrième lactation et plus (monotraite sur toute la lactation). Cependant dans la même étude, cette différence n'était pas visible pour des vaches de race Jersiaise, indiquant qu'il pourrait exister une interaction entre la race et la parité sur la réponse en lait à la monotraite.

Au-delà de ces facteurs intrinsèques aux animaux, une variabilité individuelle conséquente subsiste même dans les expérimentations pour lesquelles les vaches sont placées dans des conditions homogènes et contrôlées (Guinard-Flament et al., 2011a). Cette variabilité serait donc spécifique à l'animal, en lien avec sa génétique.

d- Facteurs génétiques

i. La race

Les effets de la monotraite ont été à notre connaissance étudiés sur huit races différentes. La majorité des études ont été réalisées sur des vaches de race Holstein, mais également sur des vaches de race Jersiaise ((Holmes et al., 1992; Carruthers et al., 1993b), Rouge Suédoise et Blanche Suédoise

(Claesson et al., 1959), Montbéliarde (Rémond et al., 2002b; Pomiès et al., 2003), Tarentaise (Rémond et al., 2002b) ou encore Brune Suisse (Schlamberger et al., 2010b). De plus, des vaches croisées Holstein × Jersiaise (Holmes et al., 1992; Lacy-Hulbert et al., 1999; Kay et al., 2013; Phyn et al., 2014) et Holstein × Normande (Guinard-Flament et al., 2011a) ont également été utilisées. Si toutes les races de vaches perdent du lait lors du passage en monotraite, le niveau de perte est variable d'une race à l'autre. Les vaches de race Jersiaise (Carruthers et al., 1993a) et Montbéliarde (Pomiès et al., 2007) semblent notamment perdre moins de lait que les vaches de race Holstein. D'après Davis et al. (1999), ces différences entre races pourraient être dues partiellement à une différence de concentration du lait en matières sèches. Les vaches ayant un lait plus concentré, telles les Jersiaises, seraient moins sensibles à la monotraite et perdraient moins de lait. Toutefois, la comparaison de deux lignées de vaches de race Holstein sélectionnées pour avoir un lait hautement ou faiblement concentré (8,9 contre 7,8 % de matières sèches) par Carruthers et al. (1993a) n'a pas permis de mettre en évidence des différences dans la réponse à la monotraite. Les différences de réponse entre races suggèrent un déterminisme génétique à la réponse à la monotraite. Si l'effet de la race sur les pertes de lait au passage en monotraite a été étudié, l'effet de la race sur les effets rémanents et les gains de production laitière au retour à deux traites par jour n'a, à notre connaissance, pas été évalué par la littérature.

ii. La répétabilité

Très peu d'études ont évalué la répétabilité des réponses des vaches laitières suite au passage en monotraite. Carruthers et al. (1993a) ont rapporté une répétabilité de 49 % sur les pertes absolues de production laitière et une répétabilité de 41 % des pertes relatives en utilisant trois périodes d'une semaine de monotraite. En complément, Rémond et Pomiès (2007) ont reporté une corrélation de 0,91 des pertes relatives au passage en monotraite pour des mêmes individus passés en monotraite plusieurs fois au cours de la même lactation. La répétabilité constituant la limite supérieure de l'héritabilité, les valeurs obtenues par Carruthers et al. (1993a) permettent de supposer que la perte de lait lors du passage en monotraite est un caractère d'héritabilité moyenne, ce qui sous-entendrait qu'une part non négligeable de la variation de ce caractère est déterminée génétiquement. La répétabilité des effets rémanents et des gains de production laitière au retour à deux traites par jour n'a à notre connaissance pas été étudiée dans la littérature.

iii. L'héritabilité et les corrélations génétiques de la réponse à la monotraite avec d'autres caractères

La perte absolue et relative de production laitière au passage en monotraite ainsi que le gain de production laitière au retour à deux traites par jour n'ont jusqu'à présent pas fait l'objet d'une étude du déterminisme génétique. En revanche, les paramètres génétiques des niveaux de production laitière et de la composition du lait en monotraite ont été évalués par Lembeye et al. (2016) en utilisant

les données de contrôle laitier enregistrées par la Livestock Improvement Corporation (LIC) en Nouvelle-Zélande de 2008 à 2012 sur des vaches de race Holstein, Jersiaise et croisée Holstein x Jersiaise. Ces auteurs ont trouvé une héritabilité de 0,33 sur la production laitière durant la monotraite, qui était légèrement inférieure à celle de la production laitière estimée pour les vaches traites deux fois par jour (0,36). L'héritabilité du taux butyreux était également légèrement inférieure en monotraite comparée à celle à deux traites par jour (0,62 contre 0,66), tandis que les héritabilités du taux protéique (0,67) et du score de cellules somatiques du lait (0,12) étaient identiques en monotraite et à deux traites par jour. Les corrélations génétiques entre les différents caractères de production et de composition du lait (production laitière, quantités de matières grasses et de protéines produites, taux butyreux et protéiques et score de cellules somatiques du lait) étaient identiques pour les deux fréquences de traite. A titre d'exemple, la corrélation de la production laitière avec la quantité de protéines produites était de 0,85 en monotraite et de 0,84 pour les vaches traites deux fois par jour. Ces corrélations montrent que les relations génétiques entre caractères sont sensiblement les mêmes entre les deux populations, excepté entre la quantité de lait et les CCS, légèrement défavorable dans la population monotraite et légèrement favorable dans la population « traite biquotidienne ». Cette analyse a surtout montré que les variances génétiques et environnementales étaient plus faibles dans la population monotraite que dans la population traite biquotidiennement. Cette différence pourrait entraîner un progrès génétique différent dans les deux populations, et un biais dans l'estimation des valeurs génétiques si cette hétérogénéité de variance selon la fréquence de traite n'était pas prise en compte.

iv. Sélection sur la production laitière en monotraite : exemple de l'index développé par le LIC en Nouvelle-Zélande

La **Livestock Improvement Corporation (LIC)** en Nouvelle-Zélande a mis en place dès 2003 un index de synthèse spécifique à la monotraite en utilisant les valeurs génétiques estimées sur les individus traités deux fois par jour pour quatre caractères : la production de lait, les matières grasses, les matières protéiques et le score des cellules somatiques du lait (McPherson et al., 2007). La première version de cet index consistait à utiliser une pondération subjective de ces caractères qui soit plus adaptée aux demandes des éleveurs en monotraite notamment pour contre-sélectionner le volume de lait produit. Une première évolution a consisté à calculer pour chaque caractère des index spécifiques à la monotraite à partir des index en bitraite et des corrélations estimées entre index bitraite et index monotraite (spécialement évalués dans une sous-population totalement en monotraite). L'impact économique des caractères dans un contexte de monotraite a également été évalué pour calculer les pondérations économiques de l'index monotraite dans l'index de synthèse. Cet index a depuis évolué. En plus des caractères utilisés dans l'index bitraite classique, de nouveaux caractères ont été pris en

compte. Il s'agit notamment de caractères concernant la vitesse de traite, la capacité de stockage, la qualité des attaches de la glande mammaire et la position des trayons avant (site internet de la Livestock Improvement Corporation : www.lic.co.nz). Les effectifs de vaches en monotraite sont jusqu'à présent insuffisants pour justifier de développer deux programmes de sélection de pères pour une utilisation soit en monotraite soit en bitraite, ou pour augmenter le progrès génétique sur la matière protéique dans la population globale. L'index de synthèse monotraite est toutefois à la disposition des éleveurs afin de leur permettre d'optimiser leur plan d'accouplement en fonction de leur fréquence de traite.

En bref

L'allongement de l'intervalle entre traites regroupe plusieurs pratiques parmi lesquelles la monotraite, qui consiste à traire les vaches une seule fois jour. Bien que correspondant à une réduction de l'astreinte de traite, cette pratique est peu répandue en raison de la diminution importante de production laitière qu'elle occasionne (-20 à -30 % en moyenne). La monotraite est également associée à des changements de composition du lait, avec généralement une augmentation du taux butyreux et du taux protéique. La monotraite générerait également une réaction inflammatoire, se traduisant par une élévation des comptages cellulaires du lait, sans pour autant accroître le nombre d'infections cliniques ou provoquer le dépassement des seuils de pénalités (mamelle saine).

Les pertes de lait au passage en monotraite sont extrêmement variables : elles oscillent entre 8 et 50 % de la production laitière initiale selon les essais. Les gains au retour à deux traites par jours sont eux aussi extrêmement variables. Cette variabilité est en partie due à des facteurs d'élevage (durée d'application de la monotraite, alimentation) mais dépend aussi de l'état physiologique des vaches (statut sanitaire, stade de lactation et parité) et de leur génétique, comme l'atteste l'influence de la race.

Cette variabilité interindividuelle, indépendamment des facteurs d'élevage (*i.e.* à conduite constante) suggère que certains individus seraient mieux adaptés que d'autres à l'allongement de l'intervalle entre traites. Cette aptitude dépendrait de l'état physiologique de l'animal mais aussi d'un déterminisme génétique. Si ce dernier a été évalué pour le niveau de production en monotraite (une seule étude réalisée en Nouvelle-Zélande), celui sur les réponses à la monotraite (*i.e.* pertes au passage en monotraite et gain au retour à deux traites par jour) n'a pas encore été étudié.

Chapitre 4 : Mécanismes mis en jeu lors de l'allongement de l'intervalle entre traites

Les mécanismes impliqués dans la diminution de la production laitière et les changements de composition du lait en réponse à l'allongement de l'intervalle entre traites sont au moins en grande partie d'origine locale. En effet, la monotraite appliquée de façon unilatérale (sur une seule demi-mamelle) génère des pertes de lait limitées aux seuls quartiers soumis à la monotraite (Claesson et al., 1959; Stelwagen et Knight, 1997). Ces mécanismes, illustrés en **Figure 12**, sont déclenchés par l'accumulation de lait dans les alvéoles mammaires. Leur analyse est complexe du fait de leur nombre, de l'enchevêtrement de leurs relations, et de la connaissance partielle que nous en avons. Selon Davis et al. (1999), ces mécanismes pourraient être classés selon deux catégories. La baisse de production laitière observée en début d'application de la monotraite (premier jour et jours suivants) constituerait la phase aiguë d'adaptation, correspondant aux mécanismes précoces mis en place dès les 24 premières heures de monotraite tandis que la phase chronique d'adaptation verrait la mise en place de mécanismes parfois initiés précocement mais maintenus par la répétition de l'allongement de l'intervalle entre traites, aboutissant à une diminution durable de la production laitière.

1. Phase aiguë d'adaptation et réponses précoces

Comme indiqué précédemment, l'allongement inhabituel de l'intervalle de traites se traduit par une stase prolongée d'une quantité plus importante de lait dans la mamelle, notamment au niveau des alvéoles mammaires, générant une distension de ces dernières. C'est principalement cette distension alvéolaire qui déclenche les mécanismes à l'origine d'une diminution curvilinéaire du taux de sécrétion du lait au cours des 24 premières heures de monotraite. Plus précisément, le taux de sécrétion reste relativement constant jusqu'à 12 h après la traite, diminue légèrement entre 12 h et 16-18 h puis plus fortement ensuite (Elliott et al., 1960; Wheelock et al., 1966; Stelwagen et al., 2008). Les phénomènes et mécanismes qui participent ou pourraient contribuer à l'inhibition de la sécrétion de lait sont connus de façon imparfaite. Ils sont induits par l'accumulation d'une quantité importante de lait dans la mamelle, cette accumulation provoquant par des effets physiques et / ou chimiques, directs ou indirects un effet inhibiteur sur l'activité métabolique des CEM. Après avoir présenté les mécanismes modulant la distension alvéolaire, nous décrirons plus en détail les mécanismes (initiés ou partiellement initiés par la distension alvéolaire) qui induisent la réponse aiguë d'adaptation de la mamelle (inflammation, augmentation de la perméabilité de l'épithélium mammaire, baisse du débit sanguin et de l'activité de synthèse des CEM), les liens entre ces mécanismes ainsi que l'influence d'un possible médiateur, le FIL.

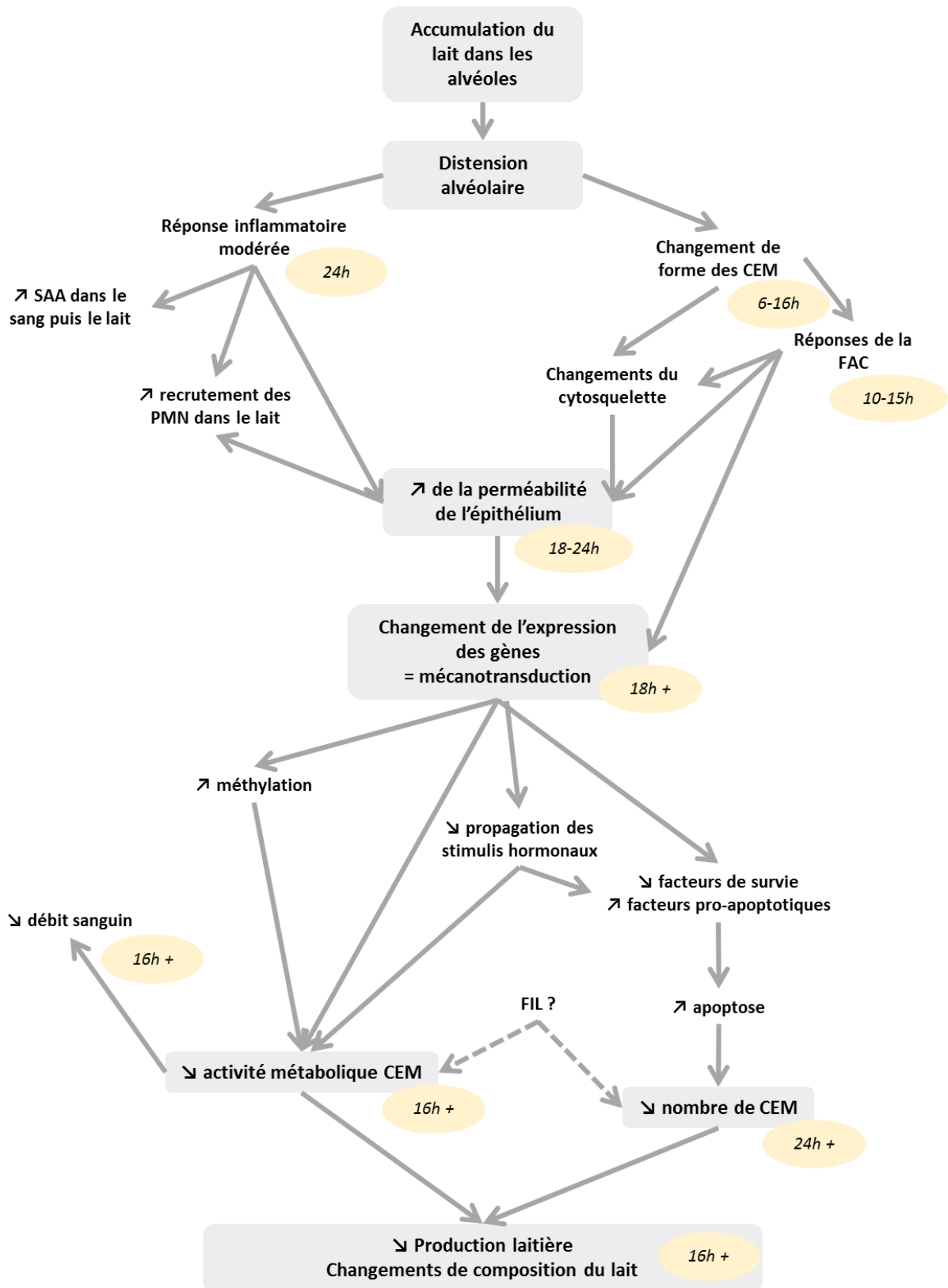


Figure 12. Mécanismes impliqués dans la diminution de la production laitière et les changements de composition du lait en réponse à l'allongement de l'intervalle entre traites. Adapté d'après Davis et al., (1999).

a- Distension des alvéoles mammaires

Selon Green et Streuli (2004), le degré et la durée de la distension des alvéoles mammaires est un des facteurs les plus importants dans la modulation de la régulation de la production du lait lors de l'allongement de l'intervalle entre traites. Cette distension est associée à des changements dans la forme des CEM, changements qui participeraient au déclenchement de l'involution mammaire lors de l'arrêt de la traite ou de la tétée (Green et Streuli, 2004).

La distension des alvéoles mammaires sous l'effet de l'accumulation du lait sécrété par les CEM serait un phénomène continu (Turner, 1955). En moyenne, le compartiment cisternal commence à se remplir six à huit heures après la traite, c'est-à-dire avant que le compartiment alvéolaire ne soit plein (Stelwagen et al., 1996). Ce dernier est rempli à environ 90 % de sa capacité, environ 16 h après la traite (Davis et al., 1999) **Figure 13**. Ainsi, la pression intra-mammaire augmente lentement après la traite puis très fortement quand la capacité de distension de la glande est atteinte (Turner, 1955).

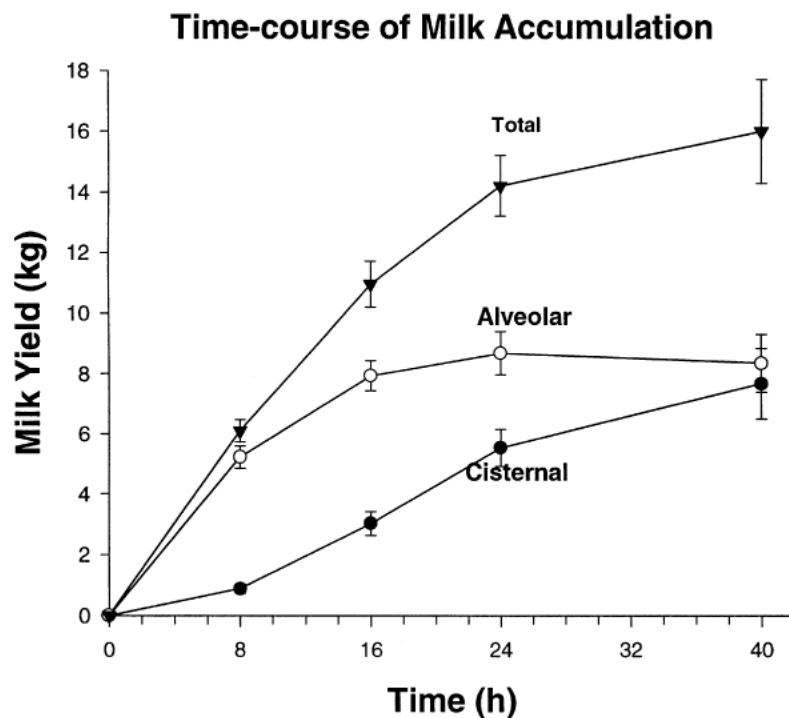


Figure 13. Quantités de laits alvéolaire et cisternal dans les glandes mammaires de vaches soumises à quatre intervalles de traite différents. (Davis et al., 1999)

Les fractions cisternales étaient mesurées après injection d'adrénaline et les fractions alvéolaires après injection d'ocytocine.

Le rôle du compartiment cisternal est d'accumuler le lait provenant des alvéoles indépendamment du compartiment alvéolaire, permettant ainsi à ces dernières d'assurer la continuité de la production en retardant leur distension (Davis et al., 1999). Ainsi, les vaches qui stockent une proportion de lait plus importante dans le compartiment cisternal que dans le compartiment alvéolaire ont des pertes de

lait moins importantes au passage en monotraite (Knight et Dewhurst, 1994; Stelwagen et Knight, 1997). La proportion de lait stockée dans la citerne augmentant au cours de la lactation (Dewhurst et Knight, 1993), cela expliquerait au moins partiellement les pertes plus importantes observées lors d'un passage en monotraite en début ou milieu de la lactation (Stelwagen et al., 2013).

La taille de la citerne ne serait toutefois pas le principal facteur régulant l'augmentation de la distension alvéolaire car la distension des alvéoles augmente avant que la capacité de stockage de la mamelle ne soit atteinte (Davis et al., 1999). Ce serait davantage l'aptitude des vaches à transférer le lait du compartiment alvéolaire vers le compartiment citernal qui influencerait les réponses en lait à la monotraite.

b- Perméabilité des jonctions serrées

Les jonctions serrées sont des structures liées au cytosquelette des cellules endothéliales et épithéliales. Elles sont situées à l'extrémité du pôle apical des cellules et remplissent à la fois une fonction de séparation entre le domaine basal et apical des CEM, et une fonction de barrière empêchant le mouvement des ions et des petits composés entre la lumière de l'alvéole et le milieu interne (Stelwagen et al., 1997). En d'autres termes, les jonctions serrées sont les garantes de l'imperméabilité de l'épithélium mammaire. Il est aujourd'hui établi que les jonctions serrées se relâchent lors de stases lactées et lors de l'involution, permettant ainsi les échanges de molécules de taille conséquente, telles la sérualbumine et les immunoglobulines entre le lait et le sang (Torres et al., 2016).

Lors du passage en monotraite, des changements de composition du lait et du sang sont observés. La concentration du lactose dans le plasma sanguin augmente fortement au premier jour de monotraite, à partir de 16 à 18 h d'accumulation de lait dans la mamelle. De manière concomitante, on observe une apparition importante d' α -lactalbumine dans le plasma sanguin (Stelwagen et al., 1994a, 1997) et, inversement, un influx de sérualbumine, d'ions Cl^- et Na^+ dans le lait, associé à une diminution du lactose et des ions K^+ dans le lait. Ces variations indiquent une modification de la perméabilité de l'épithélium mammaire durant les 24 premières heures de monotraite : celui-ci deviendrait plus perméable, indiquant un relâchement de ce dernier en réponse à l'accumulation du lait dans la mamelle. De même, ce phénomène surviendrait parallèlement à l'augmentation de la pression intra-mammaire (Turner, 1955). Selon ces auteurs, l'imperméabilité de l'épithélium serait rapidement restaurée après le passage en monotraite.

La rupture des jonctions serrées pourrait aussi être une des principales causes de la diminution de la production de lait observée lors de la monotraite. En effet, Stelwagen et al. (1995) ont observé des niveaux similaires de perte laitière en induisant une rupture des jonctions cellulaires par l'utilisation d'**EGTA (Ethylene Glycol-bis(β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-Tetraacetic Acid)**. Aujourd'hui, malgré de

nombreux travaux, le lien entre la rupture des jonctions serrées et la perte de production laitière n'est pas encore clairement explicité (lien de cause à effet direct ou indirect ou simples phénomènes concomitants ?). L'efflux de lactose vers le compartiment sanguin au travers de l'épithélium pourrait néanmoins partiellement expliquer les pertes de lait. En effet, comme indiqué au chapitre précédent, le lactose étant un des principaux composants osmotiques du lait, il contribue à la régulation osmotique de la quantité de lait produite. Sa diffusion vers le compartiment sanguin est donc probablement associée à des pertes de lait. En accord avec cette hypothèse, Stelwagen et al. (1997) ont estimé que la diffusion de lactose vers le sang survenant lorsque l'imperméabilité de l'épithélium mammaire n'est plus assurée pourrait être responsable d'environ 20 % des pertes de lait survenant durant les 24 premières heures de monotraite.

c- Inflammation mammaire

L'accumulation d'une quantité importante de lait dans les alvéoles mammaires provoque également une légère réponse inflammatoire qui pourrait être liée aux modifications de la perméabilité de l'épithélium mammaire observées sur le premier intervalle de 24 h (Stelwagen et al., 1995). Cette inflammation se traduit par l'augmentation de la CCS et de la proportion de PMN au cours du premier jour de monotraite et/ ou des jours suivants (Stelwagen et Lacy-Hulbert, 1996; Lakic, 2011). Si la perte de l'imperméabilité de l'épithélium mammaire n'est pas directement responsable de la migration des PMN vers le lait, elle pourrait avoir facilité la migration de ces derniers dans le lait (Lakic, 2011). Selon cet auteur, l'augmentation de la migration des PMN dans le lait serait due à une augmentation de l'activité chimio-attractante du lait durant le premier intervalle de 24 h même si les agents à l'origine de cette activité n'ont pu être clairement identifiés. A notre connaissance, aucune étude n'a exploré le lien entre la réponse inflammatoire de la mamelle et les variations de lait bien que cette réponse survienne aussi dès le premier jour de monotraite.

d- Débit sanguin mammaire et activité de synthèse des CEM

La quantité de sang irriguant la glande mammaire (débit sanguin mammaire) diminue lors de l'allongement de l'intervalle entre traites. Ce mécanisme se met en place à peu près simultanément à la perte de l'imperméabilité de l'épithélium mammaire et à la chute du taux de sécrétion du lait, *i.e.* dès 16-20 h d'accumulation de lait dans la mamelle chez la chèvre et la vache (Stelwagen et al., 1994b ; Guinard-Flament et al., 2011b). Trois hypothèses peuvent expliquer cette diminution. Cette dernière pourrait résulter de la moindre demande en énergie de la mamelle, liée à la diminution de l'activité métabolique des CEM (Cant et McBride, 1995), ou résulter de la compression des capillaires sanguins par le lait accumulé dans la mamelle (Farr et al., 2000), ou encore des deux phénomènes. Aujourd'hui, l'hypothèse « métabolique » prédomine, notamment parce que des perfusions intra-mammaires de solutions iso-osmotiques de sucrose ont échoué à réduire la quantité de sang irriguant la mamelle

(Peaker, 1980). Ces perfusions devaient pourtant mimer l'effet physique du lait accumulé sur le débit sanguin mammaire. Pour autant, les récents résultats de Guinard-Flament et al. (2011b) suggèrent l'existence réelle d'une compression des vaisseaux sanguins qui pourrait être à l'origine de la diminution du débit sanguin mammaire. Néanmoins, si cette diminution peut contribuer à initier un frein sur la synthèse et sécrétion de lait, elle n'explique pas à elle seule la diminution de l'activité métabolique de la mamelle, du fait de nutriments sanguins devenus limitants pour les synthèses. En effet, dans cette même étude, Guinard-Flament et al. (2011b) ont observé une régulation à la baisse de l'activité métabolique supérieure à la diminution des prélèvements mammaires de nutriments, suggérant que leur fourniture *via* le débit sanguin mammaire n'était pas le frein le plus important.

e- **FIL (Feedback Inhibitor of Lactation) et peptides issus de la dégradation de la caséine**

De manière complémentaire, ou en interaction avec les mécanismes précédemment cités, la sécrétion de lait durant les intervalles de traite prolongés pourrait également être régulée par un inhibiteur autocrine. Des preuves d'une telle molécule ont été avancées par Wilde et al. (1995), qui ont mis en évidence l'existence d'un peptide, qu'ils ont nommé le FIL (Feedback Inhibitor of Lactation). Ce peptide, de nature soluble, inhiberait la sécrétion de lait *in vitro* et *in vivo* de manière concentration-dépendante et réversible. Le FIL serait sécrété en continu dans le lait, mais coexisterait sans doute sous des formes active et inactive. La connaissance des modes de régulation de l'activité du FIL pourrait permettre d'expliquer pourquoi ce peptide entraîne une diminution de la production laitière en cas d'intervalles de traite prolongés. Une hypothèse plausible serait que le FIL soit actif seulement lorsqu'il est en contact avec les CEM, ce qui pourrait expliquer, au moins en partie, les pertes de lait supérieures lors de l'allongement de l'intervalle entre traites chez les vaches ayant un ratio stockage citernal/alvéolaire faible (Knight et al., 1998). Les mécanismes d'action du FIL, et notamment la nature de ses récepteurs au pôle apical des CEM sont pour le moment également inconnus. Ce dernier altérerait la sécrétion des protéines en impactant notamment l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique, conduisant à une diminution jusqu'à 50 % de la synthèse protéique (Knight et al., 1998), mais pourrait également agir sur la synthèse du lactose et des lipides du lait. De manière intéressante, et peut-être complémentaire, Shamay et al. (2003) ont observé que l'injection d'un hydrolysate soluble des caséines (contenant notamment des fractions de la caséine β , qui sont connues pour s'accumuler dans la glande mammaire lors de stases lactées prolongées) générerait une rupture des jonctions serrées dans un délai de huit heures et précipitait l'involution mammaire. Au regard de ces résultats, il est tentant d'émettre l'hypothèse que le composé actif, et peut-être le FIL, soit issu de ces fractions de la caséine β .

2. **Phase chronique d'adaptation et mécanismes impliqués**

Dans les jours et semaines qui suivent le passage en monotraite, des mécanismes d'adaptation (apparus dès la phase aiguë d'adaptation ou mis en place ultérieurement) vont expliquer les

changements durables de la production laitière (quantité et composition). Ces mécanismes sont principalement liés à une diminution de l'activité métabolique et sécrétoire des CEM (premiers jours et semaines) et de leur nombre (à plus long terme). Leurs effets sont réversibles lorsque la durée d'application de la monotraite est courte, c'est-à-dire de quelques jours à une ou deux semaines, et la récupération de la production laitière est généralement complète. En revanche, leurs effets peuvent devenir irréversibles lorsque la monotraite est appliquée sur des durées plus longues, expliquant la récupération souvent incomplète de la production laitière (Davis et al., 1999).

Selon Stelwagen et al. (2001), l'accumulation de lait dans la mamelle provoquerait au niveau des alvéoles mammaires un étirement et un écrasement des CEM. Ces modifications histologiques entraîneraient des modifications de l'environnement des CEM : les communications entre les CEM adjacentes et entre les CEM et la membrane basale (donc entre les CEM et la matrice extracellulaire), seraient modifiées. On parle alors de mécanotransduction. La mécanotransduction, dont toutes les voies de signalisation et les mécanismes sous-jacents n'ont pas tous été déterminés, peut agir sur l'expression des gènes de la cellule et, par ce biais, modifier le nombre de CEM (*via* des signaux d'apoptose, de survie cellulaire) et leur activité métabolique et sécrétoire. En complément, l'activité des CEM pourrait également être modulée par des phénomènes de méthylation de l'ADN. La fin de cette bibliographie détaillera d'abord les mécanismes aboutissant à une réduction durable de l'activité métabolique et sécrétoire de CEM, puis les mécanismes régulant le nombre de CEM.

a- Mécanismes aboutissant à une diminution de l'activité de synthèse de CEM

Après sept jours de monotraite, la quantité de sang irriguant la mamelle est toujours diminuée (Delamaire et Guinard-Flament, 2006a), entraînant une moindre disponibilité des nutriments sanguins pour les CEM. Néanmoins, cette réduction de l'afflux de sang à la mamelle résulterait de la diminution de l'activité métabolique de la glande mammaire. En effet, la diminution de la quantité de nutriments arrivant à la mamelle n'expliquerait que 60 % de la réduction des quantités de nutriments prélevés (glucose et d'azote α -aminé), les 40 % restants étant dus à une diminution de la capacité de la mamelle à extraire ces composés du sang, du fait d'une activité de synthèse réduite des CEM (Delamaire et Guinard-Flament, 2006a).

La diminution de l'activité métabolique des CEM est associée à une réduction de l'activité de certaines enzymes et d'une diminution des taux d'ARNm (**Acide RiboNucléique messenger**) (Delamaire et Guinard-Flament, 2006b). Ainsi, Singh et al. (2008) ont observé une diminution des ARNm de l' α -lactalbumine, de la caséine α s1 et du taux d' α -lactalbumine dans les 24-48 heures suivant la cessation de la traite. De même, la monotraite est fréquemment associée à une réduction de l'expression des gènes de la β -caséine, de la κ -caséine et de l' α -lactalbumine (Yang et al., 2005; Singh et al., 2008; Boutinaud et al., 2008; Grala et al., 2011; Littlejohn et al., 2010). La corrélation de la diminution des

niveaux d'expression de la κ -caséine et de l' α -lactalbumine pourrait indiquer une modulation par un mécanisme commun, tel un déclin des effets liés à la PRL (Boutinaud et al., 2008). L' α -lactalbumine, cofacteur nécessaire à la synthèse du lactose, voit aussi son expression diminuée, ce qui pourrait expliquer en partie la diminution de la synthèse de lactose du lait (et par voie de conséquence, de la production laitière). Elle pourrait également, indirectement, expliquer la diminution de prélèvement du glucose sanguin par la mamelle (corrélation de 0,68 entre le prélèvement de glucose mammaire et le taux de transcription de l' α -lactalbumine) (Boutinaud et al., 2008).

La mécanotransduction pourrait induire une diminution de la propagation des stimuli, notamment hormonaux (Davis et al., 1999). La réceptivité de la glande mammaire à la PRL, par exemple, pourrait être un élément clé de la réponse à la monotraite (Kim et al., 1997). L'activation des voies de signalisation de la PRL, **STAT5A** et **STAT5B (Signal Transducer and Activator of Transcription 5A and B)**, serait notamment diminuée en cas de monotraite (Murney et al., 2015a), induisant une diminution de l'activité sécrétoire de la CEM. En addition aux effets de la PRL, l'expression de l' α -lactalbumine et des caséines lors de la monotraite pourrait également être diminuée par la sérotonine, un neurotransmetteur impliqué dans la régulation des jonctions serrées et synthétisé à partir du tryptophane (Hernandez et al., 2008).

La méthylation de l'ADN est une marque épigénétique, c'est-à-dire un changement chimique qui modifie le fonctionnement du génome sans impliquer de changement de la séquence d'ADN. Elle concourrait à la mise sous silence ou à la diminution de l'expression des gènes sans nécessairement initier cette moindre expression, un autre processus pouvant la déclencher. La méthylation de l'ADN est un événement relativement stable, qui perdure donc dans le temps et est éventuellement transmissible à la descendance. Cependant, la plupart du temps, elle est effacée passivement lors de la division cellulaire (Singh et al., 2012; Nguyen et al., 2014). La méthylation d'un gène donné, serait généralement plus élevée dans les tissus d'un organe qui n'exprime pas le caractère codé par le gène. C'est par exemple le cas des gènes codant pour la caséine, qui présentent un degré de méthylation bien supérieur dans le foie (entre 61 et 78 %) par rapport à la glande mammaire en lactation (entre 28 et 33 %). La monotraite a été associée une élévation du degré de méthylation (entre +4 et +5 %) du gène *CSN1S1*, codant pour la synthèse des caséines α -S1 (Nguyen et al., 2014). Cette augmentation est légère mais pourrait concourir à la baisse de synthèse des protéines. De manière intéressante, l'arrêt de la traite pendant huit jours a aussi provoqué une augmentation des niveaux de méthylation du gène *CSN1S1*, mais la reprise de la traite a généré un effet réversible provoquant la déméthylation de ce gène. En revanche, lorsque la traite était interrompue sur une durée de 28 jours, la méthylation n'a pas été réversible et les vaches ont récupéré seulement partiellement leur niveau de production laitière (Singh et al., 2012). Par analogie, on peut donc supposer que la méthylation de l'ADN est

impliquée dans les effets rémanents de la monotraite sur l'activité de synthèse de CEM, dès lors que cette pratique est appliquée sur plusieurs semaines.

b- Mécanismes aboutissant à une réduction du nombre de CEM

La monotraite génère une augmentation de l'expression des facteurs pro-apoptotiques, associée à une diminution de l'expression des facteurs de survie cellulaire (Davis et al., 1999).

Les changements les plus fréquemment observés en association à l'application de la monotraite sont une sur-régulation de l'expression de **Bax (protein Bcl-2 associated X)** et de **Bcl-2 (protein B-cell lymphoma 2)** (Singh et al., 2005; Boutinaud et al., 2008; Grala et al., 2011). L'augmentation de la protéine Bax, et surtout l'augmentation du ratio bax:bcl2 indiquerait le déclenchement de la voie intrinsèque de l'apoptose. Toutefois Grala et al. (2011) ont relevé que le ratio bax:bcl2 revenait à la valeur initiale lors du retour à deux traites par jour. Ces mêmes auteurs ont également observé une activation des récepteurs de mort cellulaire **Fas (protein Apoptosis Stimulation Fragment)**, impliqués dans la régulation extrinsèque de l'apoptose, activation qui perdurerait lors du retour à deux traites par jour. Ils ont ainsi émis l'hypothèse que l'apoptose à court terme serait induite par le stress cellulaire, tandis que la perte de cellules observée à plus long terme lors de la monotraite serait due à des facteurs extracellulaires.

La monotraite réduit également l'expression des facteurs de survie. Par exemple, chez la vache, le passage en monotraite a réduit l'expression des récepteurs des IGF-1 (Bernier-Dodier et al., 2010). La monotraite perturberait aussi la voie de signalisation d'un autre facteur de survie, la **FAK (Focal Adhesion Kinase)**, une protéine cytoplasmique, activée par les intégrines et qui permet l'adhésion des protéines du complexe d'adhérence.

En conclusion, les mécanismes énoncés précédemment contribuent à la diminution de la production laitière *via* une baisse d'activité de synthèse des composants du lait, l'apoptose des CEM ou bien des deux. La plupart des publications attestent que la monotraite active les voies de signalisation de l'apoptose, et correspondrait bien à l'induction de l'équivalent d'un stade 1 de l'involution, dont les effets peuvent être réversibles. En revanche, il semble que la monotraite n'induit pas le deuxième stade, non réversible, de l'involution. En effet, il n'est pas établi que la monotraite soit associée à un remodelage tissulaire. Dans la majorité des cas, elle n'induit pas de prolifération des CEM (Ben Chedly et al., 2012; Bernier-Dodier et al., 2010; Boutinaud et al., 2013; Murney et al., 2015b). Ainsi, les intervalles de traite prolongés de 24 h initieraient sans doute les mécanismes mis en place lors du stade 1 de l'involution, mais la traite suivante « sauverait » le processus de lactation et empêcherait donc le déroulement du stade 2 de l'involution mammaire (Littlejohn et al., 2010).

Des analyses histologiques, menées en complément des analyses précédentes, ont montré que la perte de capacité sécrétoire concernerait l'ensemble des cellules d'une même alvéole plutôt que quelques cellules dans toutes les alvéoles (Nguyen et al., 2014; Singh et al., 2012). En d'autres termes, la monotraite génèrerait une involution asynchrone des alvéoles mammaires. Cette entrée asynchrone en involution pourrait permettre d'expliquer en partie les effets rémanents de la monotraite sur la lactation chez la vache laitière.

En bref

Les mécanismes régulant les réponses de production laitière à la monotraite sont en grande partie d'origine locale. Ils sont nombreux et parfois interdépendants. A l'heure actuelle, leur connaissance n'est pas exhaustive.

Ces mécanismes sont déclenchés directement ou indirectement par la stase prolongée d'une quantité inhabituelle de lait dans la glande mammaire. Ils peuvent être classés selon deux catégories :

- les mécanismes précoces qui correspondent à une phase aiguë d'adaptation de la mamelle, mise en place dès les 24 premières heures d'accumulation du lait. Ces mécanismes provoquent une diminution du taux de sécrétion du lait. Ils se traduisent par une inflammation modérée, une augmentation de la perméabilité de l'épithélium mammaire, une baisse du débit sanguin mammaire et de l'activité des CEM. Ils pourraient être médiés par la distension des alvéoles mammaires et/ ou par un inhibiteur autocrine peptidique, le FIL (Feedback Inhibitor of Lactation).

- des mécanismes tardifs qui correspondent à une réponse chronique d'adaptation de la mamelle (jours-semaines). Ces mécanismes peuvent être initiés précocement et sont maintenus par la répétition des allongements de l'intervalle entre traites. Ces mécanismes seraient principalement liés au phénomène de mécanotransduction (modification de l'expression des gènes de la cellule sous l'effet de changements de la structure et de l'environnement de la cellule). Concrètement, ces mécanismes résultent en une diminution durable de l'activité de synthèse des CEM et en une diminution du nombre de CEM *via* l'augmentation des processus d'apoptose. Ils expliquent ainsi la diminution durable de la production laitière en monotraite et les effets rémanents observés au retour à deux traites par jour.

Objectifs et démarche de la thèse

Nous avons vu précédemment que la quantification de l'adaptabilité des vaches laitières est un prérequis à l'identification puis à la sélection d'individus adaptables, facteur de pérennité du système d'élevage dans un contexte fluctuant. Nous avons constaté que la compréhension et l'estimation des capacités adaptatives de systèmes biologiques complexes tels les animaux d'élevage sont encore limitées en raison d'un manque de connaissances exhaustives sur l'adaptabilité des fonctions biologiques de l'animal et sur les compromis régissant l'interaction entre ces fonctions. Mieux comprendre l'adaptabilité de la fonction de lactation, fonction clé chez la vache laitière, peut constituer une contribution importante à l'évaluation globale de l'adaptabilité de la vache. Pour cela, évaluer les capacités adaptatives de la glande mammaire, l'organe siège de la synthèse et de la sécrétion des principaux constituants du lait est essentiel.

Dans ce contexte, mon travail de thèse avait deux objectifs :

Caractériser l'adaptabilité de la glande mammaire des vaches laitières en décrivant la diversité interindividuelle des réponses adaptatives

Contribuer à expliquer, voire prédire l'adaptabilité de la glande mammaire à l'aide d'indicateurs phénotypiques et génétiques

Il visait à répondre aux questions de recherche suivantes :

Quelles sont les bornes du domaine d'adaptabilité de la glande mammaire ?

Est-il possible de discriminer différents profils adaptatifs de cet organe ?

Si des profils adaptatifs existent, est-il possible de les expliquer voire de les prédire à l'aide d'indicateurs phénotypiques ou génétiques ?

L'évaluation de l'adaptabilité d'un système nécessite de perturber son fonctionnement. Pour répondre aux objectifs de la thèse, nous avons choisi d'utiliser **l'allongement de l'intervalle entre traites comme perturbation selon deux modalités**. Nous allons à présent argumenter les choix réalisés dans ce travail de thèse, en ce qui concerne 1) le modèle de perturbation et les deux modalités étudiées, 2) les critères de réponses sélectionnés pour caractériser l'adaptabilité du système « glande mammaire » et 3) les phénotypes testés en tant qu'indicateurs ou prédicteurs de cette adaptabilité.

Choix du modèle de perturbation de la glande mammaire

Le choix du modèle de perturbation n'est pas neutre. Pour répondre aux objectifs de la thèse, le modèle de perturbation devait remplir un certain nombre de conditions, à savoir :

- 1) permettre l'étude du système ciblé, c'est-à-dire la glande mammaire, en agissant localement sur cet organe (et non sur l'ensemble de l'organisme) ;
- 2) créer une perturbation rapide et réversible (lorsque la perturbation est levée) sur un pas de temps permettant son suivi dans le temps afin de caractériser la résistance et la résilience du système ciblé ;
- 3) créer une déformation du système qui soit importante pour observer et décrire l'espace des réponses adaptatives ;
- 4) être associé à une variabilité interindividuelle pour décrire l'ensemble du registre des réponses adaptatives possibles entre individus en les discriminant.

Dans ce travail de thèse, nous avons fait l'hypothèse que l'allongement de l'intervalle entre les traites à 24 heures serait un modèle qui répondrait à ces conditions. Tout d'abord, cette perturbation est considérable pour la glande mammaire : en provoquant une stase prolongée du lait, elle induit l'accumulation d'une quantité très importante et inhabituelle de lait dans la mamelle sur un pas de temps long (intervalle doublé). Par ailleurs, nous avons vu précédemment que la monotraite génère une réponse locale (mammaire), rapide (dès le premier jour), importante (-20 à -30 % de lait selon les essais) et réversible avec une récupération plus ou moins complète de la production laitière au retour à deux traites par jour (Stelwagen et Knight, 1997; Rémond et Pomiès, 2005) Elle est aussi associée à une importante variabilité des réponses entre les vaches (Rémond et Pomiès, 2005; Guinard-Flament et al., 2011).

Nous avons utilisé deux modalités de perturbation : un allongement de l'intervalle entre les traites de 24 heures ponctuel (intervalle unique de 24h) ou répété (monotraite). Comme précisé dans la bibliographie, un intervalle unique de 24 h correspond à la phase aiguë d'adaptation de la glande mammaire à la monotraite. Lors de cet intervalle, le taux de sécrétion du lait est normal après la traite et diminue ensuite de façon curvilinéaire, c'est-à-dire de plus en plus rapidement, 14 à 16 h après celle-ci. Au contraire, en monotraite, passé le cap du(es) premier(s) jour(s), la glande mammaire s'est adaptée (on est donc dans la phase chronique de l'adaptation à l'allongement de l'intervalle entre traites) et le taux de sécrétion du lait est plus faible dès les premières heures qui suivent la traite. En monotraite, la mamelle des vaches se remplit moins vite durant l'intervalle entre les traites que celle des animaux traités deux fois par jour. Pour un même individu, ces deux modèles expérimentaux pourraient donc être associés à des réponses adaptatives différentes.

Disposer des réponses aux deux modalités d'allongement de l'intervalle entre traites est intéressant car cela permettrait de déterminer si les réponses observées lors d'un intervalle unique de 24 h sont représentatives ou non de celles observées en monotraite. Par ailleurs, la variabilité des réponses entre individus à un intervalle unique de 24 h n'a pas encore été explorée. Ce travail de thèse est par conséquent l'occasion de déterminer la capacité de l'intervalle unique de 24 h à discriminer les individus entre eux.

Choix des critères utilisés pour décrire la réponse adaptative des animaux

Dans ce travail de thèse, l'aptitude du système « glande mammaire » à se déformer, a été caractérisée au travers de ses sorties. La glande mammaire a pour fonction de sécréter du lait. La perturbation de son fonctionnement, par la monotraite, se traduit par une perturbation de sa fonction sécrétoire *via* des variations importantes de la quantité et de la composition du lait.

Dans les faits, compte tenu du temps imparti pour ce travail de thèse, nous avons restreint l'étude de la réponse adaptative à la monotraite à l'étude d'un seul critère : la quantité de lait produite. Ce critère permet néanmoins de prendre en compte les effets de la monotraite sur les quantités exportées pour chacun des composants du lait (lactose, matières protéiques et grasses) aux variations de composition du lait près. Les changements de composition du lait ont aussi été décrits (surtout les effets moyens) mais ils n'ont pas fait l'objet d'une représentation sous forme de profils de réponse et les déterminants de la variabilité de ces réponses n'ont pas été étudiés.

1. Composantes de la réponse adaptative

La réponse adaptative (amplitude et bornes maximales de déformation) peut se décomposer en deux composantes : la capacité à résister (ou inversement à se déformer) sous l'effet d'une perturbation et la capacité à revenir à l'état initial (ou inversement à se transformer) lorsque cette perturbation a cessé d'être appliquée.

a- Capacité des vaches à résister à la perturbation.

Nous avons étudié la variation de lait lors du passage en monotraite, c'est-à-dire la diminution de la production laitière (appelée aussi « perte de lait »). Deux types de variations ont été considérés : la variation absolue en kilogramme par jour et la variation relative en pourcents. Les pertes de lait absolues (exprimées en kilogramme par jour) sont corrélées au niveau initial de production laitière des animaux (**Figure 14**). La perte relative (calculée en divisant la perte absolue par le niveau de production initial) permet d'étudier la perte de lait indépendamment du niveau de production initial. Il était important d'étudier aussi ce critère car des pertes relatives faibles (inférieures à 20 %), modérées (comprises entre 20 et 30 %) et importantes (supérieures à 30 %) sont observées quel que soit le niveau initial de production des animaux (**Figure 14**).

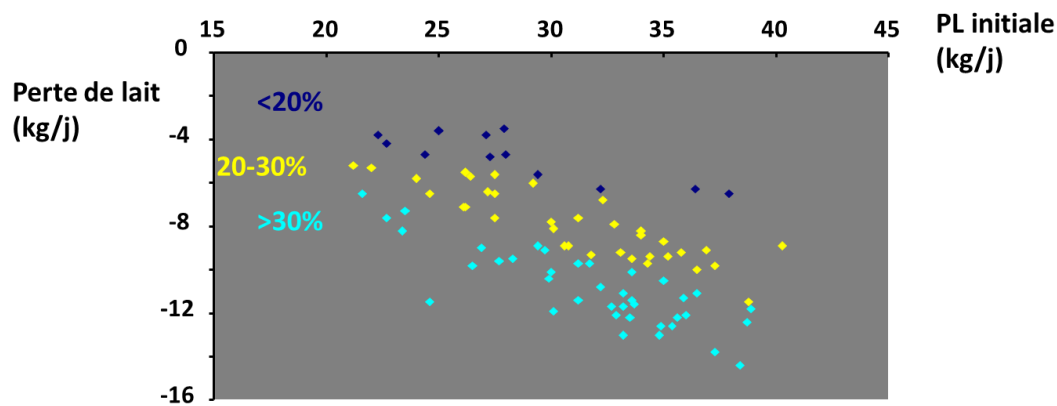


Figure 14. Pertes de lait (en kg/j et % (groupes de couleur)) au passage en monotraite en fonction de la production laitière initiale (d'après Rémond et Pomiès, 2005).

b- Capacité des vaches à revenir à l'état initial

Nous avons utilisé le regain de lait au retour à deux traites par jour exprimé en kilogramme par jour. Néanmoins ce caractère ne donne pas d'indication sur l'aptitude de la vache à retrouver son niveau de production initial lorsque la perturbation a cessé d'être appliquée. Nous avons donc complété cet indicateur par le calcul d'un taux de récupération (en pourcents) exprimé par le rapport du regain (en kilogramme par jour) divisé par la perte de lait en valeur absolue (en kilogramme par jour), multiplié par 100.

Parallèlement à ces variations de production laitière, nous avons également étudié les niveaux de production des animaux mesurés à deux traites par jour et en monotraite. En effet, il est également intéressant de pouvoir expliquer et prédire le niveau de production de l'animal en cas de monotraite.

Etude des facteurs phénotypiques et génétiques de l'adaptabilité de la glande mammaire

Le deuxième objectif de ce travail de thèse était de contribuer à comprendre et à expliquer les réponses adaptatives de la glande mammaire à l'allongement de l'intervalle entre traites *via* l'usage de potentiels facteurs phénotypiques et génétiques. Le but à plus long terme de ce travail était ainsi de pouvoir prédire la variabilité individuelle des réponses adaptatives de la glande mammaire à l'allongement de l'intervalle entre traites. L'étude de la bibliographie montre que certains facteurs sont connus pour influencer sur les réponses de l'animal suite à l'allongement de l'intervalle entre traites. Néanmoins, ces réponses restent encore inexpliquées.

1. Facteurs phénotypiques

Le choix des phénotypes mesurés s'explique par le souhait de disposer de mesures rapides et faciles à mettre en œuvre sur un grand nombre d'individus et d'utiliser une stratégie différente des études précédemment menées afin d'amener un éclairage complémentaire sur les phénomènes observés. Les

phénotypes étudiés ont été choisis en raison de leur lien pluriel ou non, direct ou indirect, potentiel ou démontré, avec les mécanismes régulant la réponse en lait des vaches laitières lors de l'omission d'une traite. Ce phénotypage n'a pas été exhaustif sur l'ensemble des animaux testés. Il a été réalisé en fonction des opportunités offertes dans le cadre de collaborations et des moyens financiers mis à disposition pour cette étude. Concrètement, ces phénotypes étaient associés aux trois hypothèses de régulation de la réponse sur la production laitière lors de l'allongement de l'intervalle entre traites en lien avec les mécanismes de réponse à la monotraite évoqué dans la bibliographie.

a- Effet physique associé à la capacité de distension, ou compliance de la glande mammaire

Ces facteurs sont liés au fait que la capacité de distension, ou compliance, de la glande mammaire pourrait varier entre les individus, modulant leur capacité à s'adapter à l'augmentation de pression intra-mammaire provoquée par l'accumulation du lait dans la mamelle au cours d'intervalles de traite prolongés.

Plus précisément, les phénotypes enregistrés pour évaluer l'effet de la compliance regroupaient le débit d'émission du lait à la traite, le lactose sanguin et la distance entre les trayons. En effet, nous avons fait l'hypothèse que le débit d'émission du lait puisse constituer une mesure simple à mettre en œuvre pour estimer l'effet de l'augmentation de la pression intra-mammaire. La mesure du lactose sanguin et en particulier de sa variation lors des 24 premières heures d'accumulation du lait dans la glande mammaire est un indicateur reconnu de la perméabilité de l'épithélium mammaire et constitue donc une mesure indirecte de la distension alvéolaire sous l'effet de la pression intra-mammaire. Enfin, la mesure de l'écartement entre les trayons et surtout la mesure de ses variations lors de l'accumulation du lait dans la glande mammaire pourrait donner des indications de la capacité de la glande mammaire à se distendre.

b- Effet de la composition peptidique du lait

Les phénotypes enregistrés pour étudier les effets liés à la composition peptidique du lait devaient permettre d'évaluer l'hypothèse de l'existence d'un Facteur Inhibiteur de la Lactation (FIL), dont la nature est présumée peptidique. Les phénotypes mesurés comprenaient :

- le complexe enzymatique plasmine et plasminogène du lait. Cette enzyme du lait voit sa concentration augmenter dans le lait lors de périodes de monotraite (Davis et al., 1999). Elle pourrait être à l'origine de la production de peptides, et notamment du FIL.

- la cartographie peptidique du lait, qui permet de détecter de manière exhaustive et de façon semi-quantitative les peptides contenus dans le lait.

c- **Etat inflammatoire de la glande mammaire**

Peu de travaux ont étudié l'effet de l'allongement de l'intervalle entre les traites en fonction de l'état sanitaire initial des animaux. Dans le cas de la monotraite, il semble que l'état inflammatoire de la glande mammaire puisse moduler les pertes de lait observées. Aussi nous avons cherché à caractériser l'état inflammatoire à la fois à l'échelle systémique (*via* l'haptoglobine sanguine, protéine de la phase aiguë de l'inflammation) et à l'échelle locale (*via* la mesure de la CCS et de la teneur en interleukine-8, une cytokine impliquée dans la signalisation des neutrophiles, dans le lait). La numération de la formule sanguine est venue compléter ces informations afin de déterminer si les réponses adaptatives à la monotraite étaient associées à des profils cellulaires sanguins particuliers, notamment au regard des cellules immunitaires.

2. **Facteurs génétiques**

La bibliographie suggère l'existence d'un déterminisme génétique du niveau de production en monotraite du même ordre de grandeur que celui estimé pour la production laitière observée en traite biquotidienne. L'étude des paramètres génétiques (héritabilités et corrélations génétiques), première analyse classiquement réalisée en génétique quantitative, a donc été implémentée non seulement sur les niveaux de production (production laitière et composition du lait), mais aussi sur les réponses de production laitière afin de déterminer la part de variation de ces réponses adaptatives liée à la génétique de l'animal. Cette étude a été prolongée par l'identification (pour la première fois) de zones du génome éventuellement impliquées dans ces réponses, au travers d'une détection de **QTL (Quantitative Trait Locus(i))**.

Dispositifs expérimentaux

Cette partie vise à décrire les deux modèles expérimentaux mis en place pour répondre aux questions de recherche formulées dans le cadre de cette thèse.

1. Intervalle de traite unique de 24h

Le premier modèle expérimental devait permettre de caractériser les réponses adaptatives de la glande mammaire à un intervalle de traite unique de 24 heures, ainsi que de déterminer l'influence des facteurs environnementaux classiques (stade de lactation, parité...) et des phénotypes complémentaires liés à la compliance de la glande mammaire, à la composition peptidique du lait et à l'inflammation sur ces réponses adaptatives.

Ce premier modèle expérimental a été mis en place à l'IE (**Installation Expérimentale**) Vache Laitière de Méjusseume située au Rheu (35) sur des vaches laitières Holstein de race pure. Il est présenté en **Figure 15**. L'intervalle de traite unique de 24 h (**24-hour milking interval, 24h-MI**) a été obtenu en supprimant la traite du matin d'une seule journée. La semaine située avant la journée d'omission de la traite du matin a constitué la période de contrôle (**control twice-daily milking, cTDM**) et les jours 7 à 14 après le retour à deux traites par jour ont permis d'évaluer les effets rémanents de l'allongement de l'intervalle entre traites (**post twice-daily milking, pTDM2**).

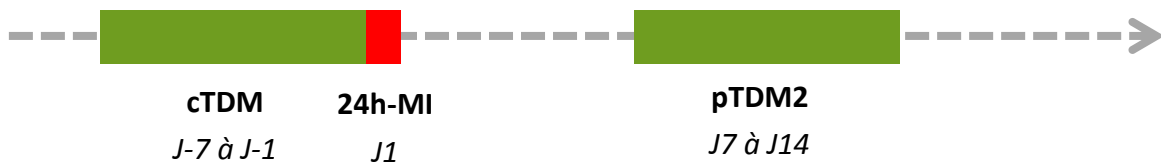


Figure 15. Schéma expérimental de l'expérimentation « omission d'une traite sur une seule journée ».

Cet essai a comporté dix séries expérimentales qui se sont succédé sur cinq ans (de 2008 à 2012), avec de une à trois périodes expérimentales par campagne laitière. Les répétitions sur un même individu en inter-lactation et intra-lactation, bien que non systématiques, avaient pour objectif non seulement de permettre de dissocier les effets du stade de lactation et de la parité de l'effet « individu », mais aussi de calculer une répétabilité animale, indicatrice du plafond d'un possible déterminisme génétique. Les essais « omission d'une traite » ont été planifiés en fonction des autres essais de l'installation expérimentale. Hormis l'éviction des vaches en tout début de lactation (moins de 24 jours de lactation), aucun autre critère de choix des animaux n'a été mis en place. Le nombre de vaches variait donc d'une période expérimentale à l'autre (entre 32 et 159) en fonction des

disponibilités en animaux. Cet essai se caractérise ainsi par une grande variété des facteurs environnementaux : stades physiologiques des animaux (stade de lactation variant entre 24 et 311 jours), parité (de la première à la cinquième lactation), âge au premier vêlage (deux ans contre trois ans) mais également saison, et donc alimentation (contrôlée à l'auge comparé à accès au pâturage). Cette variabilité est davantage détaillée dans les « Matériel et méthodes » des premier et deuxième articles. La prise en compte de cette variabilité des conditions expérimentales devait permettre de quantifier l'influence de ces facteurs environnementaux et de les comparer aux résultats reportés dans la littérature.

L'originalité du protocole consistait à enregistrer des phénotypes complémentaires aux traditionnelles mesures sur le lait (**taux butyreux (TB)**, **taux protéique (TP)**, taux de lactose et cellules somatiques du lait). Ces phénotypes complémentaires ont été présentés dans la partie « Objectifs et démarche de thèse ». Pour chacun d'eux, une mesure à l'état initial (période contrôle) et une mesure de leur variation lors de l'allongement de l'intervalle entre traites ont été réalisées. La mesure à l'état initial était à but prédictif, l'idée étant de voir si une réponse particulière de la production laitière était associée au niveau initial particulier du phénotype. La mesure de la variation du phénotype avait pour principal intérêt d'apporter des éléments de compréhension des mécanismes régulant l'adaptabilité de la vache à l'omission d'une traite.

2. Trois semaines de monotraite : étude du déterminisme génétique

Le deuxième modèle expérimental devait permettre de caractériser les réponses à trois semaines de monotraite, ainsi que d'évaluer la représentativité des 24 premières heures de monotraite. Ce modèle expérimental devait permettre d'estimer la part de variabilité des réponses adaptatives dues à la génétique de l'animal ainsi que d'identifier des zones du génome impliquées dans ces réponses.

Ce dispositif expérimental a été mis en place sur le Domaine Expérimental du Pin au Haras situé dans l'Orne (61). Les 430 vaches croisées Holstein x Normande ayant pris part à cette expérimentation étaient issues du dispositif de recherche de QTL du département Génétique Animale de l'INRA. L'organisation de ce dispositif, ses caractéristiques ainsi que ses objectifs ont déjà été présentés dans les publications de Larroque et al. (2002) et de Lefebvre et al. (2012). Néanmoins, les principes sont réexpliqués ici brièvement. Le protocole de détection de QTL mis en place à l'**UE (Unité Expérimentale)** du Pin au Haras est un protocole de croisement qui génère des individus hétérozygotes et du déséquilibre de liaison pour détecter des QTL. Les deux races ont été choisies pour leurs caractéristiques bien différenciées : des vaches de race Holstein très spécialisées en production laitière et des vaches de race Normande avec un profil mixte, c'est-à-dire une moindre production laitière, un lait plus concentré, davantage d'aptitudes bouchères, une meilleure fertilité et une moindre

mobilisation des réserves corporelles en début de lactation. Concrètement, le programme de détection de QTL a débuté en 1993 par l'accouplement en croisement des reproducteurs de génération F0 (**Figure 16**) : cinq mâles de race Holstein ont été accouplés à 13 vaches de race Normande et cinq mâles de race Normande ont été accouplés à 11 vaches de race Holstein. Cette première étape a abouti à la création de la génération F1. Un total de 862 femelles de génération F2 a été procréé en accouplant dix des mâles F1 à 70 des femelles F1. Enfin, la génération F3, d'un effectif de 324 femelles, a été créée en accouplant les mêmes dix mâles F1 à 49 femelles de F2. Le transfert embryonnaire (utilisé de manière systématique) et le sexage d'une partie des embryons ont été utilisés afin de maximiser le nombre de filles par mère et donc la puissance du dispositif (Lefebvre et al., 2012).

Parmi les 430 vaches de l'expérimentation monotraite, 291 sont issues de la génération F2 et 139 sont issues de la génération F3. Les vaches « monotraite » F2 sont issues des dix mâles F1 du protocole et de 65 des 70 vaches F1. Les dix mâles F1 ont eu de 11 à 49 filles « monotraite » F2 et les 65 femelles F1 ont procréé de une à 16 filles « monotraite » F2. Les 139 vaches « monotraite » de génération F3 sont issues de cinq des taureaux F1 (chacun ayant eu de une à 59 filles) et de 44 mères F2. Parmi les mères F2 des femelles « monotraite » F3, 21 avaient précédemment fait partie de l'expérimentation monotraite. Les femelles F2 « monotraite » ont procréé de une à 7 femelles F3 « monotraite ». La majorité de ces vaches (n= 364) a fait l'objet d'un génotypage sur puce Illumina BovineSNP50 (50K) tandis que 65 vaches ont été génotypées sur la puce Illumina BovineLD (10K), leur génotypage étant ensuite imputé afin d'obtenir 54 000 **SNP (Single Nucleotide Polymorphism)**. Parmi les 430 vaches ayant fait partie de l'expérimentation monotraite, deux n'ont pas été génotypées, quatre génotypes étaient inexploitable et deux vaches avaient des problèmes de filiation qui n'ont pu être résolus (sur les puces 50K). Au final, le génotypage était donc disponible pour 422 vaches.

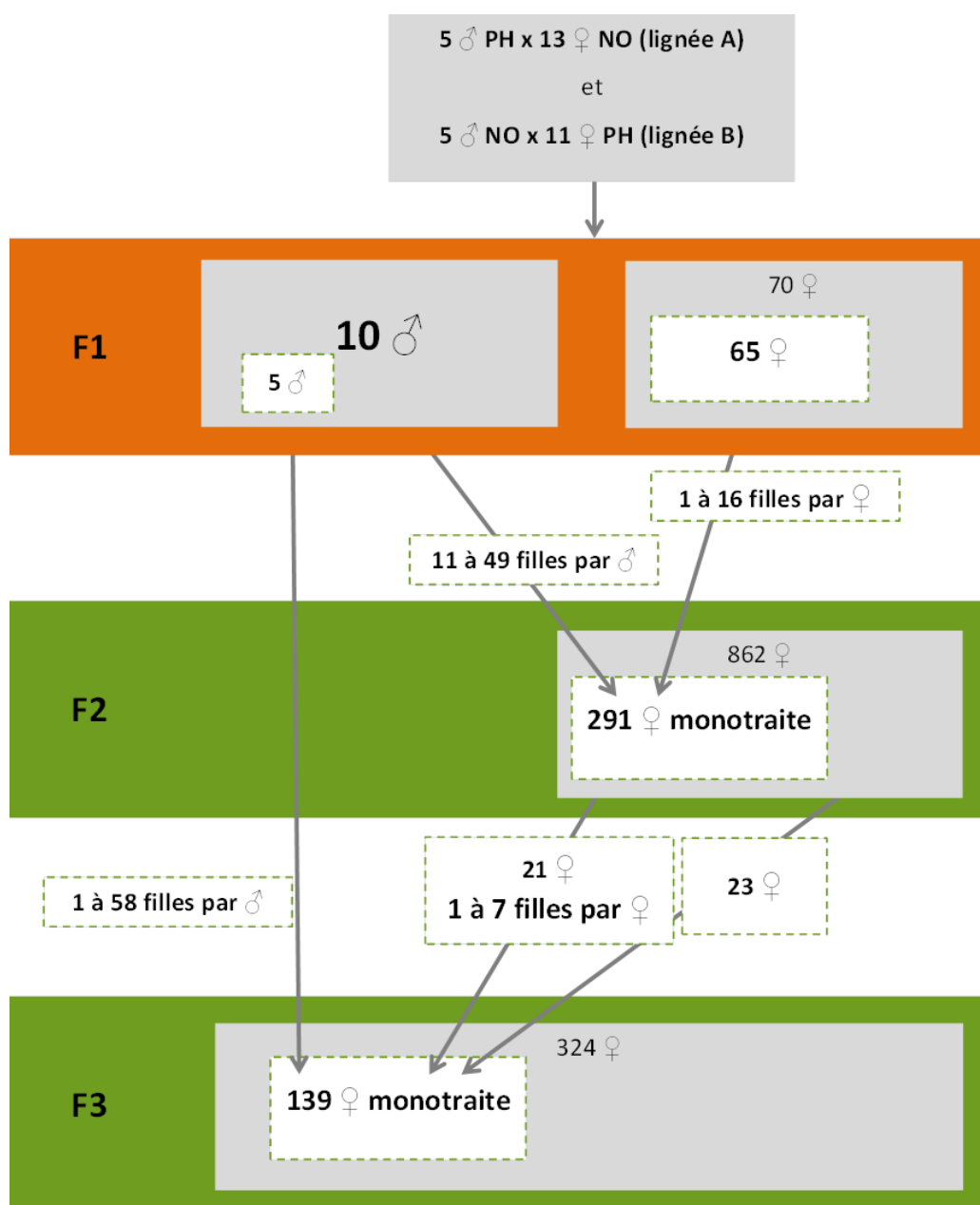


Figure 16. Schéma du dispositif expérimental de détection de QTL en croisement Holstein x Normande de l'UE du Pin au Haras et positionnement des animaux de l'expérimentation monotraite (PH = Prim'Holstein, NO = Normande, ♂ mâle et ♀ femelle).

Les 430 vaches laitières utilisées dans cette expérimentation ont été réparties en deux à trois séries de 7 à 26 vaches sur huit campagnes laitières (de 2004 à 2014, soit 22 cohortes au total) et ont été passées en monotraite (**once-daily milking, ODM**) durant trois semaines. Comme pour l'expérimentation précédente, la semaine avant la monotraite a constitué la période de contrôle (control twice-daily milking, cTDM) et les jours 7 à 14 après le retour à deux traites par jour ont servi à évaluer les possibles effets rémanents de la monotraite (post twice-daily milking, pTDM2) (**Figure 17**).



Figure 17. Schéma expérimental de l'expérimentation monotraite effectuée à l'UE du Pin au Haras.

Hormis l'enregistrement de la production et de la composition du lait (TB, TP, taux de lactose et cellules somatiques), le débit moyen d'émission du lait à la traite ainsi que des mesures de la concentration en lactose du plasma sanguin étaient également disponibles sur une partie des données ($n = 152$ et $n = 261$, respectivement). La mesure de ces phénotypes communs à la première expérimentation devait permettre de compléter l'étude de l'influence de ces phénotypes sur les réponses adaptatives observées en cas de monotraite appliquée durant trois semaines.

Résultats expérimentaux

Partie 1 : Caractérisation des réponses à un intervalle de traite unique de 24h et identification de déterminants de cette réponse

La première partie de mon travail de thèse a consisté à caractériser les réponses adaptatives de vaches laitières de race Holstein à un intervalle de traite unique de 24 h et à identifier les déterminants à cette réponse en mettant à profit des conditions expérimentales variées et la mesure de phénotypes originaux. Cette première partie a fait l'objet de deux articles (dont le premier a été publié) avec résultats complémentaires (**annexe 1**), et de trois présentations orales en congrès. Il s'agissait ici d'étudier la phase aiguë d'adaptation à l'allongement de l'intervalle entre traites, *i.e.* la première journée de monotraite.

Le premier article remplissait deux objectifs complémentaires : 1) définir les réponses moyennes des vaches à un intervalle de traite unique de 24 h ; 2) mettre à profit les conditions expérimentales variées dont nous disposions pour déterminer l'influence des facteurs déjà connus pour leurs effets sur la variabilité des réponses à la monotraite (production laitière à deux traites par jour, stade de lactation, parité...).

Réalisé sur un nombre plus restreint de données, le deuxième article avait lui aussi deux objectifs. Il s'agissait 1) d'expliquer les réponses sur la production de lait suite à l'intervalle unique de 24 h grâce à des modèles linéaires décrivant l'influence de facteurs phénotypiques relatifs à la compliance de la glande mammaire, à la composition peptidique du lait et à l'état inflammatoire de la glande mammaire, et 2) de déterminer l'existence de profils de réponses adaptatives des vaches laitières sur les variations de production laitière suite à cet intervalle et d'identifier des phénotypes (stade physiologique des animaux et facteurs phénotypiques cités plus haut) caractérisant ces profils.

En complément, se trouvent en **annexe 1** les résultats d'une étude visant à explorer les relations entre le taux horaire de sécrétion des vaches et leurs réponses individuelles à un intervalle de traite unique de 24h. Ce travail est issu du stage de **BTSA (Brevet de Technicien Supérieur Agricole) Productions Animales** de Samuel Bronsard, que j'ai encadré en 2014.

1. Réponses moyennes et variabilité individuelle des réponses des vaches laitières à un intervalle de traite unique de 24h



J. Dairy Sci. 99:3103–3112

<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-9782>

© American Dairy Science Association®, 2016.

Individual responses of dairy cows to a 24-hour milking interval

C. Charton,^{††§#} H. Larroque,^{†§#} C. Robert-Granié,^{†§#} D. Pomiès,^{||¶} H. Leclerc,^{**} N. C. Friggens,^{†††} and J. Guinard-Flament^{*†1}

*INRA, UMR 1348 PEGASE, 65 Rue de Saint-Brieuc, F-35042 Rennes Cedex, France

†AGROCAMPUS OUEST, UMR 1348 PEGASE, 65 Rue de Saint-Brieuc, F-35042 Rennes cedex, France

‡INRA, UMR 1388 GenPhySE (Génétique, Physiologie et Systèmes d'Élevage), F-31326 Castanet-Tolosan, France

§Université de Toulouse, INP, ENSAT, UMR 1388 GenPhySE (Génétique, Physiologie et Systèmes d'Élevage), F-31326 Castanet-Tolosan, France

#Université de Toulouse, INP, ENVT, UMR 1388 GenPhySE (Génétique, Physiologie et Systèmes d'Élevage), F-31076 Toulouse, France

||INRA, UMR1213 Herbivores, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France

¶Clermont Université, VetAgro Sup, UMR1213 Herbivores, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France

**Institut de l'Élevage, UMT 3G, Domaine de Vilvert, Jouy-en-Josas, France

††INRA UMR 0791 Modélisation Systémique Appliquée aux Ruminants, 16 rue Claude-Bernard, Paris 75231, France

†††AgroParisTech UMR 0791 Modélisation Systémique Appliquée aux Ruminants, 16 rue Claude-Bernard, Paris 75231, France

ABSTRACT

Some dairy farmers opt to omit one milking, either incidentally or weekly, without changing other milking times. This practice entails an extended milking interval of 24 h (24h-MI), which is associated with a decrease in milk yield. This decrease varies among cows and could be partly due to factors such as stage of lactation and milk yield level. The aim of this study was to describe the average and individual responses in terms of loss and carryover effects of a 24h-MI on milk yield. The influence of factors such as parity, stage of lactation, and milk yield potential were investigated, together with response repeatability. Our trial used 292 Holstein-Friesian cows, and consisted of 3 successive periods: 1 wk of twice-daily milking (TDM) as a control, one 24h-MI, and then 13 d of TDM. The number of observations per cow ranged from 1 to 9, with no more than three 24h-MI per lactation. The 24h-MI reduced milk yield by 23% (7.8 kg on average) and milk lactose content by 2.6 g/kg on the 24h-MI day. Milk fat and protein content, and somatic cell score increased by 3.0 g/kg, 0.5 g/kg, and 0.4 units, respectively. No significant carryover effect was found of a 24h-MI on milk yield or milk composition 2 wk after resumption of TDM. Milk yield loss and recovery varied widely (coefficient of variation 62%), and the relationship between milk loss and milk recovery showed substantial variation (residual standard deviation 2.1 kg/d). Cows with

a greater milk potential level lost more milk yield but recovered more milk, with no influence on recovery:loss ratio. Cows in early lactation recovered the lost milk yield faster. Repeatability of the responses to a 24h-MI was 44% for milk yield loss (kg/d), 57% for relative milk yield loss (%), 33% for milk yield recovery (kg/d), and 0% for milk recovery:loss ratio (%), suggesting a genetically determined ability to limit loss when one milking is omitted. To conclude, a 24h-MI caused higher milk yield losses than reported in previous studies. Stage of lactation, estimated potential milk yield level, and parity explained the cows' response to the 24h-MI, but did not account for all the individual variability.

Key words: dairy cow, 24-hour milking interval, milk loss and recovery, repeatability

INTRODUCTION

In most dairy systems, cows are milked twice daily to maximize milk collected per day with an acceptable labor cost. However, some farmers omit one milking weekly to reduce labor input, allow more flexibility in labor management (Pomiès and Rémond, 2008), or adapt to unforeseen circumstances (milking machine failure, milker's unavailability, and so on). In such cases, farmers either omit one milking without changing other milking times to keep their work pattern (milking and feeding routine), or adjust the length of milking intervals by postponing the previous milking (Ayadi et al., 2003; Meffe et al., 2003).

The omission of one milking without changing milking times entails an extended milking interval of 24 h (24-h milking interval, **24h-MI**) and is associated with an immediate decrease in milk yield observed on the day of milking omission, and carryover effects on

Received May 5, 2015.

Accepted December 5, 2015.

¹Corresponding author. Jocelyne.Flament@agrocampus-ouest.fr

Table 1. Number of observations, year, month, feeding conditions, parity, and stage of lactation per cohort

Cohort	Obs., no.	Year (dairy campaign)	Month	Feeding conditions	Parity (rank of lactation), ¹ %			Stage of lactation, ² d
					1	2	3+	
1	102	2008–09	April	Pasture	43	19	38	150 ± 50
2	47	2009–10	December	Indoor	60	25	15	55 ± 26
3	138	2009–10	June	Pasture	29	29	42	204 ± 51
4	42	2010–11	December	Indoor	93	5	2	75 ± 17
5	139	2010–11	April	Pasture	45	22	33	178 ± 45
6	125	2010–11	June	Pasture	47	23	30	241 ± 45
7	34	2011–12	December	Indoor	32	36	32	48 ± 20
8	32	2011–12	April	Indoor	28	41	31	184 ± 29
9	33	2012–13	December	Indoor	73	9	18	81 ± 18
10	32	2012–13	March	Indoor	72	9	19	172 ± 18

¹1 = first lactation, 2 = second lactation, 3+ = third lactation and plus.

²Mean ± SD.

milk yield, with a gradual return to initial state in the next 2 d (Labussière and Coindet, 1968; Radcliffe et al., 1973). In dairy cows the rate of milk secretion is known to decrease curvilinearly after 16 to 18 h of milk accumulation in the udder, so that the longer the milking intervals, the more marked are the milk losses and carryover effects (Elliott et al., 1960; Wheelock et al., 1966; Stelwagen et al., 2008).

Studies describing the average effects of using a 24h-MI by omitting one milking per week reported an average decrease in milk yield of up to 7.5% over 2 lactations (Labussière and Coindet, 1968), 13% over the entire lactation (Roguinsky et al., 1972), 3.5% over 12 mo (Radcliffe et al., 1973), 10% over 8 wk (Pomiès and Rémond, 2000), and no significant variations over the last 10 wk of lactation (O'Brien et al., 2002). These decreases in milk yield are relatively low, but vary among studies. Wheelock et al. (1966) and Radcliffe et al. (1973) report an individual variability in cows' responses. This individual variability could depend on factors such as stage of lactation, parity, and milk yield potential. Radcliffe et al. (1973) reported greater milk yield losses for high-producing cows in early lactation. Accordingly, Elliott et al. (1960) reported that one of the main factors affecting the decline in the rate of milk secretion with increasing milking interval was the yield level of cows, independent of the stage of lactation.

However, these studies were performed on limited number of cows ($n < 50$), which prevented the authors from determining the influence of these factors. The aim of our study was thus to describe the average and individual responses in terms of loss and carryover effects of a 24h-MI on milk yield and composition using a larger data set (289 dairy cows). The influence of breeding factors, such as parity, stage of lactation, and milk yield potential were investigated, together with response repeatability.

MATERIALS AND METHODS

Experimental Design

To describe responses of dairy cows to a 24h-MI, 292 Holstein dairy cows from the INRA experimental farm of Méjusseume (48.11°N, 1.71°W; Brittany, France) were used in compliance with the National Legislation on Animal Care (French Ministry of Agriculture certification No. C35–275–23).

A total of 775 24h-MI were performed, split into 10 cohorts ($32 < n < 159$), according to year, month, feeding, and housing conditions (Table 1).

Each 24h-MI consisted of 3 successive periods: 1 wk control, when cows were milked twice daily (cTDM), 1 d of 24h-MI (morning milking omitted), and 13 d of twice-daily milking (TDM) to examine milk recovery. These 13 d were divided into 3 sub-periods: pTDM1 (d 1 after 24h-MI), pTDM2 (d 2 to 6 after 24h-MI), and pTDM3 (d 7 to 13 after 24h-MI). When milked twice daily, cows were milked at 0730 and 1630 h. On the day of 24h-MI, cows were milked at 1630 h.

Observations from cows that were dried off before the end of the experiment ($n = 20$), with DIM greater than 311 d on 24h-MI day ($n = 30$) or producing less than 10 kg/d on cTDM ($n = 1$) were removed from the data set. A total of 724 observations corresponding to 289 cows were kept for analysis.

A total of 216 cows underwent more than one 24h-MI, and 73 cows only one. When the 24h-MI was repeated, the number of observations per cow ranged from 2 to 9, with 101, 52, 40, 15, 3, 1, 3, and 1 cows having 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, and 9 observations, respectively, with no cow repeated inside a cohort. The number of observations per cow varied from 1 to 3 within lactation (no more than three 24h-MI per lactation per cow) and from 1 to 4 between lactations.

Cows differed in parity, stage of lactation, and age at first calving both within and among cohorts (Table 1). Calving (seasonal calving) occurred between September and January. Age at first calving was around 24 or 34 mo, and 76% cows had their first calf at around 24 mo.

Measurements, Sampling, and Analysis

Milk yield was recorded at every milking in the milking parlor (rotary milking parlor, milk meter MM25, DeLaval France, Elancourt, France). Milk fat, protein, and lactose contents were determined from milk samples collected at each milking, 2 or 3 d a week during cTDM, pTDM1, pTDM2, and pTDM3 and on the 24h-MI day. Somatic cell count was measured once a day on the same days. Milk fat, protein, and lactose contents were determined by infrared analysis (Milkoscan, Foss Electric, Hillerød, Denmark), and SCC with a Fossomatic cell counter (Foss Electric).

Calculations

For periods longer than 1 d, milk yield and composition were averaged over 5 d (pTDM2) or 1 wk (cTDM, pTDM3). Milk lactose content was transformed using a log scale due to the nonnormality of the data. The SCC was converted into SCS using the formula $SCS = \log_2(SCC/100,000) + 3$, where SCC is expressed in units of 1,000 cells/mL (Rupp and Boichard, 1997).

Milk yield loss (kg/d) was computed as the difference between 24h-MI and cTDM. Relative milk yield loss (%) was milk yield loss (kg/d) divided by cTDM milk yield, multiplied by 100. Milk yield recovery (kg/d) was computed as the difference between pTDM3 and 24h-MI. Milk recovery:loss ratio (%) was computed as milk yield recovery (kg/d) divided by milk yield loss (kg/d), multiplied by 100. The recovery:loss ratio was calculated for cows showing both a loss of milk yield when they switched to 24h-MI, and a gain of milk yield when they switched back to TDM, which occurred for 620 challenges.

The changes expected to occur during a 21-d period of normal twice-daily milking throughout lactation were estimated according to calving month, age at first calving, milk year, parity, and DIM from a reference data set of Holstein-Friesian dairy cows from herds of the west of France with official milk recording (reference data set based on 89,399,603 test-day milking with an average of 312 cows per level (minimum 24, maximum 848); H. Leclerc, 2014, personal communication). These provided a reference against which to compare the changes from 21-d periods including a 24h-MI, and

corrected daily milk yield, milk fat, protein, and SCS contents were calculated on this basis to estimate carryover effects of the 24h-MI.

Statistical Analyses

All statistical analyses were performed using R software (R Core Team, The R Foundation for Statistical Computing, 2014, R: A Language and Environment for Statistical Computing, Version 3.0.2, Vienna, Austria, <http://www.R-project.org>). Data were analyzed using linear mixed models (R package nlme, Pinheiro et al., 2013).

The evolution of milk yield and milk composition was analyzed with the following linear mixed model. Model 1 is

$$Y_{ijklmn} = \mu + \text{period}_i + \text{stage of lactation}_j + \text{parity}_k + \text{age at first calving}_l + \text{milk year}_m + \text{interactions} + \text{cow}_n + \varepsilon_{ijklmn},$$

where Y_{ijklmn} is the dependent variable (corrected and noncorrected daily milk yield, milk fat, protein, and SCS contents and noncorrected lactose content); μ is the mean; the fixed effects tested are the period i (cTDM, 24h-MI, pTDM1, pTDM2, pTDM3), the stage of lactation j , the parity k , the age at first calving l , the milk year m , and the 2-way interactions between the fixed effects; the random effect of the cow (assumed to be normally distributed) is η ; and ε_{ijklmn} is the residual error associated with each $ijklmn$ observation. The fixed effects other than period were coded as follows: primiparous ($n = 340$) were distinguished from cows in second lactation ($n = 162$) and third or more lactation ($n = 222$). Stage of lactation was divided into 4 classes: early lactation (24–50 DIM, $n = 59$), peak of lactation (51–100 DIM, $n = 119$), mid lactation (101–180 DIM, $n = 219$), and late lactation (181–311 DIM, $n = 327$). Age at first calving was divided into 2 classes: first calving at around 24 ± 5 mo ($n = 551$) and at 34 ± 5 mo ($n = 173$). The milk year effect was defined in 3 levels (2008–2010, $n = 287$; 2010–2011, $n = 306$; and 2011–2013, $n = 131$). In preliminary analyses, stage of gestation, feeding (access to pasture versus indoor feeding only), and initial levels of fat, protein and SCS contents were also included, but were not found to be significant.

To use the milk yield level as an explanatory variable for the response to 24h-MI, milk yield during period cTDM was adjusted for environmental factors using the following linear model. Model 2 is

$$Y_{jklm} = \mu + \text{stage of lactation}_j + \text{parity}_k \\ + \text{age at first calving}_t + \text{milk year}_m \\ + \text{stage of lactation}_j \times \text{parity}_k + \text{parity}_k \\ \times \text{milk year}_m + \text{stage of lactation}_j \times \text{milk year}_m \\ + \varepsilon_{jklm},$$

where Y_{jklm} is the milk yield during period cTDM and the other effects are as described above. Potential milk yield level was then defined as $\frac{Y_{jklm} - \hat{Y}_{jklm}}{\hat{Y}_{jklm}}$, where \hat{Y}_{jklm}

is the value predicted from model 2. These values were averaged for each lactation of the cow and coded in 4 levels using the limits: [-0.38 to -10%], [-10% to 0], [0 to 10%], and [10 to 36%], which corresponds to the quartiles of a normal distribution.

Milk yield loss, relative milk yield loss, and milk yield recovery were analyzed according to the following linear mixed model. Model 3 is

$$Y_{jklmno} = \mu + \text{stage of lactation}_j + \text{parity}_k \\ + \text{potential milk yield level}_o + \text{milk year}_m \\ + \text{stage of lactation}_j \times \text{parity}_k \\ + \text{stage of lactation}_j \times \text{milk year}_m + \text{parity}_k \\ \times \text{milk year}_m + \text{cow}_n + \varepsilon_{jklmno},$$

where Y_{jklmno} is the dependent variable (milk yield absolute and relative loss and recovery); μ is the mean; the fixed effects are the stage of lactation j , the parity k , the potential milk yield level o , the milk year m , and the 2-way interactions between the fixed effects; the random effect of the cow (assumed to be normally distributed) is n ; and ε_{jklmno} is the residual error associated with each $jklmno$ observation.

The model built to analyze rate of milk recovery was identical to model 3, except for interactions. The interactions parity \times stage of lactation and parity \times milk year were not significant, but a significant potential milk yield level \times milk year interaction was found.

Results for fixed effects and interactions were expressed as least squares means and were computed using the lsmeans package (Lenth, 2014). Differences were considered significant at $P < 0.05$.

Repeatability of cows' response in terms of milk yield loss (kg/d and %) and recovery (kg/d) between each 24h-MI were computed by dividing the variance explained by the cow effect by total variance, multiplied by 100.

Pearson correlations were computed between milk yields at different experimental periods, milk losses

(kg/d, %), milk yield recovery (kg/d), and milk recovery:loss ratio (%).

RESULTS AND DISCUSSION

During the control week (cTDM), milk yield averaged 28.5 ± 6.33 kg/d, milk fat content averaged 36.9 ± 4.76 g/kg, milk protein content averaged 30.1 ± 2.4 g/kg, milk lactose content averaged 48.0 ± 2.02 g/kg, and SCS averaged 2.58 ± 1.63 units. These data showed marked individual variations, especially for milk yield, which varied from 12.9 to 52.3 kg/d, and milk fat content, which varied from 18.9 to 52.9 g/kg. Milk protein and lactose contents showed less between-cow variability: from 24.2 to 38.4 g/kg for protein content and from 32.2 to 53.1 g/kg for lactose content. Milk SCS varied widely, from -1.32 to 9.18 units (which corresponds to around 5,000 and more than 7 million cells/mL, respectively). This variability originated from the experimental design using 724 observations obtained over several years from 289 cows at different parity, stage of lactation, and age at first calving inside cohorts (Table 1). It remained steady over experimental periods except for milk fat and lactose content, whose coefficients of variation increased by 45% when one milking was omitted, and returned to their initial levels when cows resumed TDM.

Average Effects of a 24h-MI on Milk Yield and Composition

The omission of one milking led to an average decrease in milk yield of 6.3 kg/d (22.1%; Table 2). Milk yield and composition (except for milk lactose content) were corrected from the variations occurring in the course of lactation (according to model 1). In response to milking omission, least squares means of milk yield decreased by 7.8 kg/d (23.4%), and milk lactose content decreased by 2.6 g/kg, whereas milk fat and protein contents and milk SCS increased by 3.2 g/kg, 0.5 g/kg and 0.41 units, respectively (Table 3). The decrease in milk yield was greater than the 10% milk loss observed by Stelwagen et al. (2008) with one 24h-MI and the 14% losses observed in 7 cows by Wheelock et al. (1966). However, Wheelock et al. (1966) reported a high variability in responses between cows, milk yield losses varying between 1 and 31%. The decrease in milk lactose content and the increase in milk fat and protein contents and SCS support earlier findings (Labussière and Coindet, 1968; Pomiès and Rémond, 2000). Most changes in milk composition can be related to changes in mammary epithelial tissue permeability. Alveolar distension occurring in reaction to 18 to 24 h milk ac-

Table 2. Milk absolute and relative loss when switching from twice-daily milking control period (cTDM) to a 24 h milking interval (24h-MI), milk recovery and rate of milk recovery when switching back from 24h-MI to twice daily milking (pTDM3, d 7 to 13 after 24h-MI)

Item	Mean	Minimum	Maximum	SD	CV	N ¹
Milk yield loss, ² kg/d	-6.3	-21.6	4.0	3.92	62.2	724
Relative loss (milk yield), ³ %	-21.3	-52	21.6	11.54	54.2	724
Milk yield recovery, ⁴ kg/d	4.8	-7.6	20.1	4.71	98.1	724
Recovery:loss ratio (milk yield), ^{5,6} %	85.7	1.5	273.3	34.39	40.1	620

¹Number of observations.

²Difference between 24h-MI and cTDM milk yields.

³Difference between 24h-MI and cTDM milk yields divided by cTDM milk yields ($\times 100$).

⁴Difference between 24h-MI and pTDM3 milk yields.

⁵Difference between 24h-MI and pTDM3 milk yields divided by difference between cTDM and 24h-MI milk yields ($\times 100$).

⁶Computed on a subset of 620 cows.

cumulation is known to impair tight junctions (TJ) between mammary epithelial cells (MEC; Stelwagen et al., 1994; Davis et al., 1999). Impaired TJ increases exchanges between the smaller components of milk and interstitial fluids, thereby leading to a leakage of milk lactose from milk to blood and an influx of proteins from blood into the milk compartment (Stelwagen et al., 1994; Stelwagen and Lacy-Hulbert, 1996; Auld-ist and Prosser, 1998). The increase in milk protein content observed with a 24h-MI could therefore be partly due to this influx. However, extended milking intervals stimulate multiple and complex physiological mechanisms, and changes in milk composition are not due solely to impaired TJ. An increase in milk fat content, for example, has been reported in extended milking intervals (Wheelock et al., 1966), and could be due to smaller changes in the regulation of milk fat globule secretion relative to that of milk aqueous phase components (Davis et al., 1999; Guinard-Flament et al., 2011b).

Average carryover effects of the 24h-MI on milk yield and composition were estimated 13 d after resuming TDM (pTDM3). Milk yield and fat and protein contents corrected from variations occurring in the course of lactation using data from official milk recording were not different from their control period levels (Table 3). In regard to milk lactose content, it was not possible to adjust for the trend with advancing lactation, because

routine milk recording does not automatically record this. However, the nonsignificance of the unadjusted difference between cTDM and pTDM2 milk lactose content suggests no carryover effects of 24h-MI on milk lactose. To our knowledge, no study has focused on the long-term carryover effects of omitting one milking. Most studies describing cows' responses to an extended milking interval aim to determine the length of the recovery period necessary to resume initial milk production. These studies report that the length of this recovery period is different for milk yield, milk fat, and milk protein contents, and that the length of the full recovery period could be more than 48 h (Wheelock et al., 1966; Radcliffe et al., 1973). The present study, reporting no carryover effect of a 24h-MI on milk yield and composition 2 to 6 d (pTDM2) and 7 to 13 d (pTDM3) thus agrees with previous studies, showing, on average, a full recovery of milk yield within the 2 to 3 d following the 24h-MI.

However, although the 24h-MI results in an average loss of 22.1% of milk yield with no carryover effects, this figure hides a high variability of responses.

Variability of Milk Yield Loss and Subsequent Milk Recovery Associated With a 24h-MI

The correlations between milk yields during experimental periods are given in Table 4. Milk yield correla-

Table 3. Least squares means (\pm SE) of period effect [twice daily milking control period (cTDM), 24 h milking interval (24h-MI), d 1 after 24h-MI (pTDM1), d 2 to 6 after 24h-MI (pTDM2), and d 7 to 13 after 24h-MI (pTDM3)] in model 1 on corrected milk yield and composition (milk lactose content excepted) corrected from variations expected in the course of lactation

Item	cTDM	24h-MI	pTDM1	pTDM2	pTDM3
Milk yield, kg/d	33.3 ^a \pm 0.27	25.5 ^c \pm 0.27	30.0 ^b \pm 0.27	33.0 ^a \pm 0.27	32.9 ^a \pm 0.27
Milk fat, g/kg	37.7 ^b \pm 0.34	40.9 ^a \pm 0.34		37.4 ^b \pm 0.34	37.3 ^b \pm 0.34
Milk protein, g/kg	29.1 ^b \pm 0.14	29.6 ^a \pm 0.14		29.3 ^b \pm 0.14	29.2 ^b \pm 0.14
Milk lactose, g/kg	47.8 ^a \pm 0.13	45.2 ^c \pm 0.15		47.7 ^{ab} \pm 0.13	47.6 ^b \pm 0.13
Milk SCS	2.28 ^b \pm 0.09	2.69 ^a \pm 0.09		2.48 ^{ab} \pm 0.09	2.48 ^{ab} \pm 0.09

*Within each row, values with different superscript letters differ significantly ($P < 0.05$).

Table 4. Pearson correlations between milk yields during experimental periods [twice daily milking control period (cTDM), 24 h milking interval period (24h-MI), d 1 after 24h-MI (pTDM1), d 2 to 6 after 24h-MI (pTDM2), and d 7 to 13 after 24h-MI (pTDM3)], and milk yield losses (kg/d, %) or recoveries (kg/d) and recovery:loss ratio (%) expressed as absolute or relative variations (n = 725 observations)

Item	cTDM, kg/d	24h-MI, kg/d	pTDM1, kg/d	pTDM2, kg/d	pTDM3, kg/d	Loss, ¹ kg/d	Relative loss, ² %	Recovery, ³ kg/d
Milk yield								
24h-MI, kg/d	0.79***							
pTDM1, kg/d	0.88***	0.70***						
pTDM2, kg/d	0.97***	0.76***	0.90***					
pTDM3, kg/d	0.95***	0.73***	0.85***	0.97***				
Loss, ¹ kg/d	-0.59***	NS	-0.51***	-0.57***	-0.58***			
Relative loss, ² %	-0.28***	0.36***	-0.22***	-0.26***	-0.30***	0.92***		
Recovery, ³ kg/d	0.54***	NS	0.49***	0.60***	0.67***	-0.90***	-0.82***	
Recovery:loss ratio, ⁴ %	0.14***	0.10*	0.16***	0.27***	0.37***	-0.10*	NS	0.50***

¹Difference between 24h-MI and cTDM milk yields.

²Difference between 24h-MI and cTDM milk yields divided by cTDM milk yields (×100).

³Difference between 24h-MI and pTDM3 milk yields.

⁴Difference between 24h-MI and pTDM3 milk yields divided by difference between cTDM and 24h-MI milk yield (×100).

⁵Computed on a subset of 620 cows.

****P* < 0.001; ***P* < 0.01; **P* < 0.05 indicate significant difference from 0; NS: *P* < 0.05.

tions between the 24h-MI and any given TDM period were lower than those between TDM periods, indicating that the 24h-MI induced variable responses among cows on both milk loss and milk recovery. The high correlation between cTDM and pTDM3 periods (*r* = 0.95) indicates that these responses were transient, and that most cows recovered their initial performance rank. These variable responses among cows on both milk loss and milk recovery suggest the presence of cows that are more tolerant toward this practice. Dairy cows that tolerate a 24h-MI could be defined by their ability to show a limited milk loss when undergoing a 24h-MI, to recover as much milk as they lost, or both. Milk losses, recovery, and recovery:loss ratio were therefore studied as indicators of the ability of the cow to tolerate a 24h-MI.

As indicated by standard deviation, most cows lost between 2 (-9.8%) and 10 kg/d (-32.8%) when undergoing a 24h-MI, with an average loss of 6.3 kg/d (-21.3%, Table 2). As illustrated in Figure 1, this loss was highly variable (CV = 62%), with cows losing as much as 21.6 kg/d (-52%) and some cows gaining up to 4.0 kg/d (21.6%). In pTDM3, cows on average recovered less milk yield (4.8 kg/d) than they had lost (6.3 kg/d). This average 1.5 kg/d difference between milk loss and recovery was mainly due to the variations occurring in the course of lactation, as previously shown by the correction of milk yield from changes occurring in the course of lactation (Table 3). As indicated by a negative correlation (Table 4), cows showing the highest milk losses were also those that had the highest milk recovery. However, the residual standard deviation of the regression of milk recovery on milk loss was 2.1

kg/d (Figure 1), indicating a significant variation in the relationship between loss and recovery: some late-lactation cows showed no positive recovery (Figure 1).

The present study showed a higher proportion of early lactation cows among those that recovered more than expected from the general regression (i.e., cows above the line in Figure 1), and a higher proportion of later-lactation cows among those that recovered less than expected (i.e., below the line in Figure 1). Cows in early lactation (24–50 DIM) recovered on average 0.95 kg/d more than expected, whereas cows in late lactation (181–311 DIM) recovered on average 0.23 kg/d less than expected.

Although significant, the correlation (*r* = -0.10) between recovery:loss ratio and milk loss (kg/d) was weak. Furthermore, recovery:loss ratio was not correlated with relative milk loss (%), thus indicating that recovery:loss ratio could be independent of the quantity of milk lost. To our knowledge, such observations have been reported only once in the literature, but using once-daily milking over 3 wk (Guinard-Flament et al., 2011a). Thus, to quantify cows' tolerance to 24h-MI, it seems necessary to describe the 2 abilities, namely the ability to show limited losses (kg/d and %) and the ability to recover as much milk as they lost (milk recovery:loss ratio, %).

Repeatability of Cows' Response between 24h-MI

Repeatability of the cow responses to a 24h-MI were 44% for milk loss (kg/d), 57% for relative milk loss (%), 33% for milk recovery (kg/d), and 0% for milk recovery:loss ratio (%). To our knowledge, repeatability

of cows' responses to a 24h-MI has not been studied to date. Repeatability of cows' responses in cases of extended milking intervals has been described only by Carruthers et al. (1993) in the case of cows milked once a day for three 1-wk periods. The absolute milk loss repeatability observed in the present study seems consistent with the 49% repeatability reported by Carruthers et al. (1993). However, the 57% relative milk loss (%) repeatability observed here was greater than the 41% they observed. As repeatability is known to constitute an upper limit of heritability, cow's milk loss when one milking is omitted could be a trait with a moderate heritability. Hence, the mammary gland's ability to tolerate disruption with 24h-MI could in part be genetically determined.

Effects of Cows' Potential Milk Yield Level, Stage of Lactation, and Parity on Cows' Ability to Tolerate a 24h-MI

Stage of gestation, feeding (access to pasture versus control feed), and initial levels of fat and protein contents and SCS did not significantly affect milk loss (kg/d and %) or milk recovery (kg/d) in the present study.

The estimation of the potential milk yield level of the cow expresses the part of the milk yield during the control period that was not accounted for by the effects of stage of lactation, parity, age at first calving, milk year, or the interaction of these effects. This milk potential was thus considered as being the sum of the milk genetic

potential of the cow and its permanent environment. As potential milk yield level was estimated as the residual from the model adjusting milk yield during the control period for breeding factors, it is assumed here that cows with the highest residuals had the highest milk potential. In the present study, higher potential milk yield level was associated with higher milk yield loss expressed in either absolute or relative value (3.6 kg/d and 6.3% difference between lowest 25% milk potential and highest 25% milk potential, respectively, Table 5). Milk recovery (kg/d) was also greater for cows with a higher potential milk yield (+2.8 kg/d). Consequently, no significant effect of potential milk yield was found on milk recovery:loss ratio. The ability to demonstrate a strong milk recovery:loss ratio after a 24h-MI was not linked to a higher estimated milk potential.

Cows in early lactation (24–50 DIM) lost more milk (in both kg/d and %), but recovered more milk than cows in late lactation (Tables 6 and 7). Their response also showed a different time course compared with cows at peak, mid, and late lactation (Figure 2). Cows in early lactation recovered the lost milk sooner. At pTDM1, these cows (24–50 DIM) had already reached 78% of the total milk yield they ultimately recovered (at the pTDM3 period), whereas cows at peak (51–100 DIM), mid (101–180 DIM) and late (181–311 DIM) lactation had respectively reached only 65, 44, and 41% of the total milk yield they ultimately recovered.

Milk yield loss measured on the first day of once-daily milking has been reported to be greater for cows having a smaller proportion of milk stored in the mam-

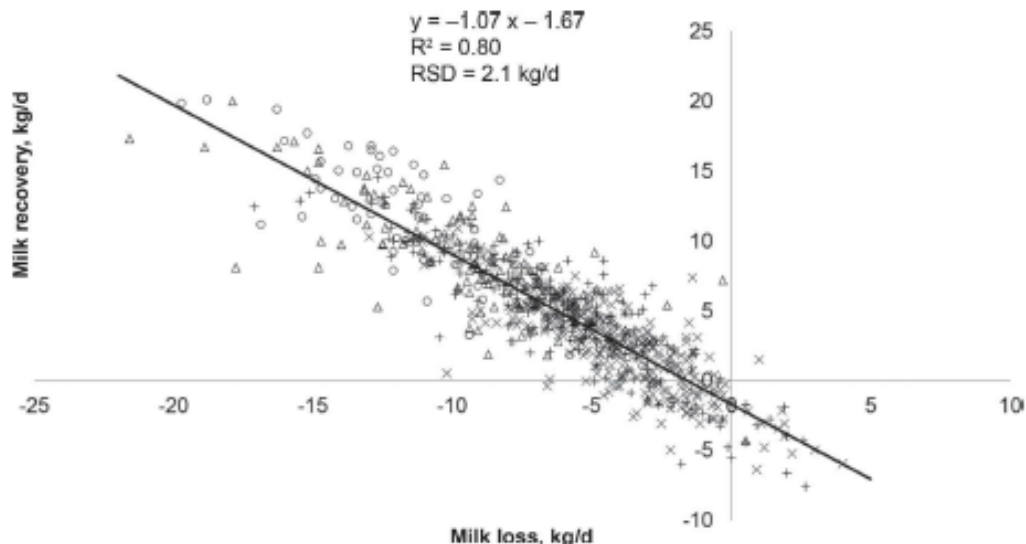


Figure 1. Individual milk yield loss and recovery of cows 2 wk after a 24-h milking interval (24h-MI). RSD = residual standard deviation. Symbols represent cows that on day of 24h-MI presented a stage of lactation between 24 and 50 DIM (O), 51 and 100 DIM (Δ), 101 and 180 DIM (+), and 181 and 311 DIM (×).

Table 5. Effects of cows' potential milk yield level on absolute and relative milk yield loss, milk recovery, and rate of milk recovery (means ± SEM)¹

Item	Potential milk yield level			
	Lowest 25% (1st quartile)	2nd quartile	3rd quartile	Highest 25% (4th quartile)
Milk yield loss, kg/d	-6.6 ± 0.30 ^a	-7.7 ± 0.27 ^b	-9.0 ± 0.24 ^c	-10.2 ± 0.31 ^d
Relative milk yield loss, %	-22.1 ± 1.0 ^a	-23.8 ± 0.9 ^a	-26.9 ± 0.8 ^b	-28.4 ± 1.1 ^b
Milk yield recovery, kg/d	6.2 ± 0.35 ^a	7.3 ± 0.32 ^b	8.1 ± 0.29 ^{bc}	9.0 ± 0.36 ^c
Milk yield recovery:loss ratio, ² %	85.6 ± 3.7 ^a	93.2 ± 3.0 ^a	89.6 ± 2.6 ^a	86.3 ± 3.5 ^a

^{a-d}Within each row, values with different superscript letters differ significantly ($P < 0.05$).

¹Potential was estimated as the residual from the model adjusting milk yield during the control period by the effects of stage of lactation, parity, age at first calving, and milk year (i.e., the median value of potential is set at zero).

²Computed on 620 cows.

mary cistern when milked twice daily on control period (Knight and Dewhurst, 1994). This proportion is lower in early lactation than in the rest of lactation (Stelwagen et al., 2013) and could explain why cows in early lactation tend to lose more milk when omitting one milking compared with cows in mid and late lactation.

The prompter milk yield recovery of cows in early lactation observed in this study is noteworthy. Milk production is known to be regulated by both number and activity of MEC (Capuco et al., 2001, 2003). Singh et al. (2005) and Tremblay et al. (2009) determined that MEC apoptosis does not increase in the first 24 h after milking, and so we assume that the 24h-MI is insufficient to induce a decrease in MEC numbers. Similar studies have also found that proliferative MEC are more numerous (Capuco et al., 2001) and that MEC secretory activity is still increasing in early lactation compared with the declining phase of lactation (Capuco et al., 2003). This is also associated with a higher milking release of prolactin, the lactogenic and galactopoietic hormone, in early lactation (Koprowski

and Tucker, 1973). All these early-lactation adaptive mechanisms could account for the faster recovery in milk yield observed in the present study for cows in early lactation.

Although parity did not significantly affect milk loss or recovery, primiparous cows showed greater relative losses in early and mid stages of lactation (Table 6). They also showed a greater milk recovery, leading to a greater recovery:loss ratio than cows in their second lactation (Table 7). To our knowledge, the influence of parity on cows' responses to a 24h-MI has not been reported in the literature. However, our finding of greater losses for primiparous cows is consistent with earlier findings using once-daily milking (Stelwagen et al., 2013). The effect of parity on recovery:loss ratio has not been studied to date. The higher recovery:loss ratio observed in primiparous cows in the present study might result from greater udder plasticity during the first months of lactation. A recent study showing similar results on milk losses on dairy ewes supports this hypothesis (Vanbergue et al., 2013).

Table 6. Effects of the interaction between stage of lactation and parity on absolute and relative milk yield loss and milk yield recovery (means ± SEM)

Item and parity	Stage of lactation			
	24-50 d	51-100 d	101-180 d	181-311 d
Milk yield loss, kg/d				
1	-11.3 ± 0.56 ^{ab}	-9.7 ± 0.33 ^d	-6.9 ± 0.31 ^{bc}	-5.1 ± 0.30 ^a
2	-13.3 ± 0.70 ^a	-9.0 ± 0.64 ^{cd}	-6.8 ± 0.38 ^{bc}	-5.0 ± 0.35 ^a
3+	-11.5 ± 0.71 ^{ab}	-9.8 ± 0.47 ^{ab}	-6.0 ± 0.33 ^{ab}	-5.7 ± 0.37 ^{ab}
Milk yield loss, %				
1	-35.4 ± 1.8 ^d	-31.7 ± 1.1 ^{cd}	-24.7 ± 1.0 ^b	-20.7 ± 1.0 ^{ab}
2	-34.2 ± 2.2 ^{cd}	-26.3 ± 2.0 ^{bc}	-21.7 ± 1.3 ^{ab}	-17.3 ± 1.2 ^a
3+	-27.5 ± 2.3 ^{bcd}	-25.3 ± 1.5 ^b	-18.6 ± 1.1 ^a	-20.3 ± 1.2 ^{ab}
Milk yield recovery, kg/d				
1	11.5 ± 0.70 ^{ab}	9.0 ± 0.40 ^{bcd}	6.6 ± 0.37 ^{cd}	4.0 ± 0.37 ^{cd}
2	14.5 ± 0.88 ^a	7.8 ± 0.79 ^{def}	5.5 ± 0.47 ^{ef}	3.3 ± 0.43 ^b
3+	11.7 ± 0.90 ^{abc}	8.4 ± 0.58 ^{cd}	4.6 ± 0.39 ^{ef}	4.6 ± 0.45 ^{cd}

^{a-h}Within each item, values with different superscript letters differ significantly ($P < 0.05$).

Table 7. Effects of stage of lactation and parity on milk yield recovery:loss ratio (means ± SEM)

Item	Milk yield recovery:loss ratio (%)
Stage of lactation	
24 to 50 d	99.0 ± 5.6 ^a
51 to 100 d	88.7 ± 3.1 ^{ab}
101 to 180 d	86.9 ± 2.4 ^{ab}
181 to 311 d	79.8 ± 2.9 ^b
Parity	
1	93.5 ± 2.3 ^a
2	84.1 ± 3.2 ^b
3+	88.3 ± 2.8 ^{ab}

^{a,b}Within each factor, values with different superscript letters differ significantly ($P < 0.05$).

CONCLUSIONS

The 24h-MI caused an average milk yield loss of 24%, higher than that reported in previous studies, with an average complete milk recovery after 2 d. However, the average responses for milk loss and recovery were associated with a significant variability among cows. Stage of lactation, potential milk yield level, and parity accounted for the cows' response to the 24h-MI, but not for all the individual variability. Other factors therefore also determine the ability of dairy cows to adapt to 24h-MI. The 57% relative milk loss (%) repeatability observed in the present study suggests that the ability of the mammary gland to tolerate an extended milking interval of 24 h could be to some degree genetically determined.

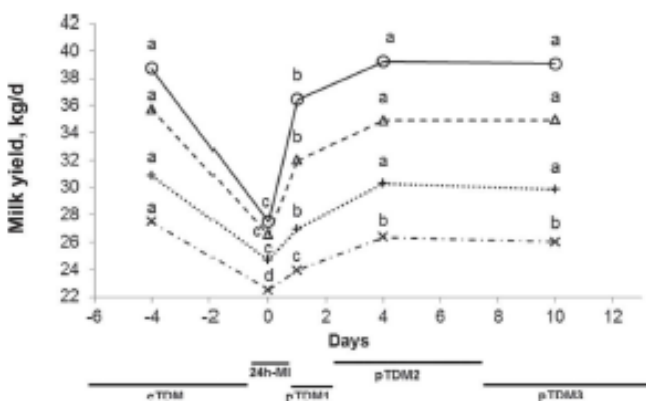


Figure 2. Time course of milk yield according to stage of lactation during experimental periods [twice daily milking control period (cTDM), a 24-h milking interval (24h-MI), d 1 after 24h-MI (pTDM1), d 2 to 6 after 24h-MI (pTDM2), and d 7 to 13 after 24h-MI (pTDM3)]. Values within the same stage of lactation with different letters differ at $P < 0.05$. Symbols represent cows that on 24h-MI presented a stage of lactation between 24 and 50 DIM (○), 51 and 100 DIM (Δ), 101 and 180 DIM (+), and 181 and 311 DIM (×).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank A. Mottin and all the staff at the INRA experimental farm of Méjusseume for help with animal care and handling. We are also grateful to G. Théaud and M. Fargetton for help in data collection. This study was funded by the INRA research unit PEGASE (St-Gilles, France).

REFERENCES

Auldust, M. J., and C. G. Prosser. 1998. Differential effects of short-term once-daily milking on milk yield, milk composition and concentrations of selected blood metabolites in cows with low or high pasture intake. Pages 41–43 in Proc. New Zealand Society of Animal Production. Massey University, Palmerston North, New Zealand.

Ayadi, M., G. Caja, X. Such, and C. H. Knight. 2003. Effect of omitting one milking weekly on lactational performances and morphological udder changes in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 86:2352–2358. [http://dx.dot.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73828-4](http://dx.dot.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73828-4).

Capuco, A., S. Ellis, S. Hale, E. Long, R. Erdman, X. Zhao, and M. Paape. 2003. Lactation persistency: Insights from mammary cell proliferation studies. *J. Anim. Sci.* 81 (Suppl.):18–31.

Capuco, A., D. Wood, R. Baldwin, K. Mcleod, and M. Paape. 2001. Mammary cell number, proliferation, and apoptosis during a bovine lactation: Relation to milk production and effect of bST. *J. Dairy Sci.* 84:2177–2187. [http://dx.dot.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)74664-4](http://dx.dot.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74664-4).

Carruthers, V. R., S. R. Davis, A. M. Bryant, H. V. Henderson, C. A. Morris, and P. J. A. Copeman. 1993. Response of Jersey and Friesian cows to once a day milking and prediction of response based on udder characteristics and milk composition. *J. Dairy Res.* 60:1–11.

Davis, S. R., V. C. Farr, and K. Steiwagen. 1999. Regulation of yield loss and milk composition during once-daily milking: A review. *Livest. Prod. Sci.* 59:77–94. [http://dx.dot.org/10.1016/S0301-6226\(98\)00204-8](http://dx.dot.org/10.1016/S0301-6226(98)00204-8).

Elliott, G. M., F. H. Dodd, and P. J. Brumby. 1960. Variations in the rate of milk secretion in milking intervals of 2–24 hours. *J. Dairy Res.* 27:293–308.

Guinard-Flament, J., Y. Gallard, and H. Larroque. 2011a. Lactose in blood plasma and the ability of dairy cows to tolerate once-daily milking in terms of milk loss and milk recovery. *J. Dairy Sci.* 94:3446–3454. <http://dx.dot.org/10.3168/jds.2010-4081>.

Guinard-Flament, J., S. Lemosquet, E. Delamaire, G. Le Bris, P. Lambertson, and C. Hurtaud. 2011b. Alteration of the nutrient uptake by the udder over an extended milking interval in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 94:5458–5468. <http://dx.dot.org/10.3168/jds.2011-4268>.

Knight, C. H., and R. Dewhurst. 1994. Once-daily milking of dairy-cows: Relationship between milk loss and cisternal milk storage. *J. Dairy Res.* 61:441–449.

Koprowski, J. A., and H. A. Tucker. 1973. Serum prolactin during various physiological states and its relationship to milk production in the bovine. *Endocrinology* 92:1480–1487.

Labussière, J., and J. Cotndet. 1968. Effets de la suppression de la traite du dimanche soir, chez les bovins de race française frisonne pie noire. *Ann. Zootech.* 17:231–244.

Lenth, R. 2014. lsmeans: Least-Squares Means. R package version 2.12. <http://CRAN.R-project.org/package=lsmeans>.

Meffe, N., C. Tache, and V. G. P. Marnet. 2003. Suppressing one milking per week throughout lactation of high producing dairy cows: Effects on animal performances and milk physico-chemical characteristics. Pages 85–88 in Rencontres Autour des Recherches sur les Ruminants, Paris, France, Dec. 2003. Institut de l'Élevage and INRA.

O'Brien, B., G. Ryan, W. Meaney, D. McDonagh, and A. Kelly. 2002. Effect of frequency of milking on yield, composition and pro-

- cessing quality of milk. *J. Dairy Res.* 69:367–374. <http://dx.doi.org/10.1017/S0022029902005605>.
- Pinheiro, J., B. Bates, S. DebRoy, D. Sarkar, and the R Development Core Team. 2013. *nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models*. R package version 3.1–111.
- Pomiès, D., and B. Rémond. 2000. Omission de une de deux traites par semaine sur des vaches laitières en milieu de lactation. Page 128 in 7èmes Rencontres Autour des Recherches sur les Ruminants, Paris, Fr. Dec. 2000. Institut de l'Élevage and INRA.
- Radcliffe, J. C., L. F. Bailey, and M. L. Horne. 1973. Periodic omission of dairy cow milkings: I. Effect on milk yield and composition and on udder health. *J. Dairy Res.* 40:247–254.
- Rogutsky, M., M. Ducelliez, and R. Borde. 1972. Effets de la suppression d'une traite par semaine sur l'infection mammaire et la production laitière. *Ann. Rech. Vétérinaires* 3:43–60.
- Rupp, R., and D. Botchard. 1997. Genetic evaluation of dairy cattle for somatic cell count to improve mastitis resistance. Pages 211–214 in 4èmes Rencontres Autour des Recherches sur les Ruminants Paris, France, Dec. 1997. Institut l'Élevage and INRA, Paris, France.
- Singh, K., J. Dobson, C. V. C. Phyn, S. R. R. Davis, V. C. C. Farr, A. J. J. Molenaar, and K. Stelwagen. 2005. Milk accumulation decreases expression of genes involved in cell-extracellular matrix communication and is associated with induction of apoptosis in the bovine mammary gland. *Livest. Prod. Sci.* 98:67–78. <http://dx.doi.org/10.1016/j.livprodsci.2005.10.016>.
- Stelwagen, K., S. R. Davis, V. C. Farr, S. J. Etchler, and I. Politis. 1994. Effect of once daily milking and concurrent somatotropin on mammary tight junction permeability and yield of cows. *J. Dairy Sci.* 77:2994–3001. [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(94\)77240-4](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(94)77240-4).
- Stelwagen, K., V. C. Farr, G. D. Nicholas, S. R. Davis, and C. G. Prosser. 2008. Effect of milking interval on milk yield and quality and rate of recovery during subsequent milking. *Livest. Sci.* 114:176–180. <http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2007.04.021>.
- Stelwagen, K., and S. Lacy-Hulbert. 1996. Effect of milking frequency on milk somatic cell count characteristics and mammary secretory cell damage in cows. *Am. J. Vet. Res.* 57:902–905.
- Stelwagen, K., C. V. C. Phyn, S. R. Davis, J. Guinard-Flament, D. Pomiès, J. R. Roche, and J. K. Kay. 2013. Invited review: Reduced milking frequency: Milk production and management implications. *J. Dairy Sci.* 96:3401–3413. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2012-6074>.
- Tremblay, G., P. Bernier-Dodier, L. Delbecchi, G. F. Wagner, B. G. Talbot, and P. Lacasse. 2009. Local control of mammary involution: Is stanniocalcin-1 involved? *J. Dairy Sci.* 92:1998–2006. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2008-1643>.
- Vanbergue, E., F. Barillet, C. Allain, P. Autran, M. R. Aurel, and O. Duvallon. 2013. Once daily milking ability of Lacaune dairy ewes: First zootechnical and physiological results. Pages 281–284 in 20èmes Rencontres Autour des Recherches sur les Ruminants, Paris, France, Dec. 2013. Institut de l'Élevage and INRA.
- Wheelock, J. V., J. A. F. Rook, F. H. Dodd, and T. K. Griffin. 1966. The effect of varying the interval between milkings on milk secretion. *J. Dairy Res.* 33:161–176. <http://dx.doi.org/10.1017/S0022029900011833>.

2. Repérage de nouveaux phénotypes prédicteurs et profils adaptatifs

24 H MILKING INTERVAL IN DAIRY COWS

Response profiles of dairy cows to a single 24 h milking interval in relation with milk proteolysis, udder compliance and immune traits

C. Charton^{*,†,‡}, H. Larroque[‡], S. Pochet[§], P. Germon[#], G. Lequeux^{||}, J. Guinard-Flament^{*,†}

* INRA, UMR 1348 PEGASE, 65 rue de Saint-Brieuc, F-35042 Rennes Cedex, France

† AGROCAMPUS OUEST, UMR 1348 PEGASE, 65 rue de Saint-Brieuc, F-35042 Rennes Cedex, France

‡ GenPhySE, Université de Toulouse, INRA, INPT, ENVT, Chemin de Borde Rouge, F-31326 Castanet-Tolosan Cedex, France

§ URTAL, INRA UR342, F-39801, Poligny, France

ISP, INRA, Université de Tours, UMR 1282, F-37380 Nouzilly, France

|| LABOCEA, 10 rue Claude Bourgelat, F-36306 Fougères Cedex, France

Corresponding author: Jocelyne GUINARD-FLAMENT

65 rue de Saint-Brieuc, F- 35042 Rennes Cedex, France

Phone: +33 (0)2 23 48 53 73

Fax: +33 (0)2 23 48 51 01

Jocelyne.Flament@agrocampus-ouest.fr

ABSTRACT

Extended 24-h milking intervals (24h-MI) can occur occasionally or weekly on dairy farms. This practice is associated with milk yield loss and recovery patterns that vary widely among cows. A recent trial including 724 24h-MI challenges demonstrated that environmental factors such as stage of lactation and parity influenced cows' responses but did not account for all individual variability. Additional traits related to physiological, immune and behavioural adaptation were measured on a subset (96 observations) of this dataset. This study aimed to determine 1) the influence of the 24h-MI on these traits, 2) the relationship of these traits with cows' milk yield responses, 3) their ability paired with environmental factors—to help predict milk yield responses to 24h-MI (adaptive profiles). The 24h-MI challenges consisted of 3 successive periods: 1 control week of twice-daily milking (cTDM), one single day of 24h-MI, then 13 days of TDM (pTDM). The 24h-MI led to udder distension, increased mammary epithelium permeability as measured by lactose concentration in blood plasma, increased milk flow rate, and altered milk proteolysis. Milk yield responses to the 24h-MI (corrected for effects of stage of lactation, parity, potential milk yield level and milk yield) were explained by traits during cTDM (milk flow rate, presence or absence of interleukin-8) and by changes during the 24h-MI (absolute increase in milk flow rate and relative udder distension). Analysis of associations between milk yield responses to 24h-MI, environmental factors and additional traits found three adaptive cow profile clusters. Cows in cluster 1 had a less compliant udder than cows in clusters 2, and they lost more milk during the 24h-MI than cluster-2 and cluster-3 cows. After resuming TDM, cluster-2 cows fully recovered the milk they had lost during the 24h-MI whereas cluster-3 cows did not, likely due to udder inflammation during cTDM, as interleukin-8 was found in their milk. These results combining new traits and environmental factors constitute a first step toward predicting individual cow responses to a 24h-MI.

Key words: dairy cow, 24-hour milking interval, milk proteolysis, udder compliance, immune traits

INTRODUCTION

The omission of one single milking without adapting adjacent milking intervals (24-h milking interval, 24h-MI) can happen unplanned if milking machines fail or on occasions when staff are absent, or planned to alleviate work-load (e.g. omission of the Sunday evening milking). This makes it interesting to study the impact of this practice on economics parameters such as milk yield, milk composition, udder health and their interactions. The omission of one milking per week with no change in other milking times was shown to induce no decrease in milk yield when implemented only over the last 10 wk of lactation (O'Brien et al., 2002) but a 13% decrease if implemented over the whole lactation (Roguinsky et al., 1972). A period of at least 48 h following weekly omission was necessary to fully recover milk yield (Wheelock et al., 1966; Radcliffe et al., 1973), whereas following a single omission, milk yield lost 0.75 kg/d in the 7 afternoon milkings (Lacic, 2011).

Few studies have attempted to describe individual variability of milk yield responses to a single 24h-MI, and most of the time only using small datasets ($n < 50$) that limited efforts to determine the factors influencing cows' responses (Elliott et al., 1960; Radcliffe et al., 1973). A recent trial including 724 24h-MI challenges implemented on 289 cows in different experimental conditions observed broad variability in individual responses on both milk yield loss and recovery and found effects of stage of lactation, parity and potential milk yield level on these responses (Charton et al., 2016). Cows in early lactation were characterized by faster milk yield recovery when resuming Twice-Daily Milking (**TDM**). Primiparous cows recovered a higher proportion of the milk they had lost than multiparous cows. Cows with a higher potential milk yield level lost more milk. However, these environmental factors did not account for all dataset variability. Indeed, standard deviations (SD) of milk yield loss and recovery were still half the initial value after correction for environmental factors (1.9 kg/d for milk yield losses and 2.5 kg/d for milk yield recovery *versus* 3.9 and 4.7, respectively).

Milk yield responses to extended milking intervals such as once-daily milking (**ODM**, one milking per day during several days) are further associated with variations in numerous traits. These traits concern milk composition (fat and protein content) and milk proteolysis (Davis et al., 1999; Stelwagen et al., 2013) but also milking parameters, with an increase in milking duration (Gleeson et al., 2007; Ferris et al., 2008), immunity, and udder inflammation with a rise in SCC in the first few days of ODM implementation (Davis et al., 1999; Stelwagen et al., 2013) or physiological parameters such as mammary epithelium permeability described by the efflux of lactose from milk to blood (Stelwagen et al., 1997; Guinard-Flament et al., 2011a). The 24h extended milking interval covers the first day of ODM which is also the acute phase of cow adaptation to ODM (Davis et al., 1999). The same traits cited above for ODM could thus also vary in response to 24h-MI, or conversely they may influence individual responses to the 24h-MI, although this relationship has not been investigated or demonstrated in ODM.

The aim of this study was to assess the effect of the 24h-MI on these traits and to determine whether these traits influence cows' milk yield responses. This assessment was performed on a subset of our previous dataset (Charton et al. 2016). We studied the association between milk yield loss and recovery to determine whether cows' responses cluster into typical profiles and whether such response profiles are at least partly determined by both the environmental factors identified in Charton et al. (2016) and the traits analyzed here.

MATERIALS AND METHODS

Experimental Design

The experimental design was described in our previous paper (Charton et al. 2016). Briefly, the experiment was conducted at the INRA experimental farm of Méjusse in compliance with the National Legislation on Animal Care (French Ministry of Agriculture certification No. C35-275-23). Experimental design consisted in a 1-wk control period when cows were milked twice daily (**cTDM**), then 1 d of 24h-MI (morning milking omitted) then back to 13 d of TDM. Milk recovery was studied on

d7 to d13 after 24h-MI (**pTDM**). Cows were milked at 7.30 a.m. and 4.30 p.m. during cTDM and pTDM and at 4.30 p.m. on the 24h-MI day.

In total, 724 24h-MIs were implemented on 292 Holstein dairy cows. Most cows (n=216) underwent more than one 24h-MI, and 73 cows underwent only one. These 724 24h-MIs were split into 10 cohorts (32 < n < 159; Table 1) according to year, month, feeding and housing conditions. Cows differed in parity, stage of lactation and age at first calving within and among cohorts.

Measurements, Sampling, and Analyses

Additional traits measured here are reported in Table 1. Briefly, these traits were related to milk yield and composition, milk proteolysis (milk plasmin and plasminogen activity and “peptides” mapping), dry matter intake (**DMI**), udder distension (distances between teat ends), milking parameters (milking duration, average and peak milk flow rates, amount and proportion of milk collected at 1 and 2 min), mammary epithelium permeability (lactose concentration in blood plasma), mammary inflammation (milk somatic cell count (**SCC**) and **interleukin-8 (IL-8)** count) and systemic inflammation (blood plasma haptoglobin) and complete blood count (**CBC**). Depending on the trait considered, the number of challenges varied from 65 to 724, with most traits available in the last 3 cohorts.

Table 1. Number of data for each trait per cohort (columns 1 to 10) and measured trait groups.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Sum
Milk yield and composition	102	47	138	42	139	125	34	32	33	32	724 (620)
Milk proteolysis								32	33	32	97 (95)
Dry matter intake		47		35			23	32	33	32	202 (200)
Udder distention								32	33	32	97 (95)
Milking parameters				42	139	125	34	32	33	32	435 (405)
Mammary epithelium permeability	87	47	138	42	138	119	34	32	33	32	721 (598)
Inflammation											
<i>Blood plasma haptoglobin, mg/mL</i>								32	33	32	97 (95)
<i>Interleukin-8</i>					139	125	34	32	33	32	395 (365)
Complete Blood Count									33	32	65 (64)
Sum	102	47	138	42	139	125	34	32	33	32	724 (620)

Values in brackets are number of data for which milk yield recovery:loss ratio indicator was available.

DMI was calculated on cows receiving a total mixed ration in individual troughs twice a day at 8:00 and 18:00. The diet met estimated energy and protein requirements for cows milked twice-daily (INRA and Agabriel, 2010). Refusals were weighed daily. Distance between udder teat ends was measured using a calliper square at 1500 h (1 h before evening milking) 2 d before 24h-MI and on 24h-MI day.

Milk. Milk yield and milking parameters were recorded at each milking in the milking parlour (rotary milking parlour, milk meter MM25, DeLaval, Elancourt, France). Milk fat, protein and lactose contents were determined from milk samples collected at each milking, 2 or 3 days a week during cTDM and pTDM periods and on the 24h-MI day. SCC was measured once a day at the same timepoint days. Milk fat, protein and lactose contents were determined by infrared analysis (Milkoscan, Foss Electric, Hillerød, Denmark), and SCC was determined on a Fossomatic cell counter (Foss, Hillerød, Denmark).

Milk proteolysis analysis was performed on milk collected two days before and on the day of the 24h-MI. Plasmin (**PL**) and plasminogen (**PLG**) activities were determined using an adaptation to microplate (Biotek Synergy Mx) of Rollema’s spectrophotometric procedure (Rollema et al., 1983) as described by Bugaud et al. (2001). The pyroGlu-Phe-Lys-pNA, HCl (Cryopep pNAPEP 1703, Montpellier, France) chromogenic peptide substrate was used for better specificity of detection of PL activity (van Asselt et al., 2008). Total activity (with urokinase) was corrected by a blank value obtained by replacing sample with 20 µL of the citrate buffer. PLG activity was calculated by subtracting PL activity (without urokinase) from total activity (PL + PLG) (with urokinase). Each milk sample was extracted once and

deposited in triplicate per microplate, and repeated on three different days. Samples from a cow before and after suppression of one milking were analyzed consecutively within the same plate.

For “peptides” mapping, a milk-soluble fraction (80 μ L) was prepared twice by precipitation of caseins at pH 4.6 (MSF) (IDF 29-1 ISO 17997-1, 2004) and analyzed by RP-HPLC using a Zorbax 300 SB-C18 column (150 mm \times 4.6 mm, 3.5 μ m, 300 Å) and similar precolumn (12.5 \times 4.6 mm) held at 40°C (Dionex-STH 585 column oven). Gradient elution was performed at 1 mL.min⁻¹ (Dionex P580 HPG pump) using solvents A (0.100% v/v trifluoroacetic acid in 18.2 MOhms water) and B (0.105% TFA/80% acetonitrile/20% water) as follows: 6.5% B (0 to 1 min), 32% (at 16 min), 44% (24 to 26 min), 48% (at 33 min), 60% (at 39 min), 100% (47 to 48 min) and back at 48 min to equilibration at 6.5% B (5 min). The signal was recorded at 205 nm (2Hz) (Dionex Ultimate 3000 DAD and Chromeleon software v.6.80) with regular checks for absence of ghost peaks (reagents or column). A home-made standard sample (mixture of MSF) was regularly injected to check the sustainability of the resolution. Samples from a cow before and after suppression of one milking were analyzed successively.

Samples for milk IL-8 were collected on d 2 before 24h-MI only. The milk was skimmed (by removing the supernatant fat pellet after centrifugation at 3,000 g for 10 min at 4°C) and stored at -20°C until analysis. IL-8 was quantified by ELISA as described in Rainard et al. (2008).

Blood. Blood samples were collected in the coccygeal vein at 1500 h two days before 24h-MI and on the day of 24h-MI (1 h before the evening milking). Samples for blood haptoglobin and blood lactose were collected into 10-mL heparinized tubes and centrifuged at 3,000 g for 10 min at 4°C. The plasma was then removed and samples were stored at -20°C until analysis.

Plasma lactose concentration was measured using a colorimetric enzymatic reaction (kit for lactose/D-galactose, Roche R-BIOPHARM GmbH, Darmstadt, Germany) on a multiparameter analyzer (Konelab 20i, KONE Instruments Corporation, Espoo, Finland). Plasma haptoglobin concentration was determined by measuring peroxidase activity at 600 nm (kit Tridelta PHASE Haptoglobin Assay TP-801, Tridelta Development Ltd, Maynooth, Ireland) using the same analyzer.

Samples for CBC were collected into vacuum tubes (Vacutainer, Unitech Ltd, Dublin, Ireland) containing less than 10 mL EDTA, then immediately stored on ice and transported for analysis. These samples were analyzed for White Blood Cells count (**WBCs**), total Red Blood Cells count (**RBCs**), Haematocrit, Haemoglobin (**Hg**), Mean Corpuscular Volume (**MCV**), Mean Corpuscular Haemoglobin Concentration (**MCHC**) and platelet number using an automated haematological analyzer (Scil Vet abc, Scil Animal Company GmbH, Aldorf, France). WBC differentials including polymorphonuclear neutrophil, eosinophil and basophil, lymphocytes and monocytes were determined using the May-Grünwald Giemsa staining protocol as described in Hayhoe and Flemans (1970).

Calculations

For cTDM and pTDM periods, milk yield and composition, milking parameters and DMI were averaged over 1 wk. Milk yield loss (kg/d) was computed as the difference between 24h-MI and cTDM. Relative milk yield loss (%) was calculated as milk yield loss (kg/d) divided by cTDM milk yield, multiplied by 100. Milk yield recovery (kg/d) was computed as the difference between pTDM and 24h-MI. Milk recovery:loss ratio (%) was computed as milk yield recovery (kg/d) divided by milk yield loss (kg/d), multiplied by 100. The recovery:loss ratio was calculated for cows showing both a loss of milk yield when switched to 24h-MI and a gain of milk yield when switched back to TDM (n=620 24h-MI). Plasma lactose was log-transformed due to the non-normal data. IL-8 status was classified as presence or absence. For each trait, absolute difference was calculated as the difference between the measure during the 24h-MI and the measure during cTDM, and relative difference was calculated as the absolute difference divided by the measure during cTDM multiplied by 100, except for milk IL-8 for which only cTDM values were available.

Statistical Analysis

All statistical analyses were performed using R software (RCore Team, The R Foundation for Statistical Computing, 2014, R: A Language and Environment for Statistical Computing, Version 3.0.2, Vienna, Austria, <http://www.R-project.org>). Results for fixed effects in models were expressed as least-squares means and computed using the lsmeans package (Lenth, 2014). Differences were considered significant at $P < 0.05$. Principal Component Analysis (PCA) followed by hierarchical clustering was computed using the PCA and HCPC functions in R package FactoMineR.

Effects of a 24h-MI on Additional Traits. The data were analyzed according to the following linear mixed model (1):

$$Y_{ijkl} = \mu + \text{period}_i + \text{stage of lactation}_j + \text{parity}_k + \text{stage of lactation}_j \times \text{parity}_k + \text{cow}_l + \varepsilon_{ijkl}$$

where Y_{ijkl} is dependent variable and μ is the mean, the fixed effects tested are period i (cTDM, 24h-MI), stage of lactation j (4 classes: 24-50, 51-100, 101-180, 181-311 DIM), parity k (3 classes: primiparous, 2nd lactation and 3rd-plus lactation), and the 2-way interaction stage of lactation \times parity, random effect of the cow (assumed to be normally distributed) is l and ε_{ijkl} is the residual error associated with each $ijkl$ observation. The fixed effects other than period were coded as described in Charton et al. (2016).

Effects of Additional Traits on Corrected Milk Yield Responses to a 24h-MI. This analysis was performed on the sub-dataset ($n=96$) corresponding to the last 3 cohorts. The traits were selected using a backward linear model selection method and only the traits with a significant effect ($P < 0.05$) on milk yield responses were kept. Milk yield responses were absolute and relative milk yield loss, milk yield recovery ($n=96$) and milk yield loss:recovery ratio ($n=94$) corrected for environmental effects (stage of lactation, parity, potential milk yield level and milk year) and cow effect. These effects were calculated using 724 24h-MI (as in model published by Charton et al., 2016) to gives better estimations (724 data rather than 96). Some traits were not tested due to the low number of observations available (as is the case for CBC traits, $n=65$) or their strong correlations with other traits within the same trait family.

Thus, the traits tested were milk PL, milk PLG and PLG:PL ratio for milk proteolysis, average evening milk flow rate for milking parameters, the sum of udder teat distances for udder distension, plasma lactose concentration for mammary epithelium permeability, blood haptoglobin for systemic inflammation, and milk IL-8 and **SCS (Somatic Cell Score)** for udder inflammation.

Response profiles. Responses profiles were built using the following raw (*i.e.* uncorrected) variables on the previous sub-dataset ($n=94$): initial milk yield level (cTDM, kg/d), milk yield loss and relative loss (kg/d, %), milk yield recovery (kg/d) and milk yield recovery:loss ratio. Data from one cow was removed ($n=93$ observations) as it was an outlier on milk yield recovery:loss ratio. Clusters were characterized with terms of environmental and additional traits. Fisher's exact test was used for traits factors with differences considered significant at $P < 0.05$. The following linear model (2) was used to assess significance of quantitative traits:

$$Y_m = \mu + \text{cluster}_m + \varepsilon_m$$

where Y_m is dependent variable (milk yield response or environmental factor or trait), μ is the mean, the fixed effect is cluster m , and ε_m is residual error associated with each r observation.

RESULTS

As previously described by Charton et al. (2016), yield losses and recovery due to 24h-MI averaged 6.3 kg/d (21.3%) and 4.8 kg/d (recovery:loss ratio of 85.7%) when calculated from the whole 724-observation dataset. When using the sub-dataset (n=96), milk yield losses and recovery averaged 8.1 kg/d (25.3%) and 7.3 kg/d (recovery:loss ratio of 91.3%).

Effects of a 24h-MI on Additional Traits

The effects of 24h-MI on milk proteolysis, milking parameters, udder distension, mammary epithelium permeability, mammary and systemic inflammation, haematological profiles and food intake are reported in Table 2.

Considering milk proteolysis, 24h-MI increased both PL and PLG (measured by activity on synthetic substrate, after urokinase activation for PLG) without altering plasminogen:plasmin ratio. "Peptide mapping" was performed to get a rapid and comprehensive picture of proteolytic changes into soluble fraction occurring during 24h-MI. Excluding the distal whey protein peaks (not computed) eluting over 35 min, we found 143 peaks ranging up to 500 mAU, but only 35 predominant peaks common to all profiles were considered in this analysis. Peaks between 190 and 300 nm diode array spectra were found characteristic of peptidic substances (data not shown). Three successive zones of peak elution (Z1, Z2 and Z3) were designed. Peptide elution varied from zone Z1 (most hydrophilic substances) to zone Z3 (most hydrophobic substances). The Z3 zone (26–35min, 35–38% acetonitrile in eluent) contains peptidic fractions resulting from the primary hydrolysis of β - and α -s2 caseins by PL (Innocente et al., 2011), particularly proteose-peptones that are the largest soluble peptides produced by PL activity on β -caseins (Schaar, 1985). The zones Z1 (peaks eluting between 2–16 min and 5–25% acetonitrile) and Z2 (16–26min, 25–35% acetonitrile) would correspond to peptidic material produced by non-specific proteolytic activity of bacterial source (Datta and Deeth, 2003; Le et al., 2006), probably also including the secondary hydrolysis products of proteose-peptones. Each cow had its own profile that was the same before or after the suppression of one milking. All of the peaks were increased to some degree by the 24h-MI, except for three (not confirmed peptidic) peaks located in the more hydrophilic Z1 zone that were shown to decrease. Increases in peaks of all three zones were correlated with PL activity but the correlations were higher for Z2 ($r=0.75^{***}$) and Z3 ($r=0.80^{***}$) than Z1 ($r=0.32^{***}$).

The 24h-MI decreased daily DMI by 0.6 kg on average. In response to 24h-MI, distance between udder teat ends increased. Absolute increase in distance between teats was greater for the front and rear quarter teats (+3.8 and +4.1 cm, respectively) than the left and right quarter teats (+2.0 and +1.8 cm). Relative distension was maximal for rear udder teat distance (+76%) compared to variations in other teat distances (+<25%).

Milking length increased by 4.1 min on average. Average milking flow rate increased by 0.5 kg/min, peak milk flow rate increased by 0.2 kg/min, and amount of milk collected at 1 and 2 min increased by 0.8 and 1.4 kg, respectively. Proportion of milk collected at 1 and 2 min decreased by 1% and 9%, respectively.

Blood plasma lactose concentration increased 6-fold from 28.8 to 172.4 mg/L (+134.6 mg/L on average) during the 24 h of milk accumulation.

Blood plasma haptoglobin concentration was 0.419 mg/mL in the cTDM period and decreased to 0.339 mg/mL during the 24h-MI. CBC was not or slightly affected by the 24h-MI. Among the 12 indicators available, only blood platelets, monocytes, haemoglobin and MCHC showed significant variations. Blood platelets increased from 286 to 341 $\times 10^3/\text{mm}^3$ whereas haemoglobin, MCHC and monocytes decreased by 0.23 g/dL, 0.98 g/mL and 3% (50% of its initial level), respectively.

Table 2. Effects on traits of 24 h milking interval (24h-MI) compared to control-period twice-daily milking (CTDM). Least-square means \pm standard error of the mean (SEM) and number of observations per traits (n).

	CTDM	24h-MI	SEM	Signif.	n
<i>Milk proteolysis</i>					
Milk plasmin activity, OD¹ \times 10⁴/min	10.7	12.9	0.90	***	97
Milk plasminogen, OD \times 10⁴/min	156.3	169.2	3.80	***	97
Milk plasminogen:plasmin ratio, %	19.7	19.4	1.75	NS	97
“Peptide” mapping zone Z1, mAU²/min	152.5	134.4	4.89	***	97
“Peptide” mapping zone Z2, mAU/min	468.8	644.7	25.64	***	97
“Peptide” mapping zone Z3, mAU/min	274.2	481.0	29.22	***	97
<i>Dry matter intake</i>					
Total dry matter intake (kg)	22.2	21.6	0.23	***	202
<i>Udder distention</i>					
Left udder side teats distance, cm	13.9	15.9	0.35	***	97
Front udder side teats distance, cm	15.4	19.2	0.58	***	97
Right udder side teats distance, cm	13.7	15.5	0.34	***	97
Rear udder side teats distance, cm	5.4	9.5	0.42	***	97
Sum of udder teat distances, cm	48.4	60.0	1.27	***	97
<i>Milking parameters</i>					
Milking duration³, min	6.3	10.4	0.19	***	435
Average milk flow rate³, kg/min	2.0	2.5	0.04	***	435
Peak milking milk flow rate³, kg/min	3.4	3.6	0.06	***	435
Amount of milk collected at 1 min³, kg	1.1	1.9	0.04	***	435
Amount of milk collected at 2 min³, kg	3.6	5.0	0.10	***	435
Proportion of milk collected at 1 min³, %	9	8	0.3	***	435
Proportion of milk collected at 2 min³, %	30	21	0.7	***	435
<i>Mammary epithelium permeability</i>					
Blood plasma lactose (mg/L)	28.82	172.40	6.005	***	721
Log-transformed blood lactose (log, units)	4.36	6.76	0.043	***	721
<i>Systemic inflammation</i>					
Blood plasma haptoglobin, mg/mL	0.42	0.34	0.041	*	97
<i>Complete Blood Count (CBC)</i>					
Red blood cells (RBCs), \times 10⁶/mm³	6.15	6.20	0.107	NS	65
Hematocrit, %	29.52	29.61	0.477	NS	65
Haemoglobin (Hg), g/dL	10.53	10.30	0.146	*	65
Mean corpuscular Hg conc. (MCHC), g/mL	35.81	34.83	0.158	***	65
Mean corpuscular volume (MCV), μm³	48	48	0.6	NS	65
Blood platelets, \times 10³/mm³	286	341	24.1	**	65
White blood cells (WBCs), \times 10³/mm³	9.67	9.65	0.556	NS	65
Polymorphonuclear neutrophils, %	46	45	2.5	NS	65
Polymorphonuclear eosinophils, %	4	5	0.7	NS	65
Polymorphonuclear basophils, %	0.3	0.4	0.14	NS	65
Lymphocytes, %	44	47	2.3	NS	65
Monocytes, %	6	3	0.5	***	65

***, **, *: means are significantly different at P <0.001, 0.01, and 0.05, respectively.

¹ OD=optical density.

² mAU = milli absorption units defined as 1 AU/1000.

³ measure made during the afternoon milking

Effects of Traits on Corrected Milk Yield Responses to a 24h-MI

Table 3. Estimates and effects of relative increase in sum of teat distances, initial evening milk average flow rate and increase in evening milk average flow rate on absolute and relative milk yield loss and milk recovery (n=96) corrected for stage of lactation, parity, potential milk yield level and effect of the cow.

	Increase in sum of udder teat distances, %	Initial milk average flow rate, kg/min	Increase in milk average flow rate, kg/min	Initial milk interleukin-8		Model adjusted R ²
				Absence	Presence	
Absolute loss¹, kg/d	8.00 ***	-1.55 ***	NS	-0.00 *	0.77	37.2
	(18.8)	(25.2)		(4.2)		
Relative loss², %	24.7 ***	-2.9 ***	2.0 *	NS	NS	32.8
	(22.7)	(14.0)	(4.6)			
Recovery³, kg/d	-7.97 **	1.52 ***	NS	-0.04 *	-1.09	27.1
	(12.5)	(16.9)		(4.6)		

1Difference between 24h-MI and cTDM milk yields.

2Difference between 24h-MI and cTDM milk yields divided by cTDM milk yields (× 100).

3Difference between 24h-MI and pTDM3 milk yields.

***, **, *, NS: significantly different from 0 at p < 0.001, p < 0.01, p < 0.05 and non-significant at p < 0.05, respectively.

Values in brackets: $\eta_i^2 = \frac{SS_{Mi}}{SS_{Mi} + SS_T}$, %; partial η_i^2 represents the proportion of variance unexplained by the remainder of the model that is explained by the predictor.

None of the traits tested were able to explain corrected milk yield recovery:loss ratio. Only 4 traits had a significant effect on the other corrected milk yield responses (Table3). Indeed, all three parameters of corrected milk yield responses (milk yield loss in kg/d and %, and milk recovery in kg/d) were significantly explained by the relative increase in sum of udder teat distances and initial average milk flow rate. Initial milk IL-8 status explained only milk yield loss and recovery in kg/d, and the increase in average milk flow rate explained milk yield loss in %. Taken together, these traits explained 37.2%, 32.8% and 27.1% of variability for milk yield losses expressed in kg/d and % and milk recovery in kg/d, respectively.

These three quantitative traits were not significantly correlated ($P > 0.05$; results not shown). As indicated by the partial η_i^2 values (Table 3), initial average milk flow rate was the most informational trait for explaining milk yield loss and recovery (kg/d), and increase in udder teat distance was the most informational train for explaining relative milk yield loss. IL-8 status during cTDM and increase in average milk flow rate were less informational.

As indicated by the sign of the effects, higher initial average milk flow rate and lower increase in the sum of udder teat distances correlated to greater milk yield loss and recovery. Presence of IL-8 in milk during cTDM reduced milk yield loss and recovery (in kg/d). Higher increases in average milk flow rates (kg/min) correlated with lower milk yield losses (%).

Response Profiles of Dairy Cows to a 24h-MI

The PCA was built on the following variables: initial milk yield and milk yield responses to 24h-MI (losses in kg/d and %, recovery in kg/d, and recovery:loss ratio in %). The first three dimensions were found sufficient to explain 99% of the variability in the dataset (55.8%, 22.1% and 21.3% for dimensions 1, 2 and 3, respectively; Figure 1). Dimension 1 opposes cows showing high milk yield losses and high milk yield recoveries with cows showing low milk yield losses and low milk yield recoveries, as the milk yield losses are negative values. The most contributive variables were initial milk yield for dimension 2 and milk recovery:loss ratio for dimension 3.

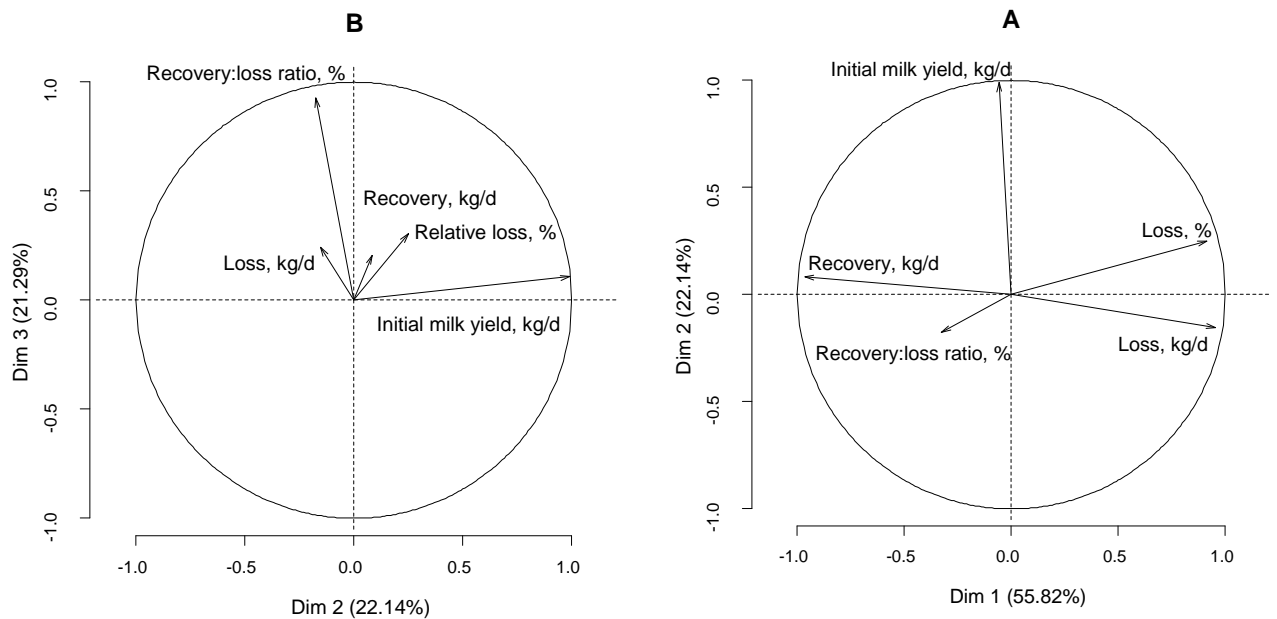


Figure 1. Variables factor map of the PCA built on the control period (cTDM) milk yield and on milk yield responses to the 24-h milking interval (24h-MI). Figure A charts the projection of the variables on dimensions 1 and 2. Figure B charts the projections of the variables on dimensions 2 and 3.

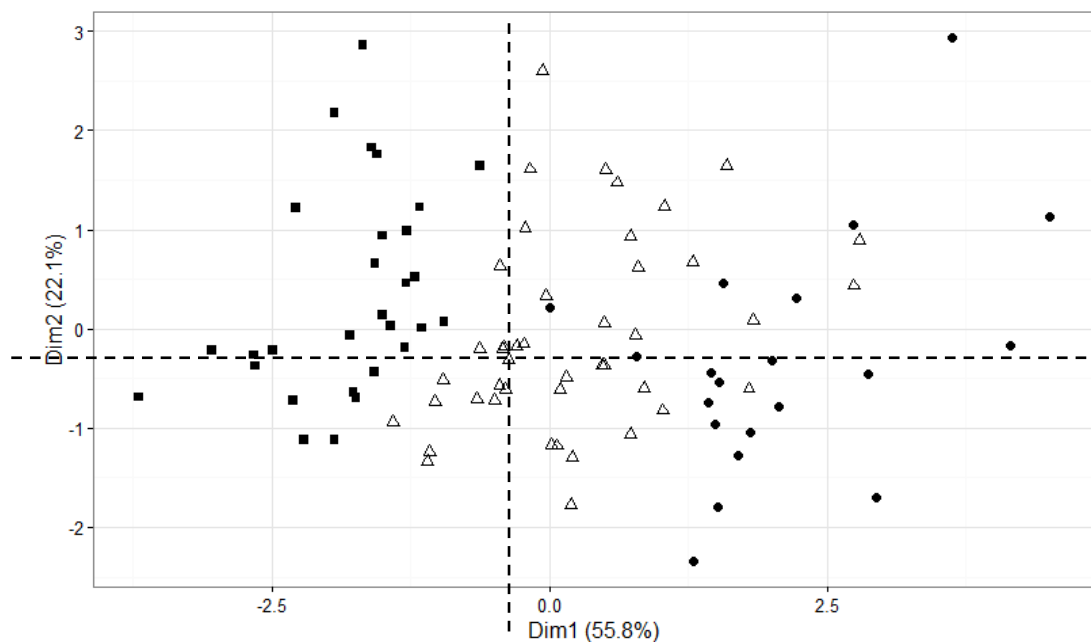


Figure 2. Clustering of cows based on the results of the PCA (see Figure 1 for construction). Symbols represent cows in cluster 1 (■, n=29), cluster 2 (Δ, n=44) and cluster 3 (●, n=20).

Table 4. Characteristic yield responses and associated environmental factors, qualitative traits and quantitative traits of the three cow profiles identified by clustering the yield responses (see Figure 2). Quantitative traits: least-squares means \pm standard error of the mean (SEM); qualitative traits: Fisher's exact test.

	Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3
Number of observations	29	44	20
<i>Milk yield responses building the PCA</i>			
Initial milk yield (kg/d)	34.4 \pm 0.99 ^a	32.5 \pm 0.81 ^{ab}	29.7 \pm 1.19 ^b
Absolute loss⁵, kg/d	-11.9 \pm 0.33 ^c	-7.4 \pm 0.27 ^b	-5.12 \pm 0.40 ^a
Relative loss⁷, %	-35.5 \pm 1.33 ^c	-23.6 \pm 1.08 ^b	-17.8 \pm 1.60 ^a
Recovery⁹, (kg/d)	10.8 \pm 0.30 ^a	7.4 \pm 0.24 ^b	3.2 \pm 0.36 ^c
Recovery:loss ratio¹¹, %	90.5 \pm 3.27 ^b	100.9 \pm 2.66 ^a	63.9 \pm 3.94 ^c
<i>Quantitative traits and environmental factors</i>			
Stage of lactation (d)	137 \pm 9.4 ^a	149 \pm 7.7 ^a	148 \pm 11.4 ^a
Potential milk yield (kg/d)	-0.4 \pm 2.25 ^{ab}	2.7 \pm 1.42 ^a	-6.2 \pm 2.10 ^b
Initial values			
Fat content (g/kg)	35.9 \pm 0.87 ^a	37.7 \pm 0.71 ^a	37.8 \pm 1.05 ^a
Protein content (g/kg)	29.8 \pm 0.35 ^a	30.3 \pm 0.28 ^a	31.1 \pm 0.42 ^a
SCC content (x1000 cells/mL)	86 \pm 22.2 ^a	66 \pm 18.0 ^a	111 \pm 26.8 ^a
Sum of udder teat distances (cm)	45.5 \pm 1.68 ^a	44.2 \pm 1.36 ^a	45.9 \pm 2.02 ^a
Average milk flow rate (kg/min)	2.4 \pm 0.09 ^a	1.9 \pm 0.08 ^b	1.8 \pm 0.11 ^b
Increase during the 24-MI			
Fat content (g/kg)	10.4 \pm 1.67 ^a	4.4 \pm 1.35 ^b	0.8 \pm 2.01 ^b
Protein content (g/kg)	0.3 \pm 0.16 ^a	0.7 \pm 0.13 ^a	0.6 \pm 0.20 ^a
SCC content (x1000 cells/mL)	54 \pm 27.9 ^a	45 \pm 22.7 ^a	58 \pm 33.6 ^a
Average milk flow rate (kg/min)	0.0 \pm 0.08 ^b	0.3 \pm 0.07 ^a	0.3 \pm 0.10 ^{ab}
Sum of udder teat distances (%)	21.6 \pm 1.68 ^b	27.0 \pm 1.37 ^a	27.4 \pm 2.03 ^{ab}
<i>Qualitative traits and environmental factors</i>			
Parity (% of cows in the cluster)	a	b	ab
1	45	68	60
2	34	11	20
3+	21	21	20
IL8 presence, % of cows	21 ^{ab}	14 ^b	40 ^a
Initial plasma haptoglobin > 400 mg/mL, % of cows	24 ^a	41 ^a	20 ^a
Increase in plasma lactose > 100 mg/L, % of cows	34 ^b	68 ^a	67 ^a

Quantitative traits and environmental factors: ^{a-c} within each row, values with different superscript letters differ significantly ($p < 0.05$).

Qualitative traits and environmental factors: ^{a-b} within each item, values with different superscript letters differ significantly among clusters ($p < 0.05$).

Clustering emerged 3 different mean profiles of cows on the basis of yield responses (Table 4, Figure 2). Cluster 2 gathered a higher number of cows ($n=44$) than clusters 1 ($n=29$) and 3 ($n=20$). Cows in cluster 1 had the highest average initial milk yield, plus the highest milk yield loss during the 24h-MI (absolute and relative) and the highest milk yield recovery when resuming TDM. They managed to recover almost all (90.5% on average) of the milk they had lost, but still less than cluster 2 (101%). Cows in cluster 3 had the opposite average response profile characterized by a low initial milk yield (similar to cluster 2) but also the lowest milk yield losses, recovery yields and rates (63.9%). Cows in cluster 2 had an intermediate average profile as far as milk yield loss and recovery are concerned. However, cluster 2 is the only one to show an average full recovery (100.9 %) of milk lost during the 24-MI when switched back to TDM.

Clusters were then characterized using environmental factors and additional traits. Clusters 1, 2 and 3 did not differ significantly for stage of lactation, initial fat, protein and SCC contents, and proportion of cows with haptoglobin > 400 mg/mL. A first overview clearly showed that clusters 2 and 3 shared roughly more similarity than with cluster 1. Examination of the other traits found that cluster-

1 cows showed a higher initial milk flow rate, a greater increase in milk fat content and a lower proportion of cows with blood plasma lactose increasing to above 100 mg/L during the 24h-MI than cluster-2 and cluster-3 cows. Cluster 1 also differed from cluster 2 by a lower proportion of primiparous cows, increased milk flow rate and increased relative distance between teat ends during the 24h-MI. Cluster 3 was not different from cluster 1 and 2 on these parameters. Finally, cluster 3 differed from cluster 2 by a lower potential milk yield level and a higher proportion of cows with presence of IL-8 in milk during cTDM whereas cluster 1 was not different from cluster 2 and 3 for these two parameters.

DISCUSSION

The milk accumulation that occurs in the udder during an extended 24h milking interval triggers numerous adaptive mechanisms, both in the udder itself but also at whole-cow level. The traits available in our dataset were tied to either physiology and immunity or behaviour. The first part of this discussion focuses on determining which of these traits were impacted by a single 24h-MI and to what extent. The second part focuses on determining whether some of these traits influenced the milk yield responses to 24h-MI and how they influenced this response. Finally, milk yield response profiles to the 24h-MI were characterized according to environmental factors and additional traits.

Effects of a 24h-MI on Additional Traits

Milk yield responses to the 24h-MI on the sub-dataset (n=96) used to assess the influence of additional traits showed a similar distribution to the responses observed on the larger dataset (n=724, data not shown).

Physiological Traits. Proteolysis in milk is largely dependent on the endogenous protease, plasmin. Both milk plasmin and its inactive zymogen plasminogen originate from blood, but milk plasmin could also originate from the conversion of plasminogen into plasmin in the cisternal milk (Ismail and Nielsen, 2010). Plasmin content of milk (as measured by its activity on a synthetic substrate) and its inactive form plasminogen (measured by difference of activity before and after activation with urokinase) were both increased by similar amounts in response to a 24h-MI. Plasminogen:plasmin ratio, which is an indicator of the *in situ* conversion of plasminogen to plasmin, was unaffected by the 24h-MI, suggesting that the increase in milk plasmin observed here was due to an enhanced influx of both plasmin and plasminogen from blood and not from *in situ* conversion of plasminogen to plasmin. Not only the amount of plasmin increased but also its activity (in the milk stored in the udder), as demonstrated by the increase in “peptide” mapping zone Z3 containing products resulting mostly from the primary hydrolysis of β - and α -s2-caseins by plasmin. Similar trends were outlined previously in the literature but only a few works have paralleled the variation in plasmin content with its activity in the udder in prolonged stasis at physiological temperature. In a 3-week experiment in late lactation comparing milks of twin cows milked either twice a day (TDM) or once a day (ODM), plasmin (as measured by activity) was the same but the ODM cows showed a significant increase in large γ -Cn fragments of β -Cn proteolysis products by plasmin compared to the TDM cows. This was attributed to the longer stay of milk in the udder (Prosser et al., 1995). Plasmin (O’Brien et al., 2002) or plasminogen but not plasmin (Rémond et al., 2004) were found to be slightly enhanced in milk in ODM compared to TDM applied over a whole lactation (Rémond et al., 2004) or late lactation (O’Brien et al., 2002).

Enhanced influx of plasmin and plasminogen from blood to milk could point to an increase in mammary epithelium permeability. This agrees well with the concomitant rise in blood plasma lactose observed here and in previous studies. The rise in blood plasma lactose found here is consistent with rises reported by Stelwagen et al. (1997), Guinard-Flament et al. (2011) and Lakic (2011) during the first 24 h of ODM. As lactose is produced exclusively by the mammary gland, the blood plasma lactose could only originate from the mammary gland. Lactose efflux from milk to blood is achieved when mammary epithelium permeability increases, *i.e.* when tight junctions between mammary epithelial cells become leaky. Stelwagen et al. (1997) observed that mammary tight junction permeability increased transiently after 18 h of milk accumulation in the udder when mammary alveoli are maximally distended, thus increasing intra-mammary pressure (**IMP**; Davis et al., 1999).

We studied the consequences of the milk accumulation on the udder shape (using distance between udder teat ends) but also on milking parameters such as milking length and peak and average milk flow rate. Milk accumulation during 24h-MI induced changes in milking parameters. The longer milking length observed here was expected, as the omission of one milking increases the amount of milk collected at next milking. However, milking length did not increase proportionally with the excess of milk stored in the mammary gland, as both average milking flow rate and peak milking flow rate also increased, probably as an adaptation to increasing IMP, as stated by Turner (1955) and Kuwada et al. (1984).

Even if not fully accurate, distances between udder teat ends were used here as an easy estimator of udder distension due to milk accumulation during extended milking intervals. Distances between teats could thus inform on the ability of the mammary gland to distend (compliance), where udders showing a high increase in teat end distance during 24h-MI being considered more compliant than udders showing a small increase (probably more rigid). Relative distension observed here during the 24h-MI was higher for front and rear quarters than for left and right quarters, indicating that the udder extended more laterally than longitudinally. Relative distension was also greater for rear quarters compared to front quarters, which is not surprising as rear teat ends are closer-spaced than front teat ends and rear quarters are known to produce more milk than front quarters (Tančin et al., 2006). The rear quarters could have experienced the highest milk accumulation during the extended milking interval, leading to higher quarter distension.

Immune Traits. Haptoglobin is a serum protein that was shown to be an early indicator of acute inflammation in ruminants for a broad spectrum of diseases (Murata et al., 2004). Here, plasma haptoglobin concentration was slightly decreased by 24h-MI, but note that both initial (0.42 ± 0.041) and 24h-MI (0.34 ± 0.041) values were above published values for healthy cattle (< 0.1 mg/mL in Ceciliani et al., (2012) and < 0.02 mg/mL in Eckersall and Conner (1988)), which would suggest inflamed status before the experiment began. Further research is needed in order to confirm the effects of a 24h-MI on haptoglobin.

We observed that implementing a 24h-MI did not lead to any change in blood neutrophil counts, which could have been expected given the previously observed increase in milk SCC in response to 24h-MI (Charton et al., 2016). Indeed, Latic (2011) observed an increase in milk PMN from blood to milk (together with a decrease in serum albumin and α -La) in the first milk following the ODM and an increase in SCC on the day following the ODM. Four other blood parameters were found to change significantly. There were decreases in Hg, MCHC and proportion of monocytes and an increase in platelets but all these changes remained very low in extent. The effect of an extended milking interval on CBC is described here for the first time, but only a limited number of samples ($n=65$) were analyzed, so further research is needed to confirm these trends and their biological meaning.

Behavioural Traits. To our knowledge, this is the first time the effect of a single 24h-MI on DMI has been reported. Lower DMI has been reported in ODM, but these decreases were limited (Pomiès and Rémond, 2002; Patton et al., 2006) and most of the time non-significant (Rémond and Pomiès, 2005; Ferris et al., 2008). Moreover, according to Rémond and Pomiès (2005), this adaptation of DMI occurs only gradually after ODM implementation and could take up to 6 weeks. Here, the small reduction in DMI might be linked to discomfort experienced by the cows due to the udder distention occurring during the extended milking interval (Stelwagen et al., 2013).

Effects of Traits on Cow's Milk Yield Responses to a 24h-MI

A single 24h-MI challenge was shown to trigger numerous adaptive responses both at mammary and whole-animal levels. The next step was to determine whether these traits (initial values during the control period or the extent of their variations) are related to cows' milk yield responses to the 24h-MI.

Three physiological traits and one immune trait were related to 24h-MI milk yield responses corrected for environmental factors. Even if these 4 traits did not explain much of the variability in the dataset, the three physiological traits were not correlated and thus provided independent information.

It was reasonably logical to link variation in sum of udder teat distances with the udder distension occurring during milk accumulation, but the biological significance of traits related to milk flow rate is less intuitive. Milk flow rate depends partly but not only on the quality of the milk ejection reflex. Milk ejection occurs when oxytocin release causes the contraction of myoepithelial cells surrounding mammary alveoli. This contraction forces alveolar milk into the larger mammary ducts and the cistern, eliciting an increase in IMP up to a peak that is specific to each individual (Gorewit et al., 1983; Bruckmaier and Blum, 1998). Even if not well documented, changes in individual average milk flow rate might at least partly proxy individual variations in IMP in relation with the ability of the mammary gland to tolerate milk accumulation ('udder compliance') over extended milking intervals. Thus, all other things being equal, a higher milk flow rate during milking could indicate a higher oxytocin-induced increase in IMP due to a lower ability of the udder to distend. Here, cows with higher average milk flow rates during the control period showed higher milk yield losses and recovery. In addition, cows whose average milk flow rate and udder teat distances increased less during the 24h-MI also lost more milk. These results add to the assumption that milk flow rate during the control period or its variation in response to extending milking interval could provide information on udder compliance. Indeed, high milk flow rate values or variations could indicate a less compliant udder that would show a larger reduction in milk yield in response to 24h-MI. However, this assumption remains to be investigated and does not provide clear evidence of causal relationships between milk flow rate and milk yield losses. Indeed, milk flow rate variations in response to 24h-MI could be either a cause or a consequence of the milk yield loss. When the mammary gland is not compliant, *i.e.* unable to distend, production would become more downregulated in response to a 24-h extended milking interval, leading to the subsequent decrease in milk flow rate observed here. Conversely, we can assume that if the cow loses more milk, then less milk accumulates in its udder, leading to lower udder distension and thus a lower increase in IMP (indicated by a lower increase in milk flow rate).

Initial udder health status has already been reported to influence cows' milk yield response to extended milking intervals. Indeed, when implementing ODM, Holmes et al. (1996) showed a higher decrease in milk yield in cows with high initial SCC levels. Here, there was no effect of initial SCC level on milk responses to the 24h-MI. However, the presence or not of Il-8, a small cytokine that triggers neutrophil recruitment during inflammation (Rainard et al., 2008), was related to milk yield loss and recovery (in kg/d). Both milk yield loss and recovery (in kg/d) were lower in cows showing an initial presence of Il-8 in the milk. As lengthening the milking interval is known to have more adverse effects on milk yield responses in cows that already have an initially inflamed udder (ODM applied in late lactation, Holmes et al., 1996), the lower milk yield recovery observed here in cows exhibiting initial udder inflammation was entirely expected. However, the lower milk yield loss was unexpected and may originate from the lower initial milk production in these cows. This assumption will be further investigated in the third part of the discussion.

To conclude, environmental factors (Charton et al., 2016) and traits influencing milk yield responses of cows switched to a 24h-MI have been identified using 724 and 96 challenges, respectively. However, modelling failed to explain how these traits and factors are related to one another. We thus moved on to study their association by determining cows' adaptive profiles using a PCA followed by hierarchical clustering.

Response Profiles of Dairy Cows to a 24h-MI

Clustering of the cows using 5 parameters emerged 3 milk yield response profiles to the 24h-MI. These profiles were well characterized by both the environmental factors and the traits. Cows from cluster 1 differed from cows of clusters 2 and 3 by showing a higher milk flow rate during the control period and a lesser increase in both milk flow rate and sum of udder teat end distances in response to

the 24h-MI. Proportion of cows showing an increase in blood plasma lactose above 100 mg/L was also lower in cluster 1 than clusters 2 and 3, suggesting that the mammary epithelium was less impaired by the 24h-MI in cluster-1 cows. The variations of these traits lead to two interpretations: cluster-1 cows showed a higher milk yield loss due to a less compliant udder or had a less udder distension due to their substantially reduced milk accumulation. The substantial milk yield losses observed in cluster 1 were also associated with a higher increase in milk fat content compared to clusters 2 and 3, which could be due to a concentration effect caused by the lower milk yield (Stelwagen et al., 2013). Note too that despite their probably less compliant udders, cluster-1 cows almost completely recovered the milk they had lost.

Milk yield responses of cluster-2 cows differed from cluster-3 cows mainly on recovery:loss ratio. Indeed, cluster-2 cows completely recovered the milk they had lost whereas cluster-3 cows only recovered 63.9% of their lost milk. The lesser recovery observed in cluster 3 is probably associated with a lower initial milk yield, a lower estimated milk yield potential or an initially inflamed udder (as indicated by a higher occurrence of initial milk IL-8) or by all of these factors. Although non-significant, initial milk SCC tended to be higher in cluster 3 than in clusters 1 and 2. This influence of milk IL-8 observed here is an interesting finding and indicates that IL-8 may make an alternative or complementary indicator to SCC for udder inflammation.

The initial “healthy” status of cluster-2 cow mammary glands could be due to the fact that this cluster had the highest proportion of primiparous cows among clusters. The clustered population was also interesting in that most cows showed a compliant udder, and only a minority of the cows were far from recovering the milk they had lost. To conclude, profiles of mammary gland adaptability were discriminated on both milk yield loss and recovery responses. These profiles were correlated to certain traits that show new predictive potential of cow adaptability to extended milking intervals, *i.e.* udder compliance, initial udder inflammation status, and cow milk yield potential.

CONCLUSIONS

This study attempted to use traits known for their influence in milk responses to ODM in order to gain a more comprehensive picture of cow’s responses to a single 24h extended milking interval. These new traits concerned milk proteolysis (milk plasmin system and “peptide” mapping), udder compliance estimated using teat end distances and milk flow rate, and udder inflammation status based on IL-8 (presence of absence) in milk. We found three profiles of mammary gland adaptability in terms of milk yield loss and recovery responses to the 24h-MI. Interestingly, these profiles were significantly associated with the immune and physiological traits identified above.

These results provide good basic knowledge to serve as a starting point for further investigation into the biological meaning of these traits. This new set of traits paired with environmental factors estimated on a larger dataset constitutes a first step towards predicting individual cow responses to a 24h-MI.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the Association GALA (Janzé, France) for providing financial support for milk interleukin-8 analysis. We thank A. Mottin and all the staff at the INRA experimental farm of Méjusseume for their help with animal care and handling. We also thank G. Théaud and M. Fargetton for help in data collection, and the laboratory technicians (F. Revardeau (INRA-URTAL) and S. Daré-Michelot (INRA-UMR PEGASE) for their help on analyzing the samples.

REFERENCES

van Asselt, A.J., A.P.J. Sweere, H.S. Rollema, and P. de Jong. 2008. Extreme high-temperature treatment of milk with respect to plasmin inactivation. *Int. Dairy J.* 18:531–538. doi:10.1016/j.idairyj.2007.11.019.

- Bruckmaier, R.M., and J.W. Blum. 1998. Oxytocin Release and Milk Removal in Ruminants. *J. Dairy Sci.* 81:939–949. doi:10.3168/jds.S0022-0302(98)75654-1.
- Bugaud, C., S. Buchin, J.-B. Coulon, A. Hauwuy, and D. Dupont. 2001. Influence of the nature of alpine pastures on plasmin activity, fatty acid and volatile compound composition of milk. *Lait.* 81:401–414. doi:10.1051/lait:2001140.
- Ceciliani, F., J. Ceron, P. Eckersall, and H. Sauerwein. 2012. Acute phase proteins in ruminants. *J. Proteomics.* 75:4207–4231. doi:10.1016/j.jprot.2012.04.004.
- Charton, C., H. Larroque, C. Robert-Granié, D. Pomiès, H. Leclerc, N.C. Friggens, and J. Guinard-Flament. 2016. Individual responses of dairy cows to a 24-hour milking interval. *J. Dairy Sci.* doi:10.3168/jds.2015-9782.
- Datta, N., and H.C. Deeth. 2003. Diagnosing the cause of proteolysis in UHT milk. *LWT - Food Sci. Technol.* 36:173–182. doi:10.1016/S0023-6438(02)00214-1.
- Davis, S.R., V.C. Farr, and K. Stelwagen. 1999. Regulation of yield loss and milk composition during once-daily milking: a review. *Livest. Prod. Sci.* 59:77–94. doi:10.1016/S0301-6226(98)00204-8.
- Eckersall, P.D., and J.G. Conner. 1988. Bovine and canine acute phase proteins. *Vet. Res. Commun.* 12:169–178. doi:10.1007/BF00362798.
- Elliott, G.M., F.H. Dodd, and P.J. Brumby. 1960. Variations in the rate of milk secretion in milking intervals of 2-24 hours. *J. Dairy Res.* 27:293–308.
- Ferris, C.P., J.P. Frost, C.S. Mayne, M. a. McCoy, and D.J. Kilpatrick. 2008. A comparison of the direct and residual response of dairy cows to once or twice-daily milking, in late lactation. *Livest. Sci.* 114:305–314. doi:10.1016/j.livsci.2007.05.015.
- Gleeson, D.E., B. O'Brien, L. Boyle, and B. Earley. 2007. Effect of milking frequency and nutritional level on aspects of the health and welfare of dairy cows. *Animal.* 1:125–32. doi:10.1017/S1751731107658030.
- Gorewit, R.C., E.A. Wachs, R. Sagi, and W.G. Merrill. 1983. Current Concepts on the Role of Oxytocin in Milk Ejection. *J. Dairy Sci.* 66:2236–2250. doi:10.3168/jds.S0022-0302(83)82073-6.
- Guinard-Flament, J., Y. Gallard, and H. Larroque. 2011. Lactose in blood plasma and the ability of dairy cows to tolerate once-daily milking in terms of milk loss and milk recovery. *J. Dairy Sci.* 94:3446–54. doi:10.3168/jds.2010-4081.
- Hayhoe, F.G.J., and R.J. Flemans. 1970. Atlas en couleurs de cytologie hématologique. 2nd Editio. Flammarion, Paris. 188 pp.
- Holmes, C., H. Kamote, D. Mackenzie, and P. Morel. 1996. Effects of a decrease in milk yield, caused by once-daily milking or by restricted feeding, on the somatic cell count in milk from cows with or without subclinical mastitis. *Aust. J. Dairy Technol.* 51:8–11.
- IDF 29-1 ISO 17997-1. 2004. Milk - Determination of casein - nitrogen content - Part 1: Indirect method. Brussels, Belgium, International Dairy Federation.
- Innocente, N., M. Biasutti, and C. Blecker. 2011. HPLC profile and dynamic surface properties of the proteose-peptone fraction from bovine milk and from whey protein concentrate. *Int. Dairy J.* 21:222–228. doi:10.1016/j.idairyj.2010.11.004.
- INRA, and J. Agabriel. 2010. Alimentation des bovins, ovins et caprins. Besoins des animaux - Valeur des aliments. Tables INRA 2007, mise à jour 2010. Quae, editor. Versailles, France. 311 pp.
- Ismail, B., and S.S. Nielsen. 2010. Invited review: Plasmin protease in milk: Current knowledge and relevance to dairy industry. *J. Dairy Sci.* 93:4999–5009. doi:10.3168/jds.2010-3122.
- Kuwada, S., S. Okamoto, and T. Matsuo. 1984. Relationship between Intrammary Pressure and Milk Secretion Rate in Lactating Dairy Cows. *Bull. Fac. Agron. Saga Univ.* 57:81–89.
- Lakic, B. 2011. Effects of a single prolonged milking interval in cows. PhD Thesis - Swedish University of Agricultural Sciences. 85 pp.
- Le, T.X., N. Datta, and H.C. Deeth. 2006. A sensitive HPLC method for measuring bacterial proteolysis and proteinase activity in UHT milk. *Food Res. Int.* 39:823–830. doi:10.1016/j.foodres.2006.03.008.
- Lenth, R. 2014. lsmeans: Least-Squares Means. R package version 2.12. <http://CRAN.R-project.org/package=lsmeans>.
- Murata, H., N. Shimada, and M. Yoshioka. 2004. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *Vet. J.* 168:28–40. doi:10.1016/S1090-0233(03)00119-9.

- O'Brien, B., G. Ryan, W. Meaney, D. McDonagh, and A. Kelly. 2002. Effect of frequency of milking on yield, composition and processing quality of milk. *J. Dairy Res.* 69:367–374. doi:10.1017/S0022029902005605.
- Patton, J., D. a Kenny, J.F. Mee, F.P. O'Mara, D.C. Wathes, M. Cook, and J.J. Murphy. 2006. Effect of milking frequency and diet on milk production, energy balance, and reproduction in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 89:1478–87. doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72215-9.
- Pomiès, D., and B. Rémond. 2002. Once a day milking of dairy cows during the whole lactation: consequences on performances and milk quality. 9th Proc. Journées 3R PARIS, ed. INRA. 195–198.
- Prosser, C.G., G. Nicholas, K. Stelwagen, S.J. Lacy Hulbert, M.W. Woolford, and T.B. McFadden. 1995. Influence of milking frequency and feeding level on plasmin activity and casein degradation in milk. *Proc. New Zeal. Soc. Anim. Prod.* 55:9–11.
- Radcliffe, J.C., L.F. Bailey, and M.L. Horne. 1973. Periodic omission of dairy cow milkings: I. Effect on milk yield and composition and on udder health. *J. Dairy Res.* 40:247–254.
- Rainard, P., C. Riollot, P. Berthon, P. Cunha, A. Fromageau, C. Rossignol, and F.B. Gilbert. 2008. The chemokine CXCL3 is responsible for the constitutive chemotactic activity of bovine milk for neutrophils. *Mol. Immunol.* 45:4020–4027. doi:10.1016/j.molimm.2008.06.010.
- Rémond, B., S. Aubailly, Y. Chilliard, D. Dupont, D. Pomiès, and M. Petit. 2002. Combined effects of once-daily milking and feeding level in the first three weeks of lactation on milk production and enzyme activities, and nutritional status, in Holstein cows. *Anim. Res.* 51:101–117. doi:10.1051/animres.
- Rémond, B., and D. Pomiès. 2005. Once-daily milking of dairy cows: a review of recent French experiments. *Anim. Res.* 54:427–442. doi:10.1051/animres.
- Rémond, B., D. Pomiès, D. Dupont, and Y. Chilliard. 2004. Once-a-day milking of multiparous Holstein cows throughout the entire lactation: milk yield and composition, and nutritional status. *Anim. Res.* 53:201–212. doi:10.1051/animres:2004014 201.
- Roguinsky, M., M. Ducelliez, and R. Borde. 1972. Effets de la suppression d'une traite par semaine sur l'infection mammaire et la production laitière. *Ann. Rech. Vétérinaires.* 3:43–60.
- Rollema, H., S. Visser, and J. Poll. 1983. Spectrophotometric assay of plasmin and plasminogen in bovine-milk. *Milchwissenschaft.* 38:214–217.
- Schaar, J. 1985. Plasmin activity and proteose-peptone content of individual milks. *J. Dairy Res.* 52:369–378.
- Stelwagen, K., V.C. Farr, H.A. McFadden, C.G. Prosser, and S.R. Davis. 1997. Time course of milk accumulation-induced opening of mammary tight junctions, and blood clearance of milk components. *Am. Physiol.* 379–386.
- Stelwagen, K., C.V.C. Phyn, S.R. Davis, J. Guinard-Flament, D. Pomiès, J.R. Roche, and J.K. Kay. 2013. Invited review: reduced milking frequency: milk production and management implications. *J. Dairy Sci.* 96:3401–13. doi:10.3168/jds.2012-6074.
- Tančin, V., B. Ipema, P. Hogewerf, and J. Mačuhová. 2006. Sources of Variation in Milk Flow Characteristics at Udder and Quarter Levels. *J. Dairy Sci.* 89:978–988. doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72163-4.
- Turner, H.G. 1955. Changes in capacity of the udder of the dairy cow during the course of lactation. *Aust. J. Agric. Res.* 6:145–160.
- Wheelock, J. V, J.A.F. Rook, F.H. Dodd, and T.K. Griffin. 1966. The effect of varying the interval between milkings on milk secretion. *J. Dairy Res.* 33:161–176. doi:10.1017/S0022029900011833.

Partie 2 : Caractérisation des réponses à trois semaines de monotraite, étude du déterminisme génétique et de la représentativité du premier intervalle de 24 h

La deuxième partie de mon travail de thèse a consisté 1) à caractériser les réponses adaptatives de vaches laitières croisées Holstein × Normande passées pendant trois semaines en monotraite ; 2) à étudier le déterminisme génétique à ces réponses, et 3) à évaluer la représentativité des réponses observées sur le premier jour de monotraite vis à vis des réponses moyennes observées sur les trois semaines de monotraite. Cette deuxième partie a fait l'objet de deux articles qui sont présentés en une version non soumise et de résultats complémentaires présentés en **annexe 2**.

Le troisième article avait quatre objectifs : 1) définir les réponses moyennes des vaches à deux semaines de monotraite, 2) étudier le déterminisme génétique des niveaux de production et de la composition du lait lors des différentes fréquences de traite (deux et une traite(s) par jour), 3) étudier le déterminisme génétique des variations (« réponses ») de production laitière à la monotraite et 4) évaluer la pertinence de deux prédicteurs possibles de la réponse à la monotraite : la composition initiale du lait et la réponse au premier jour de monotraite.

Le quatrième article présente les résultats de la détection de QTL qui avait pour but de déterminer 1) si les régions du génome impliquées dans les niveaux de production et dans la composition laitière étaient identiques pour les fréquences deux traites et une traite par jour, 2) quelles étaient les régions impliquées dans les variations de production laitière (« réponses »), et 3) si les régions génomiques détectées sur les réponses à trois semaines de monotraite étaient les mêmes que celles détectées au premier jour de monotraite.

Des premiers résultats complémentaires présentés en **annexe 2** décrivent ensuite les relations entre deux caractères (dont nous avons évalué l'influence sur les réponses à un intervalle de traite unique de 24 h) : le débit moyen d'émission du lait à la traite du matin et la lactosémie. Enfin, comme pour l'étude des réponses à un intervalle unique de 24 h, la dernière partie des résultats expérimentaux visait à déterminer l'existence de profils adaptatifs sur les réponses de production laitière en réponse à la monotraite et à évaluer la possibilité de les caractériser au regard de phénotypes disponibles, et en partie identiques à ceux étudiés sur les réponses à un intervalle unique de 24 h.

Afin de faciliter la lecture de ces résultats, les notions essentielles associées à la l'étude de la variabilité génétique sont précisées dans un préambule.

Préambule : Quelques notions de génétique quantitative

Ce préambule a pour objectif de repréciser les notions essentielles nécessaires à la compréhension des résultats de l'étude du déterminisme génétique, en particulier quelques principes et méthodes associés à l'estimation des paramètres génétiques et à la détection de QTL.

Ce préambule de synthèse est principalement réalisé à partir des ouvrages de Minvielle (1990) et de Mrode and Thompson (2005), et des articles de Boichard et al (1995 et 1998).

Quelques définitions essentielles

Gène : segment d'ADN qui code pour la synthèse d'une ou de plusieurs protéines et qui permet donc la manifestation et la transmission d'un caractère héréditaire déterminé.

Locus : emplacement précis d'un gène sur le chromosome qui le porte

Allèle : chacune des différentes formes, ou variantes possibles d'un gène, résultant d'une ou de plusieurs mutations.

Polymorphisme : un gène est dit polymorphe lorsqu'il coexiste sous la forme d'au moins deux allèles à une fréquence supérieure ou égale à 1 % au sein d'une population.

Hétérozygotie : proportion d'individus portant des allèles différents sur les chromosomes d'une même paire à un locus déterminé.

Haplotype : groupes d'allèles de différents loci situés sur le même chromosome et habituellement transmis ensemble.

Marqueurs génétiques : portion d'ADN « neutre » (sans effet sur le caractère), variable d'un individu à l'autre (polymorphe) et aisément détectable qui permet de tracer l'origine d'un segment de chromosome d'une génération à l'autre. Plusieurs types de marqueurs existent. En amélioration génétique des animaux d'élevages, les marqueurs microsatellites (séquence d'ADN très courtes dont le polymorphisme réside dans le nombre variable de répétition du motif) ont été considérés comme marqueurs de choix au cours des années 1990 avant d'être progressivement remplacés par les SNP (Single-Nucleotide Polymorphism, polymorphisme mononucléotidique) au cours des années 2000. Les SNP sont une mutation simple par remplacement d'une paire de bases du génome. Ce type de marqueur est intéressant car abondant sur le génome (ce qui permet d'en baliser l'intégralité), génétiquement stable et facilement génotypable grâce à l'utilisation de « puces » permettant l'identification automatisée de plusieurs milliers de nucléotides (Heaton et al., 2002).

QTL (Quantitative Trait Loci) : loci impliqués dans la variation des caractères quantitatifs.

Déséquilibre de liaison (DL): association préférentielle entre allèles de deux loci : il y a déséquilibre de liaison entre deux loci lorsque pour au moins un couple d'allèles, la fréquence de l'haplotype n'est pas égale au produit des fréquences alléliques dans la population des gamètes. Si on considère deux

loci bi-alléliques où A et a sont les allèles du premier locus, B et b les allèles du second locus, P_{AB} , P_{Ab} , P_{aB} et P_{ab} les fréquences des différents gamètes possibles, le déséquilibre de liaison D peut se définir selon l'équation suivante : $D = P_{AB} - P_A \times P_B$. Le déséquilibre de liaison diminue au cours des générations sous l'effet des recombinaisons génétiques (crossing-over) pouvant survenir au cours de la méiose. La fréquence des recombinaisons génétiques diminue lorsque les deux loci sont proches sur le génome, plus les loci seront proches, et plus le déséquilibre de liaison persistera au cours des générations suivant la mutation originelle (Feingold, 1991).

Les caractères mesurables chez un individu sont soit des caractères qualitatifs, soit des caractères quantitatifs. Le terme de qualitatif désigne les caractères comme la couleur de la robe ou la présence de cornes qui peuvent seulement prendre un nombre limité de valeurs. Toutefois, la plupart des caractères d'intérêt économique en production animale, dont la production et la composition du lait, qui nous intéressent plus particulièrement ici, sont quantitatifs : leurs mesures sur un grand nombre d'individus d'une population recouvrent de façon continue un large intervalle de valeurs, et leur distribution est normale (95% des mesures sont comprises entre leur moyenne plus ou moins deux écart-types). Cette large variation des caractères quantitatifs semble avoir une double origine. Tout d'abord, ces caractères sont influencés par le milieu, ou environnement. Ensuite, contrairement aux caractères qualitatifs, qui sont sous le contrôle d'un faible nombre voire d'un seul gène, les caractères quantitatifs font intervenir un grand nombre de mécanismes biologiques complexes et sont donc sous le contrôle d'un grand nombre de gènes.

a- Les composantes de la variabilité phénotypique d'un caractère quantitatif

Le phénotype (P) mesuré pour un caractère quantitatif chez un individu peut s'expliquer par deux composantes : l'une liée à l'environnement (E), l'autre liée aux gènes (G) portés par l'individu, d'où l'écriture $P = G + E$.

Le plus souvent, on suppose que E et G agissent de façon additive. Cette hypothèse ne pose pas de problème lorsque les pratiques d'élevage sont très uniformes mais ce n'est pas toujours le cas et il peut exister une interaction $G \times E$.

Le terme E , appelé « effets d'environnement » ou « effets de milieu », est classiquement décomposé par les généticiens en trois composantes : des effets identifiés et enregistrés, comme le stade ou le rang de lactation, des effets identifiés non enregistrés comme les conditions climatiques, et des effets non identifiés. Ces deux dernières composantes constituent l'erreur du modèle que l'on tente de réduire en enregistrant un maximum de données du milieu.

Pour G , la composante génétique, les caractères quantitatifs ne sont qu'exceptionnellement fortement influencés par un seul gène. Lorsque l'effet du locus est suffisamment fort pour que

l'analyse des phénotypes seuls permette de valider la ségrégation pour ce gène, on parle de gène majeur (Ytournal et al., 2008). C'est le cas du gène culard et du gène *DGAT1* chez les bovins par exemple. En règle générale, les caractères quantitatifs sont sous le contrôle d'un grand nombre de gènes. Chacun des gènes existe sous des formes différentes, nommées allèles, associées à des effets différents sur le phénotype. Les effets des allèles sur le phénotype constitue le génotype (G) et peuvent se décomposer en $A + D + I$ où A est la valeur génétique additive, c'est-à-dire la somme des effets de chaque allèle ; D est la valeur de dominance, c'est-à-dire la somme des effets d'interaction entre les deux allèles de chaque gène ; et I est la valeur d'épistasie, la somme des effets d'interaction entre allèles de différents gènes (**Figure 18**).

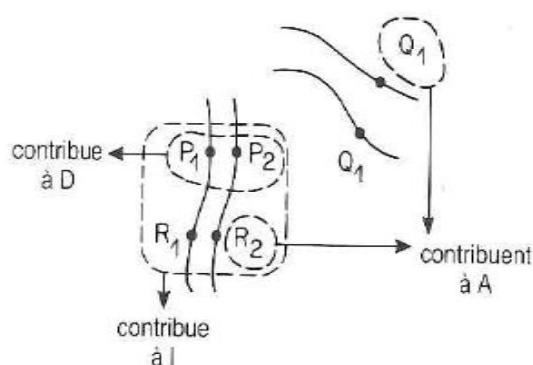


Figure 18. Les composantes du génotype d'après Minvielle (1990). Deux paires de chromosomes sont représentés, portant pour l'un deux gènes (P et R, existant sous deux formes alléliques, 1 et 2) et pour l'autre un gène (Q, existant sous une forme allélique).

Le phénotype (P) d'un individu peut alors s'écrire : $P = G + E = A + D + I + E$

Lors de la méiose, un seul allèle par gène est conservé pour la constitution d'un gamète. La valeur de dominance n'est donc pas transmissible à la descendance, et la valeur d'épistasie ne l'est qu'en partie (surtout pour les allèles de gènes très proches qui n'ont pas subi de recombinaisons). La part du génotype que transmet un individu à sa descendance est ainsi liée principalement à sa valeur génétique additive : en espérance, un individu transmet la moitié de ces allèles donc la moitié de sa valeur génétique additive. C'est donc sur l'estimation de A que s'appuie la sélection des animaux pour faire évoluer les populations d'une génération à une autre.

Par analogie, la variabilité phénotypique observée dans une population, ou variance phénotypique peut être décomposée en : $V(P) = V(G) + V(E)$. Très souvent la variabilité génétique n'est exprimée qu'au travers de sa forme transmissible à la descendance : la variabilité de la valeur génétique additive $V(A)$.

b- Etude du déterminisme génétique d'un caractère quantitatif

L'étude du déterminisme génétique d'un caractère quantitatif est un processus qui s'articule classiquement en plusieurs étapes. Une première étape permet de quantifier la part de la variation phénotypique du caractère qui est imputable à la génétique de l'animal (calcul de l'héritabilité) et les liens génétiques avec les autres caractères quantitatifs (calcul des corrélations génétiques). Cette première étape nécessite d'estimer la variance de la composante génétique additive σ_a^2 , et la covariance génétique additive σ_{a12} qui peut exister entre deux caractères. Pour compléter cette première étape, la détection des principales zones du génome impliquées dans la variation du caractère considéré, qui peut être réalisée grâce à une recherche de QTL, permet de mieux décrire la nature du déterminisme génétique. Une étude de cartographie fine peut ensuite aboutir à l'identification de mutations causales.

i. Estimation de la variance génétique additive et des paramètres génétiques

L'estimation de la valeur génétique d'un animal pour un ou plusieurs caractères se fait généralement par des modèles statistiques qui nécessitent une estimation des composantes de la variance.

- **Estimation de la valeur génétique additive**

L'estimation de la valeur génétique additive des animaux implique une modélisation statistique des effets génétiques et de milieu. Les modèles classiques de génétique quantitative sont des modèles mixtes à effets fixes (généralement les effets de milieu) et aléatoires (les valeurs génétiques et les résidus du modèle). Chaque performance peut être décomposée à l'aide d'un modèle linéaire mixte gaussien avec au minimum trois composantes additives (Mrode et Thompson, 2005) :

$$\mathbf{y} = \mathbf{Xb} + \mathbf{Za} + \mathbf{e}$$

où \mathbf{y} est le vecteur des phénotypes observés pour le caractère, \mathbf{b} est le vecteur des effets fixes d'environnement, \mathbf{a} est le vecteur des effets aléatoires (*i.e.*, vecteur des valeurs génétiques additives ; dans un modèle animal, ce sont celles de tous les individus avec performance), \mathbf{e} est le vecteur des résidus, et \mathbf{X} et \mathbf{Z} sont des matrices d'incidence qui relient les observations aux effets et sont connues contrairement à \mathbf{b} et \mathbf{a} . Les espérances de \mathbf{a} et \mathbf{e} sont supposées connues ($E(\mathbf{a}) = E(\mathbf{e}) = 0$) ainsi que les matrices de variance-covariance des effets aléatoires :

$$\text{Var} \begin{bmatrix} \mathbf{a} \\ \mathbf{e} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} G & 0 \\ 0 & R \end{bmatrix}$$

avec $\text{Var}(\mathbf{a}) = \mathbf{A}\sigma_a^2 = \mathbf{G}$, $\text{Var}(\mathbf{e}) = \mathbf{I}\sigma_e^2 = \mathbf{R}$ et $\text{Var}(\mathbf{y}) = \mathbf{V} = \mathbf{Z}\mathbf{G}\mathbf{Z}' + \mathbf{R}$ où σ_a^2 est la variance génétique additive, σ_e^2 est la variance résiduelle, \mathbf{I} désigne la matrice d'identité correspondant au nombre d'individus, et \mathbf{A} est la matrice de parenté génétique (l'élément A_{ij} est égal à deux fois le coefficient de parenté de Malécot entre les individus i et j). La meilleure prédiction linéaire non biaisée (**BLUP, Best Linear Unbiased Prediction**, Henderson, 1973) est la méthode la plus adéquate pour estimer simultanément les effets fixes et aléatoires du modèle. En pratique, elle nécessite l'inversion de \mathbf{V} , ce qui n'est pas réalisable quand on prend en compte des milliers de performances. Henderson a alors montré qu'estimer ces effets fixes et aléatoires était possible sans nécessiter l'inversion de la matrice \mathbf{V} , et que ces estimés sont les solutions du système des « équations du modèle mixte » :

$$\begin{bmatrix} \mathbf{X}'\mathbf{X} & \mathbf{X}'\mathbf{Z} \\ \mathbf{Z}'\mathbf{X} & \mathbf{Z}'\mathbf{Z} + \mathbf{A}^{-1}\mathbf{a} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \hat{\mathbf{b}} \\ \hat{\mathbf{a}} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mathbf{X}'\mathbf{y} \\ \mathbf{Z}'\mathbf{y} \end{bmatrix}$$

où $\alpha = \sigma_e^2 / \sigma_a^2$.

Ces modèles sont généralisables à l'étude de plusieurs caractères simultanément. Le modèle précédent étendu s'écrit alors : $\mathbf{y}_i = \mathbf{X}_i\mathbf{b}_i + \mathbf{Z}_i\mathbf{a}_i + \mathbf{e}_i$, i allant du caractère 1 au caractère n .

Pour deux caractères, ce modèle s'écrit sous forme matricielle :

$$\begin{bmatrix} \mathbf{y}_1 \\ \mathbf{y}_2 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mathbf{X}_1 & \mathbf{0} \\ \mathbf{0} & \mathbf{X}_2 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \mathbf{b}_1 \\ \mathbf{b}_2 \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} \mathbf{Z}_1 & \mathbf{0} \\ \mathbf{0} & \mathbf{Z}_2 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \mathbf{a}_1 \\ \mathbf{a}_2 \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} \mathbf{e}_1 \\ \mathbf{e}_2 \end{bmatrix}$$

où \mathbf{y}_i est le vecteur des phénotypes observés pour le $i^{\text{ème}}$ caractère, \mathbf{b}_i est le vecteur des effets fixes environnementaux estimés pour le $i^{\text{ème}}$ caractère et \mathbf{X}_i est sa matrice d'incidence, \mathbf{a}_i est le vecteur des effets aléatoires pour le $i^{\text{ème}}$ caractère et \mathbf{Z}_i sa matrice d'incidence et \mathbf{e}_i le vecteur des résidus pour le $i^{\text{ème}}$ caractère.

Où $E(\mathbf{a}) = 0$, $E(\mathbf{e}) = 0$, et $e \text{Var} \begin{bmatrix} \mathbf{a} \\ \mathbf{e} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mathbf{G} & \mathbf{0} \\ \mathbf{0} & \mathbf{R} \end{bmatrix}$

\mathbf{G} est la matrice de variance-covariance génétique additive de l'effet aléatoire $\mathbf{G} = \begin{bmatrix} \mathbf{A}\sigma_{a_1}^2 & \mathbf{A}\sigma_{a_{12}} \\ \mathbf{A}\sigma_{a_{12}} & \mathbf{A}\sigma_{a_2}^2 \end{bmatrix}$ dont les éléments sont définis comme suit : $\sigma_{a_{12}}$ est la covariance génétique entre les deux caractères, $\sigma_{a_1}^2$ et $\sigma_{a_2}^2$ sont les variances génétiques pour les caractères 1 et 2, respectivement ; \mathbf{R} est la matrice de variance-covariance des effets résiduels dont les éléments sont définis comme suit : $\mathbf{R} = \begin{bmatrix} \mathbf{I}\sigma_{e_1}^2 & \mathbf{I}\sigma_{e_{12}} \\ \mathbf{I}\sigma_{e_{12}} & \mathbf{I}\sigma_{e_2}^2 \end{bmatrix}$

Par analogie avec le modèle uni-caractère les équations des modèles mixtes permettant d'estimer les solutions \mathbf{a} et \mathbf{b} s'écrivent sous la forme suivante :

$$\begin{bmatrix} \mathbf{X}'\mathbf{R}^{-1}\mathbf{X} & \mathbf{X}'\mathbf{R}^{-1}\mathbf{Z}' \\ \mathbf{Z}'\mathbf{R}^{-1}\mathbf{X} & \mathbf{Z}'\mathbf{R}^{-1}\mathbf{Z} + \mathbf{A}^{-1}\mathbf{\ddot{A}}\mathbf{G}^{-1} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \hat{\mathbf{b}} \\ \hat{\mathbf{a}} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mathbf{X}'\mathbf{R}^{-1}\mathbf{y} \\ \mathbf{Z}'\mathbf{R}^{-1}\mathbf{y} \end{bmatrix}$$

avec $\mathbf{X} = \begin{bmatrix} \mathbf{X}_1 & \mathbf{0} \\ \mathbf{0} & \mathbf{X}_2 \end{bmatrix}$; $\mathbf{Z} = \begin{bmatrix} \mathbf{Z}_1 & \mathbf{0} \\ \mathbf{0} & \mathbf{Z}_2 \end{bmatrix}$; $\hat{\mathbf{b}} = \begin{bmatrix} \hat{\mathbf{b}}_1 \\ \hat{\mathbf{b}}_2 \end{bmatrix}$; $\hat{\mathbf{a}} = \begin{bmatrix} \hat{\mathbf{a}}_1 \\ \hat{\mathbf{a}}_2 \end{bmatrix}$ et $\mathbf{y} = \begin{bmatrix} \mathbf{y}_1 \\ \mathbf{y}_2 \end{bmatrix}$.

Cependant la résolution de ces modèles, tant uni-caractère que multicaractère, nécessite de connaître les variances σ_e^2 et σ_a^2 , ce qui implique d'estimer les composantes de la variance.

- **Estimation des composantes de la variance**

En raison de ses propriétés, la méthode du maximum de vraisemblance restreinte (**REstricted Maximum Likelihood, REML**) est devenue la méthode de référence pour l'estimation des composantes de la variance.

La vraisemblance se définit comme la densité de probabilité des données, la distribution étant supposée connue. Dans le cas du modèle linéaire mixte et sous l'hypothèse de normalité de la distribution des observations, elle s'écrit :

$$p(\mathbf{y}|\boldsymbol{\beta}, \boldsymbol{\sigma}) = \frac{1}{(2\pi)^{\frac{N}{2}}} |\mathbf{V}|^{-\frac{1}{2}} \exp \left[-\frac{1}{2} (\mathbf{y} - \mathbf{X}\boldsymbol{\beta})' \mathbf{V}^{-1} (\mathbf{y} - \mathbf{X}\boldsymbol{\beta}) \right]$$

où $\boldsymbol{\sigma}$ représente le vecteur des variances-covariances des effets aléatoires. Cette fonction étant strictement positive, on peut considérer son logarithme, qui est une fonction croissante (L).

Rechercher le maximum de la vraisemblance (ML) revient à rechercher le maximum de L. On cherche donc les estimés $\boldsymbol{\beta}$ et $\boldsymbol{\sigma}$ qui maximisent L. L'estimation ML a pour inconvénient de maximiser la vraisemblance globale, c'est-à-dire à la fois la vraisemblance de l'ensemble des effets fixes et des composantes de (co)variance. Le REML reprend les propriétés du ML mais prend en compte la perte de degré de liberté due aux effets fixes en maximisant uniquement la vraisemblance d'une fonction des données corrigées des effets fixes.

Les équations du REML s'obtiennent en annulant la dérivée de la fonction par rapport à chaque composante de $\boldsymbol{\sigma}$ et sont résolues de manière itérative.

Les besoins informatiques pour le REML sont conséquents, et depuis les années 1980, de nombreux algorithmes efficaces visant à l'obtention des solutions des paramètres σ_a^2 et σ_e^2 ont été proposés. Parmi eux, nous avons utilisé l'algorithme **AI-REML (Average Information REstricted Maximum Likelihood)** proposé par Johnson et al. (1995), implémenté dans la famille des logiciels BLUPF90 développés par I. Misztal et collaborateurs (Misztal, 2008).

- **Extension à la prise en compte de l'information des marqueurs moléculaires**

Avec l'information moléculaire, la valeur génétique d'un animal j (estimée à partir du modèle de base $P = G + E$) peut s'écrire : $\hat{u}_j = \sum_i x_{ij}g_i = x_jg$ où x_j est le vecteur ligne qui contient le génotype aux marqueurs de l'individu j et g est l'ensemble des effets estimés des marqueurs. Il est alors possible de réécrire le système d'équation du BLUP en remplaçant $A^{-1}\alpha$ par $\sigma_e^2/\sigma_g^2(XX')^{-1}$ (Robert-Granié et al., 2011).

Différents auteurs ont montré qu'avec un codage particulier des SNP (centré sur 0), il est possible de construire une matrice de « parenté génomique » telle que : $G = \frac{XX'}{2\sum_{m=1}^m p_i q_i}$ pour m SNP avec p_i la fréquence de l'allèle de référence du SNP i et $q_i = 1 - p_i$. Les éléments de G mesurent la proportion moyenne d'allèles partagée par deux individus pour tous les SNP pondérés par leur fréquence (partager des allèles rares est très informatif sur la parenté). Cette parenté génomique est plus précise que celle obtenue par les généalogies mais elle nécessite le génotypage de tous les individus. En pratique, pour l'estimation des valeurs génétiques comme pour celle des composantes de la variance, on va vouloir utiliser à la fois l'information généalogique (assez complète pour les espèces d'élevage) et l'information moléculaire plus précise mais connue uniquement pour certains reproducteurs. Pour cela, Legarra et al. (2009) ont montré que la variance des valeurs génétiques $Var(\mathbf{u})$ était fonction d'une matrice H telle que : $Var(\mathbf{u}) = H\sigma_u^2$, H combinant l'information SNP et l'information pedigree avec : $H = \begin{bmatrix} H_{11} & H_{12} \\ H_{21} & H_{22} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_{11} + A_{12}A_{22}^{-1}(G - A_{22})A_{22}^{-1}A_{21} & A_{12}A_{22}^{-1}G \\ GA_{22}^{-1}A_{12} & G \end{bmatrix}$ avec A_{11} la sous-matrice de parenté basée sur les pedigrees pour les animaux non génotypés, A_{22} la sous-matrice de parenté pour les animaux génotypés, et A_{12} ou A_{21} les sous-matrices de parenté entre les animaux non génotypés et génotypés.

- **Les paramètres génétiques**

Héritabilité. L'héritabilité au sens large, notée H^2 , d'un caractère se définit de la manière suivante :

$$H^2 = \frac{\sigma_g^2}{\sigma_p^2}$$

où σ_g^2 est la variance génétique et σ_p^2 la variance phénotypique pour le caractère considéré.

L'héritabilité H^2 indique donc la part de la variation phénotypique du caractère qui est imputable à la génétique de l'animal. Dans le cadre de l'amélioration génétique des animaux, il est plus intéressant de quantifier la part de variation phénotypique transmissible à la descendance, c'est-à-dire la part de variance génétique additive. On définit alors l'héritabilité restreinte h^2 :

$$h^2 = \frac{\sigma_a^2}{\sigma_p^2}$$

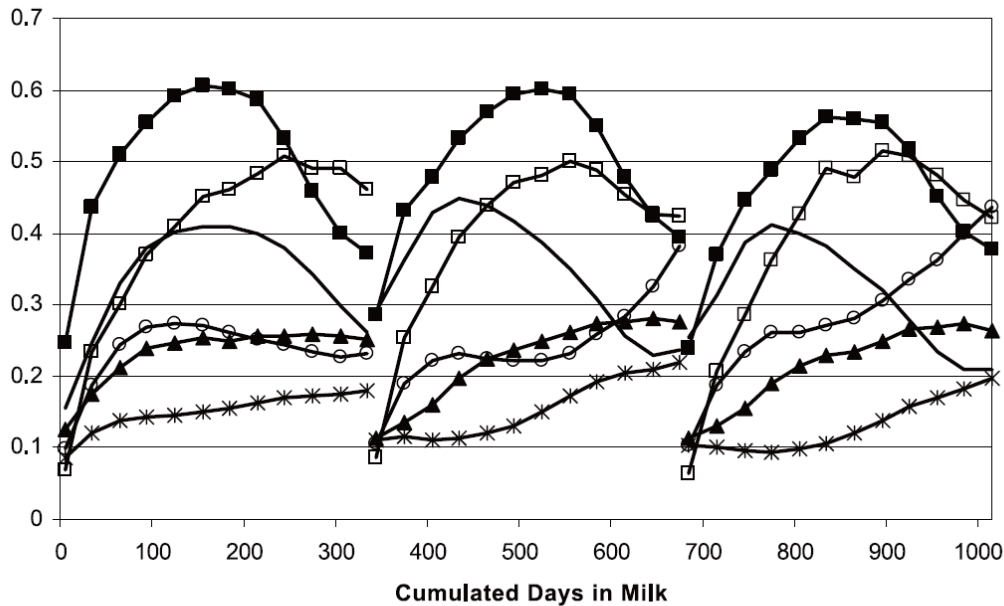
avec σ_a^2 la variance génétique additive.

L'héritabilité peut varier entre 0 et 1, où 0 représenterait le cas extrême pour lequel aucune part de la variation de performance observée n'est transmissible à la descendance et 1 représenterait le cas extrême où toutes les variations phénotypiques observées sont d'origine génétique additive et donc transmissibles à la descendance. Dans les faits, l'héritabilité varie généralement entre 0 et 0,70 et on note trois groupes d'héritabilité :

- faible : inférieure à 0,25 (reproduction femelle, viabilité des jeunes, résistance aux maladies...)
- moyenne : comprise entre 0,25 et 0,40 (morphologie, croissance, production de lait, efficacité alimentaire...)
- forte : supérieure à 0,40 (caractères de composition des produits...)

L'héritabilité d'un caractère est spécifique à une population donnée, mais varie généralement peu d'une population à l'autre. En revanche, selon le caractère considéré, elle présente des variations importantes. Dans le cas des bovins, l'héritabilité de la production laitière calculée à l'échelle de la lactation est généralement comprise entre 0,25 et 0,40, et donc qualifiée de moyenne. La composition du lait (taux butyreux et protéiques) a une héritabilité élevée, comprise entre 0,30 et 0,60 (Leclerc et al., 2009). En revanche, le taux cellulaire du lait a une héritabilité plus faible (entre 0,10 et 0,20), qui augmente au cours de la lactation (Leclerc et al., 2009), tandis que les paramètres de fertilité sont très faiblement héréditaires (intervalles entre vêlages, 0 à 0,05) (Minvielle, 1990). L'héritabilité de la

production et de la composition du lait (**quantité de matière grasses (MG)**, **quantité de matières protéiques (MP)**, TB, TP et **SCS (Somatic Cell Score)**) varie au cours de la lactation de manière assez importante, selon une courbe avec un maximum autour de 100 à 200 jours de lactation pour la plupart des caractères (**Figure 19**). La forme des courbes d'héritabilité varie également en fonction du rang de lactation, avec une première lactation qui se distingue des deuxièmes et troisièmes lactations (Druet et al., 2005; Leclerc et al., 2009).



Heritabilities for milk yield (—), fat yield (▲), fat content (■), protein yield (○), protein content (□) and somatic cell count (*).

Figure 19. Héritabilité de la production laitière, des quantités et des taux de matières grasses et de protéines du lait et des comptages cellulaires du lait au cours des trois premières lactations, d'après Druet et al. (2005)

- **Corrélations génétiques.** On définit la corrélation génétique r entre deux caractères selon la relation suivante :

$$r = \frac{\sigma_{a12}}{\sqrt{\sigma_{a1}^2 \sigma_{a2}^2}}$$

où σ_{a12} est la covariance génétique additive entre les caractères 1, et 2, σ_{a1}^2 et σ_{a2}^2 la variance génétique additive des caractères 1 et 2, respectivement.

Il existe une corrélation génétique entre caractères lorsque, chez un même individu, la valeur génétique additive de l'un des caractères n'est pas statistiquement indépendante de celle de l'autre caractère. Connaître les corrélations génétiques est primordial dans le cadre de l'amélioration génétique afin d'évaluer les effets éventuels que pourrait avoir la sélection d'un caractère sur un autre caractère. La corrélation génétique entre deux caractères peut varier de -1 à 1. Lorsqu'elle est égale à

1, on considère que les deux caractères sont génétiquement identiques. Une valeur égale à 0 indique que les caractères sont génétiquement indépendants et que la sélection sur l'un n'affectera pas l'autre. Chez les bovins, par exemple, la production laitière est corrélée négativement aux taux butyreux (-0,07 à -0,70) et protéiques (-0,10 à -0,50), ces taux étant corrélés positivement entre eux (0,40 à 0,70) (Minvielle, 1990). Il en découle que la sélection des individus sur la quantité de lait produit se fera probablement au détriment des taux butyreux et protéiques.

ii. Détection de QTL

Le modèle infinitésimal, qui considère le génome comme une « boîte noire » a permis une amélioration génétique parfois spectaculaire des caractères quantitatifs chez les populations animales. Néanmoins, cette approche n'identifie pas les gènes responsables de la variabilité génétique de ces caractères, qui permettrait de sélectionner plus efficacement les individus sur la base de l'information moléculaire (Ytournal et al., 2008).

La recherche des régions génomiques responsables de la variation des gènes d'intérêt a débuté dès la fin des années 1980 avec la construction de cartes génétiques, et la recherche directe de gènes par approche gène candidat. Néanmoins, cette approche était limitée car la plupart des caractères quantitatifs, complexes, sont sous l'influence de nombreux gènes pour la plupart inconnus.

La deuxième approche a consisté à détecter des QTL, à partir de méthodes basées sur l'existence d'un déséquilibre de liaison entre des marqueurs moléculaires, permettant de baliser le génome, et des QTL. La détection de QTL est donc conditionnée à plusieurs prérequis : 1) à la fois les QTL et les marqueurs doivent être polymorphes, 2) le reproducteur doit être hétérozygote au marqueur et 3) les marqueurs et le QTL doivent être liés et en déséquilibre de liaison. Le développement des techniques de détection de QTL a été permis à partir des années 1990, grâce au développement de marqueurs moléculaires répartis sur l'ensemble du génome, les microsatellites. Cependant, ces marqueurs encore relativement peu nombreux sur le génome ne permettaient pas de capter facilement le déséquilibre de liaison. Aussi des protocoles de détection reposant sur l'utilisation de reproducteurs supposés double hétérozygotes aux marqueurs et au QTL (que l'on ne connaît pas) ont donc été mis en place. Ils sont basés 1) soit sur des analyses intra familles de reproducteurs ayant eu une grande descendance, nombreux en bovins, il s'agit alors d'analyser les performances des « filles » ou « petites-filles » pour des caractères mesurés classiquement en ferme, 2) soit sur des protocoles expérimentaux en croisement où l'on choisit de maximiser l'obtention de reproducteurs hétérozygotes en croisant deux races de caractéristiques zootechniques différentes, et de mesurer des caractères difficiles originaux, la détection se faisant sur les performances mesurées sur les individus de deuxième génération. Ce type de protocole a une puissance maximale en utilisant des lignées totalement consanguines comme

en populations végétales, ce qui n'est pas le cas dans les populations animales, où les allèles aux QTL et aux marqueurs ne sont pas totalement fixés intra-race (comme le cas idéal de la figure). De plus, la composante polygénique peut également varier d'un individu F1 à un autre. Pour être informatif, ce type de protocole nécessite donc de disposer de suffisamment de familles de grande taille. La détection de QTL réalisée est alors une **analyse de liaison (LA)**, intra-famille, qui repose sur l'observation de la transmission des gamètes parentaux de reproducteurs supposés hétérozygotes au QTL et au marqueur dans la descendance et permet de détecter les QTL *via* le calcul de la proportion de recombinaisons survenant entre les loci des marqueurs et des QTL estimées grâce aux variations de performance pour le caractère considéré.

A la fin des années 1990, de nouvelles méthodes de détection de QTL, dérivées de la recherche d'anomalies génétiques chez l'homme, ont vu le jour. Elles utilisent la dynamique d'évolution du déséquilibre de liaison au cours des générations : ce dernier diminue très vite au cours des générations entre deux loci éloignés et se maintient de manière prolongée entre deux loci proches. Dans une population fermée de grande taille avec des accouplements au hasard, un fort DL n'est donc observé entre un marqueur et un QTL que si le marqueur est très proche du QTL. Ce DL se traduit alors par une association préférentielle entre un allèle marqueur ou un haplotype d'allèles marqueurs avec le phénotype (Ytournal et al., 2008). Mais l'utilisation de ce DL nécessite un maillage très dense du génome par les marqueurs, ce qui n'a été possible qu'avec l'arrivée des SNP et la production de puces de génotypage de forte densité. La détection de QTL réalisée est alors une **analyse d'association (LD)**. Plusieurs stratégies ont été développées pour effectuer cette recherche, dont la plus simple consiste à estimer les effets de chaque marqueur indépendamment en établissant un modèle de régression en fonction des différents allèles présents au marqueur. De multiples marqueurs étant testés sur un même jeu de données, il est nécessaire de prendre en compte le fait que les tests ne soient pas indépendants en raison du déséquilibre de liaison pouvant exister entre les marqueurs. Plusieurs méthodes, dont celle proposée par Müller et al. (2011) permettent cette prise en compte. Les deux types de dispositifs expérimentaux de recherche de QTL sont présentés dans la **Figure 20**.

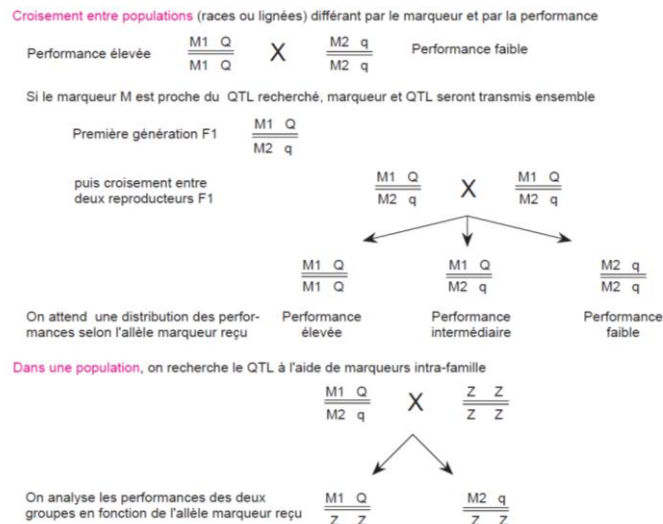


Figure 20. Dispositifs de recherche de QTL à l'aide de marqueurs. (Boichard et al., 1998)

En résumé, les études de liaison se focalisent sur la fréquence des recombinaisons survenant au sein d'une même famille lors d'un nombre limité de générations, tandis que l'analyse d'association utilise la fréquence de recombinaisons depuis la mutation originelle (donc sur un grand nombre de générations) au sein d'une population (Ott et al., 2011). Ces méthodologies différentes conditionnent des spécificités propres à chaque méthode. Les études de liaison permettent une puissance de détection élevée et sont robustes, mais donnent une localisation de QTL peu précise et dépendent du nombre de méioses observées dans le pedigree. Les études d'association permettent également une bonne puissance de détection, une localisation précise des QTL mais sont moins robustes, et sont mal adaptées aux grandes familles dans lesquelles existent un haut niveau de consanguinité (Ott et al., 2011).

La combinaison de ces deux méthodes, nommée **LDLA (Linkage Disequilibrium Likage Analysis)**, présente les avantages des deux méthodes et permet de localiser précisément les QTL tout en étant robuste à la stratification des populations. Les méthodes de LDLA sont toutefois pénalisées par un temps de calcul très élevé dû à l'utilisation des méthodes basées sur le BLUP pour estimer les composantes de la variance à partir de pedigrees complexes (nécessité d'inverser la matrice coefficient des équations des modèles mixtes pour chaque SNP inclus dans l'analyse). Des méthodes dites de pseudo-LDLA (nommées GRAMMA et FASTA) ont été développées pour permettre de réduire ces temps de calcul importants. La méthode FASTA, employée dans cette thèse, consiste à partitionner la résolution du modèle mixte en une partie commune pour tous les SNP, qui n'est résolue qu'une fois (équivalente à la résolution d'un modèle mixte sans SNP) et en une partie fonction de chaque SNP (Meyer and Tier, 2012).

1. Déterminisme génétique des réponses à trois semaines de monotraite et représentativité du premier intervalle de traite de 24 h

ESTIMATION OF GENETIC PARAMETERS FOR MILK PRODUCTION TRAITS IN RESPONSE TO A 3 WK- ONCE-DAILY MILKING PERIOD IN CROSSBRED HOLSTEIN × NORMANDE DAIRY COWS

INTRODUCTION

Reducing milking frequency by implementing once-daily milking (ODM) on dairy cows can be useful to dairy farmers to alleviate workload temporarily or even for the whole lactation. Despite these benefits on work management, ODM remains a marginal practice even in New-Zealand, where this practice is the most common, but where only 5% of dairy herds implemented ODM on the whole lactation (Stachowicz et al., 2014). In comparison, only 1% of dairy farms used ODM in the west part of France in 2006 (Michaud et al., 2007). The small use of ODM is mainly due to the substantial reduction in milk yield and to the associated changes in milk composition it entails. The implications associated with these changes in milk yield and composition are not the same whether ODM is implemented during the whole lactation or for shorter periods. In case ODM is implemented for the whole lactation, the breeder will be especially interested into maximizing the cows production level under the ODM constraint. In contrast, the breeder that will implement ODM for shorter periods during lactation will be interested in reducing the milk losses observed when cows are switched to ODM and in maximizing the milk yield recovery when resuming twice-daily milking (TDM). The first two traits (milk production level during ODM and milk yield losses when switching cows to ODM) have been shown to vary extensively both between breeds and between individuals (Clark et al., 2006a; Hickson et al., 2006; Phyn et al., 2010; Stelwagen et al., 2013; Guinard-Flament et al., 2011a), suggesting that these traits might be under a genetic determinism. Milk yield recovery when resuming TDM has been less extensively described, but, reviewing French ODM experiments, Rémond and Pomiès (2005) reported carry-over effects ranging from 2.4 to 8 % after 3 wk of ODM.

The genetic parameters for milk yield production level, milk composition and SCS in New-Zealand cows milked once-daily during the whole lactation have been recently estimated by Lembeye et al. (2016) and compared with those estimated in TDM on a population geographically close. Interestingly, these authors found that heritabilities of production traits were comparable between ODM and TDM populations although slightly lesser in ODM populations. However, although this study has shown that the extent of the genetic determinism for production traits is similar in ODM and TDM, the authors also pointed out the lowest phenotypic and genetic variances on ODM milk yield and composition traits. To date, no study focused on the genetic correlations between ODM and TDM milk production traits that would nonetheless be necessary to evaluate the need to develop an index distinct from the classic TDM index to select cows adapted to ODM. McPherson (2007) gave a first approximation by correlations between official estimated TDM breeding values and estimated ODM breeding values for production traits calculated on a sub-population, from cows in ODM throughout their lactation in New-Zealand. These correlations were high, ranging from 0.75 to 0.84 depending on trait and breed. They were high enough to allow the development of an ODM index from a predictive regression equation using estimated TDM breeding values. Nevertheless, they were not high enough high to suggest a complete common genetic determinism.

In contrast to milk production level during ODM, none evaluated the genetic determinism of cows responses (milk yield losses and recoveries) when switching cows to ODM and when resuming TDM presumably due to the large population size required for genetic studies.

Nevertheless, implementing a genetic selection either on milk production traits during ODM or on milk yield responses in case of ODM periods shorter than the whole lactation would only be profitable if this practice expands greatly (Stelwagen et al., 2013), that doesn't seem the trend neither in Europe

nor in New-Zealand. For farmers that use this practice, it would be interesting to have some easily measurable predictors of cows responses to ODM to overcome the issue of selecting animals adapted towards this practice. Two strategies can be considered to achieve this goal: determine if the traits routinely measured and available on the whole population (milk production and composition) are related to milk yield responses to ODM or finding a trait easily measurable by the breeder before the implementation of ODM. A single day of ODM might be a suitable candidate for this second type of indicator. Indeed, the most consistent and common pattern that has been reported when cows are switched to ODM is the reduction in milk yield occurring within the first day of ODM (Stelwagen et al., 2013), Moreover, Charton et al. (2016) recently showed that a 24-hour milking interval was associated with a wide individual variability in responses, suggesting the existence of a genetic determinism for these traits.

This study thus aimed to three objectives: 1) to estimate the heritabilities of milk yield and milk composition during a 3-wk ODM period and the genetic correlations between these traits measured during ODM and TDM, 2) to determine the genetic parameters of milk yield responses (*i.e.* milk yield loss when switching cows to ODM and milk yield recovery when switching them back to TDM), and 3) to determine whether milk yield composition during TDM or milk yield responses during the first day of ODM could be suitable predictors of cows milk yield responses to ODM.

MATERIALS AND METHODS

Experimental design

This study used 431 Holstein x Normande crossbred cows from the INRA experimental farm of Domaine expérimental du Pin (49°N, 0°W; Normandy, France) in compliance with the National Legislation on Animal Care (French Ministry of Agriculture certification No. B61-157-001). These cows are part of an INRA QTL detection program designed by crossing Holstein and Normande breeds (Larroque et al., 2002). The crossing of a dual-purpose breed (Normande) and a high milk productive breed (Holstein) was implemented to maximize the QTL detection power. More precisely, scheme is as follows: a first generation F1 was generated by crossing 5 Holstein males with 13 Normande females and 5 Normande males with 11 Holstein females. F2 generation was obtained by mating 10 F males with 70 F1 females and a complementary F3 generation was obtained by mating the 5 F1 males to F2 cows. The size of the families were maximized by using systematic embryo transfer and partly embryo sexing. Cows used in this study were respectively 292 and 139 of the F2 and F3 females produced from the QTL detection program. The study was performed during their second ($n = 417$) or their third ($n = 14$) lactation, at an average stage of lactation of 84 ± 12.9 DIM. No specific selection was performed neither on their milk production level nor on their belonging to certain families: cows available and with the same stage of lactation were used. One cow that was dried-off before the end of the experiment was suppressed. The 430 remaining cows were split into 22 cohorts over 8 years.

The experiment consisted of 3 successive periods: 1 control wk where cows were milked twice daily (cTDM), followed by a 3 wk period where cows were milked once-daily (3-wk ODM) to examine milk yield losses, and a 2 wk period where cows resumed twice-daily milking. Milk yield recovery was examined on second wk after resuming TDM (post twice-daily milk wk 2, pTDM2). The first day of ODM (ODM d1), corresponding to a single 24h milking interval, was also isolated to examine milk yield responses. When milked twice-daily, cows were milked at 7.30 a.m and 4.30 p.m., and when milked once-daily, cows were milked at 7.45 a.m.

Experiment was performed during winter period only, so that animals were kept indoors in deep litter housing with once-a-day mulching. Per-cow surface area was on average 7 m². Diet was distributed once daily at 0800 h and did not vary throughout the experiment to avoid any effect of feeding variation on milk yield. It was formulated according to the requirements of cows milked twice-daily (INRA and Agabriel, 2010). It consisted of corn silage offered ad libitum, grass silage (4 kg of DM/d), beet pulp (1 kg of DM/d) and soybean meal (2 kg of DM/d). Cows received 1 kg of energy concentrate

for each 2.5 kg/d of milk produced above 21 kg/d during control wk (cTDM), with a maximum of 7 kg/d of energy concentrate.

Data

Traits studied in the present trial were 8 production traits (milk yield, milk fat, protein and lactose yields, milk fat, protein and lactose contents, and somatic cell scores (SCS)) measured during pTDM, ODM d1, 3-wk ODM, and pTDM2 experimental periods and 6 traits related to milk yield responses to ODM: milk yield loss when switching cows to ODM d1 and 3-wk ODM expressed either in kg/d or in %, and milk yield recovery (in kg/d) and milk yield recovery:loss ratio (in %) when switching cows back to TDM. Milk yield was recorded in the milking parlor (Boumatic-2050®) at each milking throughout the experiment. Milk samples for milk composition (fat, protein, and lactose contents and SCC) were collected 2 d/wk during TDM periods and 4 d/wk throughout ODM period. Milk samples were stored at 4°C until analyses that were performed at the Normandy Interprofessional Milk Analysis Laboratory (LILANO, Saint-Lô, France). Milk fat, protein, and lactose contents were determined by infrared analysis (MilkoScan FT600, Foss, Hillerød, Denmark) and SCC with a Fossomatic cell counter (Foss, Hillerød, Denmark).

Calculations

Daily milk yield and composition were averaged over 1 wk (cTDM and pTDM2) or 3 wk (ODM). SCC was converted into somatic cell score (SCS) using the formula $SCS = \log_2 (SCC / 100,000) + 3$, where SCC is expressed in units of 1000 cells/mL (Rupp and Boichard, 1997).

Milk yield loss (in kg/d) was computed as the difference between ODM and cTDM milk yields. Relative milk yield loss (in %) was milk yield loss (kg/d) divided by cTDM milk yield, multiplied by 100. For ODM d1, milk yield loss (kg/d) and relative milk yield loss (%) were computed similarly, but replacing 3-wk ODM production by ODM d1 production. Milk yield recovery (kg/d) was computed as the difference between pTDM2 and 3-wk ODM. Milk recovery:loss ratio (%) was computed as milk yield recovery (kg/d) divided by milk yield loss (kg/d), multiplied by 100.

Genotypes

Genotypes were carried out with DNA extracted from blood samples. A total of 554 cows, including the cows used in the experiment, their respective parents and grand-parents, were genotyped. Among the 430 cows used in the experiment, a total of 364 cows were genotyped with the Illumina BovineSNP50 BeadChip (Illumina Inc., San Diego, CA), either at the Centre National de Génotypage (CNG, Evry, France, n=115 cows) or at Labogena (Jouy-en-Josas, France, n=249). A small group of 65 cows were genotyped using the Illumina BovineLD (10k) BeadChip at Labogena. The parents of the cows used in the experiment were genotyped with the Illumina BovineSNP50 BeadChip at the CNG. Quality control applied to SNP mapped to the 29 autosomes included elimination of animals with a call rate <95%, markers with a call frequency <90%, with a minor allele frequency <5% or genotype frequencies deviating from the Hardy-Weinberg equilibrium ($P < 1. E-4$). Genotypes on the Illumina BovineLD BeadChip and imputed to the Illumina BovineSNP50 using the software FImpute were also checked for rate of maximum change in original genotypes in order to detect progeny-parent conflict. Among the 430 cows included in the experiment, 2 weren't genotyped, 4 genotypes were damaged and 2 genotypes with pedigree conflicts were deleted. Finally, 43,801 SNP available on 554 individuals (422 cows included in the experiment and 132 parents) were kept for QTL detection.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using R software (RCore Team, The R Foundation for Statistical Computing, 2014, R: A Language and Environment for Statistical Computing, Version 3.0.2, Vienna, Austria, <http://www.R-project.org>). Results for fixed effects in models were expressed as least-squares means and computed using the lsmeans package (Lenth, 2014). Differences were considered significant at $P < 0.05$. Phenotypic **coefficient of variation (CV)** of a trait was computed as the standard deviation divided by the mean.

The effects of the experimental period (cTDM, ODM d1, 3-wk ODM and pTDM2) on milk production traits were analysed using a mixed model (1) as follows:

$$Y_{ijklm} = \mu + \text{period}_i + \text{stage of lactation}_j + \text{age at first calving}_k + \text{cohort}_l + \text{cow}_m + \varepsilon_{ijklm}$$

where Y_{ijklm} is dependent variable and μ is the mean, the fixed effects tested are period i (cTDM, ODM, pTDM1, pTDM2), the covariable stage of lactation j (31 to 138 DIM), the age at first calving k (2 classes: 24 and 36 months), and the cohort effect l (22 classes), random effect of the cow (assumed to be normally distributed) is m and ε_{ijklm} is the residual error associated with each $ijklm$ observation.

Estimation of genetic parameters

Genetic parameters were estimated using restricted maximum likelihood (REML) procedure implemented in the AIREMLF90 Software (Misztal et al., 2002; Misztal, 2008), using both pedigree and genotypic informations. Pedigree included 1565 animals distributed over 13 generations and the 422 genotyped animals were distributed in 114 families, including from 1 to 16 daughters. Single trait animal model used for the estimation of heritability was represented as follows:

$$\mathbf{y} = \mathbf{Xb} + \mathbf{Za} + \mathbf{e}$$

Where \mathbf{y} is the vector of observations and \mathbf{X} is the incidence matrix relating fixed effects (\mathbf{b}) to the individuals. The fixed effects considered for each trait were the cohort (22 classes), the age at first calving (2 classes) and the stage of lactation as covariate. \mathbf{Z} is a design matrix allocating observations to the vector of genomic breeding values (\mathbf{a}) and \mathbf{e} is a vector of random normal errors ($N(\mathbf{0}, \sigma_e^2 \mathbf{I}_v)$). Genomic breeding values \mathbf{a} were normally distributed with $\mathbf{Var}(\mathbf{a}) = \mathbf{H}\sigma_a^2$, where \mathbf{H} is the genetic relationship matrix combining SNP marker information and pedigree implemented as in Legarra et al. (2009).

Heritability (h^2) of a trait was calculated as $h^2 = \sigma_a^2 / (\sigma_a^2 + \sigma_e^2)$. Genetic correlations were estimated two by two using a bivariate animal mixed model as follows:

$$\begin{bmatrix} \mathbf{y}_1 \\ \mathbf{y}_2 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mathbf{X}_1 & \mathbf{0} \\ \mathbf{0} & \mathbf{X}_2 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \mathbf{b}_1 \\ \mathbf{b}_2 \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} \mathbf{Z}_1 & \mathbf{0} \\ \mathbf{0} & \mathbf{Z}_2 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \mathbf{a}_1 \\ \mathbf{a}_2 \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} \mathbf{e}_1 \\ \mathbf{e}_2 \end{bmatrix}$$

Where \mathbf{y}_1 and \mathbf{y}_2 are vectors of observations of traits one and two respectively, and \mathbf{X}_1 and \mathbf{X}_2 are incidence matrices relating each observation to fixed effects as defined in the univariate model. \mathbf{a}_1 and \mathbf{a}_2 are the vectors of random animals breeding values, with \mathbf{Z}_1 and \mathbf{Z}_2 the associated incidence matrices. \mathbf{e}_1 and \mathbf{e}_2 are the vectors of random residuals. The random effects are assumed to follow a normal distribution and feature the following variance-covariance structure.

$$\mathbf{var} \begin{bmatrix} \mathbf{a}_1 \\ \mathbf{a}_2 \\ \mathbf{e}_1 \\ \mathbf{e}_2 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mathbf{H}\sigma_{a1}^2 & \mathbf{H}\sigma_{a12} & \mathbf{0} & \mathbf{0} \\ \mathbf{H}\sigma_{a12} & \mathbf{H}\sigma_{a2}^2 & \mathbf{0} & \mathbf{0} \\ \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{I}\sigma_{e1}^2 & \mathbf{I}\sigma_{e12} \\ \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{I}\sigma_{e12} & \mathbf{I}\sigma_{e2}^2 \end{bmatrix}$$

where σ_{a1}^2 is the genetic variance for trait 1, σ_{a2}^2 is the genetic variance for trait 2 and σ_{a12} is the genetic covariance between traits 1 and 2, σ_{e1}^2 is the residual variance for trait 1, σ_{e2}^2 is the residual variance for trait 2 and σ_{e12} is the residual covariance between traits 1 and 2. \mathbf{H} is the genetic relationship matrix combining SNP marker information and pedigree and \mathbf{I} is an identity matrix. Genetic

$$r_g = \frac{\sigma_{a12}}{\sqrt{\sigma_{a1}^2} \times \sqrt{\sigma_{a2}^2}}$$

correlation r_g was estimated as $\frac{\sigma_{a12}}{\sqrt{\sigma_{a1}^2} \times \sqrt{\sigma_{a2}^2}}$. Confidence intervals for heritability and genetic correlations were computed by the AIREMLF90 software. Genetic coefficient of variation (CVg) of a trait was computed as the genetic standard deviation divided by the mean.

RESULTS

Effect of ODM on milk yield and composition traits. Table 1 shows the summary statistics of the variables analyzed. Implementing ODM for 3 wk reduced milk yield on average by 7.7 kg/d (*i.e.*, 27.5%) (Table 1). It decreased also milk solids (fat, protein, and lactose) yields as well as milk lactose content whereas milk fat and protein contents and SCS were increased. Most of the changes in milk yield and composition were already observed on d1 of ODM. These variations ranged similarly to those of the 3-wk ODM (Table 2), excepted for milk protein content and milk SCS (with lower values on d1 compared to 3-wk ODM) and for milk lactose content that was more reduced on d1 of ODM than on the 3-wk ODM.

When resuming TDM, milk yield recovery averaged 3.9 kg/d and cows recovered on average only 57% of the milk they lost. Milk solids yields also increased when resuming TDM, but not enough to resume their initial cTDM level. Because of no-proportional variations in milk yield and milk solids yields, different variations in milk composition were observed: fat content remained higher than its initial concentration, lactose content remained lower than its initial level, and milk protein content continued to increase compared to ODM. Milk SCS was slightly decreased 2 wk after resuming TDM.

Table 1. Mean and standard deviations of milk yield and composition and milk yield variations when switching cows from control twice-daily milking period (cTDM) to once-daily milking (d1 and 3-wk, ODM d1 and 3-wk ODM, respectively) and switching them back to twice-daily milking (pTDM2, 2nd wk after resuming TDM). Within brackets are indicated the number of observations.

	cTDM	ODM d1	3-wk ODM	pTDM2	n
Milk yield, kg/d	27.8 ± 5.56	20.1 ± 4.46	20.1 ± 4.22	24.0 ± 4.99	430
Milk fat content, g/kg	43.3 ± 5.95	48.3 ± 12.16	48.4 ± 7.33	44.6 ± 6.78	430
Milk fat yield, g/d	1189 ± 228.6	955 ± 256.6	958 ± 183.9	1068 ± 243.2	430
Milk protein content, g/kg	31.6 ± 2.35	31.7 ± 2.61	32.3 ± 2.34	33.5 ± 2.58	430
Milk protein yield, g/d	872 ± 168.4	635 ± 144.7	648 ± 135.5	806 ± 168.4	430
Milk lactose content, g/kg	49.2 ± 2.03	46.7 ± 2.73	47.0 ± 2.32	48.2 ± 2.39	430
Milk lactose yield, g/d	1359 ± 288.3	939 ± 219.8	948 ± 214.1	1166 ± 263.4	430
Milk SCS, units	2.44 ± 1.770	3.06 ± 1.75	3.46 ± 2.006	3.18 ± 1.714	430
Milk yield loss¹, kg/d		-7.7 ± 3.53	-7.7 ± 2.82		
		(428)	(430)		
Milk yield loss², %		-27.3 ± 11.21	-27.5 ± 7.64		
		(428)	(430)		
Milk yield recovery³, kg/d				3.9 ± 2.54	
				(430)	
Milk recovery:loss ratio⁴, %				57 ± 43.1	
				(430)	

¹ Difference between 3-wk or d1 ODM and cTDM milk yields.

² Difference between 3-wk or d1 ODM and cTDM milk yields divided by cTDM milk yield (× 100).

³ Difference between 3-wk ODM and pTDM2 milk yields.

⁴ Difference between 3-wk ODM and pTDM2 milk yields divided by difference between cTDM and 3-wk ODM milk yields (× 100).

Table 2. Least square means (and associated standard error of the mean, SEM) of experimental period control twice-daily milking period (cTDM), once-daily milking (d1 and 3-wk, ODM d1 and 3-wk ODM, respectively) and post twice daily milking (pTDM2, 2nd wk after resuming TDM) on milk yield and composition traits.

	cTDM	ODM d1	3-wk ODM	pTDM2	SEM ¹
Milk yield, kg/d	27.8 ^a	20.1 ^c	20.1 ^c	24.0 ^b	0.21
Milk fat content, g/kg	43.4 ^c	48.4 ^a	48.4 ^a	44.6 ^b	0.40
Milk fat yield, g/d	1192.0 ^a	960.8 ^c	957.1 ^c	1070.7 ^b	9.21
Milk protein content, g/kg	31.6 ^c	31.7 ^c	32.3 ^b	33.5 ^a	0.11
Milk protein yield, g/d	873.3 ^a	637.1 ^c	649.2 ^c	807.3 ^b	6.92
Milk lactose content, g/kg	49.2 ^a	46.7 ^d	47.0 ^c	48.2 ^b	0.10
Milk lactose yield, g/d	1360.0 ^a	939.5 ^c	949.4 ^c	1167.3 ^b	10.82
Milk SCS, units	2.45 ^c	3.10 ^b	3.48 ^a	3.20 ^b	0.07

¹ standard error of the mean

^{a-d} Within each row, values with different superscripts letters differ significantly ($p < 0.05$).

Traits variability. Control TDM yields (milk, fat, protein, and lactose) showed extensive variations (CV=around 20% for all these criteria), whereas milk composition, especially lactose and protein contents, was less variable (CV = 5 %, 7 % and 13 %, for milk lactose, protein, and fat contents, respectively) (Table 1). With a CV of 70%, milk SCS was the most variable milk composition parameter. Data variability during 3-wk ODM and pTDM2 periods was almost identical to that of cTDM period and was slightly higher on ODM d1, especially for milk fat content with a CV increased by 12% compared to cTDM.

There was a marked variability in milk yield responses (CV > 27.8 %; Table 1). 3-wk ODM milk yield losses CV (kg/d and %) were lower than ODM d1 losses CV (36.6 and 27.8 % for 3-wk ODM *versus* 45.8 and 41.1 % for ODM d1, respectively). Very high between-cow variabilities were observed on milk yield recovery (CV = 65.1 %) and milk recovery:loss ratio (CV = 75.4 %).

Estimation of genetic parameters

Heritability of milk yield and milk composition traits across experimental periods. Additive genetic variances seemed slightly lower during ODM than TDM periods for milk yield and milk lactose content, but slightly higher during ODM than TDM periods for milk fat and protein contents (Table 3). Milk SCS additive variances varied widely between experimental periods, but didn't seem to follow any specific pattern in response to ODM. Genetic coefficients of variation (CV_g) also remained stable across experimental periods and varied between 7.5 and 12.5 % for milk yield and milk fat content). It was lower for milk protein content and especially milk lactose content (<3.1 % for milk lactose content) and high for milk SCS(between 13.6 and 29.5 %).

Milk yield was a trait of moderate heritability: values ranged from 0.40 to 0.45 during TDM periods (cTDM and pTDM2; Table 3) and were slightly lower during d1 of ODM and during the 3-wk ODM (0.34 and 0.33, respectively). Milk fat and protein contents were traits of high heritability. Estimates of milk fat content heritability were lower during ODM (0.61) and especially ODM d1 (0.32) compared to TDM periods (0.66 and 0.68 for cTDM and pTDM2, respectively). On the opposite, heritability of milk protein content was maximum during 3-wk ODM and ODM d1 (0.80 and 0.75, respectively) compared to TDM periods. Milk lactose content was a trait of moderate to high heritability that was the highest during cTDM (0.66), instead of 0.25 during ODM d1 and 0.33 during ODM. Its heritability did not return to its cTDM value when switching back to TDM. Milk SCS heritability was low and decreased over experimental periods from 0.17 on cTDM to 0.07 on TDM2. **Correlations of milk yield and milk composition traits across experimental periods.** Overall, phenotypic correlations for each trait measured throughout experimental periods were close and above 0.85 for milk yield, 0.60 for milk fat, protein, and lactose contents (Table 4). There was a lower correlation for milk SCS during experimental periods, with a minimum (0.54) observed between cTDM and pTDM2 periods.

Table 3. Estimates of genetic variance (σ_a^2), coefficient of genetic variation (CV_g) and heritability (h^2) for milk yield and composition during control twice-daily milking period (cTDM), d1 and 3-wk of once daily milking (ODM d1 and 3-wk ODM, respectively) and second wk after resuming twice-daily milking (pTDM2) with their respective standard errors of the mean (n=422).

	cTDM			ODM d1			3-wk ODM			pTDM2		
	σ_a^2	CV_g	h^2	σ_a^2	CV_g	h^2	σ_a^2	CV_g	h^2	σ_a^2	CV_g	h^2
Milk yield, kg/d	9.9691	11.36	0.40 ±0.006	6.1465	12.33	0.34 ±0.006	5.2966	11.45	0.33 ±0.006	10.019	13.19	0.45 ±0.006
Milk fat content, g/kg	20.975	10.58	0.66 ±0.005	45.513	13.97	0.32 ±0.005	30.633	11.44	0.61 ±0.005	27.709	11.80	0.68 ±0.005
Milk protein content, g/kg	2.8877	5.38	0.59 ±0.005	4.2478	6.50	0.75 ±0.005	4.0676	6.24	0.80 ±0.004	3.1710	5.32	0.61 ±0.005
Milk lactose content, g/kg	2.3076	3.09	0.66 ±0.005	1.3684	2.50	0.25 ±0.006	1.3858	2.50	0.33 ±0.006	1.8286	2.81	0.37 ±0.006
Milk SCS, units	0.51757	29.48	0.17 ±0.004	0.28725	17.51	0.09 ±0.003	0.43901	19.15	0.11 ±0.004	0.18600	13.56	0.07 ±0.005

Phenotypic TDMs/ODM correlations (*i.e.*, cTDM/ODM and ODM/TDM2) were generally in the same range and slightly higher than cTDM/pTDM2 correlations excepted for milk fat content where cTDM/pTDM2 correlation was higher than the TDMs/ODM correlation. Within-trait genetic correlations throughout experimental periods were higher than phenotypic correlations. They all exceeded 0.80 (Table 4). Compared to phenotypic correlations, the opposite tendency was found as the genetic correlations between TDM periods (cTDM/pTDM2) were higher than between TDM and ODM periods (TDMs/ODM correlations) excepted for milk lactose content and milk SCS.

Table 4. Phenotypic and genetic correlations of each trait measured between control twice-daily milking and 3-wk once-daily milking (cTDM/ODM), between 3-wk ODM and wk 2 after resuming twice-daily milking (pTDM2; ODM/pTDM2) and between cTDM and pTDM2 (cTDM/pTDM2); Pearson correlations ± SEM for phenotypic correlations.

	cTDM/ODM	ODM/pTDM2	cTDM/pTDM2
Phenotypic correlations			
Milk yield, kg/d	0.87 ± 0.024	0.86 ± 0.025	0.87 ± 0.024
Milk fat content, g/kg	0.67 ± 0.036	0.63 ± 0.037	0.70 ± 0.035
Milk protein content, g/kg	0.86 ± 0.025	0.78 ± 0.030	0.60 ± 0.036
Milk lactose content, g/kg	0.76 ± 0.031	0.70 ± 0.034	0.69 ± 0.035
Milk SCS, units	0.75 ± 0.032	0.62 ± 0.038	0.54 ± 0.041
Genetic correlations			
Milk yield, kg/d	0.87 ± 0.009	0.81 ± 0.008	0.95 ± 0.005
Milk fat content, g/kg	0.84 ± 0.004	0.84 ± 0.004	0.97 ± 0.002
Milk protein content, g/kg	1.00 ± 0.000	0.99 ± 0.001	0.0 ± 0.0
Milk lactose content, g/kg	0.92 ± 0.005	1.00 ± 0.003	0.97 ± 0.004
Milk SCS, units	0.94 ± 0.035	1.00 ± 0.029	0.89 ± 0.042

Heritability of milk yield responses traits to the 3 wk ODM periods. Genetic variances of milk yield responses varied between 2.48 for milk yield loss (kg/d) estimated on 3-wk ODM and 54.48 for milk yield recovery:loss ratio (%) (Table 5). Genetic coefficients associated with these responses varied between 12.95 % for milk recovery:loss ratio (%) and 48.73 for milk yield recovery (kg/d). Heritabilities of milk yield loss observed when switching cows to ODM (0.38 and 0.32 for milk yield loss in kg/d and in %, respectively) and milk yield losses observed on ODM d1 (0.39 and 0.34 for milk yield loss in kg/d and in %, respectively) were moderate and similar to milk yield heritabilities (Table 5). Milk yield recovery (kg/d) was a trait of high heritability (0.63). Although milk loss and recovery traits were found heritable, the milk yield recovery:loss ratio wasn't found heritable.

Table 5. Estimates of genetic variance (σ_a^2), coefficient of genetic variation (CV_g) and heritability (h^2) (± SEM) for milk yield loss in kg/d and % when switching cows from twice-daily milking control period (cTDM) to once-daily milking (d1 and 3-wk, ODM d1 and 3-wk ODM, respectively) and for milk recovery and milk recovery:loss ratio when switching cows back to twice daily milking (pTDM2, second wk after resuming TDM).

	σ_a^2	CV_g	h^2
3-wk ODM loss ¹ , kg/d	2.48	20.44	0.38 ± 0.006
3-wk ODM loss ² , %	17.75	15.32	0.32 ± 0.005
ODM d1 loss ¹ , kg/d	4.14	26.43	0.39 ± 0.006
ODM d1 loss ² , %	40.35	23.27	0.34 ± 0.006
Milk recovery ³ , kg/d	3.61	48.73	0.63 ± 0.003
Recovery:loss ratio ⁴ , %	54.48	12.95	0.04 ± 0.005

¹ Difference between 3-wk or d1 ODM and cTDM milk yields.

² Difference between 3-wk or d1 ODM and cTDM milk yields divided by cTDM milk yield (× 100).

³ Difference between 3-wk ODM and pTDM2 milk yields.

⁴ Difference between 3-wk ODM and pTDM2 milk yields divided by difference between cTDM and 3-wk ODM milk yields (× 100).

Correlations of milk yield responses traits. Genetic correlations between milk yield responses traits were generally in the same range but higher than phenotypic correlations (Table 6). Milk yield losses in kg/d and in % were highly and positively correlated (0.84 phenotypically and 0.89 genetically). Milk yield recovery when resuming TDM was negatively correlated with milk yield losses in kg/d and in % (genetic correlation of -0.84 and -0.78, respectively). Milk recovery:loss ratio was less correlated with other milk yield responses traits, excepted with milk yield recovery (kg/d): 0.51 phenotypically and 0.84 genetically. It was negatively correlated with milk yield losses in kg/d and in %).

Table 6. Estimates of genetic (above the diagonal) and phenotypic (below the diagonal) correlations (with their standard error of the mean) for milk yield responses traits when switching cows from control twice-daily milking period (cTDM) to 3-wk once-daily milking (ODM) and switching them back to twice-daily milking (2nd wk after resuming twice-daily milking, pTDM2).

Milk yield	Loss	Loss	Recovery	Recovery:loss ratio
	kg/d	%	kg/d	kg/d
Loss ¹ , kg/d		0.89 ± 0.010	-0.84 ± 0.005	-0.23 ± 0.059
Loss ² , %	0.84 ± 0.027		-0.78 ± 0.006	-0.33 ± 0.041
Recovery ³ , kg/d	-0.49 ± 0.042	-0.44 ± 0.044		0.84 ± 0.032
Recovery:loss ratio ⁴ , %	0.25 ± 0.048	0.22 ± 0.048	0.51 ± 0.043	

¹ Difference between 3-wk ODM and cTDM milk yields.

² Difference between 3-wk ODM and cTDM milk yields divided by cTDM milk yield (× 100).

³ Difference between 3-wk ODM and pTDM2 milk yields.

⁴ Difference between 3-wk ODM and pTDM2 milk yields divided by difference between cTDM and 3-wk ODM milk yields (× 100).

Predictors of milk yield level during ODM and of milk yield responses to ODM

Table 7. Estimates of phenotypic and genetic correlations ± standard error of the mean (SEM) between milk yield and composition during control twice-daily milking period (cTDM) and between cTDM milk yield and milk yield responses to once-daily milking (ODM).

Milk yield	Control twice-daily-milking period				
	Fat content	Protein content	Lactose content	SCS	
	g/kg	g/kg	g/kg	units	
Phenotypic correlations					
cTDM milk yield, kg/d	-	-0.41 ± 0.044	-0.32 ± 0.046	0.18 ± 0.048	-0.16 ± 0.048
3-wk ODM Loss ¹ , kg/d	-0.67 ± 0.036	0.38 ± 0.045	0.39 ± 0.045	0.01 ± 0.048 ^{ns}	-0.06 ± 0.048 ^{ns}
3-wk ODM Loss ² , %	-0.18 ± 0.048	0.22 ± 0.047	0.29 ± 0.046	0.13 ± 0.48	-0.18 ± 0.048
Milk recovery ³ , kg/d	0.27 ± 0.047	-0.16 ± 0.048	-0.30 ± 0.046	-0.15 ± 0.048	0.11 ± 0.048
Recovery:loss ratio ⁴ , %	-0.25 ± 0.048	0.13 ± 0.049	-0.05 ± 0.049 ^{ns}	-0.16 ± 0.49	0.09 ± 0.049 ^{ns}
Genetic correlations					
cTDM milk yield, kg/d	-	-0.78 ± 0.007	-0.43 ± 0.011	0.15 ± 0.011	-0.08 ± 0.045
3-wk ODM Loss ¹ , kg/d	-0.69 ± 0.010	0.67 ± 0.010	0.68 ± 0.038	-0.42 ± 0.011	-0.35 ± 0.022
3-wk ODM Loss ² , %	-0.28 ± 0.016	0.30 ± 0.012	0.67 ± 0.011	0.10 ± 0.012	-0.19 ± 0.022
Milk recovery ³ , kg/d	0.57 ± 0.009	-0.45 ± 0.008	-0.53 ± 0.007	0.06 ± 0.008	0.36 ± 0.029
Recovery:loss ratio ⁴ , %	-0.38 ± 0.043	0.17 ± 0.066	0.25 ± 0.032	-0.23 ± 0.038	0.51 ± 0.047

¹ Difference between 3-wk ODM and cTDM milk yields.

² Difference between 3-wk ODM and cTDM milk yields divided by cTDM milk yield (× 100).

³ Difference between 3-wk ODM and pTDM2 milk yields.

⁴ Difference between 3-wk ODM and pTDM2 milk yields divided by difference between cTDM and 3-wk ODM milk yields (× 100).

Initial level of milk yield and milk composition traits. Phenotypic and genetic correlations between cTDM values of milk yield or milk composition and milk yield responses to ODM showed similar patterns (Table 7). Initial milk yield and milk yield recovery when resuming TDM are phenotypically

negatively correlated with milk protein (-0.32 with milk cTDM and -0.30 with milk recovery in kg/d) and fat contents (-0.41 with milk cTDM and -0.16 with milk recovery in kg/d). These correlations are the exact opposite for absolute milk yield losses (kg/d) (0.38 with milk fat content and 0.39 for milk protein content, respectively) and although less significant, show similar trends for relative milk yield loss when switching to ODM (%) (0.22 with milk fat content and 0.29 for milk protein content, respectively). Milk lactose content and milk SCS were generally less correlated with milk yield responses, but milk lactose content was genetically negatively (-0.43) correlated with absolute milk yield losses (kg/d).

The first day of ODM. Both from a phenotypic and a genetic point of view, milk yield and composition during ODM d1 were highly and positively correlated with their values during both cTDM and 3-wk ODM (Table 8). Correlations were higher with 3-wk ODM traits than with cTDM traits, excepted phenotypic correlation for milk SCS and genetic correlation for milk lactose contents. Phenotypic correlations between ODM d1 and 3-wk ODM traits were above 0.80 for milk yield and milk protein content, but were lower for milk fat and lactose contents and milk SCS. Genetic correlations between ODM d1 and cTDM traits were lower than 0.80 for milk yield and milk fat content. Genetic correlation between ODM d1 and cTDM protein content couldn't be estimated by the software. Those between ODM d1 and 3-wk ODM were all above 0.96, excepted for milk lactose content. Milk lactose content during ODM d1 was not strongly (0.37) genetically correlated with its 3-wk ODM values.

Milk yield loss (kg/d and %) during ODM d1 and milk yield losses during 3-wk ODM were positively correlated, both from a phenotypic and genetic point of view, their respective genetic correlation being as high as 1.00 (Table 9).

Table 8. Phenotypic and genetic correlations \pm standard error of the mean (SEM) between milk yield and composition during d1 of once-daily milking (ODM d1) and milk yield and composition during control twice-daily milking period (cTDM) or 3-wk once-daily milking (3-wk ODM).

	Phenotypic		Genetic	
	cTDM	3-wk ODM	cTDM	3-wk ODM
ODM d1				
Milk yield, kg/d	0.77 \pm 0.031	0.86 \pm 0.025	0.77 \pm 0.010	1.00 \pm NC
Milk fat content, g/kg	0.45 \pm 0.044	0.69 \pm 0.035	0.72 \pm 0.008	0.96 \pm 0.004
Milk protein content, g/kg	0.84 \pm 0.026	0.91 \pm 0.021	NA	0.99 \pm 0.000
Milk lactose content, g/kg	0.62 \pm 0.038	0.76 \pm 0.032	0.56 \pm 0.032	0.37 \pm 0.042
Milk SCS, units	0.72 \pm 0.034	0.68 \pm 0.036	0.58 \pm 0.041	0.69 \pm 0.078

Table 9. Phenotypic and genetic correlations \pm standard error of the mean between d1 of once-daily milking (ODM d1) and 3-wk ODM absolute milk yield losses (kg/d) and between ODM d1 and 3-wk ODM relative milk yield losses (%).

	Phenotypic	Genetic
Loss, kg/d¹	0.76 \pm 0.032	1.00 \pm 0.003
Relative loss², %	0.62 \pm 0.038	1.00 \pm 0.003

¹ Difference between 3-wk ODM and cTDM milk yields.

² Difference between 3-wk ODM and cTDM milk yields divided by cTDM milk yield ($\times 100$).

DISCUSSION

The effects of 3-wk ODM on milk yield and composition observed here on crossbred Holstein x Normande cows are consistent with results previously reported in case of short term (< 1 month) ODM on various cow breeds (Carruthers et al., 1993a; Rémond and Pomiès, 2005; Phyn et al., 2010). Similarly, the milk yield losses reported in the present study are in agreement with those reported in earlier

studies (Stelwagen and Knight, 1997; Rémond et al., 1999, 2002a). Carry-over effects occurring when resuming twice-daily milking have been less described in the literature but the average residual milk yield loss (Table 1: $27.8-24=3.8$ kg/d) observed in the present study was higher than the 1.8 to 0.3 kg/d residual milk yield loss reported by Rémond and Pomiès (2005) with a 3-wk ODM period, but part of the residual effects observed in our study might also originate from the decline in milk yield observed in the course of lactation.

Genetic parameters of milk yield and composition during TDM and 3-wk ODM periods

Because of the small number of observations ($n=422$), the estimation of genetic parameters was performed by taking into account both pedigree and genomic information. Including molecular information allows identifying more precisely the number of alleles actually shared by individuals. Combining pedigree and genomic information provides a more detailed estimate of the relatedness between individuals, which, in turns, results in an increased accuracy in the predicted estimates (Assenza, 2014).

Milk yield heritability during cTDM in the present study (0.40) was high but within the range reported in the literature (0.22 to 0.44) (Miglior et al., 2007; Stoop et al., 2007; Sneddon et al., 2015; Lembeye et al., 2016; for studies on test day models). Milk fat and protein contents were in the upper range of heritabilities reported by the previously cited authors, but milk lactose content heritability (0.66) was higher than values (0.25 to 0.64) reported by Welper and Freeman (1992), Miglior et al. (2007), Stoop et al. (2007) and Sneddon et al. (2015). In accordance with literature, milk SCS heritability (0.17) was lower than heritabilities reported for the milk yield and composition traits. When considering pTDM2 period, heritabilities were consistent with cTDM heritabilities for all traits excepted for milk lactose content. A slight increase in heritability during pTDM2 period was observed for milk yield, and milk fat and protein contents (+0.5, +0.2 and +0.2 unit) compared to cTDM. This might be an effect of stage of lactation, as heritabilities are known to vary along stage of lactation, with heritabilities for the traits studied being higher at around 120 DIM (pTDM2) than 84 DIM (average stage of lactation at cTDM) (Druet et al., 2005). The rather high heritabilities observed during TDM periods found in this experiment might partly result from 3 origins. First, the controlled environment in which this study was performed, second, the fact that the experiment was implemented at a stage of lactation where heritability reaches a maximum for most of these traits and third, the use of crossbred animals from different purpose breeds (the Normande breed being a dual-purpose breed and the Holstein cows being high milk yielding cows) might have generated a wide genetic variability.

Description of genetic parameters for milk yield and composition traits during ODM are scarce in the literature as they have to our knowledge only been described once by Lembeye et al. (2016) on New-Zealand dairy cows milked once-daily for the whole lactation. Despite different durations of ODM implementation (3-wk *versus* whole lactation) and breeds (Holstein x Normande cows *versus* Friesian, Jersey and Friesian x Jersey cows), similar range of heritabilities between ODM and TDM were observed in both their study and ours. Small variations in milk composition traits heritability (fat, protein and lactose content) were nevertheless observed between TDM and 3-wk ODM in the present study. The heritability of milk protein content was increased by +0.2 units, during ODM only (d1 and 3-wk ODM). In contrast, the heritability of milk lactose content was decreased on ODM by at least +0.3 units and this lower value was still observed on pTDM2 (0.37 *versus* 0.66 for pTDM2 and cTDM, respectively). This might indicate that ODM is a practice that can modify heritability of milk composition traits either reversibly (protein content) or irreversibly (lactose content). The increase in milk protein content heritability remains unclear. The decrease in heritability of milk lactose content could be related to the increase in lactose concentrations measured in blood plasma arising from the increased permeability of mammary epithelium during ODM, the highest elevations being noticed on d1 of ODM (Guinard-Flament et al., 2011). Despite lactose concentrations in blood plasma return to initial values after resuming TDM (Guinard-Flament et al., 2011), the heritability of milk lactose content remained low although cows were no more milked once a day. However, as lactose heritability values were reported to vary extensively in the literature, this reduced lactose heritability observed after

resuming TDM does not necessarily originate from the perturbation triggered by ODM (Welper and Freeman, 1992; Miglior et al., 2007; Stoop et al., 2007; Sneddon et al., 2015).

Milk fat content heritability remained in the same range throughout the experimental periods except on d1 where it was almost half of its 3-wk ODM value (0.32 versus 0.61, respectively). This might indicate that milk fat synthesis is substantially affected during ODM d1. Milk fat content was increased in response to ODM, by +5 g/kg compared to cTDM. Means were similar between d1 and 3-wk ODM but their standard deviation was larger for d1 compared to 3-wk ODM (48.3 ± 12.16 versus 48.4 ± 7.33 g/kg). This higher variability of milk fat content on d1 could result from different determinisms between individuals to sustain the quantity of energy exported in milk by reducing more or less the milk fat yield in relation with the reduction in the volume of milk produced.

The high and positive phenotypic and genetic correlations of milk and composition traits across experimental periods, indicates that overall these traits remained quite stable across experimental periods. However, the numerically higher genetic correlation found between the 2 TDM periods than between ODM and TDM periods might indicate that traits within the same milking frequency were closer from a genetic point of view. The ODM / TDM genetic correlations of milk protein, lactose and SCS were close to 1.00 (especially for the ODM / pTDM2 correlations) so that these traits might be considered identical or almost identical from a genetic point of view. However, that wasn't the case for milk yield and milk fat content, whose genetic correlations between ODM and TDM values were lower than 0.87. Milk yield during a 3-wk ODM thus isn't under a complete common genetic determinism with TDM milk yield.

Genetic parameters of milk yield responses to a 3-wk ODM

The genetic determinism of milk yield responses to ODM, which has never been studied previously, was also investigated in this study. Milk yield responses genetic coefficients of variation were quite large, especially for milk yield recovery (kg/d) that was as high as 48.73 %. Milk yield loss (kg/d and %) heritabilities found were moderate, similarly to milk yield heritability levels. Interestingly, milk yield losses observed during ODM d1 (kg/d and %) heritabilities were also consistent with milk yield loss during ODM heritabilities so that these responses share a similar level of genetic control. Milk yield recovery (kg/d) was a trait of high heritability indicating that this trait might be less determined by the environment than the other traits. However, recovery:loss ratio wasn't found heritable although this ratio is calculated on 2 traits (milk yield loss and milk yield recovery, kg/d) exhibiting moderate to high heritability. This lack of heritability could be due to the very high negative genetic correlation (-0.84) between milk yield loss and milk yield recovery. This negative genetic correlation found between milk yield recovery when resuming TDM and milk yield losses (kg/d and % that are negative values), indicate that cows that lose more milk when switched to ODM, recover also more milk when switched back to TDM.

Predictors of milk yield responses to ODM

cTDM milk yield and composition. Milk yield and composition are parameters that are routinely recorded on TDM in dairy farms and thus easy to access. If linked to milk yield responses to ODM, they could be used by farmers who want to identify and ultimately select cows that have a higher tolerance towards ODM. The negative phenotypic and genetic correlations found here between cTDM milk yield and cTDM milk solids (fat and protein) contents is consistent with the literature: the more milk the cows produce, the less this milk is concentrated. The most pronounced pattern in the correlations observed between initial milk yield and composition traits and milk yield responses to ODM is that cows that produce more milk lose more milk when switched to ODM but also recover more milk when switched back to TDM. Consistently with the negative correlation found between milk yield and milk solids concentration, the highest the milk fat and protein contents, the lowest the milk yield losses when switching cows to ODM but also the lowest milk yield recovery when switching cows back to TDM. Comparatively, milk lactose and milk SCS contents were less or even not correlated phenotypically with milk yield responses to ODM. However, from a genetic point of view, lactose

content seemed to follow a similar pattern as milk yield, which might be explained by the fact that lactose is one of the major milk osmotic components (Linzell and Peaker, 1971) and thus linked to the volume of milk produced. Milk SCS had a positive genetic correlation (0.51) with milk yield recovery:loss ratio, that is quite surprising as it could indicate that cows with an initially inflamed udder were able to recover more milk when resuming TDM. However, this correlation wasn't found significant from a phenotypic point of view.

Milk TDM yield and milk solids concentration thus seem to constitute quite suitable indicators of milk yield responses to ODM. However, these traits didn't allow to predict exactly cows responses to ODM as genetic correlation between these traits was maximum 0.69 for absolute milk loss (with TDM milk yield) and 0.67 for relative milk loss (with protein content).

First day of once-daily milking, ODM d1. The description and comparison of the changes in milk yield and composition during ODM d1 to the changes during longer ODM periods is an original approach that has to our knowledge never been so clearly implemented in previous studies. Although ODM d1 is more invasive than just measuring milk yield and composition during TDM, if giving accurate estimations of cows adaptability to ODM it could be a useful tool for breeders who want to select cows adapted towards this practice. Here, average milk yield and milk fat content during ODM d1 did not differ to those observed during the 3-wk ODM period. In contrast, milk protein and lactose contents and SCS differed: milk protein content was not increased on d1 in contrast to 3-wk ODM, and milk lactose content and milk SCS were lower on d1 compared to 3-wk ODM. These differences between d1 of ODM and 3-wk ODM could partly originate from the short-term mechanisms involved in the acute phase of ODM adaptation of the mammary gland (Davis et al., 1999). In the course of the 1st d of ODM, mammary epithelium becomes leaky after 18h of milk accumulation in the udder leading to lactose efflux from milk to blood. The greater decrease in milk lactose content on d1 of ODM could reflect the higher permeability of mammary epithelium on that day. Here, milk protein content did not increase during the 1st d of ODM, consistently with results reported by Auldish and Prosser (1998) who subjected 48 multiparous Friesian cows to 2 d of ODM, but in contrast with Charton et al (2016) who observed an increase by 0.5 unit of milk protein content with Holstein cows subjected to a single 24h milking interval (724 observations and 289 cows). However, this steady milk protein content could conceal changes in protein proportions. Indeed, Auldish and Prosser (1998) reported also a reduction in milk casein:whey protein ratio with an increase in serum albumin and immunoglobulin G concentrations. However, these mechanisms of the acute phase of udder adaptation do not seem to affect highly milk yield on d1 of ODM. Indeed, average milk yield and milk yield losses (expressed either in kg/d or %) were similar between ODM d1 and 3-wk ODM. In addition, milk yield on ODM d1 was positively and highly correlated with 3-wk ODM milk yield ($r = 0.86$). This consistency between milk yield data on d1 and 3-wk ODM was also observed when considering milk yield loss traits. Correlations between d1 and 3-wk ODM were 0.76 and 0.62 for milk yield losses in kg/d and %, respectively.

The higher genetic correlations for milk production traits estimated between ODM d1 values and 3-wk ODM values than with cTDM values (SCS excepted) indicate that the first d of ODM is already more representative of ODM than TDM and that the genetic background between ODM d1 and cTDM might partly differ. Indeed, genetic correlation between milk yield, milk fat and protein content during ODM and ODM d1 were all above 0.96, and even as high as 1.00 between ODM d1 and 3 wk-ODM milk yield losses (both as kg/d and %) suggesting a common genetic determinism for these traits. These results thus suggest that, both from a phenotypic and genetic point of view, the 1st d of ODM is relevant in order to predict milk yield losses on several days of ODM.

CONCLUSIONS

If milk yield and composition during ODM are traits that depend on a genetic determinism, milk yield responses (loss and recovery) to 3-wk ODM are also under a substantial genetic control. Those traits are of moderate to high heritability, meaning that efficient selection of "tolerant" individuals is possible. Considering predictors of cows response to ODM, twice-daily milking yield and composition

were partly genetically correlated with milk yield responses to ODM, but these correlations were lower than the correlations between ODM d1 milk yield responses and 3-wk ODM milk yield responses. Although less practical, implementing one day of ODM seems to be a more accurate predictor of cows' response to ODM. A next step into further understanding the genetic background of cows responses to ODM might be to identify genomic regions implicated in cows milk yield level and milk yield responses to ODM.

REFERENCES

- Assenza, F. 2014. Modelling genetic selection for gastrointestinal parasites resistance in small ruminants. Institut National Polytechnique de Toulouse. 125 pp.
- Carruthers, V.R., S.R. Davis, A.M. Bryant, H. V Henderson, C.A. Morris, and P.J.A. Copeman. 1993. Response of Jersey and Friesian cows to once a day milking and prediction of response based on udder characteristics and milk composition. *J. Dairy Res.* 60:1–11.
- Charton, C., H. Larroque, C. Robert-Granié, D. Pomiès, H. Leclerc, N.C. Friggens, and J. Guinard-Flament. 2016. Individual responses of dairy cows to a 24-hour milking interval. *J. Dairy Sci.* doi:10.3168/jds.2015-9782.
- Clark, D.A., C.V.C. Phyn, M.J. Tong, S.J. Collis, and D.E. Dalley. 2006. A Systems Comparison of Once- Versus Twice-Daily Milking of Pastured Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 89:1854–1862. doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72254-8.
- Druet, T., F. Jaffrezic, and V. Ducrocq. 2005. Estimation of genetic parameters for test day records of dairy traits in the first three lactations. *Genet. Sel. Evol.* 37:257–271. doi:10.1051/gse:2005001.
- Guinard-Flament, J., Y. Gallard, and H. Larroque. 2011. Lactose in blood plasma and the ability of dairy cows to tolerate once-daily milking in terms of milk loss and milk recovery. *J. Dairy Sci.* 94:3446–54. doi:10.3168/jds.2010-4081.
- Hickson, R.E., N. Lopez-Villalobos, D.E. Dalley, D. a Clark, and C.W. Holmes. 2006. Yields and persistency of lactation in Friesian and Jersey cows milked once daily. *J. Dairy Sci.* 89:2017–24. doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72269-X.
- INRA, and J. Agabriel. 2010. Alimentation des bovins, ovins et caprins. Besoins des animaux - Valeur des aliments. Tables INRA 2007, mise à jour 2010. Quae, editor. Versailles, France. 311 pp.
- Larroque, H., Y. Gallard, L. Thaumat, D. Boichard, and J.J. Colleau. 2002. A crossbreeding experiment to detect quantitative trait loci in dairy cattle. In 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, 19-23 août 2002. Montpellier, France.
- Legarra, A., I. Aguilar, and I. Misztal. 2009. A relationship matrix including full pedigree and genomic information. *J. Dairy Sci.* 92:4656–4663. doi:10.3168/jds.2009-2061.
- Lembeye, F., N. Lopez-villalobos, J.L. Burke, and S.R. Davis. 2016. Estimation of genetic parameters for milk traits in cows milked once- or twice-daily in New Zealand. *Livest. Sci.* 185:142–147. doi:10.1016/j.livsci.2016.01.022.
- Lenth, R. 2014. lsmeans: Least-Squares Means. R package version 2.12. <http://CRAN.R-project.org/package=lsmeans>.
- Linzell, J., and M. Peaker. 1971. Intracellular concentrations of sodium, potassium and chloride in the lactating mammary gland and their relation to the secretory mechanism. *J. Physiol.* 216:683–700.
- Michaud, A., M. Peyrin, A. Massiot, A. Berville, B. Portier, V. Brocard, and J. Guinard-Flament. 2007. Quelle utilisation de la monotraite dans les élevages bovins laitiers en Bretagne ? In 14emes Rencontres autour des Rech. sur les Ruminants, Paris, Fr. 5 6 Dec. 2007. 423.
- Miglior, F., A. Sewalem, J. Jamrozik, J. Bohmanova, D.M. Lefebvre, and R.K. Moore. 2007. Genetic Analysis of Milk Urea Nitrogen and Lactose and Their Relationships with Other Production Traits in Canadian Holstein Cattle. *J. Dairy Sci.* 90:2468–2479. doi:10.3168/jds.2006-487.
- Misztal, I. 2008. Reliable computing in estimation of variance components. *J. Anim. Breed. Genet.* 125:363–370. doi:10.1111/j.1439-0388.2008.00774.x.
- Misztal, I., S. Tsuruta, T. Strabel, B. Auvray, T. Druet, and D.H. Lee. 2002. BLUPF90 and related programs (BGF90). In Proceedings of the 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. 21–22.
- Phyn, C.V.C., J.K. Kay, A.G. Rius, S.R. Davis, K. Stelwagen, J.E. Hillerton, and J.R. Roche. 2010. Review : Impact of short – term alterations to milking frequency in early lactation. In Proceeding of the 4th Australasian Dairy Science Symposium, Lincoln University, NZ.

- Rémond, B., S. Aubailly, Y. Chilliard, D. Dupontc, D. Pomiès, and M. Petit. 2002. Combined effects of once-daily milking and feeding level in the first three weeks of lactation on milk production and enzyme activities , and nutritional status , in Holstein cows. *Anim. Res.* 51:101–117. doi:10.1051/animres.
- Rémond, B., J.-B. Coulon, M. Nicloux, and D. Levieux. 1999. Effect of temporary once-daily milking in early lactation on milk production and nutritional status of dairy cows. *Ann. Zootech.* 48:341–352.
- Rémond, B., and D. Pomiès. 2005. Once-daily milking of dairy cows: a review of recent French experiments. *Anim. Res.* 54:427–442. doi:10.1051/animres.
- Rupp, R., and D. Boichard. 1997. Genetic evaluation of dairy cattle for somatic cell count to improve mastitis resistance. In *4èmes Rencontres autour des Recherches sur les Ruminants Paris, Fr., Dec 1997*. Institut l’Elevage; Paris; France. 211–214.
- Sneddon, N., N. Lopez-Villalobos, S. Davis, R. Hickson, and L. Shalloo. 2015. Genetic parameters for milk components including lactose from test day records in the New Zealand dairy herd. *New Zeal. J. Agric. Res.* 58:97–107. doi:10.1080/00288233.2014.978482.
- Stachowicz, K., G. Jenkins, P. Amer, and C.V.C. Phyn. 2014. Genetic Evaluation of Milk Traits under Whole-Season Once-a-Day Milking. In *10th World Congress of Genetics Applied to Livestock Production*. Vancouver, Canada. Abstract No 821.
- Stelwagen, K., and C.H. Knight. 1997. Effect of unilateral once or twice daily milking of cows on milk yield and udder characteristics in early and late lactation. *J. Dairy Res.* 64:487–94.
- Stelwagen, K., C.V.C. Phyn, S.R. Davis, J. Guinard-Flament, D. Pomiès, J.R. Roche, and J.K. Kay. 2013. Invited review: reduced milking frequency: milk production and management implications. *J. Dairy Sci.* 96:3401–13. doi:10.3168/jds.2012-6074.
- Stoop, W.M., H. Bovenhuis, and J. a M. van Arendonk. 2007. Genetic parameters for milk urea nitrogen in relation to milk production traits. *J. Dairy Sci.* 90:1981–1986. doi:10.3168/jds.2006-434.
- Welper, R.D., and A.E. Freeman. 1992. Genetic Parameters for Yield Traits of Holsteins, Including Lactose and Somatic Cell Score. *J. Dairy Sci.* 75:1342–1348. doi:10.3168/jds.S0022-0302(92)77885-0.

2. Identification de régions du génome impliquées dans les réponses à 3 semaines de monotraite

A GWAS STUDY FOR MILK PRODUCTION TRAITS IN RESPONSE TO A 3-WK ONCE-DAILY MILKING PERIOD IN CROSSBRED HOLSTEIN × NORMANDE DAIRY COWS

INTRODUCTION

Once-daily milking (ODM) is a practice that can provide flexibility in workload management of dairy farms. However, ODM is not commonly implemented because it is mainly associated with a substantial decrease in milk yield (Davis et al., 1999; Rémond and Pomiès, 2005; Stelwagen et al., 2013). Nonetheless, this milk yield response to ODM vary extensively between studies, with cows showing as less as a 7% decrease in milk yield (Stelwagen et al., 1994c) and others showing as much as 50 % (Claesson et al., 1959). Between-cow variability was also reported when comparing dairy cows producing similar amounts of milk when milked twice daily (Rémond and Pomiès, 2005): cows producing 40 kg of milk per d at TDM produced between -7 and -17 kg/d in response to ODM (*i.e.* between -18 and -43%), suggesting that the individual ability of dairy cows to tolerate ODM might vary widely.

In the case of ODM applied for the whole lactation, this tolerance could be defined as the ability of dairy cows to maintain a high milk yield under ODM. In the case of ODM implemented over shorter lactation periods, it could be considered as the ability of cows to lose the lesser amount of milk when cows are switched to ODM and to recover the most milk that has been lost when resuming twice-daily milking (TDM). Identifying factors explaining the between-cow variability of the tolerance to ODM is thus of key importance to expand the use of this practice on dairy farms. The variability in cows ability to tolerate ODM has been shown to partly originate from environmental factors such as stage of lactation, parity or feeding strategy (Stelwagen et al., 2013; Kay et al., 2013). However, the variability in cows' tolerance to ODM is also under genetic control. Indeed, recently, Lembeye et al. (2016) reported, that despite lower genetic and residual variances of milk yield and composition in case of whole lactation ODM, these traits heritabilities and genetic correlations were similar during ODM and TDM. These results were confirmed by our recent work, when implementing a 3-wk ODM period in middle lactation. We observed that ODM milk yield and composition heritabilities were similar in their extent to TDM milk yield and composition heritabilities. What is more, heritability of cows' milk yield loss when switching cows to ODM ranged also similarly as TDM milk yield heritability (between 0.32 and 0.39 depending on trait expression) and was higher in the case of milk yield recovery when resuming TDM (0.63).

If finding a moderate level of heritability for traits related to ODM tolerance indicates that a selection on these traits might be efficient, in reality, the limited use of this practice entails insufficient availability of ODM phenotypes to perform a genetic evaluation on these traits. Interestingly, we estimated in our previous work a genetic correlation of 1 between the milk yield losses (kg/d and %) observed during the first 24h of ODM and the same traits measured during a 3-wk ODM period. This entails that implementing an ODM d1 could be used punctually to select animals that tolerate ODM in dairy farms.

If this existence of a genetic determinism of milk yield and composition and milk yield responses to ODM is now well established, to date, the genomic regions implicated in those responses remain unknown. The aim of this study was to implement a QTL detection to perform a first screening of the genomic regions potentially related to cows' tolerance to ODM. For that, genotypes available for the experimental population on which the genetic parameters for milk production traits and responses to a 3-wk ODM period were previously estimated were used. More precisely, the first objective was to determine whether the same genomic regions were implicated in milk yield and composition levels during TDM and ODM. The second objective was to determine which genomic regions were implicated in milk yield responses (loss and recovery) and whether some regions had also an influence on milk

yield and composition levels during either ODM or TDM. Finally, the last objective was to determine whether milk yield and composition levels and milk yield losses (kg/d and %) were under the influence of the same genomic regions whether considering them during 3 wk-ODM or ODM d1.

MATERIALS AND METHODS

Experimental design.

This study was based the same experimental design described in our previous study. Briefly, 430 Holstein × Normande crossbred cows from the INRA Domaine experimental du Pin experimental farm (latitude, longitude; Normandy, France) were used in compliance with the National Legislation on Animal Care (French Ministry of Agriculture certification No. B61-157-001). These cows are part of an INRA QTL detection program designed by crossing a high producing breed (Holstein) with a dual purpose breed (Normande) (Larroque et al., 2002). More precisely, a first generation F1 was generated by crossing 5 Holstein males with 13 Normande females and 5 Normande males with 11 Holstein females. F2 generation was obtained by crossing 10 F1 males with 70 F1 females, and a complementary F3 generation was obtained by mating the 5 F1 males to F2 cows. A part of the F2 and F3 cows (respectively 293 and 139) produced were used in this study during their second or their third lactation, at an average stage of lactation of 84 DIM. No specific selection was performed: cows available and with the same stage of lactation were used. The 430 cows were split into 22 cohorts over 8 years (n min = 7, n max = 26). The experiment consisted of 3 successive periods: 1 control wk where cows were milked twice daily (cTDM), followed by a 3 wk period where cows were milked once-daily (ODM), and a 2 wk period where cows resumed twice-daily milking. Milk yield loss was examined over the 3 wk ODM period and milk yield recovery was examined on second wk after resuming TDM (post twice-daily milk wk 2, pTDM2). The first day of ODM (ODM d1), corresponding to milk accumulation duration of 24h, was also studied separately to examine the milk yield losses. When milked twice-daily, cows were milked at 7.30 a.m and 4.30 p.m., and when milked once-daily, cows were milked at 7.45 a.m.

Experiment was performed during winter period only, so that animals were kept indoors in deep litter housing with once-a-day mulching. Diet based on corn silage offered ad libitum was the same throughout experiment and was formulated according to the requirements of cows milked twice-daily (INRA and Agabriel, 2010).

Data

Traits studied were 20 production traits (milk yield, milk fat, protein and lactose yields and contents) measured during pTDM, ODM D1, ODM and pTDM2 experimental periods and 6 traits related to milk yield response to ODM (milk yield loss when switching cows to ODM at d1 and over 3-wk ODM (kg/d and %, 4 traits), milk yield recovery (kg/d) and milk yield recovery:loss ratio (%) when switching cows back to twice-daily milking).

Milk yield was recorded in the milking parlor (Boumatic-2050®) at each milking throughout the experiment. Milk samples for milk composition (fat, protein and lactose contents and SCC) were collected on 2 d/wk during TDM periods and 4 d/wk throughout ODM period. Milk samples were stored at 4°C until analyses that were performed at the Normandy Interprofessional Milk Analysis Laboratory (LILANO, Saint-Lô, France). Milk fat, protein, and lactose contents were determined by infrared analysis (MilkoScan FT600, Foss, Hillerød, Denmark) and SCC with a Fossomatic cell counter (Foss, Hillerød, Denmark).

Calculations

Daily milk yield and composition were averaged over 1 wk (cTDM and pTDM2) or 3 wk (ODM, phase 1). SCC was converted into somatic cell score (**SCS**) using the formula $SCS = \log_2 (SCC / 100,000) + 3$, where SCC is expressed in units of 1000 cells/mL (Rupp and Boichard, 1997).

Milk yield loss (in kg/d) was computed as the difference between ODM and cTDM milk yields. Relative milk yield loss (in %) was milk yield loss (kg/d) divided by cTDM milk yield, multiplied by 100.

For ODM d1, milk yield loss (kg/d) and relative milk yield loss (%) were computed similarly, but replacing 3-wk ODM production by ODM d1 production. Milk yield recovery (kg/d) was computed as the difference between pTDM2 and 3-wk ODM. Milk recovery:loss ratio (%) was computed as milk yield recovery (kg/d) divided by milk yield loss (kg/d), multiplied by 100.

Genotypes

Genotypes were carried out with DNA extracted from blood samples. A total of 554 cows, including the cows used in the experiment, their respective parents and grand-parents, were genotyped. Among the 430 cows used in the experiment, a total of 364 cows were genotyped with the Illumina BovineSNP50 BeadChip (Illumina Inc., San Diego, CA), either at the Centre National de Génotypage (CNG, Evry, France, n=115 cows) or at Labogena (Jouy-en-Josas, France, n=249). A small group of 65 cows were genotyped using the Illumina BovineLD (10k) BeadChip at Labogena. The parents of the cows used in the experiment were genotyped with the Illumina BovineSNP50 BeadChip at the CNG. Quality control applied to SNP mapped to the 29 autosomes included elimination of animals with a call rate <95%, markers with a call frequency <90%, with a minor allele frequency <5% or genotype frequencies deviating from the Hardy-Weinberg equilibrium ($P < 1. E-4$). Genotypes on the Illumina BovineLD BeadChip and imputed to the Illumina BovineSNP50 using the software FImpute were also checked for rate of maximum change in original genotypes in order to detect progeny-parent conflict. Among the 430 cows included in the experiment, 2 weren't genotyped, 4 genotypes were damaged and 2 genotypes with pedigree conflicts were deleted. Finally, 43,801 SNP available on 554 individuals (422 cows included in the experiment and 132 parents) were kept for QTL detection.

QTL detection: use of a single SNP regression method in a genome wide association study (GWAS)

For each milk production and composition trait within each experimental period and for each trait related to ODM responses, phenotypes were adjusted for the previously described environmental fixed effects using Genokit software (developed by V. Ducrocq (INRA)). These non-genetic effects were estimated with the following single trait model:

$$y = Xb + Za + e$$

Where y is the vector of observations, b is the vector of fixed effects, $a \sim N(0, A\sigma_a^2)$ is the vector of random genetic effects, and $e \sim N(0, I\sigma_e^2)$ is the vector of random residual effects, X and Z are incidence matrices, A is the relationship matrix among individuals and I is the identity matrix. Variances σ_a^2 and σ_e^2 are the additive genetic and residual variances, respectively.

Fixed effects included in vector b were the same considered for each trait: cohort (22 classes), age at first calving (2 classes) and stage of lactation as covariate.

SNP effects for production traits and responses to ODM were estimated using mixed models implemented in WOMBAT software (Meyer, 2007). WOMBAT estimates the SNP effects performing a pseudo LDLA analyses method named FASTA, as described in Meyer and Tier (2012). Mixed models implemented in WOMBAT are from the form:

$$y = Za^k + W^k s^k + e^k$$

Where y is the vector of observations $a^k \sim N(0, A\sigma_a^2)$ is the vector of random genetic effects for analyses for the k th SNP (with relationship among animals accounted for *via* the pedigree relationship matrix), s^k is the vector of the k th SNP effects and e^k is the vector of residuals for the k th SNP, Z is the incidence matrix of a^k and W^k is the incidence matrix of s^k with the elements of W^k equal to the number of copies of the reference allele (0, 1, or 2) for the SNP k .

The t-values obtained for each SNP were used to calculate their corresponding P values assuming a two-tailed t-distribution. Genome-wide significant SNPs P values were determined for each trait based on a false discovery rate (FDR) of 10 %. In addition, a less restraining analyses was performed and chromosome-wide significant SNPs were determined for each trait using a Bonferroni 5% correction (SNPs above the threshold determined for each chromosome by dividing the chosen P value (0.05) by

the number of SNPs on the chromosome) in order to detect additional genomic regions of influence on traits. In addition, the genetic variance attributable to each SNP was computed as $2pqa^2$, where p is the major allele frequency, q is the minor allele frequency and a is the allele substitution effect.

The quantile-quantile plots (QQplots) of the observed against expected SNP p-values were produced for each trait and were examined to check the distribution of the test-statistics and to assess the degree of fit of the model for this trait. Most SNPs followed the null hypothesis as there were only few SNPs deviating from a normal distribution, so that no further correction was applied to data. The most significant signals found for milk yield and composition and milk yield responses to ODM were scrutinized using the cow genome map and its annotation available in (Bos_taurus_UMD_3.1.1/bosTau8 assembly). QTL regions identified as significant are either as isolated SNPs, when only one SNP was found significant in the genomic region, or as chromosomal regions delimited by the least significant SNPs surrounding the SNP associated with the maximum significance.

RESULTS

A total of 26 traits (described in Tables 1a and 1b) were considered for QTL detection in this study, among which 20 were milk yield and milk composition traits during the 4 experimental periods (cTDM, ODM d1, ODM and pTDM2), and 6 were traits describing milk yield variations, *i.e.* milk yield loss when switching cow to 3-wk ODM or ODM d1 (kg/d and %), milk yield recovery (kg/d) and milk recovery:loss ratio (%). QTL regions detected for milk traits were either genome-wise significant (FDR 10 %), chromosome-significant (Bonferroni correction 5 %) or both as indicated in tables 2 to 6.

QTL regions were detected for each trait excepted for milk SCS, where no significant QTL region were found all over the 4 experimental periods.

Table 1a. Milk yield and composition mean \pm standard deviations variations during control twice-daily milking period (cTDM), the first day of once-daily milking (ODM d1), the 3-wk once-daily milking period (ODM) and wk-2 post resuming twice-daily-milking (pTDM2).

	cTDM	ODM d1	ODM	pTDM2
Milk yield, kg/d	27.8 \pm 5.56	20.1 \pm 4.46	20.1 \pm 4.22	24.0 \pm 4.99
Milk fat content, g/kg	43.3 \pm 5.95	48.3 \pm 12.16	48.4 \pm 7.33	44.6 \pm 6.78
Milk protein content, g/kg	31.6 \pm 2.35	31.7 \pm 2.61	32.3 \pm 2.34	33.5 \pm 2.58
Milk lactose content, g/kg	49.2 \pm 2.03	46.7 \pm 2.73	47.0 \pm 2.32	48.2 \pm 2.39
Milk SCS, units	2.44 \pm 1.770	3.06 \pm 1.75	3.46 \pm 2.006	3.18 \pm 1.714

Table 1b. Milk yield loss and recovery when switching cows from twice-daily milking (TDM) to 3-wk once-daily milking (ODM) and when switching them back to TDM, respectively.

	Mean	Minimum	Maximum	SD ¹	CV ²	n ³
Loss⁴, kg/d	-7.7	-19.6	-0.8	2.82	36.6	430
ODM d1 loss⁴, kg/d	-7.7	-22.6	4.2	3.53	45.8	428
Relative loss⁵, %	-27.5	-52.4	-5.7	7.64	27.8	430
ODM d1 relative loss⁵, %	-27.3	-76.6	32.1	11.21	41.1	428
Recovery⁶, kg/d	3.9	-2.3	10.7	2.54	65.1	430
Recovery:loss ratio⁷, %	57	2	600	43.1	75.4	430

¹ Standard deviation

² Coefficient of variation calculated as the SD divided by the mean ($\times 100$).

³ Number of observations

⁴ Difference between 3-wk or d1 ODM and cTDM milk yields.

⁵ Difference between 3-wk or d1 ODM and cTDM milk yields divided by cTDM milk yield ($\times 100$).

⁶ Difference between 3-wk ODM and pTDM2 milk yields.

⁷ Difference between 3-wk ODM and pTDM2 milk yields divided by difference between cTDM and 3-wk ODM milk yields ($\times 100$).

Milk yield

A total of 5 different QTL regions located on 4 chromosomes were identified on milk yield traits during the 4 experimental periods (Table 2). However, only 1 SNP was significant at the genome-wide based FDR 10% during pTDM2, the other 4 SNPs being significant at a chromosome-wise Bonferroni correction at 5 %. The proportions of genetic variance explained by these chromosomal regions were close and ranged from 12.0 to 15.6 %. The 5 QTL regions were detected during TDM period, whereas only 1 was detected during ODM and pTDM2, and none during ODM d1. The QTL region located on BTA3 (SNP BTB-00148908) was detected during cTDM, ODM and pTDM2 experimental periods. It is also noteworthy to report that the chromosome 8 QTL (Hapmap45328-BTA-98830), that was detected during cTDM was also present, but slightly under the threshold of significance at chromosomal level during ODM and pTDM2 (result not shown). During cTDM, 3 other significant SNPs were detected on chromosome 14 at 1.65 and 1.80 Mb (SNPs ARS-BFGL-NGS-57820 and ARS-BFGL-NGS-4939, respectively)(Figure 1), and on chromosome 18 at 58.20 Mb.

Table 2. Significant chromosomal regions detected from GWAS for milk yield during experimental periods (control twice-daily milking, cTDM; first day of once-daily milking, ODM d1; once-daily milking, ODM and week 2 after resuming twice-daily milking, pTDM2).

Chr ¹	Physical position ² (Mb)	SNP max id ³	P value ⁴	Signif. SNP max ⁵	Nb SNP signif ⁶		Genetic variance ⁷
					FDR 10 % gen.	Bonferroni chr. 5 %	
cTDM							
3	106,29	BTB-00148908	4.74e-6	*	-	1	0.148
8	111,77	Hapmap45328-BTA-98830	1.42E-05	*	-	1	0.142
14	1,65	ARS-BFGL-NGS-57820	3.32E-05	*	-	1	0.120
14	1,80	ARS-BFGL-NGS-4939	6.40E-06	*	-	1	0.145
18	58,20	Hapmap45328-BTA-98830	1.43E-05	*	-	1	0.156
ODM							
3	106,29	BTB-00148908	2.17E-6	*	-	1	0.14
pTDM2							
3	106,29	BTB-00148908	2.17E-06	**	1	1	0.143

¹ Chromosome of the corresponding SNP

² Position in Mb where the SNP maximum is reached

³ Id of the SNP maximum

⁴ P value associated with the maximum SNP

⁵ Significance of the signal detected: ** for a genome-wide significance with a FDR of 10 % and * for a chromosome-wise level calculated with a Bonferroni 5 % correction

⁶ Number of the significant SNPs contributing to the peak calculated either with a genome-wide FDR 10 % or a chromosome-wise Bonferroni 5 %

⁷ Proportion of genetic variance of the trait explained by the maximum SNP, calculated as $2pqa^2$

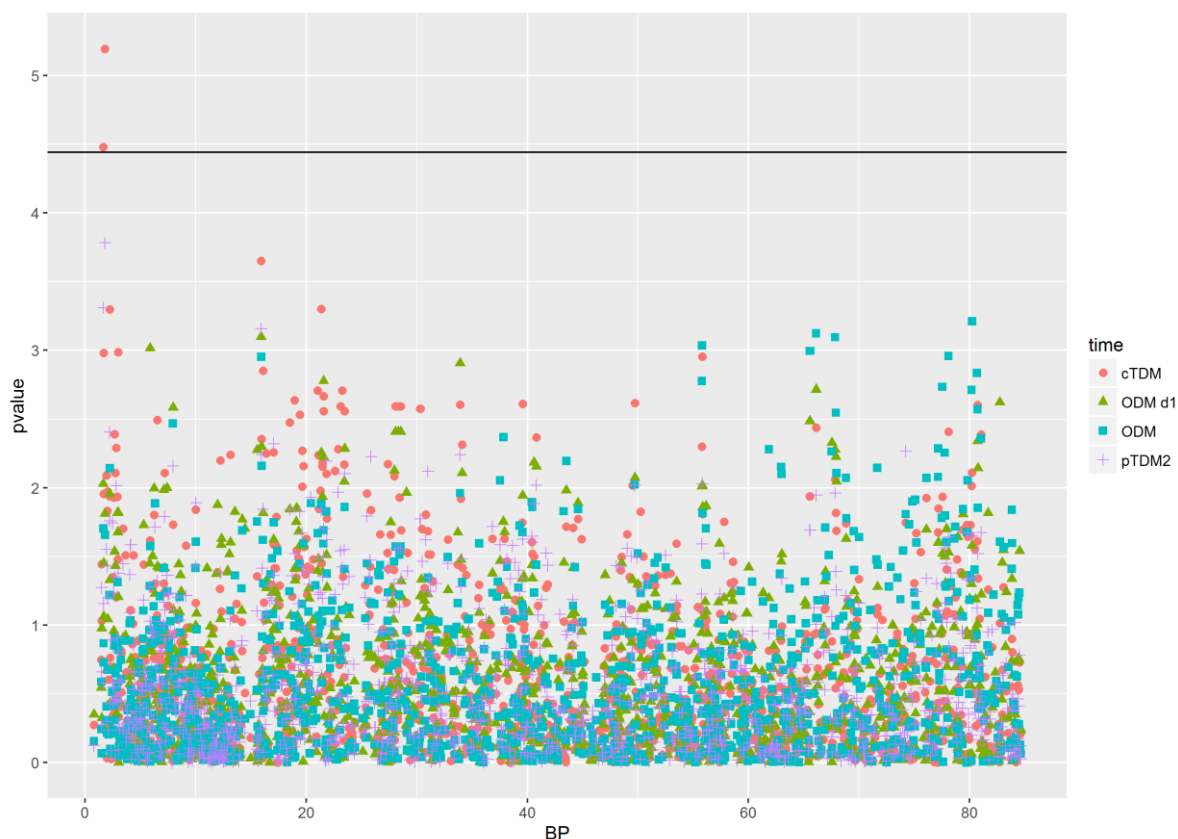


Figure 1. Chromosome-wide plot of the SNPs on chromosome 14 for milk yield during experimental periods (control twice-daily milking, cTDM; first day of once-daily milking, ODM d1; once-daily milking, ODM and week 2 after resuming twice-daily milking, pTDM2). Y axis: $-\log_{10}(P \text{ value})$ of SNPs effects. X axis: position in Mb. Experimental periods caption is located on the right of the figure. Black line represents the 5% chromosome-wide Bonferroni threshold.

Milk fat content

As 2 highly significant SNPs on the BTA14 are located in the same QTL region, from 0 to 8 QTL regions were identified on milk fat content traits over the 4 experimental periods (Figure 2). The proportions of genetic variance explained by the most significant SNPs were variable and ranged from 6.7 to 28.9 % (Table 3). The highly significant SNPs found during ODM d1 using a chromosome-wise Bonferroni correction weren't found during any other experimental period.

A total of 2 genomic regions were found common between cTDM and ODM and 3 QTL regions were found common between cTDM and pTDM2. Among these common QTL regions, 2 SNPs located in the centromeric region of BTA14 (ARS-BFGL-NGS-57820 and ARS-BFGL-NGS-4939, located at 1.65 and 1.80 Mb, respectively) were found common on the 3 periods cTDM, ODM and pTDM2. These 2 SNPs explained the higher genetic variance among all other significant SNPs, regardless of the experimental period considered. Two other QTL regions were also found on BTA14 at 3.01 and 16.09 Mb (SNPs ARS-BFGL-NGS-59769 and ARS-BFGL-NGS-64738, respectively), that were detected during twice daily milking periods (cTDM and pTDM2). Less QTL regions were found on BTA14 during ODM period. Other QTL regions were also identified on BTA5, 6, 12, 13, 17 and 19 and 24 using a genome-wise FDR of 10 %, the QTL region detected on BTA24 being detected during cTDM and ODM periods.

Table 3. Significant chromosomal regions detected from GWAS for milk fat content during experimental periods (control twice-daily milking, cTDM; first day of once-daily milking, ODM d1; once-daily milking, ODM and week 2 after resuming twice-daily milking, pTDM2).

Chr ¹	Physical position ² (Mb)	SNP max id ³	P value ⁴	Signif. SNP max ⁵	Nb signif. SNP ⁶		Signif. interval ⁷	Genetic variance ⁸
					FDR 10 % gen.	Bonferroni chr.		
cTDM								
14	1.65	ARS-BFGL-NGS-57820	4.52e-15	**/*				0.246
14	1.80	ARS-BFGL-NGS-4939	4.81e-17	**/*	13	13	1.46-2.28	0.289
14	3.01	ARS-BFGL-NGS-59769	3.98e-12	**/*	13	12	2.61-4.36	0.172
14	6.52	Hapmap232299-BTC-050306	4.89e-9	**/*	9	8	5.57-9.13	0.155
14	16.09	ARS-BFGL-NGS-64738	1.64e-5	**/*	2	2	16.09-16.39	0.075
24	48.59	ARS-BFGL-NGS-32658	2.03e-5	**/*	2	2	48.59-48.62	0.077
ODM d1								
13	40,53	ARS-BFGL-NGS-91535	3.57e-5	*	-	1	-	0.136
14	1,70	ARS-BFGL-NGS-94706	9.54e-6	*	-	2	1,67-1,70	0.221
ODM								
5	38.25	Hapmap57437-rs29017167	5.70e-5	**	2	-	36.84-38.25	0.074
6	7.61	ARS-BFGL-NGS-107847	4.55e-6	**/*	1	1	-	0.088
12	61.18	BTA-29393-no-rs	2.51e-5	**/*	14	3	30.17-67.23	0.095
13	16.95	ARS-BFGL-NGS-96622	7.14e-5	**	1	-	-	0.079
14	1.65	ARS-BFGL-NGS-57820	1.05e-12	**/*				0.224
14	1.80	ARS-BFGL-NGS-4939	4.80e-13	**/*	19	16	1.49-3.64	0.236
14	5.88	ARS-BFGL-NGS-6759	1.39e-7	**/*	3	3	5.88-7.18	0.129
14	78.09	BTA-54848-no-rs	1.11e-4	**	1	-	-	0.067
24	48.59	ARS-BFGL-NGS-32658	4.69e-5	**/*	4	2	48.46-48.59	0.078
pTDM2								
14	1.65	ARS-BFGL-NGS-57820	4.24e-14	**/*				0.219
14	1.80	ARS-BFGL-NGS-4939	3.22e-15	**/*	12	9	1.49-2.28	0.244
14	3.01	ARS-BFGL-NGS-59769	2.52e-9	**/*	12	12	2.61-4.36	0.122
14	7.18	Hapmap22665-BTC-070320	3.01e-7	**/*	7	6	5.80-7.31	0.116
14	16.09	ARS-BFGL-NGS-64738	2.58e-5	**/-	5	1	11.02-17.32	0.068
17	58.14	BTB-01100978	3.66e-5	**/*	1	1	-	0.070
19	8.20	UA-IFASA-7338	4.13e-5	**/*	1	1	-	0.082
19	18.09	BTB-00740898	1.10e-5	**/*	3	1	17.04-25.17	0.068

¹ Chromosome of the corresponding SNP

² Position in Mb where the SNP maximum is reached

³ Id of the SNP maximum

⁴ P value associated with the maximum SNP

⁵ Significance of the signal detected: ** for a genome-wide significance with a FDR of 10 % and * for a chromosome-wise level calculated with a Bonferroni 5 % correction

⁶ Number of the significant SNPs contributing to the peak calculated either with a genome-wide FDR 10 % or a chromosome-wise Bonferroni 5 %

⁷ Chromosomal regions delimited by the least significant SNPs surrounding the SNP associated with the maximum significance

⁸ Proportion of genetic variance of the trait explained by the maximum SNP, calculated as $2pqa^2$

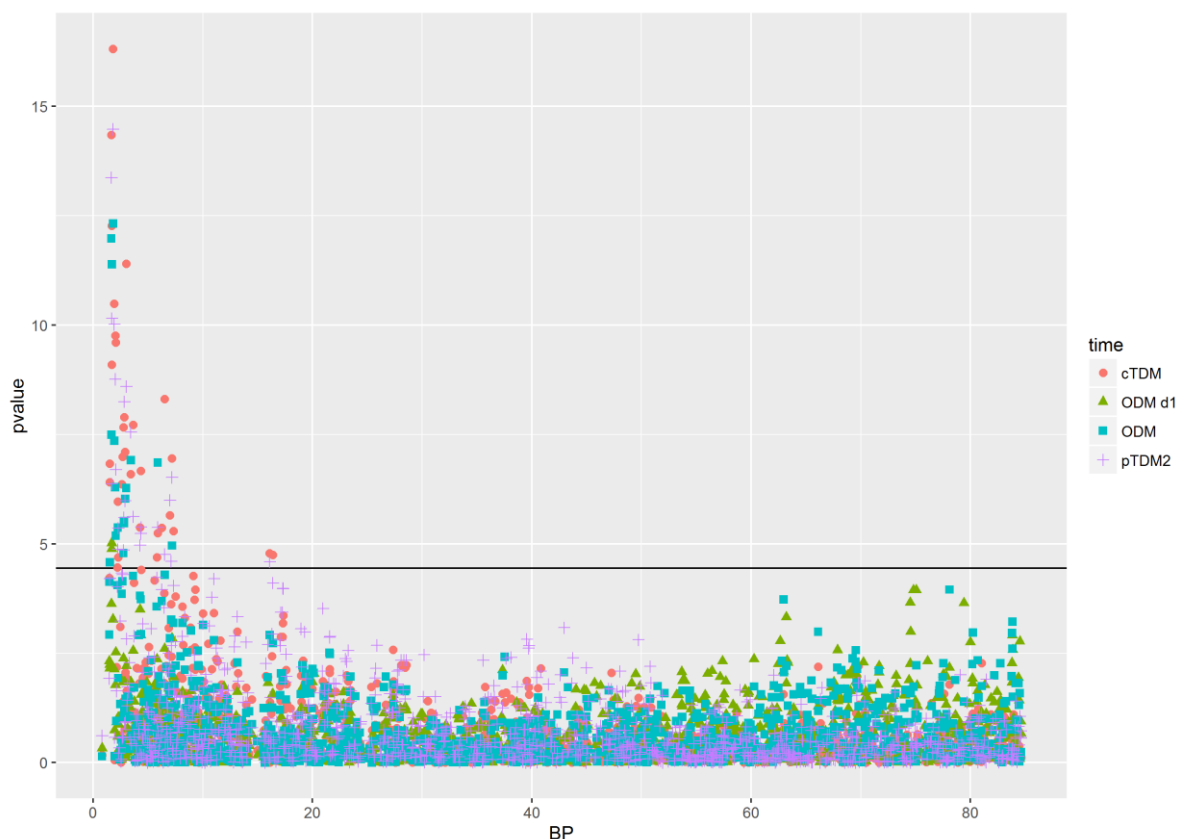


Figure 2. Chromosome-wide plot of the SNPs on chromosome 14 for milk fat content during experimental periods (control twice-daily milking, cTDM; first day of once-daily milking, ODM d1; once-daily milking, ODM and week 2 after resuming twice-daily milking, pTDM2). Y axis: $-\log_{10}(P \text{ value})$ of SNPs effects. X axis: position in Mb. Experimental periods caption is located on the right of the figure. Black line represent the 5% chromosome-wide Bonferroni threshold.

Milk protein content

As 3 highly significant SNPs on the BTA14 are located in the same QTL region, from 1 to 4 QTL regions were identified on milk protein content traits over the 4 experimental periods (Figure 3). The proportion of genetic variance due to the most significant SNPs in QTL region identified was variable and ranged from 5.2 to 12.9 % (Table 4). A total of 2 QTL regions (3 SNPs maximum) were found common over the 4 experimental periods. Two of these SNPs were ARS-BFGL-NGS-57820 and ARS-BFGL-NGS-4939 SNPs located on BTA14. These were the SNPs explaining the highest genetic variance and were common with milk fat content. The third one was located on BTA20 around 37.33 Mb. However, during ODM d1 and pTDM2, this SNP was found significant only at chromosome level. Other QTL regions were also identified on BTA14 and 17, 6, 12, 13, 17 and 19 and 24 using a chromosome-wise 5% Bonferroni correction.

Table 4. Significant chromosomal regions detected from GWAS for milk protein content during experimental periods (control twice-daily milking, cTDM; first day of once-daily milking, ODM d1; once-daily milking, ODM and week 2 after resuming twice-daily milking, pTDM2).

Chr ₁	Physical position ² (Mb)	SNP max id ³	P value ⁴	Signif SNP max ⁵	Nb signif SNP ⁶		Signif. Interval ⁷	Genetic variance ⁸ due to SNP
					FDR 10 % gen	Bonferro ni chr.		
cTDM								
14	1,65	ARS-BFGL-NGS-57820	2.39 ^e -7	**/*				0.122
14	1,80	ARS-BFGL-NGS-4939	2.50 ^e -7	**/*	2	5	1.65-2.05	0.124
14	3.01	ARS-BFGL-NGS-59769	1.31 ^e -6	**/*	1	1	-	0.096
20	37.33	BTA-50529-no-rs	1.39 ^e -5	**/*	1	2	37.33-39.28	0.096
ODM d1								
14	1,65	ARS-BFGL-NGS-57820	4.48 ^e -6	**/*				0.070
14	1,80	ARS-BFGL-NGS-4939	1.58 ^e -6	**/*	2	2	1.65-2.05	0.079
20	37,33	BTA-50529-no-rs	2.84 ^e -5	*	-	1	-	0.065
ODM								
14	1,65	ARS-BFGL-NGS-57820	9.60e-8	**/*				0.086
14	1,80	ARS-BFGL-NGS-4939	2.14e-8	**/*	8	8	1.49-2.05	0.097
14	3.01	ARS-BFGL-NGS-59769	8.59e-7	**/*	2	2	3.01-3.64	0.066
17	42.50	BTB-01595907	3.60e-5	**/*	1	1	-	0.052
20	37.33	BTA-50529-no-rs	1.06 ^e -6	***	4	4	21.46-37.33	0.079
pTDM2								
14	1,65	ARS-BFGL-NGS-57820	5.52 ^e -8	**/*				0.129
14	1,80	ARS-BFGL-NGS-4939	9.36 ^e -8	**/*	2	2	1.65-1.80	0.128
17	13,69	BTA-113935-no-rs	3.49 ^e -5	*	-	1	-	0.080
17	37,31	ARS-BFGL-NGS-90634	3.32 ^e -5	*	-	1	-	0.088
20	37,33	BTA-50529-no-rs	8.29 ^e -6	*	-	1	-	0.096

¹ Chromosome of the corresponding SNP

² Position in Mb where the SNP maximum is reached

³ Id of the SNP maximum

⁴ P value associated with the maximum SNP

⁵ Significance of the signal detected: ** for a genome-wide significance with a FDR of 10 % and * for a chromosome-wise level calculated with a Bonferroni 5 % correction

⁶ Number of the significant SNPs contributing to the peak calculated either with a genome-wise FDR 10 % or a chromosome-wise Bonferroni 5 %

⁷ Chromosomal regions delimited by the least significant SNPs surrounding the SNP associated with the maximum significance

⁸ Proportion of genetic variance of the trait explained by the maximum SNP, calculated as $2pqa^2$

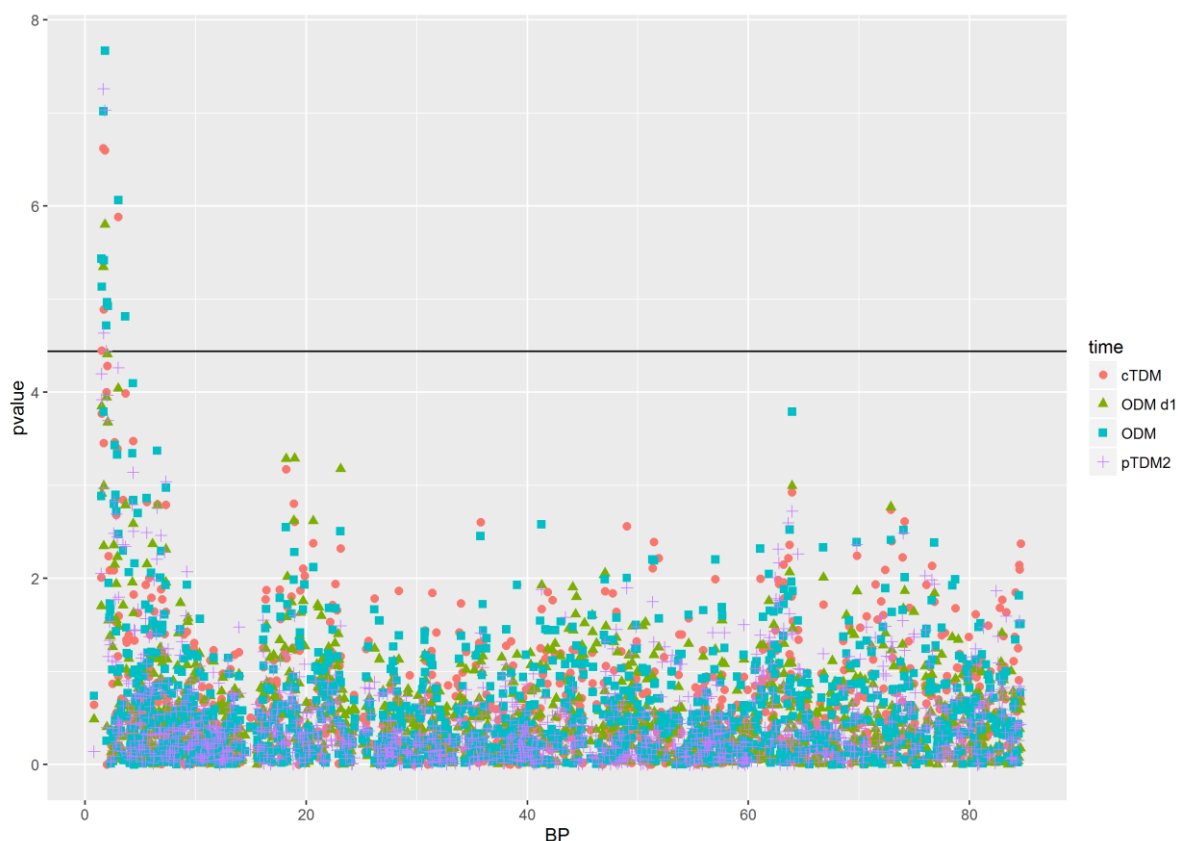


Figure 3. Chromosome-wide plot of the SNPs on chromosome 14 for milk protein content during experimental periods (control twice-daily milking, cTDM; first day of once-daily milking, ODM d1; once-daily milking, ODM and week 2 after resuming twice-daily milking, pTDM2). Y axis: $-\log_{10}(P \text{ value})$ of SNPs effects. X axis: position in Mb. Experimental periods caption is located on the right of the figure. Black line represent the 5% chromosome-wide Bonferroni threshold.

Milk lactose content

As 1 major QTL region located on BTA6 is including as much as 11 highly significant SNPs (during cTDM), from 2 to 9 QTL regions were identified on milk lactose content traits over the 4 experimental periods (Figure 4). The vast majority of the significant SNPs detected were located between 12.35 and 58.64 Mb on BTA6. Among these significant SNPs, 2 maximum SNPs, Hapmap24324-BTC-062449 (located around 37.63 Mb) and BTB-01451452 (located at around 24.36 Mb), associated with the highest proportion of genetic variance explained, were detected during all 4 experimental periods. The proportion of genetic variance due to the most significant SNPs in QTL region identified was thus highly variable, ranging from 5.1 to as much as 50.2 % (Table 5). Excepted for the SNP found on at 47.78 Mb on BTA26 during TDM periods, the QTL regions found on other chromosomes (1, 3, 4, 8, 10, 12, 16, 24, 28) were specific to one experimental period.

Table 5. Significant chromosomal regions detected from GWAS for milk lactose content during experimental periods (control twice-daily milking, cTDM; first day of once-daily milking, ODM d1; once-daily milking, ODM and week 2 after resuming twice-daily milking, pTDM2).

Chr ¹	Physical position ² (Mb)	SNP max id ³	P value ⁴	Signif. SNP max ⁵	Nb signif. SNP ⁶		Signif. Interval ⁷	Genetic variance ⁸
					FDR 10 % gen.	Bonferroni chr		
cTDM								
1	114.95	ARS-BFGL-NGS-92715	3.60 ^e -5	**	1	-	-	0.070
3	25.12	Hapmap54955-rs29010328	1.30 ^e -4	**	3	-	16.98-25.15	0.054
6	16.61	ARS-BFGL-NGS-35792	7.87 ^e -10	**/*				0.161
6	21.64	BTB-00247795	6.65 ^e -9	**/*				0.144
6	24.36	BTB-01451452	2.38 ^e -12	**/*				0.190
6	28.18	Hapmap49794-BTA-91444	7.18 ^e -9	**/*				0.156
6	30.69	BTA-75665-no-rs	2.95 ^e -11	**/*				0.156
6	36.69	ARS-BFGL-NGS-103240	4.84 ^e -14	**/*	88	45	12.35-58.64	0.264
6	37.63	Hapmap24324-BTC-062449	9.47 ^e -20	**/*				0.369
6	38.06	BTA-121739-no-rs	8.31 ^e -13	**/*				0.228
6	39.07	ARS-BFGL-NGS-2946	1.02 ^e -10	**/*				0.149
6	41.59	Hapmap33430-BTC-037618	2.86 ^e -7	**/*				0.103
6	58.38	BTA-21386-no-rs	2.54 ^e -5	**/*				0.080
8	48.07	BTB-01563190	3.95 ^e -5	**	3	-	39.58-48.11	0.080
8	104.83	Hapmap39690-BTA-82650	8.62 ^e -5	**	1	-	-	0.064
12	45.30	BTB-01438270	3.36 ^e -5	**/*	3	1	45.30-58.83	0.090
16	39.02	ARS-BFGL-NGS-114895	1.87 ^e -4	**	2	-	27.11-39.02	0.051
26	47.78	ARS-BFGL-NGS-109233	1.07 ^e -5	**/*	1	1	-	0.085
28	27.79	ARS-BFGL-NGS-18505	4.75 ^e -5	**/*	1	1	-	0.065
ODM d1								
6	24.36	BTB-01451452	1.65 ^e -8	**/*				0.372
6	37.63	Hapmap24324-BTC-062449	5.70 ^e -9	**/*	15	14	12.35-41.59	0.458
24	33.58	ARS-BFGL-NGS-72010	2.14 ^e -6		1		-	0.234
ODM								
3	41.84	ARS-BFGL-NGS-103300	2.75e-5	**	1	-	-	0.145
5	3.47	BTB-01357570	2.75e-5	**/*	1	1	-	0.144
6	17.54	BTB-00245693	4.77e-8	**/*				0.255
6	24.36	BTB-01451452	3.04e-9	**/*				0.31
6	36.61	ARS-BFGL-NGS-57515	4.71e-9	**/*	26	20	12.35-39.07	0.326
6	37.63	Hapmap24324-BTC-062449	1.48e-12	**/*				0.502
6	39.07	ARS-BFGL-NGS-2946	2.97e-8	**/*				0.248
10	90.44	UA-IFASA-9665	2.98e8	**/*	1	1	-	0.144
16	0.59	Hapmap36082-SCAFFOLD195821_13908	7.26 ^e -5	**	1	-	-	0.148
pTDM2								
3	28.46	Hapmap26402-BTA-141183	5.89 ^e -6	**/*	14	5	1.01-33.40	0.148
4	93.52	Hapmap40190-BTA-71658	1.31 ^e -4	**	2	-	93.52-93.64	0.123
6	16.61	ARS-BFGL-NGS-35792	7.43 ^e -9	**/*				0.286
6	24.36	BTB-01451452	4.05 ^e -11	**/*				0.337
6	35.46	Hapmap27887-BTA-156628	9.92 ^e -10	**/*	41	29	12.35-39.07	0.320
6	37.63	Hapmap24324-BTC-062449	6.65 ^e -14	**/*				0.499
6	38.06	BTA-121739-no-rs	5.80 ^e -9	**/*				0.289
8	39.58	Hapmap46544-BTA-94974	3.45 ^e -5	**	2	-	39.58-41.34	0.153

10	90.44	UA-IFASA-9665	2.03 ^{e-5}	**/*	2	1	90.44-91.58	0.132
26	47.78	ARS-BFGL-NGS-109233	9.91 ^{e-5}	**	1	-	-	0.127

¹ Chromosome of the corresponding SNP

² Position in Mb where the SNP maximum is reached

³ Id of the SNP maximum

⁴ P value associated with the maximum SNP

⁵ Significance of the signal detected: ** for a genome-wide significance with a FDR of 10 % and * for a chromosome-wise level calculated with a Bonferroni 5 % correction

⁶ Number of the significant SNPs contributing to the peak calculated either with a genome-wise FDR 10 % or a chromosome-wise Bonferroni 5 %

⁷ Chromosomal regions delimited by the least significant SNPs surrounding the SNP associated with the maximum significance

⁸ Proportion of genetic variance of the trait explained by the maximum SNP, calculated as $2pqa^2$

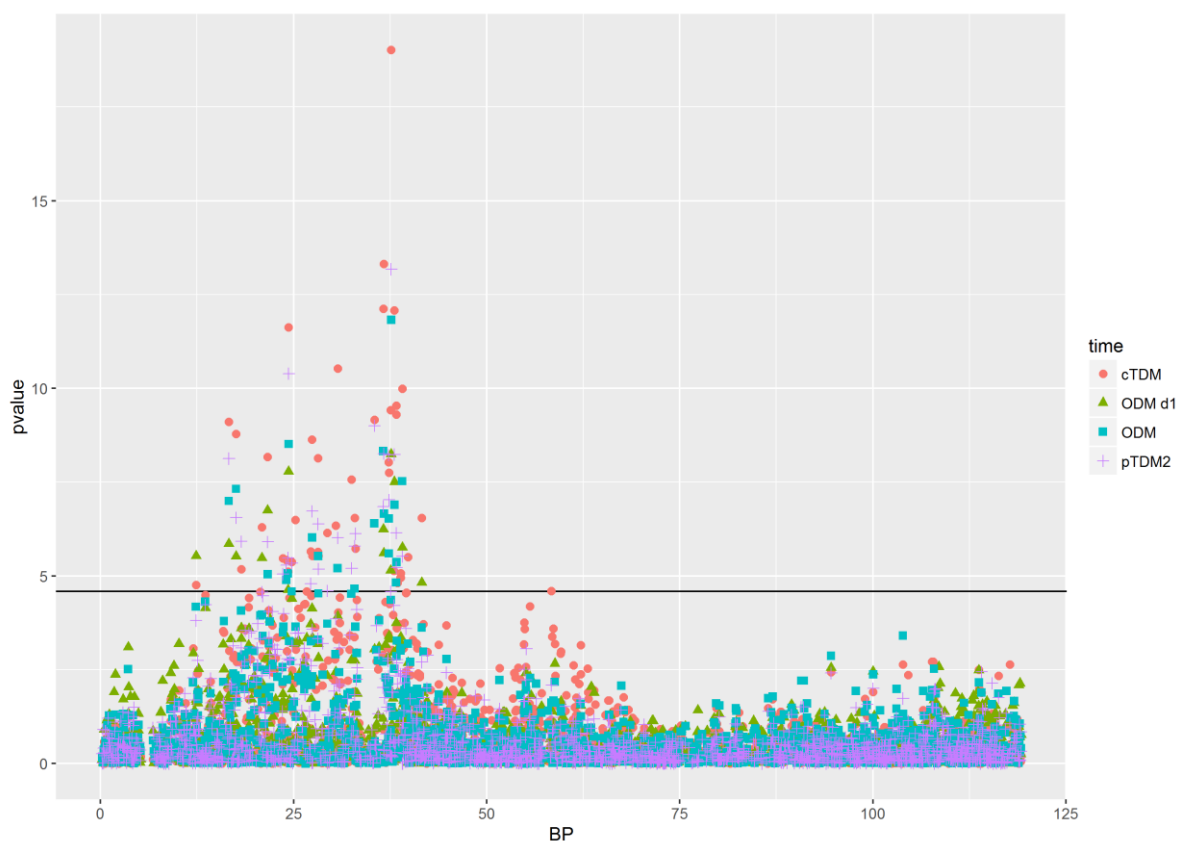


Figure 4. Chromosome-wide plot of the SNPs on chromosome 6 for milk lactose content during experimental periods (control twice-daily milking, cTDM; first day of once-daily milking, ODM d1; once-daily milking, ODM and week 2 after resuming twice-daily milking, pTDM2). Y axis: $-\log_{10}(P \text{ value})$ of SNPs effects. X axis: position in Mb. Experimental periods caption is located on the right of the figure. Black line represent the 5% chromosome-wide Bonferroni threshold.

Milk yield responses traits to ODM

Few QTL regions were detected on milk yield responses to a 3-wk ODM. Whereas no SNP were detected for relative milk yield losses (%), 3 significant SNPs, all located in the same QTL region on BTA14, were detected for absolute milk yield loss (kg/d) at chromosome level (but not at genome level, Table 6, Figure 5, A). Two out of those 3 significant SNPs were ARS-BFGL-NGS-57820 and ASR-BFGL-NGS-4939, already found for milk yield, milk fat, and protein content traits.

Three different SNPs were found at chromosomal level for absolute and relative milk yield loss (kg/d and %) during ODM d1, among which one, located at 59.84 Mb on BTA 22, was found significant for both traits (Figure 5, C and D). The other 2 were located at either around 29.66 Mb on BTA24 (ODM

d1 absolute milk yield loss, kg/d) or around 33.28 Mb on BTA12 (ODM d1 relative milk yield loss, %). This latter SNP was also part of the 4 significant SNPs found at chromosomal level for milk yield recovery (kg/d), and was the only one significant at genomic level (Figure 5, B).

Two out of the 3 other SNPs found significant on milk recovery were located at respectively 44.80 and 67.23 Mb on BTA12 and around 116.18 Mb on BTA4. No significant SNP was found for milk yield loss:recovery ratio. Although always less than 10 %, the proportion of genetic variance due to the significant SNPs was higher for milk yield loss (3-wk ODM and ODM d1 in kg/d, and ODM d1in %) than for milk yield recovery (kg/d).

No common SNP was found between 3-wk ODM and ODM d1 milk yield loss, nor between ODM milk yield loss and recovery when switching cows back to TDM. A significant SNP for relative milk yield loss (kg/d) when switching cows to ODM d1 was found at 29.66 Mb on chromosome 24 and a significant SNP for milk yield recovery (kg/d) after resuming TDM was found at 116.18 Mb on chromosome 4.

Table 6. Significant chromosomic regions detected from GWAS for milk yield responses to once-daily milking (first day of once-daily milking, ODM d1; once-daily milking, ODM and week 2 after resuming twice-daily milking, pTDM2).

Chr ¹	Physical position ² (Mb)	SNP max id ³	P value ⁴	Signif. SNP max ⁵	Nb. Signif SNP ⁶		Genetic variance ⁷
					FDR 10 % gen.	Bonferro ni chr.	
Milk yield loss (kg/d) when switching to ODM							
14	1,65	ARS-BFGL-NGS-57820	1.12E-05	*	-	1	0.146
14	1,70	ARS-BFGL-NGS-94706	2.11 ^E -05	*	-	1	0.169
14	1,80	ARS-BFGL-NGS-4939	3.56 ^E -05	**/*	-	1	0.200
Milk yield loss (kg/d) when switching cows to ODM d1							
22	59,84	ARS-BFGL-NGS-59239	2.26E-05	*	-	1	0.136
24	29,66	ARS-BFGL-NGS-81983	3.24E-05	*	-	1	0.115
Relative milk yield loss (%) when switching cows to ODM d1							
12	33,28	ARS-BFGL-NGS-78056	2.67E-05	*	-	1	0.152
22	59,84	ARS-BFGL-NGS-59239	1.80E-05	*	-	1	0.161
Milk yield recovery (kg/d) when switching cows back to TDM (pTDM2)							
4	116,18	ARS-BFGL-NGS-119744	1.28E-05	*	-	1	0.086
12	33,28	ARS-BFGL-NGS-78056	2.60E-06	**/*	1	1	0.092
12	44,80	ARS-BFGL-NGS-39971	1.15E-05	*	-	1	0.078
12	67,23	ARS-BFGL-NGS-21566	9.88E-06	*	-	1	0.072

¹ Chromosome of the corresponding SNP

² Position in Mb where the SNP maximum is reached

³ Id of the SNP maximum

⁴ P value associated with the maximum SNP

⁵ Significance of the signal detected: ** for a genome-wide significance with a FDR of 10 % and * for a chromosome-wise level calculated with a Bonferroni 5 % correction

⁶ Number of the significant SNPs contributing to the peak calculated either with a genome-wise FDR 10 % or a chromosome-wise Bonferroni 5 %

⁷ Proportion of genetic variance of the trait explained by the maximum SNP, calculated as $2pqa^2$

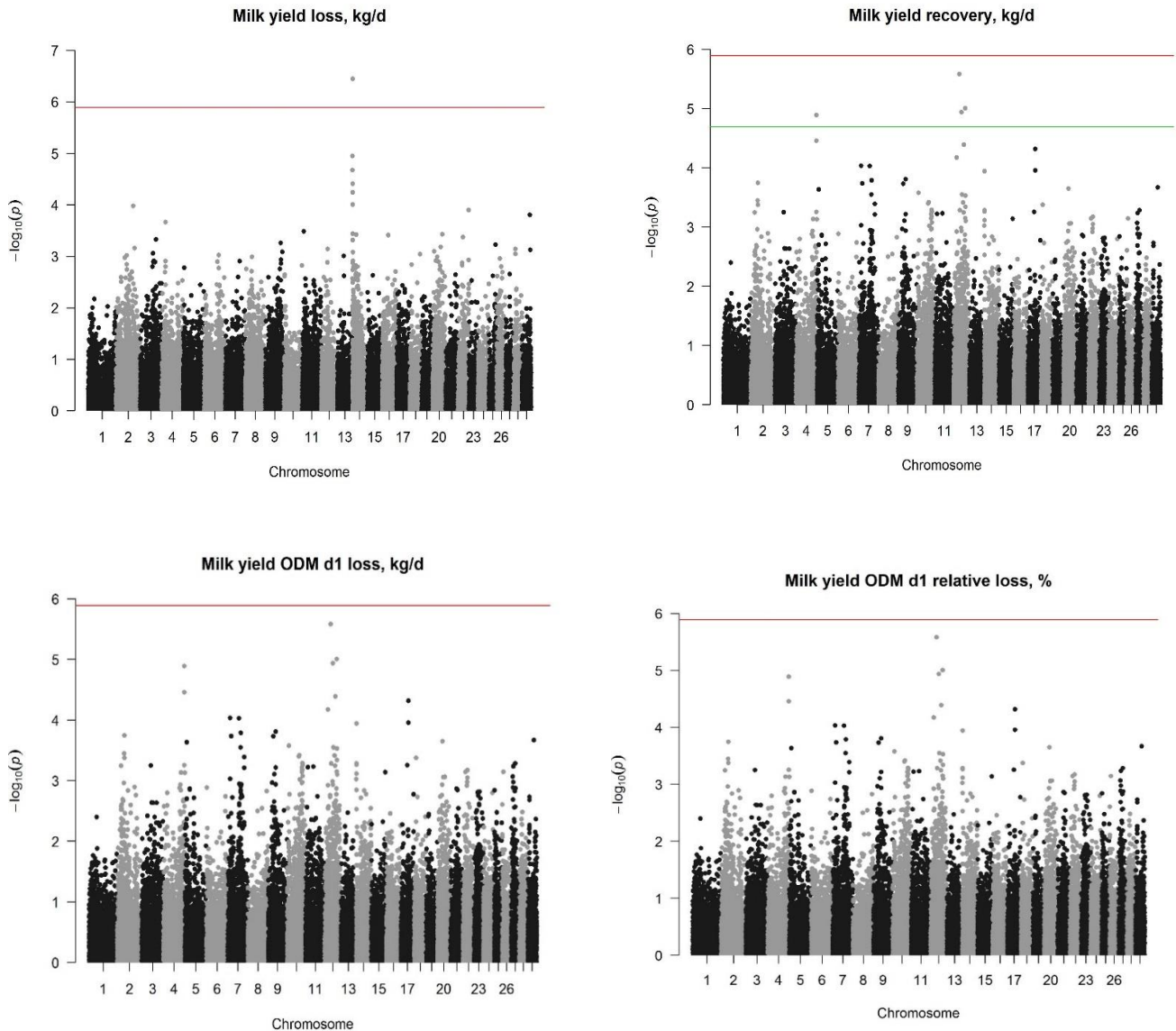


Figure 5. Genome-wide manhattan plot of the SNPs for milk yield responses to 3-wk ODM (milk yield loss kg/d (A) and milk yield recovery (kg/d), (B) and ODM d1 (milk yield ODM d1 loss, kg/d, (C) and milk yield ODM d1 relative loss, %, (D) These plots show the combined association signals ($-\log_{10}(P)$ value) on the y axis versus SNPs positions in the cow genome on the x axis. Red lines represent the 5% genome-wide Bonferroni 5 % threshold and the green line represents the genome-wide FDR 10 % threshold (only significant on milk yield recovery (kg/d). Manhattan plot were computed using R package qqman (Turner, 2014).

DISCUSSION

In this study, we report the results of a genome-wide association study on milk production traits and milk yield responses to a 3-wk ODM on 422 crossbred Holstein x Normande cows. QTL regions were located for milk yield, milk fat, protein and lactose contents and milk yield responses to ODM traits, but not for milk SCS. Moreover, those significant SNPs were located on relatively few genomic regions. This could result from the small number of cows taking part in this experiment. Indeed, simulations demonstrated that the INRA QTL detection program was powerful to detect QTL with moderate substitution effect (0.3 phenotypic standard deviation) when fixed within breed, and QTL with higher substitution effect when not fixed within breed (Larroque et al., 2002). However, all

animals included in the INRA QTL detection program weren't used in the present study so that size of families wasn't preserved, which certainly decreased the QTL detection power.

Here, QTL detection was performed within trait over time to compare their evolution between experimental periods, cTDM, ODM, and pTDM2. Most SNPs detected were significant for one trait over one period only and SNPs detected in each of the 3 experimental periods were limited. The latest concerned mainly the 2 chromosomes: BTA14 for milk yield and milk fat and protein content (detailed in Figures 2, 3 and 4) and also for milk yield loss (kg/d), and BTA6 for milk lactose content (detailed in Figure 5).

Milk yield and composition levels across experimental periods

BTA14 QTL region. On BTA14, 2 chromosomal regions have been highlighted: the first being centered around 1.80 Mb, the second around 16.09 Mb. The centromeric region of BTA14, where these 3 regions were located, has already been reported to contain a wide concentration of QTL related to milk yield and composition traits (Ogorevc et al., 2009; Jiang et al., 2010), especially milk fat content. In this sense, this finding confirms the power of the QTL detection performed in this study. In more details, this chromosomal region has already been extensively described in the literature for its large effects on milk fat content, but also on milk yield, milk protein and fat yield and milk protein content (Winter et al., 2002; Grisart et al., 2002, 2004). This region contains the diacylglycerol acyl transferase 1 (DGAT1) gene that plays key role in triglyceride synthesis as it catalyzes the fixation of the 3rd fatty acid on glycerol. The 2 SNPs that were found here most significant on the milk yield, milk protein and fat content traits, ARS-BFGL-NGS-4939 and ARS-BFGL-NGS-57820 were already reported by several authors to be located close to the DGAT1 region, ARS-BFGL-NGS-4939 being even located in the DGAT1 gene (Salem et al., 1998; Jiang et al., 2010; Yang et al., 2014; Fang et al., 2014). Grisart et al. (2002) and Winter et al. (2002) identified a substitution of a lysine residue by an alanine residue on position 232 of this DGAT1 gene and hypothesized that this K232A polymorphism was the causal mutation explaining the QTL effect. However, since this discovery, some other authors hypothesized that the major QTL effect observed at the centromeric region of BTA14 is not solely due to the K232A polymorphism, and that some other genes could also be implicated in these responses. In particular, despite the very low frequency of K232A in French breeds Montbéliarde and Normande, Sanchez et al. (2016) found a major QTL effect on BTA14, meaning that another polymorphism might be implicated. Bennewitz et al. (2004) also concluded to the existence of possible epistatic effects on the same traits (milk yield, fat and protein content) arising from another QTL in linkage with the DGAT1 gene. In addition to the DGAT1 gene, Kaupe et al. (2007) identified another gene located in this genomic region, CYP11B1 at 1.33 Mbp, having a significant effect on milk yield traits.

BTA6 QTL region. The second chromosomal region with a high effect in this study was located on BTA6 and concerned only milk lactose content. It was centered on the SNP Hapmap24324-BTC-062449, located around 37.63 Mb on BTA6. This genomic region was found here to explain as much as 50.2 % of the genetic variance of milk lactose content during ODM. This region had already been reported for having containing a major QTL on milk protein content, particularly on α_{S1} -casein in both Chinese and French Holstein cows, and in Normande and Montbéliarde French breeds (Jiang et al., 2010; Fang et al., 2014; Boichard et al., 2014; Sanchez et al., 2016). Boichard et al. (2014) estimated that this effect was stronger in Holstein than in Normande and Montbéliarde cows (with respectively 30, 10, and 7 % of the variability explained of α_{S1} -casein content in protein yield). Moreover, the SNP the more significant for this region is located around 46 Mb in Normande and Montbéliarde breed instead of 37 Mb in Holstein breed, so that it is possible that this QTL effect is due to 2 different genetic mutations between those breeds (Boichard et al., 2014). In Norwegian dairy cattle, a version of the haplotype covering BTA6 positions 29 to 45 cM was also found to be associated with a marked decrease in milk fat and protein contents, whereas it was associated with an only slight increase in milk yield (Olsen et al., 2002). As milk lactose is one of the major osmotic component of milk, these authors hypothesized that this genomic region might contain a gene regulating milk lactose content. Indeed, an increase in milk lactose secretion is likely to induce an increase in milk yield, the fat and protein synthesis being

unaltered and their respective contents being thus decreased. In accordance to this study, although established in another ruminant specie, Silva et al. (2011) found a QTL region affecting milk lactose content around 29.3 cM on the chromosome 6 in Brazilian Gir dairy cattle. Although no obvious candidate gene for milk lactose synthesis was found in this genomic region, 2 genes were previously identified in this chromosomal region at 37 Mb for their effects on milk production traits. Cohen-Zinder et al. (2005) have located a QTL affecting both milk yield and composition and have postulated that this QTL could be due to a missense mutation they have identified for the ABCG2 gene coding for a transmembrane ATP transporter. Boichard et al. (2014) also found an effect of this genomic region on milk protein composition and hypothesized that this QTL effect could be due to the OPN gene, coding for the osteopontin, a protein implicated in calcium regulation.

If the 2 major QTL regions identified here are well described in the literature, their impact on milk lactose content and not on milk protein content on which it had been reported before is rather surprising (Boichard et al., 2014). On the opposite it is also surprising that we didn't find here any effects of the genomic regions already reported in the literature for their influence on lactose content. Indeed, the DGAT1 region located on BTA14 that we found for milk yield and milk fat and protein content has indeed been reported by Bovenhuis et al. (2015) to influence milk lactose content, and in the same genomic region, Sanders et al. (2006) on German Angeln cows also identified a specific allele of the DGAT1 promoter VNTR associated with significant effect on lactose yield and contents traits. Neither were identified in this study any of the genomic regions located on BTA6 (86 Mb), BTA19 (49 Mb), BTA18 (54 Mb), BTA22 (53 Mb) (Cecchinato et al., 2014, Brown Swiss cows) and BTA27 (36 Mb) (Littlejohn et al., 2014, crossbred Holstein × Jersey cows) that were found to influence milk lactose content. We also didn't find any effect on protein content of the genomic region located around 87 Mb on BTA6 that has been shown to have a major effect on milk κ -casein in both Holstein and Normande breeds (Boichard et al., 2014) on milk protein content, but this latter fact might be due to the fact that κ -casein represents only 9.7 % of total milk protein (Walstra et al., 1984).

Other QTL regions. The other QTL regions identified on milk yield and composition traits were observed less consistently over experimental periods than where the 2 major QTL regions identified on BTA6 and BTA14. Two SNPs were also found significant (BTA3, 106.29 Mb) or almost significant (BTA8, 111.77 Mb) on milk yield across the 3 experimental periods, attesting their existence. If the BTA3 genomic region was already reported for a possible influence on milk yield (Ogorevc et al., 2009), we didn't find any candidate gene for BTA3 and BTA8 QTLs in the literature. Some of the other QTL regions were found significant on 1 experimental period only (ODM : milk protein content (BTA17), pTDM2 : milk fat content (BTA17, BTA19), but some QTL regions were also found consistent between cTDM and pTDM2 (milk lactose content, BTA26) or between cTDM and ODM (milk fat content, BTA24, milk protein content, BTA20). The inconsistency in the observation of these QTL over experimental periods might either reflect that the change in experimental periods induced a disappearance or appearance of some QTL regions or simply indicate that these QTL effects were too limited to be identified during every experimental periods.

Milk yield responses to a 3-wk ODM

The second objective of this study was to determine which genomic regions were implicated in milk yield responses to ODM and whether some regions had an influence in both milk yield responses and milk yield and composition levels during either ODM or TDM. Milk yield loss (kg/d) was found significantly influenced by one genomic region only, the genomic region on BTA14 associated with DGAT1 gene. This QTL region was not detected on milk relative loss (%), but was found having a significant effect on cTDM milk yield. This indicates that the detection of this QTL on milk yield loss might rather be an indirect effect of milk yield than a specific DGAT1 effect on milk yield loss when switching cows to ODM. Indeed, as shown in the previous study established on this dataset, the milk yield loss level (kg/d) was highly genetically correlated ($r=-0.69$) with initial cTDM milk yield.

No common QTL was found between milk yield loss (kg/d) and milk yield recovery (kg/d), so that the genetic control of those 2 milk yield responses might be located in different genomic regions. Moreover, no QTL was detected on milk yield recovery:loss ratio, meaning that this study didn't allow to find any genomic region influencing the ability of the dairy cow to recover the milk yield they had lost. However, this might also be due the fact that milk yield recovery:loss ratio is calculate as the ratio of two traits (milk yield loss in kg/d and milk yield recovery in kg/d) that are strongly negatively correlated (-0.84). Although we might have identified here a QTL that might be related to milk lactose metabolism, this major QTL effect wasn't found significant in any of the milk yield responses to ODM. More generally, it is worth mentioning that only the BTA14 genomic region (1.65 to 1.80 Mb) was found common between genomic regions identified on milk yield and composition levels and milk responses to ODM, so that the genomic regions controlling these 2 types of traits might be at least partly different. Possible implication for that fact is the current selection performed on milk yield traits doesn't fully allow selecting efficiently animals able to tolerate ODM.

Representability of ODM d1 on 3-wk ODM

Finally, the last objective in this study was to determine whether ODM d1 milk yield and composition levels and ODM d1 milk yield losses (kg/d and %) shared the same genomic regions of influence as ODM levels and milk yield responses.

Milk yield and composition level. Given the high genetic correlations observed between a 3-wk ODM and ODM d1 milk yield and composition traits (observed in previous study) finding common QTL regions between those traits was expected. However, no QTL region were detected on d1 of ODM for milk yield and milk fat content at a genome-wise level, and only the BTA14 and BTA6 major effects were detected on d1 and 3-wk ODM for milk protein and milk lactose contents, respectively. The consistency in the QTL regions detected during 3-wk and ODM d1 for milk protein content is in accordance with the 0.99 genetic correlation between protein content on ODM and on ODM d1. In case of the lactose content, although the genetic correlation between a 3-wk ODM and ODM d1 wasn't high ($r = 0.37$), the QTL having a major effect on milk lactose content was found during both periods, probably due to its very high effect.

Milk yield responses. One genomic region located on BTA22 was found common between absolute (kg/d) and relative (%) ODM d1 milk yield losses, so that these responses might share a common genetic control, but no obvious candidate gene for this locus was noticed, nor has been to our knowledge this region reported in the literature. No QTL region was found common between 3-wk ODM loss and ODM d1 losses (kg/d and %) despite the 1.00 genetic correlation observed previously between them. However, one QTL region located around 33.28 Mb on BTA12 and that has been reported to be possibly linked with milk yield, fat and protein yield and protein percentage (Ogorevc et al., 2009) was found common between milk yield relative loss (%) on d1 of ODM and milk yield recovery (kg/d). This might indicates that the proportion of milk lost during the first 24h of ODM is partly under the control of the same genomic regions as the amount (kg/d) of milk recovered when cows resume TDM.

Based on these QTL detection results on milk yield and composition levels and milk yield responses during ODM d1, it is difficult to draw any definite conclusion about whether or not the genomic regions implicated on ODM d1 are identical to the genomic regions observed in case of a 3-wk ODM period. The absence of common genomic regions identified between 3-wk ODM and ODM d1 traits might be either due to the fact that the determinism of these traits is essentially under polygenic control (no major gene implicated in these traits) or to the QTL detection design used in this study (small number of observations or small allelic difference between the breeds used).

CONCLUSIONS

This study constitutes a first step in scanning the genome for identifying regions implicated in milk yield and composition levels during ODM and milk yield responses to ODM. The small amount of data

used in this study is likely to have reduced the power of detection, so that mainly major QTL (as confirmed by DGAT1) were detected. The existence of specific regions on the genome implicated in the regulation of cows' responses to ODM is probable as different QTL regions were found according to different milking frequencies, and as milk yield responses to ODM were influenced by other QTL regions than milk yield and composition levels were. This study didn't allow to clearly determine whether genomic regions implicated in milk yield and composition levels and milk yield responses during ODM d1 were similar to the genomic regions implicated in a 3-wk ODM period. Finally, even if studying the genetic control of milk lactose content of dairy cows wasn't the aim of this study, a new QTL that hasn't been reported until now was found affecting milk lactose content. Understanding this result, eventually identifying a candidate gene for this QTL, would require further analysis.

REFERENCES

- Bennewitz, J., N. Reinsch, S. Paul, C. Looft, B. Kaupe, C. Weimann, G. Erhardt, G. Thaller, C. Kühn, M. Schwerin, H. Thomsen, F. Reinhardt, R. Reents, and E. Kalm. 2004. The DGAT1 K232A Mutation Is Not Solely Responsible for the Milk Production Quantitative Trait Locus on the Bovine Chromosome 14. *J. Dairy Sci.* 87:431–442. doi:10.3168/jds.S0022-0302(04)73182-3.
- Boichard, D., A. Govignon-Gion, H. Larroque, C. Maroteau, I. Palhière, G. Tosser-Klopp, R. Rupp, M.-P. Sanchez, and M. Brochard. 2014. Déterminisme génétique de la composition en acides gras et protéines du lait des ruminants, et potentialités de sélection. *INRA Prod. Anim.* 27:283–298.
- Bovenhuis, H., M.H.P.W. Visker, H.J.F. van Valenberg, A.J. Buitenhuis, and J.A.M. van Arendonk. 2015. Effects of the DGAT1 polymorphism on test-day milk production traits throughout lactation. *J. Dairy Sci.* 98:6572–82. doi:10.3168/jds.2015-9564.
- Cecchinato, A., C. Ribeca, S. Chessa, C. Cipolat-Gotet, F. Maretto, J. Casellas, and G. Bittante. 2014. Candidate gene association analysis for milk yield, composition, urea nitrogen and somatic cell scores in Brown Swiss cows. *Animal.* 8:1062–70. doi:10.1017/S1751731114001098.
- Claesson, O., A. Hansson, N. Gustafsson, and E. Brannang. 1959. Once-daily milking compared with twice daily milking. *Acta Agric. Scand.* 9:38–59.
- Cohen-Zinder, M. 2005. Identification of a missense mutation in the bovine ABCG2 gene with a major effect on the QTL on chromosome 6 affecting milk yield and composition in Holstein cattle. *Genome Res.* 15:936–944. doi:10.1101/gr.3806705.
- Davis, S.R., V.C. Farr, and K. Stelwagen. 1999. Regulation of yield loss and milk composition during once-daily milking: a review. *Livest. Prod. Sci.* 59:77–94. doi:10.1016/S0301-6226(98)00204-8.
- Fang, M., W. Fu, D. Jiang, Q. Zhang, D. Sun, X. Ding, and J. Liu. 2014. A Multiple-SNP Approach for Genome-Wide Association Study of Milk Production Traits in Chinese Holstein Cattle. *PLoS One.* 9:e99544. doi:10.1371/journal.pone.0099544.
- Grisart, B., W. Coppieters, F. Farnir, L. Karim, C. Ford, P. Berzi, N. Cambisano, M. Mni, S. Reid, P. Simon, R. Spelman, M. Georges, and R. Snell. 2002. Positional Candidate Cloning of a QTL in Dairy Cattle: Identification of a Missense Mutation in the Bovine DGAT1 Gene with Major Effect on Milk Yield and Composition. *Genome Res.* 12:222–231. doi:10.1101/gr.224202.
- Grisart, B., F. Farnir, L. Karim, N. Cambisano, J.-J. Kim, A. Kvasz, M. Mni, P. Simon, J.-M. Frere, W. Coppieters, and M. Georges. 2004. Genetic and functional confirmation of the causality of the DGAT1 K232A quantitative trait nucleotide in affecting milk yield and composition. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101:2398–2403. doi:10.1073/pnas.0308518100.
- INRA, and J. Agabriel. 2010. Alimentation des bovins, ovins et caprins. Besoins des animaux - Valeur des aliments. Tables INRA 2007, mise à jour 2010. Quae, editor. Versailles, France. 311 pp.
- Jiang, L., J. Liu, D. Sun, P. Ma, X. Ding, Y. Yu, and Q. Zhang. 2010. Genome wide association studies for milk production traits in Chinese Holstein population. *PLoS One.* 5. doi:10.1371/journal.pone.0013661.
- Kaupe, B., H. Brandt, E.-M. Prinzenberg, and G. Erhardt. 2007. Joint analysis of the influence of CYP11B1 and DGAT1 genetic variation on milk production, somatic cell score, conformation, reproduction, and productive lifespan in German Holstein cattle. *J. Anim. Sci.* 85:11. doi:10.2527/jas.2005-753.

- Kay, J.K., C.V.C. Phyn, a G. Rius, S.R. Morgan, T.M. Grala, and J.R. Roche. 2013. Once-daily milking during a feed deficit decreases milk production but improves energy status in early lactating grazing dairy cows. *J. Dairy Sci.* 96:6274–84. doi:10.3168/jds.2012-6167.
- Larroque, H., Y. Gallard, L. Thauinat, D. Boichard, and J.J. Colleau. 2002. A crossbreeding experiment to detect quantitative trait loci in dairy cattle. In 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, 19-23 août 2002. Montpellier, France.
- Lembeye, F., N. Lopez-villalobos, J.L. Burke, and S.R. Davis. 2016. Estimation of genetic parameters for milk traits in cows milked once- or twice-daily in New Zealand. *Livest. Sci.* 185:142–147. doi:10.1016/j.livsci.2016.01.022.
- Littlejohn, M.D., K. Tiplady, T. Lopdell, T.A. Law, A. Scott, C. Harland, R. Sherlock, K. Henty, V. Obolonkin, K. Lehnert, A. MacGibbon, R.J. Spelman, S.R. Davis, and R.G. Snell. 2014. Expression variants of the lipogenic AGPAT6 gene affect diverse milk composition phenotypes in *Bos taurus*. *PLoS One.* 9:1–12. doi:10.1371/journal.pone.0085757.
- Meyer, K. 2007. WOMBAT - A tool for mixed model analyses in quantitative genetics by restricted maximum likelihood (REML). *J Zhejiang Univ Sci B.* 8:815–821. doi:10.1631/jzus.2007.B0815.
- Meyer, K., and B. Tier. 2012. “SNP Snappy”: A strategy for fast genome-wide association studies fitting a full mixed model. *Genetics.* 190:275–277. doi:10.1534/genetics.111.134841.
- Ogorevc, J., T. Kunej, A. Razpet, and P. Dovc. 2009. Database of cattle candidate genes and genetic markers for milk production and mastitis. *Anim. Genet.* 40:832–851. doi:10.1111/j.1365-2052.2009.01921.x.
- Olsen, H.G., L. Gomez-Raya, D.I. Våge, I. Olsaker, H. Klungland, M. Svendsen, T. Adnøy, a Sabry, G. Klemetsdal, N. Schulman, W. Krämer, G. Thaller, K. Rønningen, and S. Lien. 2002. A genome scan for quantitative trait loci affecting milk production in Norwegian dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 85:3124–3130. doi:10.3168/jds.S0022-0302(02)74400-7.
- Rémond, B., and D. Pomiès. 2005. Once-daily milking of dairy cows: a review of recent French experiments. *Anim. Res.* 54:427–442. doi:10.1051/animres.
- Rupp, R., and D. Boichard. 1997. Genetic evaluation of dairy cattle for somatic cell count to improve mastitis resistance. In 4èmes Rencontres autour des Recherches sur les Ruminants Paris, Fr., Dec 1997. Institut l’Elevage; Paris; France. 211–214.
- Salem, M.M.I., G. Thompson, S. Chen, A.B. Pereira, and J. Carvalheira. 1998. Genome-Wide Association Study for Milk-Fat Yield in Portuguese Holstein Cattle. In 10th World Congress of Genetics Applied to Livestock Production. 12–14.
- Sanchez, M.P., A. Govignon-Gion, M. Ferrand, M. Gelé, D. Pourchet, Y. Amigues, S. Fritz, M. Boussaha, A. Capitan, D. Rocha, G. Miranda, P. Martin, M. Brochard, and D. Boichard. 2016. Whole-genome scan to detect quantitative trait loci associated with milk protein composition in 3 French dairy cattle breeds. *J. Dairy Sci.* 99:8203–8215. doi:10.3168/jds.2016-11437.
- Sanders, K., J. Bennowitz, N. Reinsch, G. Thaller, E.-M. Prinzenberg, C. Kühn, and E. Kalm. 2006. Characterization of the DGAT1 mutations and the CSN1S1 promoter in the German Angeln dairy cattle population. *J. Dairy Sci.* 89:3164–3174. doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72590-5.
- Silva, A.A., A.L.S. Azevedo, K. Gasparini, R.S. Verneque, M.G.C.D. Peixoto, B.R. Panetto, S.E.F. Guimarães, and M.A. Machado. 2011. Quantitative trait loci affecting lactose and total solids on chromosome 6 in Brazilian gir dairy cattle. *Genet. Mol. Res.* 10:3817–3827. doi:10.4238/2011.October.31.15.
- Stelwagen, K., C.V.C. Phyn, S.R. Davis, J. Guinard-Flament, D. Pomiès, J.R. Roche, and J.K. Kay. 2013. Invited review: reduced milking frequency: milk production and management implications. *J. Dairy Sci.* 96:3401–13. doi:10.3168/jds.2012-6074.
- Stelwagen, K., I. Politis, J.H. White, B. Zavizion, C.G. Prosser, S.R. Davis, and V.C. Farr. 1994. Effect of milking frequency and somatotropin on the activity of plasminogen activator, plasminogen, and plasmin in bovine milk. *J. Dairy Sci.* 77:3577–3583. doi:10.3168/jds.S0022-0302(94)77301-X.
- Turner, S.D. 2014. qqman: an R package for visualizing GWAS results using Q-Q and manhattan plots. 81. 559-575 pp.
- Walstra, P., R. Jenness, and H.T. Badings. 1984. Dairy chemistry and physics. Wiley. 467 pp.
- Winter, A., W. Krämer, F. a O. Werner, S. Kollers, S. Kata, G. Durstewitz, J. Buitkamp, J.E. Womack, G. Thaller, and R. Fries. 2002. Association of a lysine-232/alanine polymorphism in a bovine gene encoding acyl-

CoA:diacylglycerol acyltransferase (DGAT1) with variation at a quantitative trait locus for milk fat content. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99:9300–9305. doi:10.1073/pnas.142293799.

Yang, S., C. Qi, Y. Xie, X. Cui, Y. Gao, J. Jiang, L. Jiang, S. Zhang, Q. ZHANG, and D. SUN. 2014. A post-GWAS replication study confirming the association of C1 4H8orf33 gene with milk production traits in dairy cattle. Front. Agric. Sci. Eng. 1:321. doi:10.15302/J-FASE-2014037.

3. Profils adaptatifs des réponses à trois semaines de monotraite

La dernière étape de cette étude a consisté à discriminer les réponses de la glande mammaire des vaches laitières selon des profils adaptatifs différents et à caractériser ces profils de réponse. Il s'agissait ainsi de déterminer si les deux phénotypes décrits précédemment modulaient ces profils de réponse. Pour mener à bien cette étude, une **analyse en composantes principales (ACP)** suivie d'un clustering a été réalisée à l'aide du package FactoMineR du logiciel R. L'ACP avait pour objectif de discriminer les différents types d'association entre les variations de production laitière.

a- Matériel et méthodes

L'ACP a été construite sur les sept variables suivantes (définies dans les articles 3 et 4) : la production laitière initiale (cTDM, kg/j), les pertes absolues et relatives de production laitière au premier jour de monotraite (ODM d1, kg/j et %), les pertes absolues et relatives moyennes des trois semaines de monotraite (ODM, kg/j et %) et les gains ainsi que le taux de récupération de production laitière au retour à deux traites par jour sur la période pTDM2.

L'ACP a été réalisée sur 406 des 430 vaches ayant été passées en monotraite : 21 vaches pour lesquelles le taux de récupération n'avait pas été calculé (pertes au passage en monotraite supérieures à zéro ou gain au retour à deux traites par jour inférieur à zéro), deux vaches pour lesquelles les pertes de production laitière à J1 n'étaient pas disponibles ($n = 2$), et une vache dont le taux de récupération de 600 % constituait une valeur aberrante ont été supprimées du jeu de données. Les clusters ont été caractérisés par des facteurs environnementaux et par des phénotypes. L'influence des facteurs environnementaux et des phénotypes qualitatifs a été déterminée par un test exact de Fisher (considérés comme significatifs à $P < 0,005$). Le modèle linéaire suivant a été utilisé pour déterminer l'influence des facteurs environnementaux et des phénotypes quantitatifs :

$$Y_m = \mu + cluster_m + \varepsilon_m$$

où Y_m est le caractère considéré, μ est la moyenne, l'effet fixe du cluster est m et ε_m est l'erreur résiduelle associée à chaque observation m . Les résultats de ces modèles sont présentés sous forme de lsmeans.

Résultats et discussion

Les quatre premières dimensions de l'ACP expliquaient 98,3 % de la variabilité des données (53,2 %, 22,7 %, 13,4 % et 9,0 % pour les dimensions 1, 2, 3 et 4, respectivement). Toutes les valeurs de pertes de lait étant négatives, la dimension 1 opposait les vaches ayant des pertes et des récupérations (kg/j) élevées aux vaches ayant des pertes et des récupérations de production laitière faibles (**Figure 1 A**). Les

Partie 2 : Caractérisation des réponses à trois semaines de monotraite, étude du déterminisme génétique et de la représentativité du premier intervalle de 24 h

variables les plus fortement contributrices à la dimension 2 étaient le taux de récupération (%) et la quantité de lait regagnée (kg/j). Le niveau initial de production laitière (cTDM) était la variable la plus fortement contributrice à la dimension 3 (**Figure 1 B**). La dimension 4 était quant à elle plus faiblement expliquée par les variables constitutives de l'ACP.

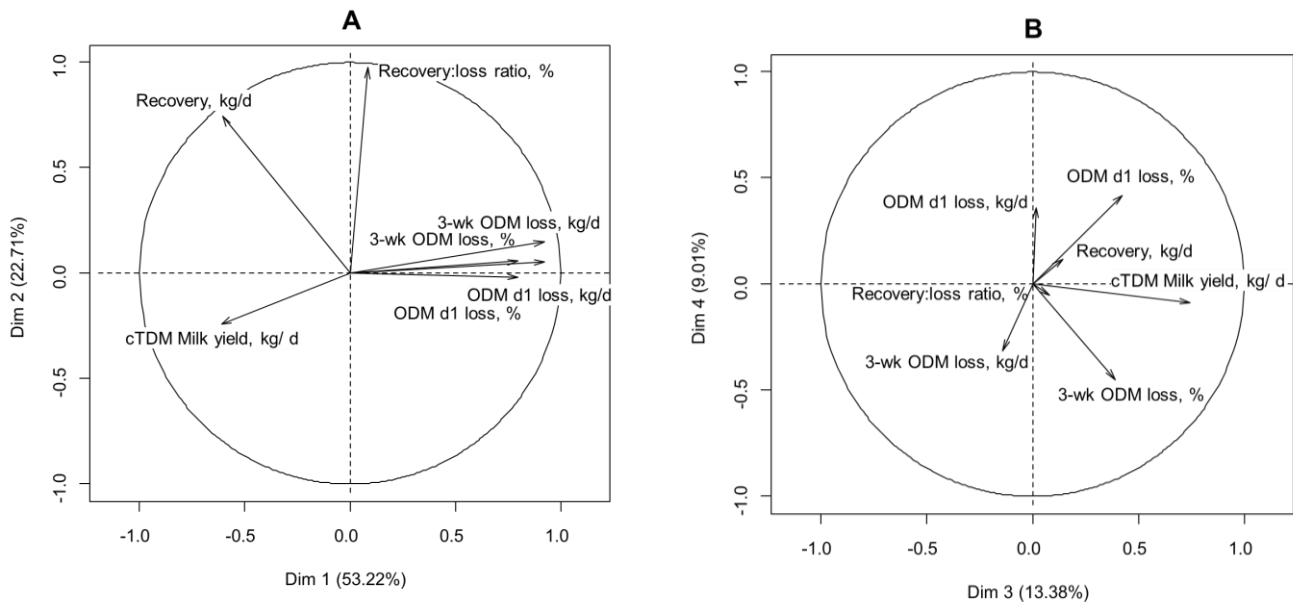


Figure 1. Cercle des corrélations de l'ACP dans le plan des composantes 1 et 2 (A) et des composantes 3 et 4 (B).

Le clustering a conduit à l'identification de quatre profils basés sur les réponses de production laitière à la monotraite (**Tableau 1** et **Figure 2**). Les effectifs des clusters 1 à 3 étaient comparables (entre 116 et 121 individus), tandis que le cluster 4 comptabilisait 52 vaches seulement.

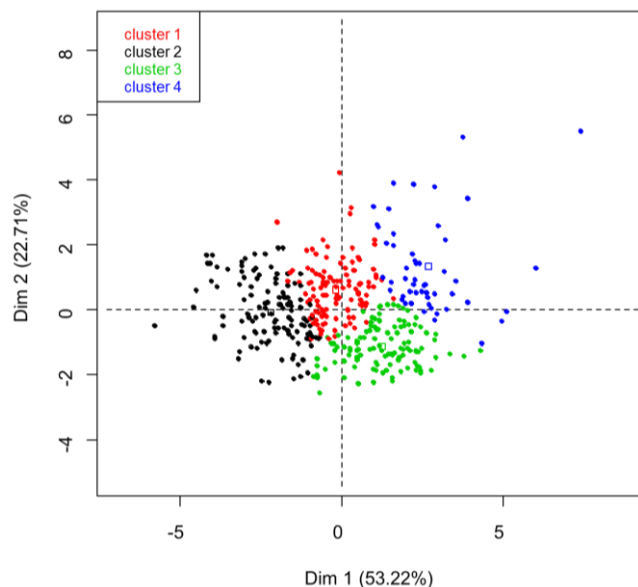


Figure 2. Clusters obtenus à partir de la classification hiérarchique réalisée sur les résultats de l'ACP.

Tableau 1. Caractéristiques des groupes de profils de réponse de production laitière à une période de monotraite de trois semaines. Les résultats sont présentés sous la forme valeurs moyennes calculées par la méthode des moindres carrés \pm l'erreur type de la moyenne pour les caractères quantitatifs et sont les résultats d'un test exact de Fisher pour les caractères qualitatifs.

	Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3	Cluster 4
Nombre d'observations	116	121	117	52
<i>Variables de construction de l'ACP</i>				
Production laitière initiale, kg/j	26.2 \pm 0.41 ^b	32.6 \pm 0.40 ^a	27.2 \pm 0.41 ^b	22.6 \pm 0.61 ^c
Pertes absolues à J1, kg/j	-7.9 \pm 0.20 ^c	-11.6 \pm 0.20 ^d	-6.0 \pm 0.20 ^b	-3.4 \pm 0.30 ^a
Pertes relatives à J1, %	-30.7 \pm 0.79 ^c	-36.0 \pm 0.77 ^d	-22.1 \pm 0.78 ^b	-14.5 \pm 1.17 ^a
Pertes absolues, kg/j	-7.6 \pm 0.14 ^c	-11.1 \pm 0.14 ^d	-6.4 \pm 0.14 ^b	-4.1 \pm 0.21 ^a
Pertes relatives, %	-29.4 \pm 0.48 ^c	-34.3 \pm 0.47 ^d	-23.8 \pm 0.48 ^b	-18.5 \pm 0.72 ^a
Récupération absolue, kg/j	5.2 \pm 0.16 ^b	5.7 \pm 0.15 ^a	1.7 \pm 0.16 ^d	3.8 \pm 0.23 ^c
Taux de recuperation, %	69.2 \pm 2.30 ^b	51.9 \pm 2.25 ^c	27.1 \pm 2.29 ^d	97.2 \pm 3.44 ^a
<i>Facteurs environnementaux</i>				
Stade de lactation (j)¹	84 \pm 1.2 ^{ab}	81 \pm 1.2 ^b	86 \pm 1.2 ^a	83 \pm 1.8 ^{ab}
Parité (% vaches en 2^{ème} lactation vs 3^{ème})²	98 ^a	100 ^a	97 ^a	88 ^b
Age au 1^{er} vêlage (% de vêlages 2 ans vs 3)²	57 ^{ab}	51 ^{ab}	46 ^b	67 ^a
<i>Phénotypes mesurés en période de contrôle</i>				
Taux butyreux (g/kg)¹	44.2 \pm 0.52 ^a	40.2 \pm 0.51 ^b	44.0 \pm 0.52 ^a	46.3 \pm 0.78 ^a
Taux protéique (g/kg)¹	31.6 \pm 0.21 ^b	30.4 \pm 0.20 ^c	32.3 \pm 0.21 ^{ab}	32.8 \pm 0.31 ^a
Taux de lactose (g/L)¹	49.2 \pm 0.19 ^{ab}	49.0 \pm 0.19 ^b	49.7 \pm 0.19 ^a	48.9 \pm 0.28 ^{ab}
Comptages cellulaires, x1000 cells/mL¹	202 \pm 30.0 ^a	170 \pm 29.3 ^a	119 \pm 29.8 ^a	206 \pm 44.8 ^a
SCS, unités¹	2.79 \pm 0.164 ^a	2.46 \pm 0.161 ^{ab}	2.10 \pm 0.163 ^b	2.26 \pm 0.245 ^{ab}
Débit moyen d'émission du lait (kg/min)¹	2.79 \pm 0.125 ^{ab}	3.14 \pm 0.134 ^a	2.35 \pm 0.127 ^{bc}	2.23 \pm 0.161 ^c
Lactosémie (mg/L)¹	25.9 \pm 1.37 ^a	24.6 \pm 1.40 ^a	25.6 \pm 1.38 ^a	22.9 \pm 1.21 ^a
<i>Phénotypes mesurés au 1^{er} jour de monotraite</i>				
Lactosémie (mg/L)¹	152.9 \pm 16.73 ^b	169.3 \pm 16.46 ^{ab}	226.6 \pm 16.20 ^a	152.5 \pm 24.07 ^{ab}

¹ caractères quantitatifs

² caractères qualitatifs

Les vaches du cluster 2, qui avaient la plus forte production laitière à cTDM, ont eu les pertes (kg/j et %) les plus importantes, mais ont également eu la récupération (kg/j) la plus élevée au retour à deux traites par jour. Elles ont au final récupéré un peu plus de la moitié du lait qu'elles avaient perdu (51,9 % en moyenne). Les vaches du cluster 1 et du cluster 3 avaient des niveaux initiaux de production laitière inférieurs au cluster 2 et peu différents (+1,0 kg/j pour le cluster 3). De manière surprenante, les vaches du cluster 1 ont perdu davantage de lait lors du passage en monotraite que les vaches du cluster 3 (-7,6 kg/j contre -6,4 kg/j) et ont récupéré de manière importante au retour à deux traites par jour (+5,2 kg/j versus +1,7 kg/j). Elles présentaient donc un taux de récupération de lait élevé (69,2 %). A l'inverse, les vaches du cluster 3 se caractérisaient par un très faible taux de récupération : seulement un tiers (27,1 %) du lait perdu. Enfin, les vaches du cluster 4, qui se caractérisaient en période témoin par un niveau plus faible de production laitière que les trois autres clusters (22,6 kg/j, soit 10,0 kg de lait en moins que les vaches du cluster 2) présentaient un taux de récupération élevé de 97,2 %. Leurs pertes de lait étaient

faibles (-4,1 kg/j, soient. de -18,5%). Avec des gains de lait de +3,8 kg/j, ces vaches ont été capables de regagner presque complètement le lait perdu au passage en monotraite.

Les pertes de lait (en kg/j et en %) observées lors des 24 premières heures de monotraite étaient très peu différentes des pertes observées en monotraite, quel que soit le groupe considéré.

Chacun des quatre profils obtenus a ensuite été caractérisé par le stade de lactation, la parité et l'âge au premier vêlage des animaux, les critères de composition du lait, le débit d'émission du lait à la traite et la lactosémie (**Tableau 1**). Le stade de lactation moyen et la proportion de vaches en deuxième lactation ne différaient pas d'un cluster à l'autre. Il en est de même pour la lactosémie mesurée en période de contrôle. En revanche, le cluster 3 comportait une proportion plus faible de vêlages précoces à deux ans que le cluster 4 (-21 %).

Les vaches du cluster 2 associaient la production d'un lait moins concentré (taux butyreux, taux protéique et taux de lactose plus faible) que celui des autres groupes à un débit d'émission du lait plus élevé, observations qui pourraient découler de leur plus forte production laitière initiale.

Les vaches des clusters 1 et 3 avaient en moyenne des taux butyreux, protéiques et de lactose comparables. Les vaches du cluster 1, qui ont perdu davantage de lait lors du passage en monotraite que les vaches du cluster 3, avaient un débit initial d'émission du lait à la traite numériquement supérieur (de +0,44 kg/min par rapport au débit du cluster 3) alors qu'elles produisaient 1,0 kg de lait en moins par jour. Elles se différenciaient également des vaches du cluster 3 par des SCS plus élevés durant la période de contrôle. Enfin, les vaches du cluster 3, qui se caractérisaient par leur faible taux de récupération, présentaient une augmentation plus forte du taux de lactose sanguin au premier jour de monotraite.

Par rapport aux autres clusters, les vaches du cluster 4, qui se caractérisaient par un niveau initial de production laitière plus faible et par la proportion de lait perdu la plus faible, présentaient en moyenne les plus forts taux butyreux et protéiques, mais un taux de lactose du lait inférieur et plus variable. Ces vaches étaient également caractérisées par leur faible débit d'émission du lait durant la période témoin et par une lactosémie au premier jour de monotraite la plus faible avec les vaches du cluster 1.

Discussion générale

Aujourd'hui, compte tenu du contexte instable auquel font face les exploitations bovines laitières, le pilotage du système est devenu un élément clé pour garantir la pérennité des élevages. Au sein de ces exploitations, la vache laitière est une des composantes essentielles du système. Sa capacité à s'adapter à son environnement et à ses changements (climat, disponibilité de la ressource alimentaire, pression sanitaire, pratiques de gestion du troupeau...) est déterminante pour assurer, à l'échelle supérieure, la durabilité du système d'élevage.

Néanmoins, nous avons constaté que la compréhension et l'estimation des capacités adaptatives des organismes tels que les animaux d'élevage est encore limitée en raison d'un manque de connaissances exhaustives sur l'adaptabilité des fonctions biologiques de l'animal et sur les compromis régissant l'interaction entre ces fonctions. Obtenir une meilleure compréhension de l'adaptabilité de la fonction de lactation, fonction clé chez la vache laitière, peut constituer une contribution importante à l'évaluation de l'adaptabilité de la vache. Pour cela, il paraît pertinent d'évaluer les capacités adaptatives de la glande mammaire, organe assurant la fonction de lactation. Aussi, le présent travail de thèse avait deux objectifs :

Caractériser l'adaptabilité de la glande mammaire des vaches laitières en décrivant la diversité interindividuelles des réponses adaptatives

Contribuer à expliquer, voire prédire l'adaptabilité de la glande mammaire à l'aide d'indicateurs phénotypiques et génétiques

Il visait à répondre aux questions de recherche suivantes :

- Quelles sont les bornes du domaine d'adaptabilité de la glande mammaire ?
- Est-il possible de discriminer différents profils adaptatifs de cet organe ?
- Si des profils adaptatifs existent, est-il possible de les expliquer voire de les prédire à l'aide d'indicateurs phénotypiques ou génétiques ?

Pour y parvenir, nous avons mis en place deux expérimentations qui visaient à perturber le fonctionnement de la glande mammaire. Nous avons choisi l'allongement de l'intervalle entre traites à 24 h comme modèle de perturbation selon deux modalités : un allongement ponctuel (intervalle unique de 24 h) ou répété (monotraite).

Dans cette discussion générale, nous analyserons le domaine de validité des résultats obtenus. Tout d'abord, nous préciserons les profils adaptatifs de la glande mammaire observés en réponse aux deux modalités de perturbation testées et discuterons la pertinence du choix de ces modèles. Nous aborderons ensuite les phénotypes et la place de la composante génétique contribuant à décrire et expliquer les profils adaptatifs.

Au début de chaque chapitre de la discussion générale, un encadré précisera les questions méthodologiques ou scientifiques abordées. Les résultats de ce travail qui ont une application pratique pour les éleveurs qui utilisent ou souhaitent utiliser la monotraite, seront présentés sous la forme d'un encadré « En pratique ! ».

Partie 1 : Mise en évidence de différents profils adaptatifs de la glande mammaire

Les questions auxquelles cette partie de la discussion va répondre sont les suivantes :

L'allongement de l'intervalle entre traites est-il un modèle de perturbation pertinent pour étudier l'adaptabilité de la glande mammaire ?

Permet-il de discriminer les deux composantes de l'adaptabilité (résistance et résilience) et de définir des profils type de réponse ?

Les réponses avec un intervalle unique de 24 h sont-elles représentatives des réponses à trois semaines de monotraite ?

La glande mammaire est-elle un système déformable de type élastique, flexible, plastique ?

1. L'allongement de l'intervalle entre traites de 24 h est-il un modèle de perturbation pertinent pour étudier l'adaptabilité de la glande mammaire ?

Pour répondre aux objectifs de la thèse, le modèle de perturbation devait remplir un certain nombre de conditions, notamment créer une déformation importante, rapide et réversible du système « glande mammaire » pour décrire l'espace des réponses adaptatives et caractériser la résistance et la résilience du système « glande mammaire ». Il devait aussi être associé à une variabilité interindividuelle pour décrire le registre individuel des réponses adaptatives possibles.

Ces conditions ont été remplies. En effet, les deux modalités de l'allongement de l'intervalle entre traites ont généré une déformation conséquente de la glande mammaire. Les pertes moyennes de lait étaient de 21 % pour un intervalle unique de 24 h et de 28 % pour la monotraite. Au retour à deux traites par jour, la quantité de lait produite a augmenté à nouveau pour revenir, ou pas, selon les cas, au niveau initial de production laitière. La déformation observée était extrêmement variable d'un individu à l'autre, puisque le coefficient de variation associé aux pertes de lait relatives était de 54 % lors d'un intervalle unique et de 37 % pour la monotraite. Cette variabilité était visible non seulement sur la résistance du système, mais aussi sur sa résilience étant donné que les gains de production laitière au retour à deux traites par jour étaient eux aussi très variables (CV de 40 % et de 75 % pour le taux de récupération suite à l'intervalle unique de 24 h et la monotraite, respectivement). Ainsi les deux modalités de perturbation

ont aussi permis de discriminer les individus sur les deux composantes de l'adaptation, la résistance et la résilience.

2. L'allongement de l'intervalle de traite permet-il de discriminer des profils types de réponse ?

Afin de décrire au mieux l'adaptation de la glande mammaire, une analyse en composante principale (ACP) suivie d'un clustering a été réalisée sur la base de cinq variables (le niveau initial de production laitière, les pertes de lait en kg/j et en %, les gains de lait en kg/j et le taux de récupération). L'ACP a été réalisée sur les valeurs moyennes calculées en périodes pré- et post-expérimentales et expérimentales (omission de la traite). La prise en compte du niveau initial de production laitière a permis de positionner les clusters les uns par rapport aux autres, et les différents clusters obtenus ont été caractérisés par les facteurs environnementaux (stade physiologique et phénotypes). L'ACP a permis de prendre en compte les deux composantes de la réponse adaptative, la résistance et la résilience. Ultérieurement dans la discussion, deux critères ont été privilégiés pour les analyser : la perte de lait relative (en pourcents) pour la résistance et le taux de récupération en lait (en pourcents) pour la résilience car ces deux critères sont indépendants de la production laitière initiale (Guinard-Flament et al., 2011a).

L'ACP a permis d'identifier quatre types de profils adaptatifs différents. Le fait que l'ACP ait permis de regrouper les réponses individuelles dans des profils type de réponse signifie que la répartition des réponses des individus à l'allongement de l'intervalle entre traites n'était pas homogène dans l'espace des réponses et que cette perturbation était bien pertinente pour regrouper les réponses adaptatives des individus dans des profils type de réponse.

Toutefois, en travaillant sur des données résumant les pertes ou les gains, l'ACP n'a pas permis d'analyser la dynamique de réponse au cours du temps. Il aurait été intéressant catégoriser les formes de courbes de réponse de la lactation, en utilisant par exemple le package KmL développé sous R (Genolini C et Falissard B, KmL : A Package To Cluster Longitudinal Data). Ce genre d'approche aurait permis d'identifier des évolutions spécifiques en se basant soit sur les valeurs journalières, soit sur des valeurs de production laitière en relatif par rapport au niveau de départ. Des évolutions spécifiques auraient pu être caractérisées comme la rapidité de réponse (exemple de la vitesse avec laquelle les vaches récupèrent en lait lors du retour à deux traites par jour), qui aurait apporté une information complémentaire par rapport aux analyses sur des variables statiques.

3. Les mêmes types de profils adaptatifs sont-ils observés selon les deux modalités de perturbation testées : intervalle de 24 h unique ou répété ?

Le nombre de profils observés ici est limité : au maximum quatre profils. Nous pouvons nous interroger sur l'exhaustivité de ces profils de réponse et la capacité du dispositif expérimental utilisé dans ce travail à visualiser l'ensemble des types de profils adaptatifs possibles en réponse à l'allongement de l'intervalle entre traites. Le choix d'utiliser une perturbation d'une durée d'une journée ou d'une durée de trois

semaines a été fait d'une part pour décrire les phases aiguë et chronique d'adaptation de la mamelle et d'autre part, parce qu'en moyenne la monotraite de trois semaines était associée à des effets rémanents sur la production de lait au retour à deux traites par jour, effets qui n'étaient pas rapportés pour des périodes d'une journée. Cette durée a en effet été suffisante pour observer des effets rémanents, mais on peut aussi faire l'hypothèse que cette durée de trois semaines a peut-être été insuffisante pour exacerber les discriminations entre les individus et révéler les profils de réponse spécifiques de manière exhaustive. Toutefois, l'observation de ces profils spécifiques a potentiellement aussi été limitée de manière importante, non par les protocoles expérimentaux, mais par le choix de réaliser le clustering sur des variables statiques (évoqué dans le paragraphe précédent).

Il est intéressant de noter que les types de profils observés sont communs entre les deux modalités de perturbation testées. En effet, trois des quatre types de profils adaptatifs sont comparables entre l'intervalle unique de 24 h et la monotraite (**Figures 21 et 22**).

Parmi ces trois profils, on distingue :

- Un **premier type de profil de réponses** composé de **vaches ayant un niveau initial élevé de production laitière, qui perdent beaucoup de lait lors de l'allongement de l'intervalle et qui récupèrent, moyennement à bien, le lait perdu**, cluster 1 pour l'intervalle unique de 24 h et 2 pour les trois semaines de monotraite).
- Les **deuxième et troisième types de profil de réponses** sont constitués par **des vaches qui avaient un niveau initial de production laitière moyen à faible et récupéraient peu, voire pas de lait au retour à deux traites par jour** (cluster 3 pour les 2 modalités d'application de l'allongement de l'intervalle entre traite) ou **récupéraient l'intégralité voire davantage de lait au retour à deux traites par jour** (clusters 2 et 4 pour respectivement un intervalle unique de 24 h et la monotraite). Ces deux derniers profils de réponse ne se distinguent pas sur la variable « pertes de lait ». Les vaches appartenant à ce cluster pouvaient avoir des pertes élevées, moyennes ou faibles.
- En complément à ces trois types de profils, un quatrième **type de profil** a été observé sur les réponses à la monotraite (cluster 2). C'est un profil intermédiaire. Il était composé de **vaches qui perdaient une quantité moyenne de lait au passage en monotraite, et qui récupéraient moyennement le lait perdu**.

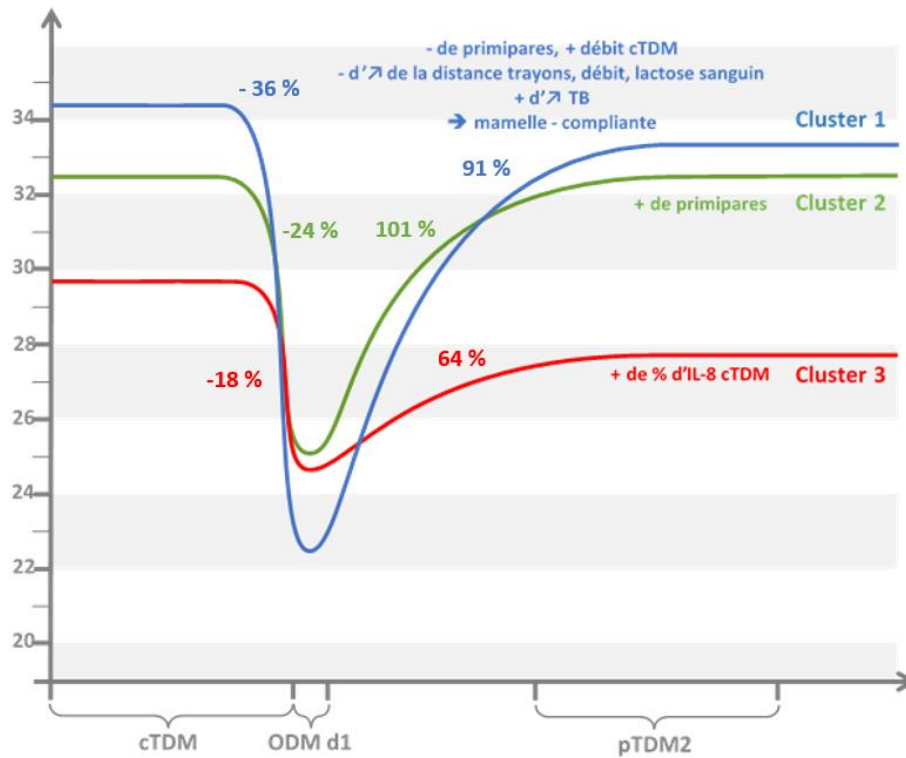


Figure 21. Différents profils adaptatifs observés lors de l'intervalle de traite unique de 24 h. Les chiffres correspondant aux pertes relatives (%) et au taux de récupération (%) sont indiqués pour chaque cluster.

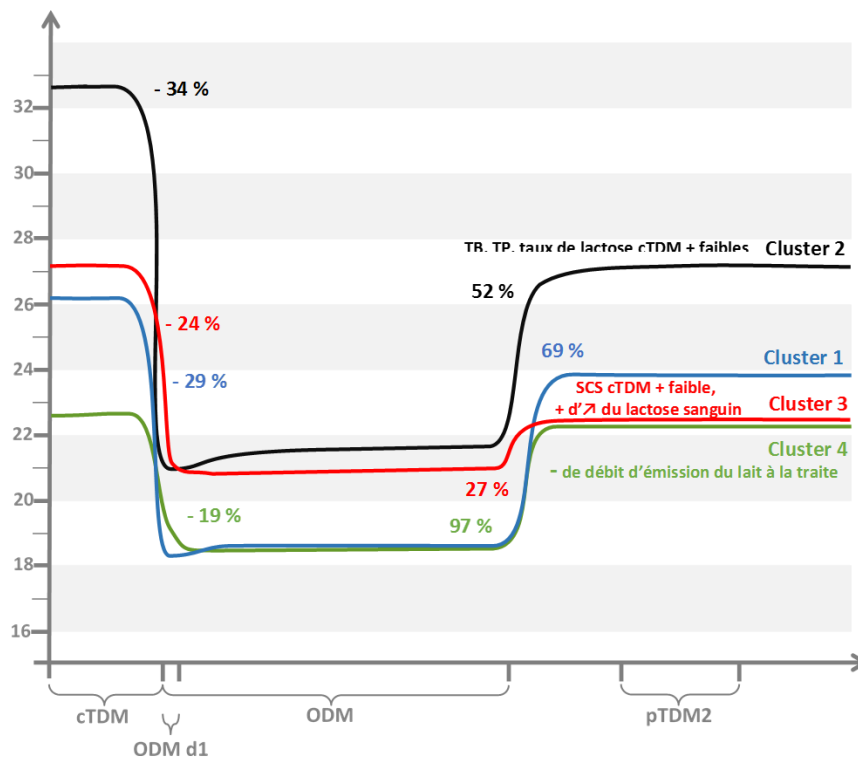


Figure 22. Différents profils adaptatifs observés lors de trois semaines de monotraite. Les chiffres correspondant aux pertes relatives (%) et au taux de récupération (%) sont indiqués pour chaque cluster.

Le premier jour de monotraite a jusqu'à présent été très peu décrit dans les études s'attachant à expliquer les variations de production laitière chez les animaux passés en monotraite, sans doute parce qu'il correspond à une phase particulière de réponse décrite par Davis et al (1999), celle de la phase aiguë d'adaptation à l'allongement de l'intervalle entre les traites. Le fait d'observer les mêmes types de profils adaptatifs en réponse à un intervalle unique de 24 h et la monotraite suggère que la phase aiguë de réponse à l'allongement de l'intervalle entre traites permet en partie de prédire les réponses de la glande mammaire sur une perturbation d'une durée plus longue. C'est sans doute vrai pour le critère « production de lait » (voir **Figure 22** où le premier jour de monotraite présente des réponses très proches des réponses moyennes observées sur trois semaines de monotraite) mais ce constat n'est peut-être pas généralisable à d'autres critères comme la composition du lait, cette composition résultant de l'ajustement entre les régulations de la synthèse des différents composants du lait (matières grasses, matières protéiques, lactose).

4. La glande mammaire est-elle un système déformable de type élastique, flexible ou plastique ?

On peut tenter de qualifier les profils de réponse obtenus selon les grands types d'adaptation définis dans la partie bibliographique de ce mémoire. Dans tous les cas, l'allongement de l'intervalle de traite a généré une déformation de la glande mammaire sur le critère « quantité de lait produit ». Les quatre types de profils de réponses obtenus sont assimilables à la trajectoire de systèmes déformables signifiant que la glande mammaire se comporte comme telle en réponse à l'allongement de l'intervalle entre traites. Ce constat n'est pas surprenant. Il était même attendu, puisque le choix du modèle de perturbation reposait sur la base même de l'existence de cette déformation rapportée par la bibliographie (Davis et al., 1999; Rémond and Pomiès, 2005).

Les systèmes déformables, c'est-à-dire capables de flexibilité, peuvent être caractérisés davantage en précisant s'il s'agit d'une déformation de nature élastique (retour à la normale après la déformation), ou plastique (associée à une transformation du système : la réponse du système sera différente si la perturbation est à nouveau reproduite – la réponse n'est alors pas répétable). Le troisième type de profil de réponse peut être qualifié d'élastique car, pour ce groupe de vaches, les effets de l'allongement de l'intervalle entre traites étaient réversibles après l'arrêt de l'application de la perturbation (Alcaras et Lacroux, 1999; Blanc et al., 2010; Martin et Sauvart, 2010b). En effet, la récupération en lait au retour à deux traites par jour a été totale voire légèrement supérieure à la quantité de lait perdu chez ces animaux. Les trois autres types de profils de réponses observés sont tous *a minima* flexibles dans la mesure où le niveau de production laitière au retour à deux traites par jour est inférieur au niveau initial de production laitière. Néanmoins, leur état final différent pourrait aussi révéler une transformation du système « glande mammaire » liée à la perturbation, c'est-à-dire une trajectoire de réponse qualifiée de plastique. Les deux expérimentations de cette thèse ne permettent pas de déterminer s'il s'agit réellement ou non

de systèmes de type plastique : on ne peut en effet évaluer si l'organisme a développé de nouvelles facultés d'adaptation sous l'effet de la perturbation dans la mesure où la perturbation n'a pas été répétée systématiquement sur l'ensemble des individus pour les deux modalités de perturbation testées. Pour la monotraite, nous avons bien réalisé une répétition (phase 2, données non présentées dans cette thèse), mais celle-ci différait sur la durée d'application (2 semaines de monotraite) et a été appliquée sur une partie seulement des animaux ($n = 110$). Dans la bibliographie, nous avons vu que les effets moyens de la monotraite sur les performances laitières dépendent de la durée pendant laquelle elle est appliquée. La tolérance des animaux à la monotraite pourrait varier en fonction des animaux et de la durée d'application de la monotraite. Aussi nous n'avons pas utilisé cette deuxième phase de monotraite pour déterminer s'il s'agit ou pas d'une transformation. La répétabilité de la résistance et de la résilience à l'intervalle de traite unique de 24 h a bien été étudiée, mais de manière séparée pour ces deux critères, *via* des modèles statistiques. Pour évaluer la répétabilité des profils de réponses, il conviendrait d'évaluer la constance de l'appartenance des individus au même cluster lors de la répétition de la perturbation, ce qui n'a pas été fait dans cette thèse, notamment en raison d'un déséquilibre dans les répétitions.

Partie 2 : Les profils adaptatifs sont-ils explicables à l'aide d'indicateurs phénotypiques ?

Ce travail de thèse a comme second objectif de contribuer à expliquer l'adaptabilité de la glande mammaire. Si le but à plus long terme est de pouvoir prédire les réponses individuelles, il s'agit aussi de mieux comprendre les variations importantes de production de lait et la forte variabilité individuelle des réponses provoquées par l'allongement de l'intervalle entre traites. Pour cela, il importe donc à présent d'identifier les phénotypes à valeur explicative, voire prédictive de la variabilité individuelle. Les profils type de réponses adaptatives identifiés, il est aussi intéressant de caractériser les individus appartenant à chacun de ces groupes en identifiant les phénotypes communs, partagés entre les individus d'un même groupe. Il est à noter que ces phénotypes communs peuvent avoir un lien de cause à effet avec les variables explicatives de l'ACP, mais pas nécessairement. De même, si le lien de cause à effet existe, il n'est pas possible de déterminer le sens de cette liaison : s'agit-il d'une cause ou d'une conséquence ? Seule la bibliographie peut nous aider à interpréter cette relation et son sens.

1. Contexte

L'influence des phénotypes a été déterminée *via* deux approches méthodologiques complémentaires : 1) l'écriture de modèles linéaires visant à combiner les phénotypes de manière à expliquer au mieux les réponses de production laitière à l'allongement de l'intervalle entre traites (indépendamment des quatre types de profils de réponse observés) et 2) des **ANOVA (ANalysis Of Variance)** permettant de comparer les niveaux des phénotypes entre les différents types de profils de réponse. Ces deux approches ont surtout été réalisées sur la modalité de perturbation « intervalle unique de 24 h », pour laquelle un

phénotypage plus important des vaches dans une grande variété de conditions expérimentales (stade physiologique, alimentation, saison...) avait été conduit. Ainsi qu'évoqué au début ce mémoire, ce phénotypage n'a pas été exhaustif sur l'ensemble des animaux, car fonction de la découverte de nouveaux phénotypes d'intérêt, des opportunités offertes dans le cadre de collaborations et des moyens financiers mis à disposition. Ainsi, il existe un fort déséquilibre d'effectifs entre les phénotypes mesurés et entre les stades physiologiques. Ces déséquilibres ont pénalisé cette étude, notamment en diminuant potentiellement la puissance des analyses statistiques. Pour mémoire, comme illustré dans le **Tableau 1** de l'article 2, la perturbation a été mise en œuvre sur un effectif de 724 individus mais la majorité des mesures de phénotypage n'a été réalisée que sur les trois dernières cohortes expérimentales pour un total de 97 observations (65 seulement pour les données de numération et formule sanguine).

A l'inverse, si la deuxième modalité de perturbation (monotraite) a été réalisée dans un milieu plus contrôlé avec des conduites alimentaires plus homogènes et des animaux à des stades de lactation et parité comparables, le phénotypage des animaux a été beaucoup plus restreint et seuls deux des phénotypes mesurés lors de la première modalité ont été mesurés : la concentration en lactose sanguin (lactosémie) et le débit d'émission du lait à la traite. Pourquoi ? Pour le lactose sanguin, l'étude d'un sous-jeu de données de cet essai (n = 86) avait montré que ce paramètre était corrélé aux gains de lait et au taux de récupération au retour à deux traites par jour (Guinard-Flament et al., 2011a). Il était donc intéressant de poursuivre sa mesure. Pour le débit d'émission du lait, une étude non publiée à ce jour et réalisée sur 16 vaches Holstein de l'Installation Expérimentale de Méjusseume en 2009 avait montré que ce phénotype pouvait avoir une potentielle valeur prédictive sur les pertes de lait suite à l'omission ponctuelle d'une traite.

2. Choix des phénotypes étudiés

Quelques travaux ont cherché à prédire les réponses de production laitière suite au passage en monotraite chez les vaches laitières. Ces travaux se sont consacrés essentiellement à l'étude des pertes de lait, le retour à deux traites par jour n'étant pas envisagé. Les phénotypes étudiés étaient alors centrés sur les caractéristiques du lait et de la mamelle en lien avec sa capacité de stockage et le transfert du lait entre les traites, du compartiment alvéolaire vers la citerne (Knight and Dewhurst, 1994; Carruthers et al., 1993b; Davis et al., 1998). Ces phénotypes étaient nombreux. Parmi ceux-ci, on trouve :

- La proportion de lait citernal et alvéolaire, déterminée à partir du volume de lait correspondants mesurés après huit heures (Knight et Dewhurst, 1994) ou 24 et 40 h d'accumulation du lait (Davis et al., 1998)
- le volume de lait résiduel (volume de lait collecté une fois la traite terminée après injection d'ocytocine) mesuré à 40 h (Carruthers et al., 1993b)

- la capacité fonctionnelle de la mamelle, qui correspond au volume de lait contenu dans la mamelle après 40 h d'accumulation de lait, lorsque la sécrétion de lait est devenue nulle (Carruthers et al., 1993b; Davis et al., 1998)
- le volume de la glande mammaire (Knight et Dewhurst, 1994; Carruthers et al., 1993)
- la productivité de la glande mammaire, qui correspond au ratio de la production laitière journalière divisée par la capacité fonctionnelle de la mamelle à 40 h.

Ces pertes sont restées très mal expliquées. En effet, Carruthers et al. (1993) n'ont pas trouvé de prédicteurs du pourcentage de pertes de lait ($n = 92$). Dans leur étude, le seul facteur ayant une valeur prédictive était le volume de lait résiduel : les vaches ayant des niveaux élevés de lait résiduel tendaient à perdre plus de lait en monotraite que les vaches ayant des niveaux faibles de lait résiduel. De même, Davis et al. (1998) ont observé que les pertes de lait n'étaient pas corrélées au volume de lait citernal, alvéolaire ou total dans la mamelle mais que le volume de lait citernal à 24 h rapporté à celui mesuré à 40 h d'accumulation expliquait 37 % de la variabilité des pertes de lait observées (kg/j) ($n = 22$). De manière identique Knight et Dewhurst (1994) n'ont pas observé de corrélation entre les pertes de lait et les niveaux de production ou les caractéristiques de stockage du lait dans la mamelle, excepté avec le jour 1 de monotraite où les pertes de lait en L/j étaient prédites par la proportion de lait citernal mesurée 8 h après la traite ($R^2 = 0,61$ et $0,65$ respectivement pour la première période de monotraite de sept jours et la deuxième période de monotraite de 14 jours, effectuées deux semaines après la première période de monotraite ; $n = 10$).

En raison de ces résultats peu concluants, l'objectif de cette thèse était d'élargir le champ d'investigation des phénotypes explicatifs en explorant davantage de mécanismes que par le passé, mécanismes susceptibles de provoquer ou de moduler la diminution de la sécrétion de lait (intégrité de l'épithélium mammaire, inflammation...). Les phénotypes ont donc été choisis en raison de leur lien supposé ou réel, direct ou indirect avec les mécanismes régulant les pertes de lait lors de l'allongement de l'intervalle entre traites. Ils devaient être également rapides et faciles à mettre en œuvre sur un grand nombre d'individus en les perturbant le moins possible.

Pour rappel, les phénotypes étudiés concernaient le lait (production et composition), le stade physiologique des animaux (stade de lactation, parité, âge au premier vêlage) et des phénotypes complémentaires associés aux trois hypothèses de régulation de la réponse sur la production laitière lors de l'allongement de l'intervalle entre traites :

- l'effet physique lié à l'accumulation de lait dans la mamelle et à l'augmentation de la pression intra-mammaire, sachant que cet effet est probablement modulé par la capacité de distension, ou compliance, de la glande mammaire,

- l'effet de la composition peptidique du lait en lien avec la présence d'un facteur inhibiteur de la lactation dans le lait, le FIL, qui agirait au niveau des alvéoles mammaires, sur les CEM, en exerçant un rétrocontrôle négatif sur la synthèse et la sécrétion de lait.
- et l'état inflammatoire

Les questions auxquelles cette partie de la discussion va répondre sont les suivantes :

Quel est le lien entre les réponses de production laitière et le niveau initial de production et de composition du lait ?

Quelle est l'influence du stade physiologique sur les profils de réponse ?

Les caractéristiques phénotypiques de l'animal suffisent-elles à expliquer les profils adaptatifs ? Les caractéristiques phénotypiques ont-elles la même influence en cas de réponse à court et à moyen terme ?

L'étude permet-elle de relier les nouvelles caractéristiques phénotypiques étudiées à des mécanismes déjà étudiés ou dont l'existence était supposée ?

3. Quel est le lien entre les réponses de production laitière et le niveau initial de production ainsi que la composition du lait ?

L'analyse des corrélations interindividuelles montre que plus l'animal produit de lait, plus les pertes de lait (kg/j) au passage en monotraite sont élevées (24h-MI : -0,59 ; 3-wk ODM : -0,66), cette relation étant moins voire pas observée sur les pertes relatives (en pourcents) (24h-MI : -0,28 ; 3-wk ODM : -0,18). Ce résultat a déjà été rapporté par Rémond et Pomiès (2005) ($r = 0,68$ et $0,01$ respectivement ; $n = 237$ individus). La proportion de lait perdu lors de l'allongement de l'intervalle entre traites est peu ou pas liée au niveau initial de production laitière des animaux. De la même façon, plus les vaches produisent de lait avant l'omission de la traite, plus elles récupèrent de lait au retour à deux traites par jour (kg/j), sans que pour autant leur taux de récupération soit supérieur. Si on s'intéresse aux profils de réponse obtenus, on constate une hiérarchie dans les clusters : quelle que soit la modalité d'application de l'allongement de l'intervalle entre traites, plus le cluster se distinguait par un niveau initial de production laitière élevée, plus la proportion de lait perdu était importante, sans que le taux de récupération ne soit corrélé à ce niveau de production laitière initial. Ainsi, la production laitière initiale permet partiellement de prédire la quantité de lait perdu (kg/j) lors de l'allongement d'intervalle de traite et au retour à deux traites par jour, mais elle permet moins bien de prédire les proportions de lait perdu et ne permettrait pas de prédire la proportion de lait regagné au retour à deux traites par jour.

La concentration du lait, représentée par les taux butyreux et protéiques, a été proposée par le passé comme facteur pouvant moduler les pertes de lait en réponse à la monotraite (Davis et al., 1999). Selon ces auteurs, les vaches produisant naturellement un lait plus concentré toléraient mieux la monotraite et

perdaient moins de lait. Les travaux réalisés par Carruthers et al. (1993a), comparant deux races ayant des productions et des taux différents (Frisonne et Jersiaise) et en intra-race, des vaches jersiaises produisant un lait riche ou pauvre en protéines, n'ont pas mis en évidence d'effet de la concentration du lait en matières sur les pertes de lait. Dans cette thèse, cette hypothèse n'a également pas été validée lorsque ces concentrations étaient introduites comme variables explicatives dans les modèles linéaires pour expliquer les réponses à 24 h d'intervalle de traite. En revanche, l'analyse des profils de réponse suggère un effet potentiel de la concentration du lait en matières. En effet, lors de la perturbation « monotraite », les vaches du cluster 2, qui présentaient des taux butyreux et protéiques plus faibles en période témoin, étaient celles qui perdaient le plus de lait (en valeur absolue et en valeur relative). Néanmoins, ces animaux étaient aussi ceux qui produisaient le plus de lait. Cet effet « concentration » pourrait être davantage lié au potentiel laitier des animaux plutôt qu'à un effet propre de la concentration. En effet, les modèles linéaires, incluant un effet niveau de « production laitière potentielle » (représentant le potentiel génétique et l'environnement permanent de production laitière de l'animal) n'ont pas mis en évidence d'effet des taux butyreux et protéiques sur les réponses à l'allongement de l'intervalle entre traites.

4. Quelle est l'influence du stade physiologique sur les réponses ?

Dans cette thèse, les effets du stade physiologique des animaux sur l'adaptabilité de la glande mammaire ont été étudiés en décrivant les effets du stade de lactation, de la parité et de l'âge au premier vêlage. Ils ont été seulement estimés sur la première modalité de perturbation « intervalle unique de 24 h », compte tenu de l'homogénéité du stade physiologique des animaux pour la deuxième modalité de perturbation testée, la monotraite.

Le stade de lactation était très significatif dans les modèles visant à expliquer les réponses adaptatives sur la production laitière. Le début de la lactation était associé à des pertes de production laitière (en valeur absolue et en valeur relative), un gain au retour à deux traites par jour (kg/j) et un taux de récupération (%) supérieurs. Il était aussi associé à une récupération plus rapide du lait perdu au retour à deux traites par jour. Ces pertes plus importantes de lait en début de lactation ont aussi été rapportées dans la littérature (Carruthers et al., 1993b; Stelwagen et Knight, 1997; Rémond et Pomiès, 2005). Elles pourraient résulter de l'accumulation d'une quantité plus importante de lait dans la mamelle alors que la proportion de lait stocké dans la citerne est plus faible à ce stade (par rapport au milieu et fin de lactation) (Knight et Dewhurst, 1994; Stelwagen et al., 2013). En effet, la taille relative de la citerne (*i.e.*, proportion de lait stocké dans la citerne) augmente au cours de la lactation (Knight et Dewhurst, 1994).

Comme précédemment indiqué, la récupération du lait perdu était aussi plus rapide en début de lactation. Ce résultat souligne les propriétés d'élasticité de la glande mammaire en début de lactation, où l'aptitude à récupérer la quantité de lait perdu s'accompagnerait ainsi d'une aptitude à récupérer cette

quantité plus rapidement. Cette élasticité de la glande mammaire pourrait être liée à la sécrétion de PRL à la traite qui est supérieure en début de lactation et diminue progressivement au cours de la lactation (Koprowski et Allen Tucker, 1973). Au retour à deux traites par jour, les quantités de PRL sécrétées à la traite seraient plus importantes en début qu'en fin de lactation, et agiraient sur un tissu mammaire toujours en prolifération et avec une activité métabolique des CEM encore croissante (Capuco et al., 2003).

A noter, si l'effet du stade de lactation était significatif dans les modèles linéaires établis, les profils adaptatifs n'étaient en revanche pas caractérisés par des différences de stade de lactation entre clusters. Un tel résultat pourrait signifier que le stade de lactation influence les réponses à l'allongement de l'intervalle entre traites si ces réponses sont considérées séparément les unes des autres, mais pas nécessairement la combinaison de ces dernières.

Les effets de la parité discriminaient majoritairement les réponses des vaches primipares de celles des vaches multipares. Les vaches primipares perdaient proportionnellement plus de lait que les vaches multipares, comme rapporté par (Rémond et Pomiès, 2005). Une interaction entre la parité et le stade de lactation était aussi significative : les primipares en début et au milieu de la lactation perdaient une proportion plus élevée de lait mais récupéraient aussi davantage. A notre connaissance, cette interaction n'a jamais été précédemment observée. Les primipares étaient davantage représentées dans le cluster 2, caractérisé par un profil de type élastique. La parité, principalement du fait des vaches primipares, pourrait ainsi participer à l'élasticité de la glande mammaire. Cette hypothèse mériterait une vérification.

L'âge au premier vêlage (deux ans contre trois ans) n'a pas eu d'effet dans le cas de la modalité « intervalle unique de 24 h ». En revanche, pour la modalité « monotraite », l'âge au premier vêlage discriminait le cluster 3. Ce dernier contenait moins de vaches ayant vêlé autour de deux ans (donc plus de vaches ayant vêlé à trois ans) que le cluster 4. Ce cluster 3 était aussi caractérisé par un taux de récupération très faible (27,1 %), notamment par rapport au cluster 4 qui présentait le taux de récupération le plus élevé (97,2 %). Selon Le Cozler (2013), bien qu'un premier vêlage à 24 mois s'accompagne le plus souvent d'une meilleure production laitière par jour de vie productive (c'est-à-dire à l'échelle de la carrière de la vache), la production en première lactation peut être inférieure du fait que ces vaches allouent encore des ressources vers leur fonction de croissance (au détriment donc de leur production laitière). Ici, la production laitière journalière des animaux était inférieure pour le cluster 4 qui contenait davantage de vaches ayant vêlé à 24 mois (22,6 contre 27,2 kg/j pour le cluster 3). Il pourrait être tentant de relier cette plus faible production initiale des vaches du cluster 4 à la plus forte de proportion de premiers vêlages à 2 ans dans ce groupe, mais cet effet doit être relativisé du fait que l'essai ne comportait pas de primipares (mais principalement des vaches en deuxième lactation).

5. Influence des phénotypes complémentaires sur les réponses adaptatives de la glande mammaire

Les modèles linéaires sur les réponses adaptatives des vaches à un intervalle unique de 24 h ont mis en évidence très peu de phénotypes explicatifs de la variabilité des réponses. En revanche, le clustering a permis de visualiser l'influence de davantage de phénotypes ainsi que l'association entre eux.

i. Phénotypes liés à la distension de la glande mammaire

Dans cette thèse, nous avons cherché à étudier le rôle de la compliance de la glande mammaire, c'est-à-dire de sa capacité à se distendre. Nous avons fait l'hypothèse que 1) le débit d'émission du lait à la traite et ses variations pourrait constituer une mesure indirecte de la pression régnant dans la mamelle, 2) la mesure de l'écartement des trayons et surtout la mesure de ses variations lors de l'accumulation du lait pourrait donner des indications sur la distension de la mamelle et 3) la mesure du lactose sanguin et en particulier de sa variation lors des 24 premières heures d'accumulation du lait pourrait donner à la fois des informations sur la distension des alvéoles mammaires, mais aussi sur l'intégrité de l'épithélium mammaire, en lien avec les mécanismes de régulation de l'activité sécrétoire des CEM.

Plusieurs indicateurs relatifs aux paramètres de traite (durée de traite, quantité et proportion de lait émis à une et deux minutes, débits moyen et au pic d'émission du lait) et la distension entre les trayons (distances latérales et longitudinales exprimées en valeur absolue ou relative, distance totale) ont été compilés. Il s'est avéré que l'information apportée par chacun des indicateurs au sein d'un même groupe (paramètres de traite et distance entre les trayons) était redondante, ne permettant pas un éclairage supplémentaire sur les mécanismes impliqués dans les réponses adaptatives. Le débit moyen d'émission du lait et la distance totale entre les trayons ont alors été conservés comme seuls indicateurs de ces deux groupes.

Lors de l'ajustement des modèles statistiques visant à expliquer les variations de production laitière à un intervalle unique de 24 h, ces deux indicateurs (débit moyen d'émission du lait à la traite en période cTDM et augmentation relative de la distance totale entre les trayons lors du jour d'omission) ont eu un effet significatif sur les pertes (kg/j et %) et les gains (kg/j). Certaines modalités de ces indicateurs ont aussi été associées aux trois profils de réponse à l'intervalle unique de 24 h : par opposition aux vaches des clusters 2 et 3, les vaches du cluster 1 présentaient un débit moyen d'émission du lait pendant la traite en période témoin plus élevé et, après 24 h d'accumulation de lait dans la mamelle, présentaient des augmentations plus faibles de la distance totale entre les trayons, du débit moyen d'émission du lait à la traite, et une proportion plus faible de vaches avec une lactosémie supérieure à 100 mg/mL. Pour mémoire, les vaches de ce cluster 1 présentaient également le niveau de production laitière le plus élevé (34,4 kg/j contre 32,5 et 29,7 kg/j respectivement pour les clusters 2 et 3), les pertes (kg/j et %) et les gains (kg/j) les plus élevés en réponse à l'intervalle de 24 h. Leur production laitière initiale plus élevée,

pourrait expliquer le débit moyen d'émission du lait supérieur en période témoin. Ce résultat est aussi observé pour la deuxième modalité de perturbation, la monotraite : les vaches du cluster 2, qui présentaient une production laitière initiale supérieure, avaient en moyenne un débit moyen d'émission du lait à la traite supérieur en période témoin. En revanche, les augmentations plus faibles de la distance totale entre les trayons, du débit moyen d'émission du lait, associée à une proportion plus faible de vaches ayant une lactosémie supérieure à 100 mg/mL suggèrent une moindre augmentation de la distension du tissu et des alvéoles mammaires et de la pression d'éjection du lait au moment de la traite chez les animaux présentant les caractéristiques précédemment énoncées.

Ces résultats sont intéressants. Ils montrent la pertinence de ces nouveaux indicateurs et témoignent du lien existant entre les pertes de lait et la compliance de la mamelle. Néanmoins, s'ils confortent la relation de cause à effet entre pertes de lait et compliance de la mamelle, ils ne permettent pas de statuer sur le sens de cette relation. En effet, à ce stade, il n'est pas possible de dire si les pertes de lait supérieures observées chez les vaches du cluster 1 (intervalle unique de 24 h) sont dues à la moindre compliance de la glande mammaire (qui oppose alors une résistance à l'accumulation du lait), ou si c'est parce que ces pertes de lait ont été supérieures que la glande mammaire s'est moins distendue (conséquence).

Pour ce qui concerne la capacité de la vache à récupérer la quantité de lait perdu au retour à deux traites par jour, les indicateurs de la compliance de la mamelle ne semblent pas jouer de rôle majeur. Ils ne permettent pas de discriminer les clusters sur la résilience, c'est-à-dire le taux de récupération. Il n'empêche que, pour la perturbation de type « monotraite », la lactosémie mesurée au premier jour était plus élevée pour le cluster 3, cluster qui présentait le taux de récupération le plus faible (27,1 %). Ce résultat a déjà été rapporté par Guinard-Flament et al. (2011a) sur une sous-partie de ce jeu de données. Dans leur étude, le taux de récupération était corrélé modérément et négativement à la lactosémie mesurée juste avant la traite au premier jour de monotraite ($r = -0,40$; $n = 86$). A l'inverse, aucune corrélation n'a été observée lors de l'intervalle unique de 24 h. Cette étude présentait très peu d'effets rémanents, en lien avec la durée très brève d'application de cette perturbation (Rémond et Pomiès, 2005), et les taux de récupération en lait étaient en moyenne supérieurs à ceux observés pendant l'essai « monotraite » (91,3 % contre 57 % respectivement). La très faible résilience du cluster 3 en réponse à la monotraite pourrait relever de phénomènes initiant l'apoptose des CEM et/ ou provoquant la méthylation de l'ADN (Singh et al., 2012; Nguyen et al., 2014).

ii. Influence des phénotypes liés à la composition peptidique du lait

Le phénotypage du lait sur l'activité du complexe plasmine et la cartographie peptidique du lait lors de l'intervalle unique de 24 h permettait de prendre en compte l'hypothèse du FIL, facteur de nature supposée peptidique inhibant la synthèse et sécrétion du lait lors de l'allongement de l'intervalle entre traites (Wilde et al., 1995). De manière cohérente avec ce qui est observé en monotraite (Knutson et al.,

1993; Stelwagen et al., 1994c), l'intervalle de traite unique de 24 h était bien associé à une augmentation de l'activité de la plasmine et du plasminogène. La cartographie peptidique a aussi confirmé cette activité supérieure de la plasmine, puisqu'une augmentation à la fois de la fraction des peptides issue de l'hydrolyse primaire des caséines β et α_{s2} par la plasmine (protéoses-peptones) et de la fraction contenant des produits secondaires la dégradation de ces protéoses-peptones (Schaar, 1985; Datta et Deeth, 2003; Le et al., 2006) était observée. Des modifications de la composition peptidique du lait sont donc observées dès la phase aiguë de la réponse à l'allongement de l'intervalle de traite. En revanche, nous n'avons pas trouvé de relation significative entre les composés peptidiques et les réponses (pertes ou gains de lait) à l'intervalle de traite prolongé, et ce malgré les différents types d'approche réalisés (pics peptidiques considérés séparément ou par zones d'éluion). Ainsi aucun peptide candidat pour le FIL n'a été identifié. Plusieurs raisons pourraient expliquer ce résultat. Premièrement, la résolution de la cartographie peptidique n'a pas permis de quantifier précisément les peptides présents : certains pics étaient peu résolus et non différenciables des autres pics co-élués. Deuxièmement, bien que le FIL soit supposé agir dès les 24 premières heures d'accumulation du lait (Davis et al., 1999), un unique intervalle de 24 h pourrait être insuffisant pour le détecter.

iii. Influence des phénotypes liés à l'immunité/ l'inflammation de la glande mammaire

L'état inflammatoire de la glande mammaire pouvant moduler les pertes de lait suite au passage en monotraite (-14 contre -26 % de lait chez les vaches ayant respectivement 150 000 et 790 000 cellules/mL ; Holmes et al. (1996), plusieurs phénotypes ont été mesurés afin de déterminer le lien entre l'immunité ou l'inflammation de la glande mammaire et les réponses adaptatives à l'allongement de l'intervalle entre traites. Plus précisément, les CCS étaient disponibles sur les deux modalités de perturbation. Ces données étaient complétées, dans le cas de l'intervalle unique de 24 h sur une sous partie des données, par des mesures du taux d'interleukine-8 (IL-8) en période témoin, de la **numération et formule sanguine (NFS)** et du taux d'haptoglobine sanguine (inflammation générale). La présence d'IL-8 dans le lait à l'état initial est le seul paramètre d'immunité de la glande mammaire qui influait significativement sur les réponses adaptatives des vaches à un intervalle unique de 24 h. Dans les modèles linéaires, des niveaux initialement plus élevés d'IL-8 étaient associés à des pertes (kg/j) et des gains (kg/j) moins élevés. En ce qui concerne les profils adaptatifs, les taux d'IL-8 plus élevés étaient associés au cluster 3, qui se caractérisait effectivement par des pertes plus faibles (kg/j et %), mais surtout par une incapacité à récupérer le lait perdu au retour à deux traites par jour (taux de récupération de 63,9 % pour ce cluster 3 contre 90,5 et 100,9 % pour les clusters 1 et 2).

Les mesures d'IL-8 n'étaient pas disponibles sur les réponses à la monotraite. Nous ne disposions que des CCS. Contrairement aux résultats de Holmes et al. (1996), le niveau initial de CCS n'a pas eu d'effet significatif sur les pertes de lait lors de la comparaison des clusters. A l'inverse, le cluster 3, qui se

caractérisait par le taux de récupération le plus faible (27,1 %) se distinguait par le niveau initial de CCS le plus faible (SCS de 2,1 contre 2,79 pour le cluster 1, qui avait un taux de récupération de 69 %). Il semble peu probable que ce phénotype contribue réellement à discriminer les animaux sur leur taux de récupération. En effet, ce résultat est en contradiction avec ceux observés sur l'intervalle unique de 24 h où la CCS n'a pas eu d'effet sur le taux de récupération (seulement le niveau d'IL-8).

En pratique !

Ce travail de thèse a permis d'identifier des phénotypes, tels le débit d'émission du lait à la traite, facilement mesurables en ferme et qui permettraient de réaliser une première estimation des réponses en lait (pertes de lait au passage en monotraite et gain de lait au retour à deux traites par jour) auxquelles l'éleveur peut s'attendre.

Le niveau initial de production est un bon indicateur de la quantité de lait qui pourrait être perdue. Par ailleurs, bien que dans cette étude un état initial inflammé de la glande mammaire n'ait pas été associé à des pertes supérieures au passage en monotraite, la quantité de lait récupéré était inférieure au retour à deux traites par jour. Cette étude confirme donc la nécessité d'être vigilant quant aux effets d'une situation sanitaire médiocre avant d'appliquer la monotraite.

Partie 3 : Des réponses adaptatives en partie génétiquement contrôlées

A quel point la génétique de l'animal détermine-t-elle le niveau de production laitière lors de l'allongement de l'intervalle entre traites, et les réponses adaptatives ?

Les zones génomiques ayant un effet fort sur la production et la composition du lait lors des 2 traites par jour ont-elles le même impact lors de la monotraite ? Qu'en est-il des réponses adaptatives ?

Existe-t-il des zones du génome spécifiques de l'adaptabilité à la monotraite ?

Existe-t-il des prédicteurs génétiques à l'adaptabilité de la glande mammaire ? Le déterminisme génétique de la phase aiguë de l'adaptation à l'allongement de l'intervalle entre traites est-il le même que celui impliqué dans une réponse à plus long terme (trois semaines) ?

1. A quel point la génétique de l'animal détermine-t-elle le niveau de production laitière lors de l'allongement de l'intervalle entre traites, et les réponses adaptatives ?

Le déterminisme génétique de la quantité et de la composition du lait produit lors de la monotraite et des réponses de production laitière, a été évalué à partir du protocole de trois semaines de monotraite sur la population de vaches croisées Holstein × Normande. Le déterminisme génétique du niveau de production en monotraite avait déjà été étudié par Lembeye et al. (2016) sur des vaches croisées Jersiaise × Holstein durant toute une lactation en monotraite. Aussi, l'originalité du travail réalisé dans cette thèse réside dans la durée, plus courte, d'application de la monotraite, et surtout dans l'estimation de

paramètres génétiques des pertes de lait au passage en monotraite et des gains de lait au retour à deux traites par jour.

Conformément aux observations de Lembeye et al. (2016), les niveaux d'héritabilité observés pour la production et la composition laitière durant la période de monotraite étaient du même ordre de grandeur que ceux observés lorsque les vaches étaient traites deux fois par jour, bien que légèrement plus faibles pour la production laitière (-0,07), pour le taux butyreux (-0,05) et les SCS (-0,06). L'héritabilité du taux protéique était cependant plus élevée (+0,21). Quant au taux de lactose, son héritabilité était plus variable en fonction des périodes expérimentales : elle chutait de 0,66 à 0,25 lors du premier jour de monotraite, était de 0,33 pour la période globale de monotraite, et ne retrouvait pas son niveau initial lors du retour à deux traites par jour (0,37). De manière intéressante, l'héritabilité des pertes absolues et relatives lors du passage en monotraite était modérée, comparable à celle de la production laitière. En revanche, les gains de production laitière au retour à deux traites par jour avaient un niveau d'héritabilité élevé (0,63), qui contrastait avec le taux de récupération non héritable. Les hauts niveaux de corrélations génétiques entre les caractères de production mesurés à deux traites par jour et en monotraite indiquent que le contrôle génétique de ces caractères est en grande partie identique pour les deux fréquences de traite. Cependant, ces corrélations ne sont pas aussi élevées que lorsque les caractères sont mesurés lors de deux périodes de traite biquotidienne. Le déterminisme génétique modéré des pertes de lait indique que la capacité de résistance de la glande mammaire à l'allongement de l'intervalle entre traites est de manière assez importante sous contrôle génétique, et que ce contrôle génétique est encore plus important sur les gains au retour à deux traites par jour. Le taux de récupération, en revanche, n'a pas été trouvé comme étant héritable. Ce résultat pourrait être calculatoire et dû au fait que le taux de récupération est exprimé comme le ratio entre deux variables (les gains de lait au retour à deux traites par jour en kg/j et les pertes de lait au passage en monotraite en kg/j) génétiquement très fortement corrélées (-0,84). Du fait des propriétés de l'indicateur de la résilience choisi, il n'est donc pas possible de déterminer le contrôle génétique de l'aptitude de la glande mammaire à la résilience. Toutefois, même si les gains de lait au retour à deux traites par jour en kg/j ne précisent pas si la vache a été apte à récupérer l'intégralité du lait perdu, ils apportent une indication de l'amplitude de cette capacité. Enfin, il convient de préciser que l'effectif de 430 vaches laitières utilisé dans cette expérimentation était très restreint pour effectuer une analyse du déterminisme génétique, et que cet élément a pu impacter les résultats obtenus.

2. Les zones génomiques identifiées à deux traites par jour ont-elles le même impact lors de la monotraite ? Qu'en est-il des réponses adaptatives ?

La détection de régions génomiques devait nous permettre de déterminer si les mêmes régions du génome étaient identiquement impliquées dans les niveaux de production avec les deux fréquences de

traite. Surtout, elle devait nous permettre d'étudier si les réponses adaptatives de la glande mammaire à l'allongement de l'intervalle entre traites sont sous le contrôle de zones du génome et si oui, si elles sont différentes ou partiellement différentes de celles connues pour leur influence sur les niveaux de production laitière. En d'autres termes, elle devait nous permettre de déterminer si des régions du génome étaient impliquées spécifiquement dans les réponses adaptatives de la glande mammaire.

Globalement, peu de régions génomiques ont été détectées sur les niveaux de production laitière et de composition du lait lors des différentes périodes expérimentales. Ce faible nombre peut être dû d'une part à l'effectif restreint de vaches dont nous disposions, et d'autre part à son organisation en familles de taille relativement petite (de une à seize filles par famille), ces deux paramètres influençant la puissance de détection. En dehors de l'effectif lié au protocole monotraite, le dispositif expérimental était globalement suffisamment puissant pour détecter des QTL, soit fixés intra-race avec un effet de substitution modéré, soit non fixés intra-race mais avec un effet de substitution fort (Larroque et al., 2002). Nous sommes peut-être restés dans ces cas de figure. Nous avons trouvé deux régions génomiques ayant des effets majeurs. La première, située en position centromérique du chromosome 14, qui contient notamment le gène *DGAT1*, est une région bien connue pour son influence sur le taux butyreux ainsi que sur la quantité de lait et le taux protéique (Winter et al., 2002; Grisart et al., 2002, 2004). Cette région avait déjà été détectée sur l'ensemble de ce dispositif de détection de QTL (Larroque et al. 2008, Lefevbre et al. 2012). Sa détection dans le dispositif monotraite sur la production laitière et les taux butyreux et protéiques nous a permis de valider nos détections de QTL.

La deuxième région génomique majeure détectée lors de cette étude est plus surprenante. En effet, cette région a été identifiée à de multiples reprises pour son effet sur la caséine α_{s1} en race Holstein et par conséquent sur le taux protéique (Jiang et al., 2010; Fang et al., 2014; Boichard et al., 2014; Sanchez et al., 2016). Nous ne l'avons détectée ici que pour le seul taux de lactose du lait et non pour les autres critères de production et de composition du lait, comme le taux protéique et le volume de lait produit. L'absence d'effet de cette région chromosomique sur le volume de lait produit pourrait s'expliquer par le fait que, bien que le lactose soit un des principaux composés osmotiques du lait (avec les minéraux il est responsable d'environ 75 % de la pression osmotique du lait, le reste dépendant partiellement des protéines (valeurs estimées par calcul)), l'osmose est un paramètre stable et l'évolution du taux de lactose sera généralement compensée par des mécanismes impliquant les autres composés osmotiques. En accord avec cet argument, la corrélation du taux de lactose avec la quantité de lait produite est généralement faible (corrélation génétique = 0,15 dans notre étude et similaire dans les résultats de Miglior et al. (2007)). Le fait que cette région chromosomique influant le taux de lactose ne soit pas observée en race pure pourrait provenir d'une différence allélique entre les deux races utilisées lors du protocole de croisement, qui expliquerait pourquoi ce QTL n'est retrouvé que dans notre population

croisée. Cette hypothèse mériterait d'être vérifiée sur l'intégralité des vaches du protocole de détection de QTL de l'UE du Pin au Haras.

Les caractères déterminés par ces régions des chromosomes 6 et 14 l'ont été aussi bien avant que pendant et après la monotraite. La perturbation de la glande mammaire n'a donc pas changé l'influence de ces deux régions chromosomiques sur la production et la composition du lait. En complément, certaines régions chromosomiques étaient ponctuellement détectées avec moins d'intensité sur les caractères de production laitière et de composition du lait 1) durant une période expérimentale seulement, 2) ou avant le passage en monotraite et durant la monotraite, 3) ou durant la monotraite et au retour à deux traites par jour, 4) ou bien encore durant les périodes de traite biquotidienne seulement. Ces régions n'étant pas déjà connues pour leur impact sur les caractères de production laitière, des questions demeurent sur la réalité et/ ou leur mode d'influence. Celles identifiées uniquement en monotraite ou en traite biquotidienne correspondent-elles à une réaction à la fréquence de traite ? Les zones détectées en monotraite puis lors du retour à deux traites par jour correspondent-elles à des processus se mettant en place lors du changement de fréquence de traite et qui perdurent ensuite ? Pour répondre à ces questions, il serait nécessaire de confirmer ces régions par un dispositif plus puissant de détection, afin de permettre une cartographie fine de ces zones.

Les pertes absolues de production laitière ont été influencées par la région du gène *DGAT1* sur le chromosome 14. Ce résultat est sans doute à mettre en relation avec la corrélation génétique positive forte entre la perte absolue et la production laitière. Les autres QTL détectés pour les réponses à la monotraite n'ont pas été identifiés pour les niveaux de production laitière ou la composition du lait. De plus, aucune de ces régions n'ont été impliquées à la fois dans les pertes et les gains au retour à deux traites par jour, alors qu'il existe entre les deux caractères une corrélation génétique négative très forte. Il existerait donc peut-être des régions génomiques, différentes des régions à fort effet sur la production et la composition du lait, qui détermineraient partiellement la résistance de la glande mammaire lors de l'allongement de l'intervalle entre traites. Nous pouvons émettre l'hypothèse que l'absence de détection de QTL à effet fort sur les pertes ou les gains de lait a été due au dispositif expérimental (pas de différence de fréquence allélique entre les races par exemple), ou au fait que le déterminisme génétique de ces caractères est peut-être plutôt polygénique. Aucun QTL n'a été détecté sur le taux de récupération, ce qui est cohérent avec sa très faible héritabilité.

3. Existe-t-il des prédicteurs génétiques à l'adaptabilité de la glande mammaire ?

Un autre objectif de cette thèse était d'identifier des éventuels prédicteurs génétiques de l'adaptabilité de la glande mammaire des vaches laitières. Nous avons ainsi évalué si la composition du lait en période témoin était corrélée aux réponses adaptatives de la glande mammaire à la monotraite. Les corrélations génétiques indiquent que les vaches ayant initialement un lait plus concentré (c'est-à-

dire dont les taux butyreux et protéiques étaient plus élevés) et une production laitière initiale plus faible ont perdu moins de lait au passage en monotraite (à la fois en kg/j et en %, mais de manière moins marquée pour les pertes en valeur relative) et une récupération absolue plus faible. Ces résultats auraient donc tendance à confirmer l'hypothèse émise par Davis et al., (1999) concernant l'influence de la concentration du lait sur les pertes laitières. Toutefois, ces corrélations n'étaient pas suffisamment élevées (0,69 au maximum) pour permettre de prédire avec exactitude les réponses adaptatives de la glande mammaire.

- i. *Le déterminisme génétique de la phase aiguë de l'adaptation à l'allongement de l'intervalle entre traite est-il le même que celui impliqué dans une réponse à plus long terme (trois semaines) ?*

La plupart des caractères laitiers observés au premier jour de monotraite ont des niveaux d'héritabilité similaires à ceux observés lors de trois semaines de monotraite, hormis pour le taux butyreux et dans une moindre mesure le lactose. Les pertes de lait absolues et relatives au premier jour de monotraite étaient génétiquement identiques aux pertes de lait observées lors des trois semaines de monotraite. Ceci peut signifier que le déterminisme génétique des réponses adaptatives à l'allongement de l'intervalle entre traites s'exprime dès la phase aiguë de l'adaptation à la monotraite pour le critère « volume de lait » et pourrait relever majoritairement du même contrôle génétique.

Concernant le taux de lactose du lait, la corrélation génétique entre sa mesure au premier jour de monotraite et sa mesure pendant la monotraite est relativement plus faible (0,37) que pour les autres caractères. Elle pourrait s'expliquer par la perturbation très importante de ce caractère au premier jour de monotraite, perturbation liée à la perte de l'intégrité de l'épithélium mammaire et à l'ouverture transitoire des jonctions serrées en réponse à l'accumulation de lait dans la mamelle (Guinard-Flament et al., 2011a). Au cours de ces travaux, nous avons tenté d'étudier le déterminisme génétique de la perméabilité de l'épithélium mammaire mais les résultats (non montrés ici) ne permettaient pas de conclure en raison d'un nombre trop limité de données sur l'évolution du taux de lactose sanguin.

L'héritabilité du taux butyreux variait peu tout au long de l'expérimentation, excepté au premier jour de monotraite où elle diminuait (de 0,61 à 0,68 contre 0,32 respectivement), suggérant des effets d'environnement plus importants. De fait la production de matière grasse a été très fortement perturbée lors du premier jour de monotraite. En moyenne, sur les trois semaines de monotraite, le taux butyreux a augmenté de +5,0 g/kg mais cette augmentation n'a pas été systématique pour tous les animaux, l'évolution du taux butyreux étant très variable entre les individus, de -10,5 g/kg à +38,5 g/kg. Au premier jour de monotraite, le taux butyreux était en moyenne de 48,3 g/kg contre 48,4 g/kg pour les trois semaines de monotraite. Cependant, il variait beaucoup plus, allant de 10,7 à 98,1 g/kg (ET = 12,16 g/kg) pour le premier jour de monotraite, contre une variation de 31,7 à 80,8 g/kg pour les trois semaines de monotraite (avec un écart-type de 7,33 g/kg). Cette variabilité interindividuelle pourrait résulter et

témoigner de la plasticité du métabolisme mammaire, plasticité métabolique qui varierait selon les individus. En effet, lors de la phase aiguë d'adaptation des vaches laitières à un intervalle de traite de 36 h, il a été observé une diminution de la quantité de glucose capté par la mamelle (Guinard-Flament et al., 2011b). Cette diminution s'accompagnait aussi d'une partition intramammaire différente du glucose capté entre les voies de synthèse des composants du lait, au profit de la production de matière grasse et au détriment de la synthèse du lactose. Dans cette étude, l'augmentation du taux butyreux (+62 g/kg), due à une diminution non proportionnelle de la sécrétion de matières grasses et de la sécrétion du lait, s'expliquait par une chute de la proportion du glucose capté et converti en lactose passant de 90 à 53 %. Cette modification du devenir métabolique du glucose capté par la mamelle dans la phase aiguë d'adaptation de la mamelle semble varier d'un individu à l'autre. Il serait intéressant à l'avenir de comprendre son sens biologique et d'en identifier les déterminants car elle pourrait s'exprimer différemment selon les individus.

Les implications pratiques de ces résultats sont détaillées dans le paragraphe suivant.

En pratique !

Les niveaux d'héritabilité observés pour la production et la composition du lait au cours de la monotraite sont comparables aux niveaux d'héritabilité de ces caractères observés en cas de traite biquotidienne classique. De plus, la corrélation génétique importante entre la production laitière en traite biquotidienne et à trois semaines de monotraite suggère que le fait que la sélection classique sur la production laitière améliore également le niveau de production en monotraite.

Néanmoins, les critères d'adaptabilité de la vache à la monotraite (pertes au passage à deux traites par jour et gains au retour à deux traites par jour) semblent être sous un contrôle génétique au moins partiellement différent. Sélectionner les individus sur ces critères nécessiterait donc de réaliser un phénotypage à grande échelle des animaux sur ces caractères. Compte tenu de la très faible proportion d'élevages pratiquant la monotraite en France, mettre en place un tel schéma de sélection sur ces caractères semble donc difficilement justifiable, à moins de voir une augmentation très importante de la fréquence de cette pratique, ce qui ne semble pas être dans la tendance actuelle.

En l'absence d'un tel « index monotraite », les éleveurs ayant intégré cette pratique comme un objectif d'élevage pourraient vouloir disposer d'indicateurs fiables et faciles à mesurer, afin de sélectionner sur le long terme les individus les plus adaptés à cette pratique. Dans notre approche, nous avons déterminé que la concentration du lait, estimable facilement en ferme grâce aux taux butyreux et protéiques, fournirait, bien qu'imparfaitement, une première approximation des pertes et des effets rémanents auxquels s'attendre. La sélection pourrait donc se faire partiellement *via* l'analyse des index des vaches sur la production laitière et les taux. Cette sélection nécessite toutefois d'être raisonnée, en faisant des compromis en raison de la corrélation génétique de l'ordre de -0,3 à 0,4 existant entre la production laitière et les taux.

Bien que plus contraignant, réaliser un intervalle unique de 24 h permettrait de prédire de manière beaucoup plus fiable les réponses des vaches à une période plus longue de monotraite, étant donné la corrélation phénotypique et génétique très élevée existant entre ces caractères.

Néanmoins, toutes ces solutions ne pourraient s'appliquer qu'aux éleveurs pour lesquels la pratique de la monotraite (sur tout ou partie de la lactation) est un objectif global de l'élevage à long terme et qui disposent de suffisamment d'animaux dans leur troupeau pour avoir une marge de manœuvre dans leur sélection. Toutefois, phénotyper les vaches sur leurs réponses au premier jour de monotraite pourrait également leur permettre de repérer des familles tolérant mieux la pratique que d'autres, et ainsi aiguiller le choix de leur plan d'accouplement (choix du taureau, des vaches reproductrices...).

Conclusions et perspectives

Nous avons justifié l'intérêt général de cette étude par le fait de contribuer à l'acquisition de connaissances sur l'adaptabilité des vaches laitières, élément clé pour la robustesse et la pérennité des élevages bovins laitiers. Plus précisément, nos objectifs lors de ce travail de thèse étaient à la fois de caractériser l'adaptabilité de la glande mammaire en décrivant la diversité interindividuelle des réponses adaptatives, et de contribuer à expliquer, pour prédire à plus long terme, l'adaptabilité de la glande mammaire à l'aide d'indicateurs phénotypiques et génétiques. Pour parvenir à ces fins, le fonctionnement de la glande mammaire a été perturbé en allongeant la fréquence de traite selon deux modalités : un intervalle de traite unique de 24 h et trois semaines de monotraite. Le critère cible étudié était le volume de lait produit et ses variations.

La démarche expérimentale choisie nous a permis de mettre différents profils adaptatifs en évidence, qui sont fonction des modalités de résistance et de résilience, indiquées respectivement par les pertes de lait relatives à l'allongement de l'intervalle entre traites et par le taux de récupération au retour à deux traites par jour. Ces profils adaptatifs ont pu être caractérisés par des résistances très variables (faibles, modérés mais rarement importantes) et des résiliences totales, moyennes ou faibles. Les profils de réponse ont été qualifiés de flexible (récupération partielle) ou d'élastique (récupération totale). Nous avons aussi constaté des similarités entre les profils de chacune des deux modalités de l'allongement de l'intervalle entre traites, suggérant que l'intervalle unique de 24 h est un modèle d'intérêt pour caractériser des périodes plus longues. Cette relation est particulièrement forte pour la résistance mais est cependant moins vraie pour la résilience, qui pourrait davantage dépendre de la durée d'application de l'allongement de l'intervalle entre traites. Ce travail a aussi été l'occasion de tester et d'identifier de nouveaux phénotypes d'intérêt pour caractériser les différents profils adaptatifs. Les profils similaires pouvaient partager des caractéristiques phénotypiques communes liées à l'immunité et/ ou à la compliance de la glande mammaire... mais ceux-ci n'expliquaient pas totalement les réponses adaptatives identifiées, et la réponse adaptative des animaux est aussi en partie génétiquement déterminée.

Les héritabilités des caractères de production laitière lors de trois semaines de monotraite étaient comparables à celles de ces mêmes caractères estimées lorsque les vaches sont traitées deux fois par jour, et bien que n'étant génétiquement pas complètement liés, les caractères de production en monotraite et en bitraite étaient très fortement corrélés. Sélectionner les vaches sur leur production laitière en bitraite améliore donc également le niveau de production en monotraite. La résistance du système glande mammaire lors du passage en monotraite peut être considérée comme la part de variabilité résiduelle des réponses à la monotraite qui ne dépend pas du niveau de production. La résistance de la glande mammaire aurait également une héritabilité moyenne, mais son déterminisme pourrait impliquer des zones génomiques différentes de celles expliquant les caractères de production. La résilience de la glande mammaire n'est pas un caractère héritable en raison de la forte corrélation génétique entre ces deux

composants. Enfin, nous avons observé que la production laitière et les réponses de production laitière au premier jour de monotraite (ou premier intervalle unique de 24 h) sont génétiquement très hautement corrélées aux réponses à trois semaines de monotraite. L'ensemble de ces résultats suggère donc la possibilité de sélectionner des individus dont la glande mammaire est plus ou moins adaptée à la monotraite.

A l'issue de ce travail, il convient de mettre en perspective les résultats obtenus ainsi que de définir le domaine de validité que l'on peut associer à ces résultats. Voici les questions soulevées :

L'approche par les réponses de production laitière suffit-elle à résumer l'adaptabilité de la glande mammaire ?

Utiliser un seul type de perturbation suffisait-il à déterminer avec fiabilité l'adaptabilité de la glande mammaire ? Les modalités d'application de l'allongement de l'intervalle entre traites utilisées permettaient-elles de déterminer l'adaptation aux allongements de l'intervalle entre traites de manière exhaustive ?

L'étude d'un seul type de fonction suffit-elle pour prédire l'adaptabilité de l'animal ? Et l'adaptabilité à l'échelle du système d'élevage ?

Compte tenu du temps imparti pour ce travail de thèse, nous avons choisi de restreindre l'étude de la majorité des réponses adaptatives de la glande mammaire à la production de lait. Même si le phénotypage assez exhaustif et l'étude du déterminisme génétique ont contribué à identifier des déterminants de l'adaptabilité de la glande mammaire, on peut se demander si la production laitière permet bien d'appréhender l'ensemble du fonctionnement de la glande mammaire. L'argument principal était qu'à l'exception des variations de composition (qui peuvent être appréhendées par les taux), la quantité de lait est un indicateur synthétique qui permet d'évaluer les capacités d'exportation de la glande mammaire. Toutefois, le fait de considérer le fonctionnement de la glande mammaire par la seule sortie du volume de lait est réducteur. Ici les autres aspects de l'adaptabilité de glande mammaire comme la composition du lait, la santé de la mamelle et la persistance de la lactation n'ont pas été considérés en tant que sorties du système mais seulement comme facteurs explicatifs (excepté la persistance de la lactation qui n'a pas du tout été évoquée dans ce travail). Au final, il serait intéressant d'intégrer ces dimensions pour expliquer conjointement leurs variations et déterminer les profils adaptatifs.

On peut ensuite se demander si les modalités de la monotraite employées ont permis d'évaluer tous les types de profils adaptatifs existant à l'allongement de l'intervalle entre traites. En effet, si nous avons évalué les réponses à un intervalle unique de traite de 24 h et à trois semaines de monotraite, ces durées d'application de la pratique restent courtes. Sachant que les mécanismes enclenchés lors de la réduction de la fréquence de traite, et en particulier ceux affectant les effets rémanents, peuvent se mettre en place

à long terme, on peut faire l'hypothèse que les durées utilisées étaient peut-être trop courtes pour déterminer toute l'étendue des réponses adaptatives possibles. Il serait alors nécessaire de compléter cette étude par des durées supérieures de monotraite, qui permettraient par exemple, d'étudier l'aptitude de la mamelle à maintenir la persistance de la lactation en cas de monotraite.

Une autre question posée concerne la représentativité de la monotraite en tant que modèle de perturbation. Dans les résultats présentés précédemment, il apparaît clairement que l'allongement de l'intervalle entre traites a permis de générer une perturbation de la production laitière importante, locale, réversible et variable d'un individu à l'autre. Si l'on utilisait un autre type de perturbation, comme l'alimentation, les réponses seraient sans doute partiellement identiques à l'exemple de la perte de production laitière en réponse à la réduction des apports énergétiques (Friggens et al., 2016). Aussi peut-on légitimement s'interroger sur la généralisation des profils adaptatifs identifiés dans cette thèse à d'autres perturbations. Est-ce que la même variété de types adaptatifs serait observée ? Est-ce que la parité et le stade de lactation seraient encore des déterminants de la flexibilité et de la plasticité des réponses ? Il n'est pas évident que les mêmes diversités de profils adaptatifs soient alors observés, notamment pour des perturbations qui s'appliqueraient à l'échelle de l'organisme entier (comme dans le cas d'une perturbation alimentaire) car les réponses adaptatives résulteraient à la fois de l'adaptation de la mamelle mais aussi des autres tissus et fonctions plus ou moins prioritaires de l'organisme.

A l'inverse, en utilisant l'allongement de l'intervalle entre traites comme modèle de perturbation de la mamelle, nous avons estimé n'étudier que l'adaptabilité de cet organe. Ce n'est pas tout à fait vrai. Le fait d'utiliser des animaux à différents stades physiologiques, particulièrement au niveau du stade de lactation, permettait, dans le cas de l'intervalle unique de 24 h, d'intégrer au moins partiellement l'évolution temporelle des compromis entre les différentes fonctions de l'animal (Phocas et al., 2014) et donc l'adaptabilité globale de l'animal (grandement influencée par ces compromis). De plus, bien que le milieu ait été contrôlé lors des trois semaines de monotraite, le fait d'avoir effectué le passage en monotraite au moment du pic de lactation, période où la glande mammaire est au maximum de son fonctionnement pourrait nous avoir permis de caractériser l'adaptabilité de la glande mammaire à la période où les compromis s'expriment le plus fortement chez les vaches laitières.

Enfin, même si tous les profils adaptatifs de la glande mammaire identifiés ici ne sont pas aussi favorables (c'est-à-dire associés à des pertes limitées lors du passage en monotraite et à une récupération totale lors du retour à deux traites par jour) les uns que les autres lors de la mise en place de la monotraite, une telle diversité de profils adaptatifs peut être un facteur d'adaptabilité et de robustesse à l'échelle du troupeau lorsque ce dernier est soumis à des perturbations environnementales de nature variée (Blanc et al., 2013).

Références

- Alcaras, J., and F. Lacroux. 1999. Planifier c'est s'adapter. *Econ. Sociétés, Sci. Gest. Série S.G.* 26–27:7–37.
- van Asselt, A.J., A.P.J. Sweere, H.S. Rollema, and P. de Jong. 2008. Extreme high-temperature treatment of milk with respect to plasmin inactivation. *Int. Dairy J.* 18:531–538. doi:10.1016/j.idairyj.2007.11.019.
- Assenza, F. 2014. Modelling genetic selection for gastrointestinal parasites resistance in small ruminants. Institut National Polytechnique de Toulouse. 125 pp.
- Aubron, C., A. Lurette, and C.H. Moulin. 2010. Simulation des conséquences économiques de différentes stratégies fourragères avec foin face aux aléas climatiques en élevage bovin laitier. *In 17ème Rencontres autour Recherches autour des Ruminants*. Paris, France. 249–252.
- Auldish, M.J., and C.G. Prosser. 1998. Differential effects of short-term once-daily milking on milk yield, milk composition and concentrations of selected blood metabolites in cows with low or high pasture intake. *In Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*. 41–43.
- Ayadi, M., G. Caja, X. Such, and C.H. Knight. 2003. Effect of omitting one milking weekly on lactational performances and morphological udder changes in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 86:2352–8. doi:10.3168/jds.S0022-0302(03)73828-4.
- Béguin, P., B. Dedieu, E. Sabourin, P. Correa, F. Dieguez, L. Dobremez, A. Dufour, F. Goulet, N. Hostiou, M. Jeuffroy, N. Joly, B. Lémery, S. Madelrieux, P. Marie, R. Martin-Clouaire, J. Meynard, H. Morales, B. Nettier, C. Nicourt, C. Petit, J. Porcher, J. Rellier, L. Sayre, G. Servière, H. Tallon, L. Temple, and J. Tourrand. 2011. Le travail en agriculture : son organisation et ses valeurs face à l'innovation. L'Harmattan, Paris, France.
- Bennewitz, J., N. Reinsch, S. Paul, C. Looft, B. Kaupe, C. Weimann, G. Erhardt, G. Thaller, C. Kühn, M. Schwerin, H. Thomsen, F. Reinhardt, R. Reents, and E. Kalm. 2004. The DGAT1 K232A Mutation Is Not Solely Responsible for the Milk Production Quantitative Trait Locus on the Bovine Chromosome 14. *J. Dairy Sci.* 87:431–442. doi:10.3168/jds.S0022-0302(04)73182-3.
- Bernier-Dodier, P., L. Delbecchi, G.F. Wagner, B.G. Talbot, and P. Lacasse. 2010. Effect of milking frequency on lactation persistency and mammary gland remodeling in mid-lactation cows. *J. Dairy Sci.* 93:555–64. doi:10.3168/jds.2009-2320.
- Billon, P. 2009. Traite des vaches laitières matériel, installation, entretien. I. de l'élevage (France), editor. Ed. La France agricole. 555 pp.
- Blanc, B. 1982. Les protéines du lait à activité enzymatique et hormonale.
- Blanc, F., B. Dumont, G. Brunschwig, F. Bocquier, and J. Agabriel. 2010. Robustesse, flexibilité, plasticité : des processus adaptatifs révélés dans les systèmes d'élevage extensifs de ruminants. *INRA Prod. Anim.* 23:65–80.
- Blanc, F., E. Ollion, L. Puillet, L. Delaby, S. Ingrand, M. Tichit, and N.C. Friggens. 2013. Evaluation quantitative de la robustesse des animaux et du troupeau : quels principes retenir ? Principles for a quantitative evaluation of robustness at the animal and herd levels. *20ème Rencontres autour des Rech. sur les Ruminants*. 265–272.
- Bodin, L., G. Bolet, M. Garcia, H. Garreau, C. Larzul, and I. David. 2010. Robustesse et canalisation: Vision de généticiens. *Prod. Anim.* 23:11–22.

- Boichard, D., A. Govignon-Gion, H. Larroque, C. Maroteau, I. Palhière, G. Tosser-Klopp, R. Rupp, M.-P. Sanchez, and M. Brochard. 2014. Déterminisme génétique de la composition en acides gras et protéines du lait des ruminants, et potentialités de sélection. *INRA Prod. Anim.* 27:283–298.
- Boichard, D., P. Le Roy, H. Levéziel, and J. Elsen. 1998. Utilisation des marqueurs moléculaires en génétique animale. *INRA Prod. Anim.* 11:67–80.
- Boichard, D.I., J.M. Elsen, P. Leroy, and C. Chevalet. 1995. Detection of and mapping quantitative trait loci with genetic markers. *In Rencontres autour des Recherches sur les Ruminants.* Paris. 139–144.
- Boutinaud, M., M.H. Ben Chedly, E. Delamaire, and J. Guinard-Flament. 2008. Milking and feed restriction regulate transcripts of mammary epithelial cells purified from milk. *J. Dairy Sci.* 91:988–98. doi:10.3168/jds.2007-0587.
- Boutinaud, M., L. Galio, V. Lollivier, L. Finot, S. Wiart, D. Esquerre, and E. Devinoy. 2013. Unilateral once daily milking locally induces differential gene expression in both mammary tissue and milk epithelial cells revealing mammary remodeling. *Physiol. Genomics.* 45:973–985. doi:10.1152/physiolgenomics.00059.2013.
- Boutinaud, M., J. Guinard-Flament, and HélèneJammes. 2004. The number and activity of mammary epithelial cells, determining factors for milk production. *Reprod. Nutr. Dev.* 44:499–508. doi:10.1051/rnd:2004054.
- Boutinaud, M., V. Lollivier, L. Finot, R.M. Bruckmaier, and P. Lacasse. 2012. Mammary cell activity and turnover in dairy cows treated with the prolactin-release inhibitor quinagolide and milked once daily. *J. Dairy Sci.* 95:177–87. doi:10.3168/jds.2011-4461.
- Bovenhuis, H., M.H.P.W. Visker, H.J.F. van Valenberg, A.J. Buitenhuis, and J.A.M. van Arendonk. 2015. Effects of the DGAT1 polymorphism on test-day milk production traits throughout lactation. *J. Dairy Sci.* 98:6572–82. doi:10.3168/jds.2015-9564.
- Brocard, V., G. Trou, F. Gervais, N. Muller, K. Quemeneur, and J. Flament. 2015. En Bretagne, les éleveurs laitiers changent peu leurs horaires et intervalles de traite. *In Rencontres autour des Recherches sur les Ruminants.* Paris, France. 189.
- Bruckmaier, R.M., and J.W. Blum. 1998. Oxytocin Release and Milk Removal in Ruminants. *J. Dairy Sci.* 81:939–949. doi:10.3168/jds.S0022-0302(98)75654-1.
- Brunschwig, G., S. Babault, B. Remond, and D. Pomies. 2004. Simulation de la traite des vaches laitières une seule fois par jour durant de courtes périodes (1 à 13 semaines) : effets sur l' EBE et le temps dégagé au niveau de l'exploitation. *In 11èmes Rencontres autour des Recherches sur les Ruminants.* 231.
- Brunschwig, G., B. Remond, D. Pomies, B. Martin, and L. Vidal. 2003. Simulation de la traite des vaches laitières une seule fois par jour en période estivale ou durant toute l'année : effets sur le revenu et le temps dégagé au niveau de l'exploitation. *10èmes Rencontres autour des Rech. sur les Ruminants.* 100.
- Bugaud, C., S. Buchin, J.-B. Coulon, A. Hauwuy, and D. Dupont. 2001. Influence of the nature of alpine pastures on plasmin activity, fatty acid and volatile compound composition of milk. *Lait.* 81:401–414. doi:10.1051/lait:2001140.
- Burns, A.R., R.A. Bowden, S.D. MacDonell, D.C. Walker, T.O. Odebunmi, E.M. Donnachie, S.I. Simon, M.L. Entman, and C.W. Smith. 2000. Analysis of tight junctions during neutrophil transendothelial migration. *J. Cell Sci.* 113:45–57.

- Cant, J.P., and B.W. McBride. 1995. Mathematical analysis of the relationship between blood flow and uptake of nutrients in the mammary glands of a lactating cow. *J. Dairy Res.* 62:405. doi:10.1017/S0022029900031113.
- Capuco, A., S. Ellis, S. Hale, E. Long, R. Erdman, X. Zhao, and M. Paape. 2003. Lactation persistency: Insights from mammary cell proliferation studies. *J. Anim. Sci.* 81 (Suppl.):18–31.
- Capuco, A., D. Wood, R. Baldwin, K. Mcleod, and M. Paape. 2001. Mammary cell number, proliferation, and apoptosis during a bovine lactation: relation to milk production and effect of bST. *J. Dairy Sci.* 84:2177–2187. doi:10.3168/jds.S0022-0302(01)74664-4.
- Carruthers, V.R., S.R. Davis, A.M. Bryant, H. V Henderson, C.A. Morris, and P.J.A. Copeman. 1993a. Response of Jersey and Friesian cows to once a day milking and prediction of response based on udder characteristics and milk composition. *J. Dairy Res.* 60:1–11.
- Carruthers, V.R., S.R. Davis, and P.J. Copeman. 1993b. Effects of oxytocin, machine stripping and milking rate on production loss of cows milked once a day. *J. Dairy Res.* 60:13–18. doi:10.1017/S0022029900027308.
- Cecchinato, A., C. Ribeca, S. Chessa, C. Cipolat-Gotet, F. Maretto, J. Casellas, and G. Bittante. 2014. Candidate gene association analysis for milk yield, composition, urea nitrogen and somatic cell scores in Brown Swiss cows. *Animal.* 8:1062–70. doi:10.1017/S1751731114001098.
- Ceciliani, F., J. Ceron, P. Eckersall, and H. Sauerwein. 2012. Acute phase proteins in ruminants. *J. Proteomics.* 75:4207–4231. doi:10.1016/j.jprot.2012.04.004.
- Charton, C., H. Larroque, C. Robert-Granié, D. Pomiès, H. Leclerc, N.C. Friggens, and J. Guinard-Flament. 2016. Individual responses of dairy cows to a 24-hour milking interval. *J. Dairy Sci.* doi:10.3168/jds.2015-9782.
- Chauvat, S., J. Seegers, T.B. N’Guyen, and B. Clement. 2003. Le travail d’astreinte en élevage bovin laitier. Institut l’Elevage; Paris; France. 51 pp.
- Ben Chedly, H., P. Lacasse, P.-G. Marnet, and M. Boutinaud. 2012. 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.* 1–10. doi:10.1017/S1751731112001176.
- Chilliard, Y., A. Ferlay, and M. Doreau. 2001. Contrôle de la qualité nutritionnelle des matières grasses du lait par l’alimentation des vaches laitières : Acides gras trans, polyinsaturés, acide linoléique conjugué. *Prod. Anim.* 14:323–335.
- Claesson, O., A. Hansson, N. Gustafsson, and E. Brannang. 1959. Once-daily milking compared with twice daily milking. *Acta Agric. Scand.* 9:38–59.
- Clark, D.A., C.V.C. Phyn, M.J. Tong, S.J. Collis, and D.E. Dalley. 2006a. A Systems Comparison of Once-Versus Twice-Daily Milking of Pastured Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 89:1854–1862. doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72254-8.
- Clark, D., C. Phyn, M. Tong, S. Collis, and D. Dalley. 2006b. A systems comparison of once-versus twice-daily milking of pastured dairy cows. *J. Dairy Sci.* 89:1854–1862.
- Cohen-Zinder, M. 2005. Identification of a missense mutation in the bovine ABCG2 gene with a major effect on the QTL on chromosome 6 affecting milk yield and composition in Holstein cattle. *Genome Res.* 15:936–944. doi:10.1101/gr.3806705.

- Colleau, J.J., and D. Regaldo. 2001. Définition de l'objectif de sélection dans les races bovines laitières. *Rencontre Rech. Ruminants 2001 8ème Journées 3R*. 330–332.
- Couvreur, S., and C. Hurtaud. 2007. Le globule gras du lait: Sécrétion, composition, fonctions et facteurs de variation. *Prod. Anim.* 20:369–382.
- Le Cozler, Y. 2013. Reproduction chez la génisse laitière. *Repromag*. 12–23.
- Datta, N., and H.C. Deeth. 2003. Diagnosing the cause of proteolysis in UHT milk. *LWT - Food Sci. Technol.* 36:173–182. doi:10.1016/S0023-6438(02)00214-1.
- Davis, S.R., V.C. Farr, P.J.A. Copeman, V.R. Carruthers, C.H. Knight, and K. Stelwagen. 1998. Partitioning of milk accumulation between cisternal and alveolar compartments of the bovine udder: relationship to production loss during once daily milking. *J. Dairy Res.* 65:1–8.
- Davis, S.R., V.C. Farr, and K. Stelwagen. 1999. Regulation of yield loss and milk composition during once-daily milking: a review. *Livest. Prod. Sci.* 59:77–94. doi:10.1016/S0301-6226(98)00204-8.
- Delaby, L., and J.L. Peyraud. 2009. Making the best use of the farm's forages for the production of milk. *Fourrages*. 198:38191–210.
- Delamaire, E., and J. Guinard-Flament. 2006a. Increasing milking intervals decreases the mammary blood flow and mammary uptake of nutrients in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 89:2007–2016.
- Delamaire, E., and J. Guinard-Flament. 2006b. Longer milking intervals alter mammary epithelial permeability and the Udder's ability to extract nutrients. *J. Dairy Sci.* 89:2007–16. doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72268-8.
- Delouis, C., and P. Richard. 1991. La lactation. In *La reproduction chez les mammifères et chez l'homme*. C. Thibault and M. Levasseur, editors. INRA, Ellipse, Paris, France. 487–514.
- Dewhurst, R., and C. Knight. 1993. An investigation of the changes in sites of milk storage in the bovine udder over two lactation. *Anim. Prod.* 57:379–384.
- Djabri, B., N. Bareille, F. Beaudreau, and H. Seegers. 2002. Quarter milk somatic cell count in infected dairy cows : a meta-analysis. *Vet. Res.* 33:335–357. doi:10.1051/vetres.
- Druet, T., F. Jaffrezic, and V. Ducrocq. 2005. Estimation of genetic parameters for test day records of dairy traits in the first three lactations. *Genet. Sel. Evol.* 37:257–271. doi:10.1051/gse:2005001.
- Ducrocq, V., D. Boichard, A. Barbat, and H. Larroque. 2001. Intégration des caractères fonctionnels dans un index de synthèse pour les races bovines laitières : de la théorie à la pratique. *Rencontre Rech. Ruminants 2001 8ème Journées 3R*. 333–336.
- Eckersall, P.D., and J.G. Conner. 1988. Bovine and canine acute phase proteins. *Vet. Res. Commun.* 12:169–178. doi:10.1007/BF00362798.
- Elliott, G.M., F.H. Dodd, and P.J. Brumby. 1960. Variations in the rate of milk secretion in milking intervals of 2-24 hours. *J. Dairy Res.* 27:293–308.
- Ellis, S., and A. V. Capuco. 2002. Cell proliferation in bovine mammary epithelium: Identification of the primary proliferative cell population. *Tissue Cell.* 34:155–163. doi:10.1016/S0040-8166(02)00025-3.
- Falconer, D.S., and T.F.C. Mackay. 1966. Introduction to quantitative genetics. 4th editio. Longmans Green, Harlow, Essex, UK. 464p. pp.

- Fang, M., W. Fu, D. Jiang, Q. Zhang, D. Sun, X. Ding, and J. Liu. 2014. A Multiple-SNP Approach for Genome-Wide Association Study of Milk Production Traits in Chinese Holstein Cattle. *PLoS One*. 9:e99544. doi:10.1371/journal.pone.0099544.
- Farr, V.C., C.G. Prosser, and S.R. Davis. 2000. Effects of mammary engorgement and feed withdrawal on microvascular function in lactating goat mammary glands. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 279:H1813-8.
- Feingold, J. 1991. Le déséquilibre de liaison. *Médecine/Sciences*. 7:161. doi:10.4267/10608/4324.
- Ferris, C.P., J.P. Frost, C.S. Mayne, M. a. McCoy, and D.J. Kilpatrick. 2008. A comparison of the direct and residual response of dairy cows to once or twice-daily milking, in late lactation. *Livest. Sci.* 114:305–314. doi:10.1016/j.livsci.2007.05.015.
- Flint, D.J., and C.H. Knight. 1997. Interactions of Prolactin and Growth Hormone (GH) in the Regulation of Mammary Gland Function and Epithelial Cell Survival. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*. 2:41–48. doi:10.1023/A:1026321529451.
- Fox, P.F., T. Uniacke-Lowe, P.L.H. McSweeney, and J.A. O’Mahony. 2015. Salts of Milk. *In Dairy Chemistry and Biochemistry*. Springer International Publishing, Cham. 241–270.
- Friggens, N.C., C. Disenhaus, and H. V Petit. 2010. Nutritional sub-fertility in the dairy cow: towards improved reproductive management through a better biological understanding. *Animal*. 4:1197–1213. doi:doi:10.1017/S1751731109991601.
- Friggens, N.C., C. Duvaux-Ponter, M.P. Etienne, and P. Schmidely. 2016. Characterizing individual differences in animal responses to a nutritional challenge : Toward improved robustness measures. *J. Dairy Sci.* 4:2704–2718.
- Friggens, N.C., and E.H. van der Waaij. 2009. Modelling of resource allocation patterns. *In Resource Allocation Theory Applied to Farm Animal Production*. W.A. Rauw, editor. CABI, Wallingford, UK. 302–320.
- Gaucheron, F. 2005. The minerals of milk. *Reprod. Nutr. Dev.* 45:473–483. doi:10.1051/rnd.
- Gillespie, J.H., and M. Turelli. 1988. Genotype-environment interactions. *Genetics*. 121:129–138.
- Gleeson, D.E., B. O’Brien, L. Boyle, and B. Earley. 2007. Effect of milking frequency and nutritional level on aspects of the health and welfare of dairy cows. *Animal*. 1:125–32. doi:10.1017/S1751731107658030.
- Gopal, P.K., and H.S. Gill. 2000. Oligosaccharides and glycoconjugates in bovine milk and colostrum. *Br. J. Nutr.* 84:S69–S74. doi:10.1017/S0007114500002270.
- Gorewit, R.C., E.A. Wachs, R. Sagi, and W.G. Merrill. 1983. Current Concepts on the Role of Oxytocin in Milk Ejection. *J. Dairy Sci.* 66:2236–2250. doi:10.3168/jds.S0022-0302(83)82073-6.
- Grala, T.M., C.V.C. Phyn, J.K. Kay, A.G. Rius, M.D. Littlejohn, R.G. Snell, and J.R. Roche. 2011. Temporary alterations to milking frequency, immediately post-calving, modified the expression of genes regulating milk synthesis and apoptosis in the bovine mammary gland. *Proc. New Zeal. Soc. Anim. Prod.* 71:3–8. doi:10.1079/BJN19660078.
- Green, K.A., and C.H. Streuli. 2004. Apoptosis regulation in the mammary gland. *Cell. Mol. Life Sci.* 61:1867–1883. doi:10.1007/s00018-004-3366-y.
- Grignard, A., D. Stilmant, J. Oenema, S. Tirard, L. Debruyne, and S. Hennart. 2013. Comparaison des

- performances économiques et environnementales de fermes laitières biologiques et conventionnelles en Europe du Nord-Ouest. *In* 20ème Rencontres autour des Recherches sur les Ruminants. 221–224.
- Grisart, B., W. Coppieters, F. Farnir, L. Karim, C. Ford, P. Berzi, N. Cambisano, M. Mni, S. Reid, P. Simon, R. Spelman, M. Georges, and R. Snell. 2002. Positional Candidate Cloning of a QTL in Dairy Cattle: Identification of a Missense Mutation in the Bovine DGAT1 Gene with Major Effect on Milk Yield and Composition. *Genome Res.* 12:222–231. doi:10.1101/gr.224202.
- Grisart, B., F. Farnir, L. Karim, N. Cambisano, J.-J. Kim, A. Kvasz, M. Mni, P. Simon, J.-M. Frere, W. Coppieters, and M. Georges. 2004. Genetic and functional confirmation of the causality of the DGAT1 K232A quantitative trait nucleotide in affecting milk yield and composition. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101:2398–2403. doi:10.1073/pnas.0308518100.
- Guinard, J., H. Rulquin, and R. Vérité. 1994. Effect of Graded Levels of Duodenal Infusions of Casein on Mammary Uptake in Lactating Cows. 1. Major Nutrients. *J. Dairy Sci.* 77:2221–2231. doi:10.3168/jds.S0022-0302(94)77165-4.
- Guinard-Flament, J., E. Delamaire, P. Lambertson, and J.L. Peyraud. 2007. Adaptations of mammary uptake and nutrient use to once-daily milking and feed restriction in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90:5062–72. doi:10.3168/jds.2007-0259.
- Guinard-Flament, J., Y. Gallard, and H. Larroque. 2011a. Lactose in blood plasma and the ability of dairy cows to tolerate once-daily milking in terms of milk loss and milk recovery. *J. Dairy Sci.* 94:3446–54. doi:10.3168/jds.2010-4081.
- Guinard-Flament, J., S. Lemosquet, E. Delamaire, G. Le Bris, P. Lambertson, and C. Hurtaud. 2011b. Alteration of the nutrient uptake by the udder over an extended milking interval in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 94:5458–68. doi:10.3168/jds.2011-4268.
- Guinard-Flament, J., P.-G. Marnet, I. Verdier-Metz, C. Hurtaud, M.C. Montel, K. Stelwagen, and D. Pomiès. 2013. La traite, un outil de pilotage du troupeau et de maîtrise de la qualité du lait en élevage bovin laitier. *INRA Prod. Anim.* 26:193–205.
- Hale, S.A., A. V Capuco, and R.A. Erdman. 2003. Milk Yield and Mammary Growth Effects Due to Increased Milking Frequency During Early Lactation. *J. Dairy Sci.* 86:2061–2071. doi:10.3168/jds.S0022-0302(03)73795-3.
- Hayhoe, F.G.J., and R.J. Flemans. 1970. Atlas en couleurs de cytologie hématologique. 2nd Editio. Flammarion, Paris. 188 pp.
- Heaton, M.P., G.P. Harhay, G.L. Bennett, R.T. Stone, W.M. Grosse, E. Casas, J.W. Keele, T.P.L. Smith, C.G. Chitko-McKown, and W.W. Laegreid. 2002. Selection and use of SNP markers for animal identification and paternity analysis in U.S. beef cattle. *Mamm. Genome.* 13:272–281. doi:10.1007/s00335-001-2146-3.
- Hebb, C., and J.L. Linzell. 1970. Innervation of the mammary gland. A histochemical study in the rabbit. *Histochem. J.* 2:491–505. doi:10.1007/BF01003127.
- Henderson, C.R. 1973. Sire evaluation and genetic trends. *Proc. Anim. Breed. Genet. Symp. Honour J.L. Lush.* 10–41. doi:/1973.1973Symposium10x.
- Hernandez, L.L., C.M. Stiening, J.B. Wheelock, L.H. Baumgard, A.M. Parkhurst, and R.J. Collier. 2008. Evaluation of serotonin as a feedback inhibitor of lactation in the bovine. *J. Dairy Sci.* 91:1834–44. doi:10.3168/jds.2007-0766.

- Herve, L., H. Quesnel, V. Lollivier, and M. Boutinaud. 2015. Regulation of cell number in the mammary gland by controlling the exfoliation process in milk in ruminants. *J. Dairy Sci.* 99:1–10. doi:10.3168/jds.2015-9964.
- Hickson, R.E., N. Lopez-Villalobos, D.E. Dalley, D. a Clark, and C.W. Holmes. 2006. Yields and persistency of lactation in Friesian and Jersey cows milked once daily. *J. Dairy Sci.* 89:2017–24. doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72269-X.
- Holmes, C., H. Kamote, D. Mackenzie, and P. Morel. 1996. Effects of a decrease in milk yield, caused by once-daily milking or by restricted feeding, on the somatic cell count in milk from cows with or without subclinical mastitis. *Aust. J. Dairy Technol.* 51:8–11.
- Holmes, C.W., G.F. Wilson, D.D.S. Mackenzie, and J. Purchas. 1992. The effects of milking once daily throughout lactation on the performance of dairy cows grazing on pasture. *Proc. New Zeal. Soc. Anim. Prod.* 52:13–16.
- Holt, C. 1983. Swelling of golgi vesicles in mammary secretory cells and its relation to the yield and quantitative composition of milk. *J. Theor. Biol.* 101:247–261. doi:10.1016/0022-5193(83)90339-9.
- Hovey, R.C., T.B. Mcfadden, and R.M. Akers. 1999. Regulation of Mammary Gland Growth and Morphogenesis by the Mammary Fat Pad : A Species Comparison. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* 4:53–68. doi:10.1023/A:1018704603426.
- Huquet, B., H. Leclerc, and V. Ducrocq. 2012. Modelling and estimation of genotype by environment interactions for production traits in French dairy cattle. *Genet. Sel. Evol.* 44:35. doi:10.1186/1297-9686-44-35.
- IDF 29-1 ISO 17997-1. 2004. Milk - Determination of casein - nitrogen content - Part 1: Indirect method. Brussels, Belgium, Internation Dairy Federation.
- Innocente, N., M. Biasutti, and C. Blecker. 2011. HPLC profile and dynamic surface properties of the proteose-peptone fraction from bovine milk and from whey protein concentrate. *Int. Dairy J.* 21:222–228. doi:10.1016/j.idairyj.2010.11.004.
- INRA, and J. Agabriel. 2010. Alimentation des bovins, ovins et caprins. Besoins des animaux - Valeur des aliments. Tables INRA 2007, mise à jour 2010. Quae, editor. Versailles, France. 311 pp.
- Ismail, B., and S.S. Nielsen. 2010. Invited review: Plasmin protease in milk: Current knowledge and relevance to dairy industry. *J. Dairy Sci.* 93:4999–5009. doi:10.3168/jds.2010-3122.
- Jammes, H., and J. Djiane. 1988. Le développement de la glande mammaire et son contrôle hormonal dans l'espèce bovine. *INRA Prod. Anim.* 1:299–310.
- Jenness, R. 1974. The composition of milk. *In* Lactation, a comprehensive treatise - Volume III Nutrition and biochemistry of milk maintenance. B.L. Larson and V.. R. Smith, editors. Academic Press, New York, USA. 3–107.
- Jenness, R. 1986. Species variation in mammary gland function. *J. Dairy Sci.* 69:869–885.
- Jensen, R.G. 1995. Handbook of milk composition. Academic Press. 919 pp.
- Jiang, L., J. Liu, D. Sun, P. Ma, X. Ding, Y. Yu, and Q. Zhang. 2010. Genome wide association studies for milk production traits in Chinese Holstein population. *PLoS One.* 5. doi:10.1371/journal.pone.0013661.
- Johnson, D.L., R. Thompson, T.P. Callanan, D.A. Harville, R.J.C. Cantet, D. Gianola, I. Misztal, R.L. Fernando, I.E. Dennis, R.B. Schnabel, A. George, J.W. Liu, H.U. Graser, S.P. Smith, B. Tier, D.A. Harville, N.M.

- Laird, N. Lange, D. Stram, M.J. Lindstrom, D.M. Bates, D. Marquardt, K. Meyer, I. Misztal, I. Misztal, M. Perez-Enciso, J.A. Nelder, R. Mead, W.H. Press, B.P. Flannery, S.A. Teukolsky, W.T. Vetterling, S.R. Searle, G. Casella, C.E. McCulloch, K. Takahashi, J. Fagan, and M.S. Chin. 1995. Restricted Maximum Likelihood Estimation of Variance Components for Univariate Animal Models Using Sparse Matrix Techniques and Average Information. *J. Dairy Sci.* 78:449–456. doi:10.3168/jds.S0022-0302(95)76654-1.
- Johnson, I.D., and I.C. Hart. 1986. Manipulation of milk yield with growth hormone. *In* Recent Advances in animal Nutrition. Butterworths, London, UK. 105–123.
- Kamote, H.I., C.W. Holmes, D. Mackenzie, R.J. Holdaway, and B.W. Wickham. 1994. Effects of once daily milking in later lactation on cows with either low or high initial somatic cell counts. *Proc. New Zeal. Soc. Anim. Prod.* 54:285–287.
- Kaupe, B., H. Brandt, E.-M. Prinzenberg, and G. Erhardt. 2007. Joint analysis of the influence of CYP11B1 and DGAT1 genetic variation on milk production, somatic cell score, conformation, reproduction, and productive lifespan in German Holstein cattle. *J. Anim. Sci.* 85:11. doi:10.2527/jas.2005-753.
- Kay, J.K., C.V.C. Phyn, a G. Rius, S.R. Morgan, T.M. Grala, and J.R. Roche. 2013. Once-daily milking during a feed deficit decreases milk production but improves energy status in early lactating grazing dairy cows. *J. Dairy Sci.* 96:6274–84. doi:10.3168/jds.2012-6167.
- Keenan, T., and S. Patton. 1995. The milk lipid globule membrane. *In* Handbook of milk composition. R. (Ed) Jensen, editor. Academic Press, New York, USA. 5–62.
- Kim, J.Y., Y. Mizoguchi, H. Yamaguchi, J. Enami, and S. Sakai. 1997. Removal of milk by suckling acutely increases the prolactin receptor gene expression in the lactating mouse mammary gland. *Mol. Cell. Endocrinol.* 131:31–38. doi:10.1016/S0303-7207(97)00086-5.
- Knap, P.W. 2005. Breeding robust pigs. *Aust. J. Exp. Agric.* 45:763–773. doi:10.1071/EA05041.
- Knight, C., and R. Dewhurst. 1994. Once-daily milking of dairy-cows: relationship between milk loss and cisternal milk storage. *J. Dairy Res.* 61:441–449.
- Knight, C.H., and M. Peaker. 1984. Mammary development and regression during lactation in goats in relation to milk secretion. *Q. J. Exp. Physiol.* 69:331–8. doi:10.1113/expphysiol.1984.sp002809.
- Knight, C.H., M. Peaker, and C.J. Wilde. 1998. Local control of mammary development and function. *Rev. Reprod.* 3:104–112. doi:10.1530/ror.0.0030104.
- Knutson, R.J., D.D. Mackenzie, S.R. Davis, and S.N. McCutcheon. 1993. The effect of once daily milking on concentration and yields of plasminogen, plasmin and other whey proteins. *In* Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production. 155–158.
- Koprowski, J.A., and H. Allen Tucker. 1973. Serum Prolactin During Various Physiological States and Its Relationship to Milk Production in the Bovine. *Endocr. Soc. J.* 92:1480–1487.
- Kuhn, N.J., D.T. Carrick, and C.J. Wilde. 1980. Lactose Synthesis: The Possibilities of Regulation. *J. Dairy Sci.* 63:328–336. doi:10.3168/jds.S0022-0302(80)82934-1.
- Kuwada, S., S. Okamoto, and T. Matsuo. 1984. Relationship between Intramammary Pressure and Milk Secretion Rate in Lactating Dairy Cows. *Bull. Fac. Agron. Saga Univ.* 57:81–89.
- Labussière, J., and J. Coindet. 1968. Effets de la suppression de la traite du dimanche soir, chez les bovins de race française frisonne pie noire. *Ann. Zootech.* 17:231–244.

- Lacasse, P., S. Ollier, V. Lollivier, and M. Boutinaud. 2016. New insights into the importance of prolactin in dairy ruminants. *J. Dairy Sci.* 99:864–874. doi:10.3168/jds.2015-10035.
- Lacy-Hulbert, S., D. Dalley, and D. Clark. 2005. The effects of once a day milking on mastitis and somatic cell count. *In Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*. New Zealand Society of Animal Production; Hamilton; New Zealand. 137–142.
- Lacy-Hulbert, S., M. Woolford, G.D. Nicholas, C.G. Prosser, and K. Stelwagen. 1999. Effect of milking frequency and pasture intake on milk yield and composition of late lactation cows. *J. Dairy Sci.* 82:1232–1239.
- Lakic, B. 2011. Effects of a single prolonged milking interval in cows. PhD Thesis - Swedish University of Agricultural Sciences. 85 pp.
- Larroque, H., Y. Gallard, L. Thauinat, D. Boichard, and J.J. Colleau. 2002. A crossbreeding experiment to detect quantitative trait loci in dairy cattle. *In 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, 19-23 août 2002. Montpellier, France.
- Le, T.X., N. Datta, and H.C. Deeth. 2006. A sensitive HPLC method for measuring bacterial proteolysis and proteinase activity in UHT milk. *Food Res. Int.* 39:823–830. doi:10.1016/j.foodres.2006.03.008.
- Leclerc, H., A. Barbat-Leterrier, and V. Ducrocq. 2009. Mise en place d'une évaluation génétique sur les caractères laitiers à partir des performances élémentaires en remplacement des données lactation en race bovine. *Rencontres autour des* 291–294.
- Lefcourt, A.M., and R.M. Akers. 1983. Is Oxytocin Really Necessary for Efficient Milk Removal in Dairy Cows? *J. Dairy Sci.* 66:2251–2259. doi:10.3168/jds.S0022-0302(83)82074-8.
- Lefebvre, R., H. Larroque, S. Barbey, Y. Gallard, J.J. Colleau, C. Chantry-Darmon, A. Delacroix-Buchet, A.-L. Laine, and D. Boichard. 2012. Détection de QTL de caractères originaux dans une population bovine croisée Holstein x Normande. *19. Rencontres Rech. Ruminants.* 19:73–76.
- Legarra, A., I. Aguilar, and I. Misztal. 2009. A relationship matrix including full pedigree and genomic information. *J. Dairy Sci.* 92:4656–4663. doi:10.3168/jds.2009-2061.
- Leitner, G., M. Chaffer, O. Krifucks, a Glickman, E. Ezra, and a Saran. 2000. Milk leucocyte populations in heifers free of udder infection. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health.* 47:133–8.
- Lembeye, F., N. Lopez-villalobos, J.L. Burke, and S.R. Davis. 2016. Estimation of genetic parameters for milk traits in cows milked once- or twice-daily in New Zealand. *Livest. Sci.* 185:142–147. doi:10.1016/j.livsci.2016.01.022.
- Lenth, R. 2014. lsmeans: Least-Squares Means. R package version 2.12. <http://CRAN.R-project.org/package=lsmeans>.
- Lerner, I.M. 1954. Genetic homeostasis. Oliver and Boyd, London, UK. 134p. pp.
- Ley, J., and R. Jenness. 1970. Lactose Synthetase Activity of alpha-lactalbumins from Several Species. *Arch. Biochem. Biophys.* 138:464–469.
- Lin, Y., X. Sun, X. Hou, B. Qu, X. Gao, and Q. Li. 2016. Effects of glucose on lactose synthesis in mammary epithelial cells from dairy cow. *BMC Vet. Res.* 12:81. doi:10.1186/s12917-016-0704-x.
- Lindmark-Månsson, H., C. Bränning, G. Aldén, and M. Paulsson. 2006. Relationship between somatic cell count, individual leukocyte populations and milk components in bovine udder quarter milk. *Int. Dairy J.* 16:717–727. doi:10.1016/j.idairyj.2005.07.003.

- Linzell, J., and M. Peaker. 1971. Intracellular concentrations of sodium, potassium and chloride in the lactating mammary gland and their relation to the secretory mechanism. *J. Physiol.* 216:683–700.
- Littlejohn, M.D., K. Tiplady, T. Lopdell, T.A. Law, A. Scott, C. Harland, R. Sherlock, K. Henty, V. Obolonkin, K. Lehnert, A. MacGibbon, R.J. Spelman, S.R. Davis, and R.G. Snell. 2014. Expression variants of the lipogenic AGPAT6 gene affect diverse milk composition phenotypes in *Bos taurus*. *PLoS One.* 9:1–12. doi:10.1371/journal.pone.0085757.
- Littlejohn, M.D., C.G. Walker, H.E. Ward, K.B. Lehnert, R.G. Snell, G.A. Verkerk, R.J. Spelman, D.A. Clark, and S.R. Davis. 2010. Effects of reduced frequency of milk removal on gene expression in the bovine mammary gland. *Physiol. Genomics.* 41:21–32. doi:10.1152/physiolgenomics.00108.2009.
- Llamas Moya, S., M. Alonso Gómez, L.A. Boyle, J.F. Mee, B. O’Brien, and S. Arkins. 2008. Effects of milking frequency on phagocytosis and oxidative burst activity of phagocytes from primiparous and multiparous dairy cows during early lactation. *J. Dairy Sci.* 91:587–95. doi:10.3168/jds.2007-0379.
- Loiselle, M.C., C. Ster, B.G. Talbot, X. Zhao, G.F. Wagner, Y.R. Boisclair, and P. Lacasse. 2009. Impact of postpartum milking frequency on the immune system and the blood metabolite concentration of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92:1900–12. doi:10.3168/jds.2008-1399.
- Lollivier, V., J. Guinard-Flament, M. Ollivier-Bousquet, and P.-G. Marnet. 2002. Oxytocin and milk removal: two important sources of variation in milk production and milk quality during and between milkings. *Reprod. Nutr. Dev.* 42:173–186. doi:10.1051/rnd.
- Lollivier, V., P.-G. Marnet, S. Delpal, D. Rainteau, C. Achard, A. Rabot, and M. Ollivier-Bousquet. 2006. Oxytocin stimulates secretory processes in lactating rabbit mammary epithelial cells. *J. Physiol.* 570:125–40. doi:10.1113/jphysiol.2005.097816.
- Lynch, M., and W. Gabriel. 1987. Environmental Tolerance. *Am. Nat.* 129:283–303.
- MacGibbon, A., and M. Taylor. 2006. Advanced Dairy Chemistry Volume 2- Composition and Structure of Bovine Milk Lipids. In *Advanced Dairy Chemistry*. P. Fox and P. McSweeney, editors. Springer US, Boston, MA, USA. 1–42.
- Martin, O., and D. Sauvant. 2010a. A teleonomic model describing performance (body, milk and intake) during growth and over repeated reproductive cycles throughout the lifespan of dairy cattle. 1. Trajectories of life function priorities and genetic scaling. *Animal.* 4:2048–56. doi:10.1017/S1751731110001369.
- Martin, O., and D. Sauvant. 2010b. A teleonomic model describing performance (body, milk and intake) during growth and over repeated reproductive cycles throughout the lifespan of dairy cattle. 2. Voluntary intake and energy partitioning. *animal.* 4:2048–2056. doi:10.1017/S1751731110001369.
- Martinet, J., and L. Houdebine. 1993. Biologie de la lactation. INSERM-INRA Editions, Versailles, France. 3-28 pp.
- McNamara, S., J.J. Murphy, F.P. O’Mara, M. Rath, and J.F. Mee. 2008. Effect of milking frequency in early lactation on energy metabolism, milk production and reproductive performance of dairy cows. *Livest. Sci.* 117:70–78. doi:10.1016/j.livsci.2007.11.013.
- McPherson, A.W., J.E. Pryce, and A.M. Winkelman. 2007. The genetic improvement of cows for once-a-day (OAD) milking. In *Once-a-day milking conference*. Hamilton, New-Zealand. 44–48.
- Meffe, N., C. Tache, and V.G.P. Marnet. 2003. Suppressing one milking per week throughout lactation of high producing dairy cows: effects on animal performances and milk physico-chemical

- characteristics. *In* Rencontres autour des Recherches sur les Ruminants, Paris, Fr., Dec. 2003. 85–88.
- Meyer, K. 2007. WOMBAT - A tool for mixed model analyses in quantitative genetics by restricted maximum likelihood (REML). *J Zhejiang Univ Sci B*. 8:815–821. doi:10.1631/jzus.2007.B0815.
- Meyer, K., and B. Tier. 2012. “SNP Snappy”: A strategy for fast genome-wide association studies fitting a full mixed model. *Genetics*. 190:275–277. doi:10.1534/genetics.111.134841.
- Michaud, A., M. Peyrin, A. Massiot, A. Berville, B. Portier, V. Brocard, and J. Guinard-Flament. 2007. Quelle utilisation de la monotraite dans les élevages bovins laitiers en Bretagne ? *In* 14èmes Rencontres autour des Rech. sur les Ruminants, Paris, Fr. 5 6 Dec. 2007. 423.
- Miglior, F., A. Sewalem, J. Jamrozik, J. Bohmanova, D.M. Lefebvre, and R.K. Moore. 2007. Genetic Analysis of Milk Urea Nitrogen and Lactose and Their Relationships with Other Production Traits in Canadian Holstein Cattle. *J. Dairy Sci*. 90:2468–2479. doi:10.3168/jds.2006-487.
- Minvielle, F. 1990. Principes d’amélioration génétique des animaux domestiques. INRA, Versailles, France - Les Presses de l’Université Laval, Québec, Canada. 211 pp.
- Misztal, I. 2008. Reliable computing in estimation of variance components. *J. Anim. Breed. Genet*. 125:363–370. doi:10.1111/j.1439-0388.2008.00774.x.
- Misztal, I., S. Tsuruta, T. Strabel, B. Auvray, T. Druet, and D.H. Lee. 2002. BLUPF90 and related programs (BGF90). *In* Proceedings of the 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. 21–22.
- Monteix, P., A. Farrugia, P. Note, C. Espinasse, F. Anglard, F. Fournier, O. Troquier, and D. Pomiès. 2015. Quelles performances pour deux systèmes expérimentaux d’élevage laitier herbagers bas intrants de montagne ? *In* 22ème Rencontres autour des Recherches sur les Ruminants. Paris, France. 363.
- Mrode, R., and R. Thompson. 2005. Linear Models for the Prediction of Animal Breeding Values. 2nd edition. CABI International, Wallingford, UK. 240-245 pp.
- Müller, B.U., B. Stich, and H.-P. Piepho. 2011. A general method for controlling the genome-wide type I error rate in linkage and association mapping experiments in plants. *Heredity (Edinb)*. 106:825–831. doi:10.1038/hdy.2010.125.
- Müller-Buschbaum, P., R. Gebhardt, S. V Roth, E. Metwalli, and W. Doster. 2007. Effect of calcium concentration on the structure of casein micelles in thin films. *Biophys. J*. 93:960–8. doi:10.1529/biophysj.107.106385.
- Murata, H., N. Shimada, and M. Yoshioka. 2004. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *Vet. J*. 168:28–40. doi:10.1016/S1090-0233(03)00119-9.
- Murney, R., K. Stelwagen, T.T. Wheeler, J.K. Margerison, and K. Singh. 2015a. Activation of signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) is linked to β 1-integrin protein abundance in unilaterally milked bovine mammary glands. *J. Dairy Sci*. 98:3133–3142. doi:10.3168/jds.2014-9003.
- Murney, R., K. Stelwagen, T.T. Wheeler, J.K. Margerison, and K. Singh. 2015b. The effects of milking frequency in early lactation on milk yield, mammary cell turnover, and secretory activity in grazing dairy cows. *J. Dairy Sci*. 98:305–11. doi:10.3168/jds.2014-8745.
- Nguyen, M., M. Boutinaud, B. Pétridou, A. Gabory, M. Pannetier, S. Chat, S. Bouet, L. Jouneau, F. Jaffrezic, D. Laloë, C. Klopp, N. Brun, C. Kress, H. Jammes, M. Charlier, and E. Devinoy. 2014. DNA Methylation and Transcription in a Distal Region Upstream from the Bovine AlphaS1 Casein Gene after Once or

- Twice Daily Milking. *PLoS One*. 9:e111556. doi:10.1371/journal.pone.0111556.
- Niessen, C.M. 2007. Tight Junctions/Adherens Junctions: Basic Structure and Function. *J. Invest. Dermatol.* 127:2525–2532. doi:10.1038/sj.jid.5700865.
- O’Brien, B., G. Ryan, W. Meaney, D. McDonagh, and A. Kelly. 2002. Effect of frequency of milking on yield, composition and processing quality of milk. *J. Dairy Res.* 69:367–374. doi:10.1017/S0022029902005605.
- O’Driscoll, K., D. Gleeson, B. O’Brien, and L. Boyle. 2010. Effect of milking frequency and nutritional level on hoof health, locomotion score and lying behaviour of dairy cows. *Livest. Sci.* 127:248–256. doi:10.1016/j.livsci.2009.10.006.
- O’Driscoll, K., G. Olmos, S. Llamas Moya, J.F. Mee, B. Earley, D. Gleeson, B. O’Brien, and L. Boyle. 2012. A reduction in milking frequency and feed allowance improves dairy cow immune status. *J. Dairy Sci.* 95:1177–1187. doi:10.3168/jds.2011-4408.
- Ogorevc, J., T. Kunej, A. Razpet, and P. Dovc. 2009. Database of cattle candidate genes and genetic markers for milk production and mastitis. *Anim. Genet.* 40:832–851. doi:10.1111/j.1365-2052.2009.01921.x.
- Ollion, E., S. Ingrand, C. Espinasse, J.M. Trommenschlager, and F. Blanc. 2013. How to assess the diversity of dairy cows adaptive capacities. In 64th Annual Meeting of the EAAP. Nantes, France. 496.
- Ollivier-Bousquet, M. 2002. Milk lipid and protein traffic in mammary epithelial cells: joint and independent pathways. *Reprod. Nutr. Dev.* 42:149–162.
- Olsen, H.G., L. Gomez-Raya, D.I. Våge, I. Olsaker, H. Klungland, M. Svendsen, T. Adnøy, a Sabry, G. Klemetsdal, N. Schulman, W. Krämer, G. Thaller, K. Rønningen, and S. Lien. 2002. A genome scan for quantitative trait loci affecting milk production in Norwegian dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 85:3124–3130. doi:10.3168/jds.S0022-0302(02)74400-7.
- Ott, J., Y. Kamatani, and M. Lathrop. 2011. Family-based designs for genome-wide association studies. *Nat. Rev. Genet.* 12:465–474. doi:10.1038/nrg2989.
- Patton, J., D. a Kenny, J.F. Mee, F.P. O’Mara, D.C. Wathes, M. Cook, and J.J. Murphy. 2006. Effect of milking frequency and diet on milk production, energy balance, and reproduction in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 89:1478–87. doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72215-9.
- Peaker, M. 1980. The effet of raised intramammary pressure on mammary function in the goat in relation to the cessation of lactation. *J. Physiol.* 301:415–428.
- Peaker, M. 1983. Secretion of ions and water. *Biochem. Lact.* 285–304.
- Phocas, F., J. Bobe, L. Bodin, B. Charley, J.Y. Dourmad, N.C. Friggens, J.F. Hocquette, P.Y. Le Bail, E. Le Bihan-Duval, P. Mormède, P. Quéré, and F. Schelcher. 2014. Des animaux plus robustes: Un enjeu majeur pour le développement durable des productions animales nécessitant l’essor du phénotypage fin et à haut débit. *Prod. Anim.* 27:181–194.
- Phocas, F., M. Brochard, H. Larroque, G. Lagriffoul, J. Labatut, and J. Guerrier. 2013. Etat actuel et perspectives d’évolution des objectifs de sélection chez les ruminants. In Rencontres autour des Recherches sur les Ruminants. Paris, France. 129–132.
- Phyn, C.V.C., J.K. Kay, A.G. Rius, S.R. Davis, K. Stelwagen, J.E. Hillerton, and J.R. Roche. 2010. Review : Impact of short – term alterations to milking frequency in early lactation. In Proceeding of the 4th Australasian Dairy Science Symposium, Lincoln University, NZ.

- Phyn, C.V.C., J.K. Kay, A.G. Rius, S.R. Morgan, T.M. Grala, J.F. Roche, and C.S. Roach. 2011. Effect of temporary alterations to milking frequency during the early post-partum period on milk production and body condition score in grazing dairy cows. *Soc. Anim. Prod.* 71:45–49.
- Phyn, C.V.C., J.K. Kay, a G. Rius, S.R. Morgan, C.G. Roach, T.M. Grala, and J.R. Roche. 2014. Temporary alterations to postpartum milking frequency affect whole-lactation milk production and the energy status of pasture-grazed dairy cows. *J. Dairy Sci.* 97:6850–6868. doi:10.3168/jds.2013-7836.
- Pomiès, D., P. Marnet, and S. Cournut. 2008. Les conduites de traite simplifiées en élevage laitier: vers la levée de l'astreinte biquotidienne. *INRA Prod. Anim.* 21:59–70.
- Pomiès, D., B. Martin, Y. Chilliard, P. Pradel, and B. Rémond. 2007. Once-a-day milking of Holstein and Montbéliarde cows for 7 weeks in mid-lactation. *Animal.* 1:1497–1505. doi:10.1017/S1751731107000778.
- Pomiès, D., B. Martin, and B. Rémond. 2003. La traite une fois par jour pendant 7 semaines de vaches laitières Prim'Holstein et Montbéliarde en milieu de lactation: performances zootechniques, qualité du lait et des fromages. *Renc. Rech.* 81–84.
- Pomiès, D., and B. Rémond. 2000. Omission de une de deux traites par semaine sur des vaches laitières en milieu de lactation. In 7èmes Rencontres autour des Recherches sur les Ruminants, Paris, Fr. Dec. 2000. 128.
- Pomiès, D., and B. Rémond. 2002. Once a day milking of dairy cows during the whole lactation: consequences on performances and milk quality. *9th Proc. Journées 3R PARIS, edt. INRA.* 195–198.
- Portier, B., F. Chénais, and V. Brocard. 2006. Traire une fois par jour toute l'année : un revenu équivalent à certaines ocnditions. *Cap Elev.* 6, 10–13.
- Poutrel, B., J.P. Caffin, and P. Rainard. 1983. Physiological and Pathological Factors Influencing Bovine Serum Albumin Content of Milk. *J. Dairy Sci.* 66:535–541. doi:10.3168/jds.S0022-0302(83)81822-0.
- Prosser, C.G., G. Nicholas, K. Stelwagen, S.J. Lacy Hulbert, M.W. Woolford, and T.B. McFadden. 1995. Influence of milking frequency and feeding level on plasmin activity and casein degradation in milk. *Proc. New Zeal. Soc. Anim. Prod.* 55:9–11.
- Puillet, L., O. Martin, M. Tichit, and D. Réale. 2013. A modelling framework to evaluate benefits of animal adaptive capacity for livestock farming systems. In 64th Annual Meeting of the EAAP. Nantes, France. 494.
- Pullan, S., J. Wilson, a Metcalfe, G.M. Edwards, N. Goberdhan, J. Tilly, J. a Hickman, C. Dive, and C.H. Streuli. 1996. Requirement of basement membrane for the suppression of programmed cell death in mammary epithelium. *J. Cell Sci.* 109 (Pt 3:631–642.
- Radcliffe, J.C., L.F. Bailey, and M.L. Horne. 1973. Periodic omission of dairy cow milkings: I. Effect on milk yield and composition and on udder health. *J. Dairy Res.* 40:247–254.
- Rainard, P., C. Riollet, P. Berthon, P. Cunha, A. Fromageau, C. Rossignol, and F.B. Gilbert. 2008. The chemokine CXCL3 is responsible for the constitutive chemotactic activity of bovine milk for neutrophils. *Mol. Immunol.* 45:4020–4027. doi:10.1016/j.molimm.2008.06.010.
- Rémond, B., S. Aubailly, Y. Chilliard, D. Dupontc, D. Pomiès, and M. Petit. 2002a. Combined effects of once-daily milking and feeding level in the first three weeks of lactation on milk production and enzyme activities , and nutritional status , in Holstein cows. *Anim. Res.* 51:101–117. doi:10.1051/animres.

- Rémond, B., J.-B. Coulon, M. Nicloux, and D. Leveux. 1999. Effect of temporary once-daily milking in early lactation on milk production and nutritional status of dairy cows. *Ann. Zootech.* 48:341–352.
- Rémond, B., and D. Pomiès. 2005. Once-daily milking of dairy cows: a review of recent French experiments. *Anim. Res.* 54:427–442. doi:10.1051/animres.
- Rémond, B., and D. Pomiès. 2007. Once-daily milking of Holstein cows for one-week decreases milk yield by twenty-five percent without any carry-over effect. *Livest. Sci.* 110:192–195. doi:10.1016/j.livsci.2006.12.009.
- Rémond, B., D. Pomiès, D. Dupont, and Y. Chilliard. 2004. Once-a-day milking of multiparous Holstein cows throughout the entire lactation: milk yield and composition, and nutritional status. *Anim. Res.* 53:201–212. doi:10.1051/animres:2004014 201.
- Rémond, B., D. Pomiès, C. Julien, and J. Guinard-Flament. 2009. Performance of dairy cows milked twice daily at contrasting intervals. *Animal.* 3:1463–71. doi:10.1017/S1751731109990371.
- Rémond, B., P. Pradel, D. Pomiès, and M. Petit. 2002b. Effect of once daily milking of cows, for seven weeks, in mid lactation. *In Rencontres autour des Recherches sur les Ruminants.* Paris, France. 203.
- Rhodes, F.M., B.A. Clark, K.L. Macmillan, and S. Mcdougall. 1998. Use of once daily milking or treatment with progesterone and oestradiol benzoate in anoestrous cows. *Proc. New Zeal. Soc. Anim. Prod.* 58:44–46.
- Riollet, C., P. Rainard, and B. Poutrel. 2002. Cells and Cytokines in Inflammatory Secretions of Bovine Mammary Gland. *In Biology of the Mammary Gland.* Kluwer Academic Publishers, Boston. 247–258.
- Robert-Granié, C., A. Legarra, and V. Ducrocq. 2011. Principes de base de la sélection génomique. *INRA Prod. Anim.* 24:331–340.
- Roguinsky, M., M. Ducelliez, and R. Borde. 1972. Effets de la suppression d'une traite par semaine sur l'infection mammaire et la production laitière. *Ann. Rech. Vétérinaires.* 3:43–60.
- Rollema, H., S. Visser, and J. Poll. 1983. Spectrophotometric assay of plasmin and plasminogen in bovine-milk. *Milchwissenschaft.* 38:214–217.
- Royal, M.D., J.E. Pryce, J.A. Woolliams, and A.P.F. Flint. 2002. The Genetic Relationship between Commencement of Luteal Activity and Calving Interval, Body Condition Score, Production, and Linear Type Traits in Holstein-Friesian Dairy Cattle. *J. Dairy Sci.* 85:3071–3080. doi:10.3168/jds.S0022-0302(02)74394-4.
- Rupp, R., and D. Boichard. 1997. Genetic evaluation of dairy cattle for somatic cell count to improve mastitis resistance. *In 4èmes Rencontres autour des Recherches sur les Ruminants* Paris, Fr., Dec 1997. Institut l'Elevage; Paris; France. 211–214.
- Salem, M.M.I., G. Thompson, S. Chen, A.B. Pereira, and J. Carnevalheira. 1998. Genome-Wide Association Study for Milk-Fat Yield in Portuguese Holstein Cattle. *In 10th World Congress of Genetics Applied to Livestock Production.* 12–14.
- Sanchez, M.P., A. Govignon-Gion, M. Ferrand, M. Gelé, D. Pourchet, Y. Amigues, S. Fritz, M. Bousaha, A. Capitan, D. Rocha, G. Miranda, P. Martin, M. Brochard, and D. Boichard. 2016. Whole-genome scan to detect quantitative trait loci associated with milk protein composition in 3 French dairy cattle breeds. *J. Dairy Sci.* 99:8203–8215. doi:10.3168/jds.2016-11437.
- Sanders, K., J. Bennewitz, N. Reinsch, G. Thaller, E.-M. Prinzenberg, C. Kühn, and E. Kalm. 2006.

- Characterization of the DGAT1 mutations and the CSN1S1 promoter in the German Angeln dairy cattle population. *J. Dairy Sci.* 89:3164–3174. doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72590-5.
- Sauvant, D., and O. Martin. 2010. Robustesse, rusticité, flexibilité, plasticité... les nouveaux critères de qualité des animaux et des systèmes d'élevage : définitions systémique et biologique des différents concepts. *INRA Prod. Anim.* 23:5–10.
- Schaar, J. 1985. Plasmin activity and proteose-peptone content of individual milks. *J. Dairy Res.* 52:369–378.
- Scheiner, S.M., and R.F. Lyman. 1989. The genetics of phenotypic plasticity I. Heritability. *J. Evol. Biol.* 2:95–107. doi:10.1046/j.1420-9101.1989.2020095.x.
- Schlamberger, G., S. Wiedemann, E. Viturro, H.H.D. Meyer, and M. Kaske. 2010a. Effects of continuous milking during the dry period or once daily milking in the first 4 weeks of lactation on metabolism and productivity of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93:2471–85. doi:10.3168/jds.2009-2823.
- Schlamberger, G., S. Wiedemann, E. Viturro, H.H.D. Meyer, and M. Kaske. 2010b. Effects of continuous milking during the dry period or once daily milking in the first 4 weeks of lactation on metabolism and productivity of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93:2471–85. doi:10.3168/jds.2009-2823.
- Selmanoff, M., and C. Selmanoff. 1983. Role of pup age, estradiol-17 beta and pituitary responsiveness in the differences *Biol. Reprod.* 411:400–411.
- Shamay, A., F. Shapiro, G. Leitner, and N. Silanikove. 2003. Infusions of casein hydrolyzates into the mammary gland disrupt tight junction integrity and induce involution in cows. *J. Dairy Sci.* 86:1250–8. doi:10.3168/jds.S0022-0302(03)73709-6.
- Sidot, G., J.C. Moreau, and A. Guillaumin. 2005. L'attente des éleveurs par rapport à l'évolution de leur métier et des conditions de travail. 95–103.
- Silva, A.A., A.L.S. Azevedo, K. Gasparini, R.S. Verneque, M.G.C.D. Peixoto, B.R. Panetto, S.E.F. Guimarães, and M.A. Machado. 2011. Quantitative trait loci affecting lactose and total solids on chromosome 6 in Brazilian gir dairy cattle. *Genet. Mol. Res.* 10:3817–3827. doi:10.4238/2011.October.31.15.
- Singh, K., S.R. Davis, J.M. Dobson, A.J. Molenaar, T.T. Wheeler, C.G. Prosser, V.C. Farr, K. Oden, K.M. Swanson, C.V.C. Phyn, D.L. Hyndman, T. Wilson, H.V. Henderson, and K. Stelwagen. 2008. cDNA Microarray Analysis Reveals that Antioxidant and Immune Genes Are Upregulated During Involution of the Bovine Mammary Gland. *J. Dairy Sci.* 91:2236–2246. doi:10.3168/jds.2007-0900.
- Singh, K., J. Dobson, C.V.C.V.C. Phyn, S.R.R. Davis, V.C.C. Farr, A.J.J. Molenaar, and K. Stelwagen. 2005. Milk accumulation decreases expression of genes involved in cell–extracellular matrix communication and is associated with induction of apoptosis in the bovine mammary gland. *Livest. Prod. Sci.* 98:67–78. doi:10.1016/j.livprodsci.2005.10.016.
- Singh, K., a. J. Molenaar, K.M. Swanson, B. Gudex, J. a. Arias, R. a. Erdman, and K. Stelwagen. 2012. Epigenetics: a possible role in acute and transgenerational regulation of dairy cow milk production. *Animal.* 6:375–381. doi:10.1017/S1751731111002564.
- Sneddon, N., N. Lopez-Villalobos, S. Davis, R. Hickson, and L. Shalloo. 2015. Genetic parameters for milk components including lactose from test day records in the New Zealand dairy herd. *New Zeal. J. Agric. Res.* 58:97–107. doi:10.1080/00288233.2014.978482.
- Stachowicz, K., G. Jenkins, P. Amer, and C.V.C. Phyn. 2014. Genetic Evaluation of Milk Traits under Whole-Season Once-a-Day Milking. *In* 10th World Congress of Genetics Applied to Livestock Production.

Vancouver, Canada. Abstract No 821.

- Stefanon, B., M. Colitti, G. Gabai, C.H. Knight, and C.J. Wilde. 2002. Mammary apoptosis and lactation persistency in dairy animals. *J. Dairy Res.* 69:37–52. doi:doi:10.1017/S0022029901005246.
- Stelwagen, K., S.R. Davis, V.C. Farr, S.J. Eichler, and I. Politis. 1994a. Effect of once daily milking and concurrent somatotropin on mammary tight junction permeability and yield of cows. *J. Dairy Sci.* 77:2994–3001. doi:10.3168/jds.S0022-0302(94)77240-4.
- Stelwagen, K., S.R. Davis, V.C. Farr, C.G. Prosser, and R. a Sherlock. 1994b. Mammary epithelial cell tight junction integrity and mammary blood flow during an extended milking interval in goats. *J. Dairy Sci.* 77:426–432. doi:10.3168/jds.S0022-0302(94)76969-1.
- Stelwagen, K., V.C. Farr, S.R. Davis, and C.G. Prosser. 1995. EGTA-induced disruption of epithelial cell tight junctions in the lactating caprine mammary gland. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 269.
- Stelwagen, K., V.C. Farr, H.A. McFadden, C.G. Prosser, and S.R. Davis. 1997. Time course of milk accumulation-induced opening of mammary tight junctions, and blood clearance of milk components. *Am. Physiol.* 379–386.
- Stelwagen, K., V.C. Farr, G.D. Nicholas, S.R. Davis, and C.G. Prosser. 2008. Effect of milking interval on milk yield and quality and rate of recovery during subsequent frequent milking. *Livest. Sci.* 114:176–180. doi:10.1016/j.livsci.2007.04.021.
- Stelwagen, K., and C.H. Knight. 1997. Effect of unilateral once or twice daily milking of cows on milk yield and udder characteristics in early and late lactation. *J. Dairy Res.* 64:487–94.
- Stelwagen, K., C.H. Knight, V.C. Farr, S.R. Davis, C.G. Prosser, and T.B. McFadden. 1996. Continuous versus single drainage of milk from the bovine mammary gland during a 24 hour period. *Exp. Physiol.* 81:141–149. doi:10.1113/expphysiol.1996.sp003915.
- Stelwagen, K., and S. Lacy-Hulbert. 1996. Effect of milking frequency on milk somatic cell count characteristics and mammary secretory cell damage in cows. *Am. J. Vet. Res.* 57:902–905.
- Stelwagen, K., R.D. McLaren, S.A. Turner, H.A. McFadden, and C.G. Prosser. 1998. No evidence for basolateral secretion of milk protein in the mammary gland of lactating goats. *J. Dairy Sci.* 81:434–437. doi:10.3168/jds.S0022-0302(98)75594-8.
- Stelwagen, K., C.V.C. Phyn, S.R. Davis, J. Guinard-Flament, D. Pomiès, J.R. Roche, and J.K. Kay. 2013. Invited review: reduced milking frequency: milk production and management implications. *J. Dairy Sci.* 96:3401–13. doi:10.3168/jds.2012-6074.
- Stelwagen, K., I. Politis, J.H. White, B. Zavizion, C.G. Prosser, S.R. Davis, and V.C. Farr. 1994c. Effect of milking frequency and somatotropin on the activity of plasminogen activator, plasminogen, and plasmin in bovine milk. *J. Dairy Sci.* 77:3577–3583. doi:10.3168/jds.S0022-0302(94)77301-X.
- Stoop, W.M., H. Bovenhuis, and J. a M. van Arendonk. 2007. Genetic parameters for milk urea nitrogen in relation to milk production traits. *J. Dairy Sci.* 90:1981–1986. doi:10.3168/jds.2006-434.
- Svennersten-Sjaunja, K., and K. Olsson. 2005. Endocrinology of milk production. *Domest. Anim. Endocrinol.* 29:241–258. doi:10.1016/j.domaniend.2005.03.006.
- Swaisgood, H.E. 2003. Chemistry of the Caseins. *In Advanced Dairy Chemistry—1 Proteins.* Springer US, Boston, MA. 139–201.
- Tančin, V., B. Ipema, P. Hogewerf, and J. Mačuhová. 2006. Sources of Variation in Milk Flow Characteristics

- at Udder and Quarter Levels. *J. Dairy Sci.* 89:978–988. doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72163-4.
- Tao, N., E.J. DePeters, J.B. German, R. Grimm, and C.B. Lebrilla. 2009. Variations in bovine milk oligosaccharides during early and middle lactation stages analyzed by high-performance liquid chromatography-chip/mass spectrometry. *J. Dairy Sci.* 92:2991–3001. doi:10.3168/jds.2008-1642.
- Torres, a., N. Castro, A. Suárez-Trujillo, A. Argüello, and J. Capote. 2016. Interrelationships among the length of milk stasis, tight junction permeability to lactose and monovalent cations, rate of milk secretion and composition in dairy goats traditionally milked once a day. *Small Rumin. Res.* 137:85–90. doi:10.1016/j.smallrumres.2016.03.022.
- Trott, J.F., B.K. Vonderhaar, and R.C. Hovey. 2008. Historical perspectives of prolactin and growth Hormone as mammogens, lactogens and galactagogues - Agog for the future! *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* 13:3–11. doi:10.1007/s10911-008-9064-x.
- Tucker, C.B., D.E. Dalley, J.-L.K. Burke, and D. a Clark. 2007. Milking cows once daily influences behavior and udder firmness at peak and mid lactation. *J. Dairy Sci.* 90:1692–703. doi:10.3168/jds.2006-577.
- Turner, H.G. 1955. Changes in capacity of the udder of the dairy cow during the course of lactation. *Aust. J. Agric. Res.* 6:145–160.
- Turner, S.D. 2014. qqman: an R package for visualizing GWAS results using Q-Q and manhattan plots. 81. 559-575 pp.
- Waddington, C.H. 1957. The strategy of the genes. A discussion of some aspects of theoretical biology. George Allen and Unwin, London, UK. 262 p. pp.
- Walstra, P., T. Geurts, A. Noomen, A. Jellena, and M. Van Boekel. 1999. Dairy technology : principles of milk properties and processes. Dekker Marcel (Ed), New-York Basel, USA. 485-515 pp.
- Walstra, P., R. Jenness, and H.T. Badings. 1984. Dairy chemistry and physics. Wiley. 467 pp.
- Welper, R.D., and A.E. Freeman. 1992. Genetic Parameters for Yield Traits of Holsteins, Including Lactose and Somatic Cell Score. *J. Dairy Sci.* 75:1342–1348. doi:10.3168/jds.S0022-0302(92)77885-0.
- Wheelock, J. V, J.A.F. Rook, F.H. Dodd, and T.K. Griffin. 1966. The effect of varying the interval between milkings on milk secretion. *J. Dairy Res.* 33:161–176. doi:10.1017/S0022029900011833.
- Wilde, C.J., C. V Addey, L.M. Boddy, and M. Peaker. 1995. Autocrine regulation of milk secretion by a protein in milk. *Biochem. J.* 305 (Pt 1:51–8.
- Wilde, C.J., and C.H. Knight. 1989. Metabolic Adaptations in Mammary Gland During the Declining Phase of Lactation. *J. Dairy Sci.* 72:1679–1692. doi:10.3168/jds.S0022-0302(89)79279-1.
- Winter, A., W. Krämer, F. a O. Werner, S. Kollers, S. Kata, G. Durstewitz, J. Buitkamp, J.E. Womack, G. Thaller, and R. Fries. 2002. Association of a lysine-232/alanine polymorphism in a bovine gene encoding acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase (DGAT1) with variation at a quantitative trait locus for milk fat content. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99:9300–9305. doi:10.1073/pnas.142293799.
- Yang, J., B. Zhao, V.E. Baracos, and J.J. Kennelly. 2005. Effects of bovine somatotropin on beta-casein mRNA levels in mammary tissue of lactating cows. *J Dairy Sci.* 88:2806–2812. doi:10.3168/jds.S0022-0302(05)72960-X.
- Yang, S., C. Qi, Y. Xie, X. Cui, Y. Gao, J. Jiang, L. Jiang, S. Zhang, Q. ZHANG, and D. SUN. 2014. A post-GWAS replication study confirming the association of C1 4H8orf33 gene with milk production traits in dairy cattle. *Front. Agric. Sci. Eng.* 1:321. doi:10.15302/J-FASE-2014037.

- Yang, W., H. Zerbe, W. Petzl, R.M. Brunner, J. Günther, C. Draing, S. von Aulock, H.-J. Schuberth, and H.-M. Seyfert. 2008. Bovine TLR2 and TLR4 properly transduce signals from *Staphylococcus aureus* and *E. coli*, but *S. aureus* fails to both activate NF-kappaB in mammary epithelial cells and to quickly induce TNFalpha and interleukin-8 (CXCL8) expression in the udder. *Mol. Immunol.* 45:1385–97. doi:10.1016/j.molimm.2007.09.004.
- Ytournal, F., H. Gilbert, and D. Boichard. 2008. Comment affiner la localisation d'un QTL? *Prod. Anim.* 21:147–158.

Annexes

Annexe 1 : Omission d'une traite et taux horaire de sécrétion jour-nuit

Cette étude a fait l'objet du stage de BTSA Productions Animales de Samuel Bronsard, stage de deux mois que j'ai encadré en 2014. Il n'a pas encore fait l'objet d'une publication ou d'une présentation dans des colloques/ congrès. Le texte ci-dessous est un résumé de son rapport.

a- Introduction

L'omission d'une traite se caractérise par une chute importante de la production laitière (-20 à -30 % en moyenne selon les études) et par la variabilité des pertes de lait entre les individus (Rémond and Pomiès, 2005). A titre d'exemple, cette perte peut varier entre -7 et -18 kg/jour chez des vaches produisant environ 40 kg de lait par jour (**Figure 1**).

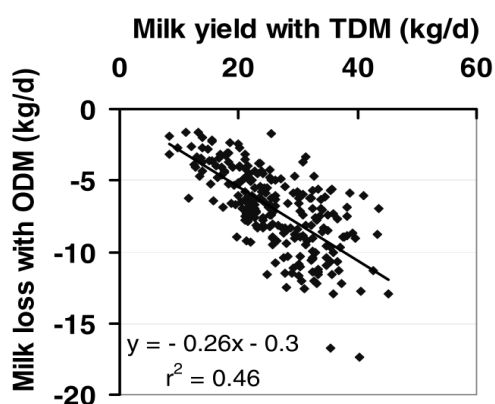


Figure 1 : Variabilité inter-individuelle la perte de lait induite par la monotraite estimée par la différence entre la production laitière de la dernière semaine à deux traites/jour (TDM) et la première semaine de monotraite (ODM) (n = 237 individus, phase descendante de la lactation) (Rémond and Pomiès, 2005).

Cette variabilité individuelle suggère que certaines vaches seraient mieux adaptées que d'autres à l'omission d'une des deux traites quotidiennes. Elles auraient alors la capacité de supporter de longs intervalles entre les traites sans que leur production de lait soit fortement diminuée.

Chez la vache laitière, l'allongement ponctuel d'un intervalle de traite jusqu'à 20, 24, 30 et 36 heures induit une diminution curvilinéaire du taux de sécrétion du lait par la mamelle. La synthèse et sécrétion de lait reste relativement constante pendant les 12 premières heures qui suivent la traite puis elle diminue légèrement entre 12 et 16-18 heures pour ensuite commencer à chuter fortement (Elliott et al., 1960; Schmidt 1960; Wheelock et al., 1966; Stelwagen et al., 2008). Chez les animaux traités deux fois par jour, l'intervalle de traite se déroulant la nuit (intervalle nocturne) est généralement plus long que l'intervalle entre les deux traites de la journée (intervalle diurne) : à l'exemple des intervalles jour-nuit 9 h-15 h, 10 h-14 h et 11 h-13 h. Effectivement, l'étude récente des bases de données des deux organismes bretons de contrôle de performances (EILYPS et BCLEO ; soit 6,991 élevages) montre que 69,7 % des exploitations bretonnes étudiées présentaient en 2014 un intervalle de traite en journée compris entre 10 et 11 heures,

avec une moyenne de 10 h 23 (Brocard et al., 2015). L'intervalle de nuit était donc généralement compris entre 13 et 14 heures.

Ainsi, si le taux horaire de sécrétion commence à baisser au-delà de 12 heures d'intervalle, la production de lait pourrait être soumise à un frein pendant l'intervalle nocturne chez les animaux traités deux fois par jour. Chez les vaches sensibles aux intervalles longs, ce taux de sécrétion nocturne pourrait être plus fortement inhibé. Ces mêmes individus pourraient aussi tolérer moins bien la monotraite, c'est-à-dire perdre plus de lait lors du passage en monotraite.

Le travail confié à Samuel Bronsard a donc porté sur les taux horaires de sécrétion diurne et nocturne. Il avait pour objectif 1) de décrire la variabilité de ces taux chez des vaches traitées habituellement sur un rythme jour-nuit de 9 h-15 h, 2) de déterminer l'effet du stade de lactation, de la parité et de l'âge au vêlage sur ces taux (en cohérence avec les travaux précédemment présentés) et 3) d'étudier la relation entre la perte de lait à l'omission d'une traite et les taux horaires de sécrétion diurne et nocturne mesurés avant l'omission, et notamment avec l'écart entre ces deux taux.

b- Matériel et méthodes

Cet essai a déjà été décrit dans les deux articles précédents. Brièvement, il a consisté à réaliser ponctuellement l'omission d'une traite journalière sur des vaches laitières de race Prim'Holstein de l'installation expérimentale INRA de Méjusseume. Le schéma expérimental était composé de la façon suivante : une semaine contrôle (cTDM) où les animaux étaient traités deux fois par jour aux heures normales de l'installation expérimentale, une journée où la traite du matin a été omise (24h-MI) et deux semaines post-expérimentales (pTDM1 et pTDM2) où les animaux étaient à nouveau traités deux fois par jour aux heures normales de traite de l'installation expérimentale.

Ici, l'étude s'est déroulée sur trois campagnes laitières successives entre 2010 et 2013. Elle concerne les séries pour lesquelles il y eu un enregistrement automatique des paramètres de traite par l'installation de traite au moment de la traite, à savoir huit séries (n = 460 individus). Le tri et la validation des données ont conduit à retirer des individus de l'analyse. Au final, l'omission d'une traite ponctuelle a concerné 274 vaches laitières et a été réalisée une à six fois par vache. Ce sont 437 omissions d'une traite qui ont été analysées (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Effectifs et caractéristiques des animaux.

Série	Effectif	Stade de lactation (j)	Parité (% de rang de lactation)			Production laitière initiale (kg/j)	Age au premier vêlage (mois)
			1	2	3+		
1	42	75 ± 16	93	5	2	33,0 ± 4,4	29 ± 5,1
2	139	138 ± 40	45	22	33	26,2 ± 3,1	25 ± 2,6
3	125	252 ± 39	47	23	30	22,2 ± 2,7	25 ± 3,5
4	34	48 ± 20	32	36	32	38,0 ± 7,1	27 ± 4,6
5	32	184 ± 29	28	41	31	34,0 ± 5,4	27 ± 4,7
6	33	81 ± 18	73	9	18	33,0 ± 5,9	25 ± 2,5
7	32	172 ± 18	72	9		30,4 ± 4,7	25 ± 2,5

Les conditions de logement, de traite et d'alimentation des animaux sont décrites très succinctement dans le **Tableau 2**. Elles pouvaient varier entre les séries mais restaient constantes au sein d'une même série.

Tableau 2 : Conditions expérimentales.

	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6	Série 7
Campagne laitière	2010-2011			2011-2012	2012-2013		
Logement	Stabulation	Pâturage		Stabulation			
Horaires de traite	6 h 45 et 16 h 30			6 h 45 et 16 h			
Alimentation (8 h et 18 h)	Ration complète individuelle		Pâturage jour et nuit		Ration complète individuelle		

i. Mesures et analyses

Les deux données nécessaires au calcul du **taux horaire de sécrétion (THS)**, la production laitière et l'heure de début de traite ont été enregistrées automatiquement pour chaque individu à chaque traite (compteur à lait MM25, DeLaval, Elancourt, France).

ii. Calcul du taux horaire de sécrétion et des écarts de taux de sécrétion

Le taux horaire de sécrétion, exprimé en kg/h, a été calculé comme étant le rapport entre la quantité de lait produite pendant l'intervalle de traite et la durée de cet intervalle de traite. Il s'agit donc d'un THS moyen sur l'intervalle de traite considéré. L'intervalle de temps entre les traites a été calculé à partir des heures de début de traite. Nous n'avons pas tenu compte de la durée de la traite.

Deux THS ont été calculés par jour et par vache : le THS diurne correspondant au lait collecté à la traite du soir, et le THS nocturne correspondant au lait collecté à la traite du matin. Ces deux taux ont ensuite été moyennés par période selon les périodes considérées :

- -période témoin : une semaine avant l'omission, de J-7 à J-1 (cTDM)
- le jour de l'omission : J1 (une donnée, pas de moyenne calculée) (24h-MI)
- le lendemain de l'omission : J2 (une donnée, pas de moyenne calculée), (J2)
- la semaine qui suit l'omission : de J3 à J7 (pTDM1)
- la deuxième semaine après l'omission : de J8 à J14 (pTDM2)

L'écart entre le THS diurne et nocturne a aussi été considéré. Pour ce faire, les données moyennées par période ont permis de calculer, pour chaque vache et chaque période, une différence absolue (en kg/h) et relative (en %) :

$$\text{Ecart absolu} = \text{THS diurne} - \text{THS nocturne} \quad \text{Ecart relatif} = (\text{THS diurne} - \text{THS nocturne}) / \text{THS diurne} \times 100$$

iii. Calcul des critères « pertes de lait »

Pour chaque vache, la perte de production laitière (exprimée en kg/j) a été calculée en soustrayant la production laitière moyenne journalière de la période cTDM à celle du jour de l'omission de la traite (24h-MI). La perte relative de production laitière (exprimée en %) a été calculée en divisant la perte de lait (exprimée en kg/j) par la production laitière moyenne journalière à cTDM et en la multipliant par 100.

iv. Analyses statistiques

Les caractéristiques des animaux (stade de lactation, parité et niveau de production laitière à cTDM) ont été codées pour être regroupées en catégories pour l'analyse statistique des données. Le stade de lactation a été divisé en quatre classes : 24 à 50 jours de lactation (stade 24-50), 51 à 100 jours (stade 51-100), 101 à 180 jours (stade 101-180), 181 à 311 jours de lactation (stade 181-311). La parité a été divisée en trois classes : les primipares (parité 1), les vaches en deuxième lactation (parité 2) et les animaux à trois et plus de trois lactations (parité 3+). L'âge au premier vêlage a été divisé en deux classes : 24 et 34 mois. Enfin la campagne laitière a été divisée en deux catégories : 2010-2011 et 2011-2013. L'évolution des THS diurne et nocturne a été analysée avec le modèle linéaire mixte suivant :

$$Y_{ijklmn} = \mu + \text{période}_i + \text{stade de lactation}_j + \text{parité}_k + \text{âge au premier vêlage}_l + \text{campagne laitière}_m + \text{interactions} + \text{vache}_n + \varepsilon_{ijklmn}$$

Les effets fixes testés sont la période i (cTDM, J2, pTDM1, pTDM2), le stade de lactation j , la parité k , l'âge au premier vêlage l , la campagne laitière m , les interactions de ces effets fixes et l'effet aléatoire de la vache n ; ε_{ijklmn} est l'erreur résiduelle associée à chaque observation $ijklmn$.

c- Résultats et discussion

i. Description des mesures de THS au cours des différentes périodes expérimentales

Le **Tableau 3** présente les valeurs moyennes, minimales, maximales et écart-types des THS diurne et nocturne observés au cours de l'étude et les écarts entre ces deux taux pour chacune des périodes de l'expérimentation. Dans cet essai, les THS étaient de l'ordre de 1,2 kg/h pour les périodes cTDM et pTDM et variaient selon les individus de façon non négligeable : entre 0,5 et 2,14 kg/h pour la nuit et entre 0,6 et 2,27 kg/h pour le jour, respectivement pour cTDM. L'écart-type du THS était plus important sur l'intervalle diurne que nocturne (0,301 contre 0,252 pour cTDM), suggérant une variabilité individuelle du THS plus grande sur l'intervalle jour. La différence entre les THS diurne et nocturne était en moyenne de l'ordre de 0,02-0,03 kg/h, hormis le lendemain du jour de monotraite où elle avoisinait 0,10 kg/h, traduisant la progressive remontée de la production du lait suite au retour à deux traites par jour.

Tableau 3 : Valeurs moyennes, minimales, maximales et écart-types des taux horaires de sécrétion (THS) diurne et nocturne et des écarts entre ces deux THS chez des vaches laitières traitées deux fois par jour (sur un rythme de traite jour-nuit de 9 h-15 h) et dont la traite du matin a été omise au J1 (n = nombre d'observations).

Période	Moyenne	Minimum	Maximum	Ecart-type	n
<i>THS diurne, kg/h</i>					
J-7 à J-1 (témoin)	1,25	0,60	2,27	0,301	437
J2	1,17	0,26	2,23	0,341	298
J3 à J7	1,22	0,48	2,19	0,330	435
J8 à J14	1,22	0,45	2,15	0,319	437
<i>THS nocturne, kg/h</i>					
J-7 à J-1 (témoin)	1,23	0,50	2,14	0,252	437
J2	1,07	0,06	2,02	0,331	298
J3 à J7	1,19	0,51	2,15	0,266	435
J8 à J14	1,20	0,45	2,07	0,266	437
<i>Différence entre le THS diurne et nocturne, kg/h</i>					
J-7 à J-1 (témoin)	0,02	-0,31	0,52	0,1213	437
J2	0,10	-0,43	0,79	0,1436	297
J3 à J7	0,03	-0,28	0,62	0,1339	435
J8 à J14	0,02	-0,26	0,68	0,1212	437
<i>Différence relative entre le THS diurne et nocturne, %</i>					
J-7 à J-1 (témoin)	0,4	-27,6	45,9	9,726	437
J2	8,0	-47,9	48,6	11,971	297
J3 à J7	0,5	-45,1	37,5	11,005	435
J8 à J14	0,3	-35,5	37,0	9,325	437

La **Figure 2** décrit les données du THS nocturne en fonction du THS diurne en période témoin. Elle montre que ces deux grandeurs sont corrélées positivement ($r = 0,92$) : plus le THS est important en journée, plus il est important la nuit. Cette figure nous apprend aussi que le THS nocturne n'est pas systématiquement inférieur au THS diurne, contrairement à l'hypothèse formulée où la sécrétion du lait serait inhibée pendant la nuit sur un intervalle de 15 heures. Dans cette étude, le THS nocturne a été supérieur au THS diurne pour 205 des 437 observations de cette étude (*i.e.* 47 % des données).

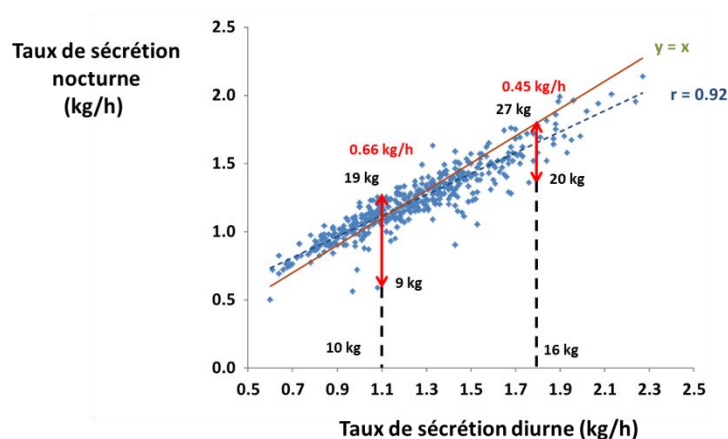


Figure 2 : Evolution du taux horaire de sécrétion nocturne en fonction du taux horaire de sécrétion diurne en période témoin alors que les animaux sont traités deux fois par jour. Chaque donnée correspond à la moyenne du taux de sécrétion des sept jours de la semaine expérimentale (n = 437 individus).

L'analyse du nuage de points de la **Figure 2** montre que ce taux a été systématiquement supérieur pour des THS diurnes faibles inférieurs à 0,97 kg/h (exception faite de cinq observations sur les 71 concernées) et systématiquement inférieur pour des THS diurnes élevés (supérieurs à 1,7 kg/h).

On remarque aussi, à même THS diurne, une variabilité non négligeable des THS nocturnes. En effet, des animaux présentant un THS diurne de 1,1 kg/h (*i.e.* produisant 10 kg de lait à la traite du soir), peuvent présenter des THS nocturnes variant entre 0,6 et 1,26 kg/h (soit un écart entre ces deux valeurs de 0,66 kg/h) : ces animaux produisent entre 9 et 19 kg de lait pendant la nuit. De même, des individus présentant un THS diurne de l'ordre de 1,8 kg/h (*i.e.* produisant 16 kg de lait à la traite du soir) peuvent présenter des écarts entre leur THS nocturne de 0,45 kg/h et produire entre 20 et 27 kg de lait la nuit. La **Figure 3** illustre cette variabilité entre individus. Elle montre aussi une corrélation positive et modérée entre les écarts de THS diurne et nocturne et le THS diurne ($r = 0,57$). Plus le taux de sécrétion de la mamelle en journée est important, plus l'écart entre les THS diurne et nocturne est élevé.

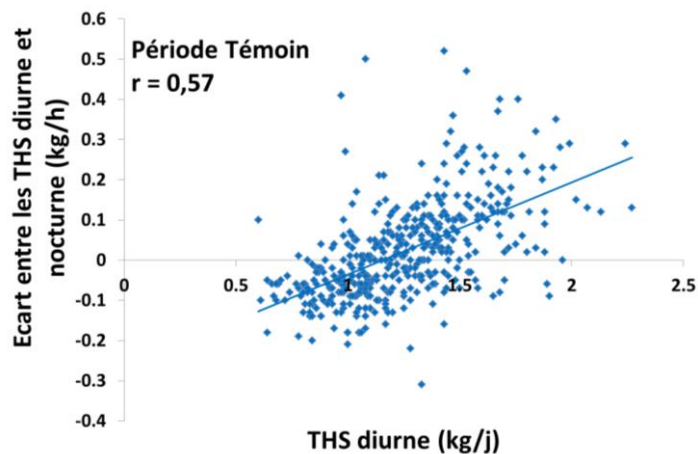


Figure 3 : Evolution des écarts entre les taux horaires de sécrétion (THS) diurne et nocturne en fonction du THS diurne en période témoin alors que les animaux sont traités deux fois par jour. Chaque donnée correspond à la moyenne du taux de sécrétion des sept jours de la semaine expérimentale ($n = 437$ individus).

Ainsi, le frein à la sécrétion de lait par la mamelle pendant l'intervalle de traite nocturne n'est pas systématique, signifiant qu'un allongement limité de l'intervalle de traite (ici 15 heures) ne suffit pas toujours à déclencher à lui seul une inflexion de la sécrétion lactée. D'autres facteurs, telle la quantité de lait produite par l'animal pourraient intervenir.

ii. *Evolution des taux horaires de sécrétion diurne et nocturne au cours de l'essai et effets de la parité, du stade de lactation et de l'âge au premier vêlage :*

Le **Tableau 4** présente l'effet de la période, de la parité, du stade de lactation et de l'âge au premier vêlage sur les THS, le ratio et les écarts calculés entre ces deux taux lorsque les animaux étaient traités deux fois par jour. Quel que soit le facteur considéré, la valeur moyenne du THS nocturne a toujours été inférieure à celle du THS diurne correspondant.

Tableau 4 : Evolution des taux horaires de sécrétion (THS) diurne (jour) et nocturne (nuit), et des écarts entre ces deux taux en fonction de la période expérimentale, de la parité, du stade de lactation et de l'âge au premier vêlage (lsméans \pm SEM). Le ratio THS nocturne/THS diurne a été calculé sur la base des estimations des TSH jour et nuit.

	THS jour (kg/h)	THS nuit (kg/h)	Ratio THS nuit/THS jour	Ecart THS jour - THS nuit (kg/h)	Ecart THS jour- THS nuit (%)
Période					
J-7 à J-1 (témoin)	1,48 \pm 0,016 ^a	1,39 \pm 0,015 ^a	0,94	0,083 \pm 0,0083 ^b	4,386 \pm 0,6615 ^b
J2	1,38 \pm 0,017 ^b	1,23 \pm 0,016 ^b	0,89	0,156 \pm 0,0089 ^a	10,514 \pm 0,7288 ^a
J3 à J7	1,46 \pm 0,016 ^a	1,37 \pm 0,015 ^a	0,94	0,090 \pm 0,0083 ^b	4,614 \pm 0,6615 ^b
J8 à J14	1,45 \pm 0,016 ^a	1,38 \pm 0,015 ^a	0,95	0,072 \pm 0,0083 ^b	3,336 \pm 0,6615 ^b
Parité					
1	1,23 \pm 0,017 ^c	1,17 \pm 0,016 ^c	0,95	0,060 \pm 0,0076 ^b	3,558 \pm 0,5500 ^b
2	1,53 \pm 0,020 ^b	1,41 \pm 0,018 ^b	0,92	0,128 \pm 0,0102 ^a	7,478 \pm 0,8044 ^a
3 et +	1,57 \pm 0,029 ^a	1,44 \pm 0,027 ^a	0,92	0,113 \pm 0,0105 ^a	6,101 \pm 0,7715 ^a
Stade de lactation					
24 à 50 jours	1,72 \pm 0,027 ^a	1,52 \pm 0,0227 ^a	0,88	0,187 \pm 0,0158 ^a	10,702 \pm 1,2830 ^a
51 à 100 jours	1,57 \pm 0,019 ^b	1,44 \pm 0,0169 ^b	0,92	0,141 \pm 0,0100 ^a	7,661 \pm 0,7534 ^a
101 à 180 jours	1,34 \pm 0,018 ^c	1,28 \pm 0,0160 ^c	0,96	0,063 \pm 0,0091 ^b	4,142 \pm 0,5463 ^b
181 à 311 jours	1,14 \pm 0,017 ^d	1,13 \pm 0,0153 ^d	0,99	0,011 \pm 0,0084 ^c	0,344 \pm 0,6175 ^c
Age au premier vêlage					
24 mois	1,40 \pm 0,015 ^b	1,31 \pm 0,013 ^b	0,94	0,099 \pm 0,0071	-
32 mois	1,49 \pm 0,026 ^a	1,37 \pm 0,024 ^a	0,92	0,102 \pm 0,0107	-
ETR ¹	0,1450	0,1174		0,100	8,382

a, b, c, d Les moyennes avec des lettres différentes diffèrent significativement au seuil 5% en intra-facteur étudié (période, parité, stade de lactation, âge au vêlage).

¹ Écart-type résiduel.

Au cours de l'essai, les deux THS, diurne et nocturne, étaient plus faibles au J2 (jour qui suivait le jour de l'omission de la traite) et n'étaient plus différents ensuite des taux initiaux mesurés en période Témoin. L'écart entre les taux de sécrétion jour-nuit s'est maintenu tout au long de l'essai (pas de variation significative) hormis au J2 de l'expérimentation où il a été supérieur (0,156 contre 0,083 kg/h en période témoin). Cet écart plus important au J2 pourrait s'expliquer là encore, par la remontée progressive du taux de sécrétion de lait par la mamelle au cours de cette journée en lien avec l'éloignement de la journée d'omission de la traite du matin (le THS nocturne du J2 est plus proche de cette journée que le THS jour du J2).

Les THS diurne et nocturne ont augmenté avec **la parité** des animaux, surtout entre les primipares et les multipares. Les écarts entre le THS diurne et nocturne ont aussi été plus importants pour les multipares que les primipares (0,128 et 0,113 contre 0,060 kg/h, respectivement pour les parités 2, 3+ contre 1). Les multipares produisant en moyenne davantage de lait que les primipares, ces résultats sont cohérents avec ceux de la **Figure 3**, à savoir plus les animaux produisent de lait, plus les THS diurnes sont élevés et plus l'écart entre le THS diurne et nocturne est important.

Les THS diurne et nocturne diminuent avec **l'avancée de la lactation** mais cette diminution est plus importante pour le THS diurne. En effet, dans cet essai, le THS diurne a diminué de 0,58 kg/h entre le stade 24-50 jours et le stade 181-311 jours (1,72 - 1,14 kg/h) alors que le THS nocturne a diminué de 0,39 kg/h

(1,52 - 1,13 kg/h). Ce résultat est confirmé par l'analyse des écarts entre le THS diurne et nocturne. Cet écart a diminué significativement au cours de la lactation : il est passé de 0,187 kg/h en début de lactation à 0,011 kg/h en fin de lactation. Ainsi, le début et milieu de lactation, qui se caractérisent par des quantités supérieures de lait produit par les animaux, présentent des écarts de THS plus importants conformément aux observations précédemment réalisées. En fin de lactation, la quantité de lait produite pendant l'intervalle nocturne ne serait plus suffisante pour générer un frein sur la sécrétion de lait.

Les THS diurne et nocturne des vaches ayant vêlé pour la première fois à 32 mois sont significativement supérieurs à ceux des vaches ayant vêlé pour la première fois à 24 mois, du fait d'une différence de maturité entre les animaux. Mais cette différence est faible (respectivement de +0,09 et +0,06 kg/h pour le jour et la nuit). Aussi, les écarts entre le THS diurne et nocturne ne sont pas différents entre les vaches dont l'âge à la première mise-bas est de 24 et 32 mois.

Lorsque la production de lait est augmentée du fait de la parité ou du stade de lactation, le frein sur la sécrétion de lait par la mamelle pendant l'intervalle nocturne est plus important. En moyenne, ce frein diminue au cours de la lactation pour devenir quasi inexistant en fin de lactation.

iii. *Relation entre les pertes de lait et les taux horaires de sécrétion diurne et nocturne :*

Les **Tableaux 5** et **6** présentent respectivement, les variations de production laitière observées le jour de l'omission de la traite et les coefficients de corrélation entre les pertes de lait et les THS. En moyenne, sur cette journée d'omission de la traite du matin, la perte de lait était de 6,6 kg, *i.e.* de 21,6 %.

Tableau 5 : Description des pertes de lait en kg/j et %, observées le jour de l'omission de la traite.

	Moyenne	Minimum	Maximum	Ecart-type	n
Perte de lait en kg/j	-6,6	-21,6	1,9	3,78	437
Perte de lait en %	-21,6	-51,5	6,5	10,36	437

Tableau 6 : Coefficients de corrélation¹ entre les pertes de lait (kg/j et %) mesuré le jour de l'omission de la traite et les taux horaires de sécrétion (THS) diurne et nocturne mesurés en période témoin et l'écart entre ces deux THS (THS jour-nuit) (n = 437).

	THS nocturne kg/h	THS diurne kg/h	THS jour-nuit kg/h	THS jour-nuit %	Pertes de lait kg/j
THS diurne, kg/h	0,92				
THS jour-nuit, kg/h	0,20	0,57			
THS jour-nuit, %	0,18	0,54	0,97		
Pertes de lait, kg/j	-0,50	-0,58	-0,38	-0,36	
Pertes de lait, %	-0,19	-0,27	-0,28	-0,27	0,92

¹ coefficient de Pearson (r) significatif au seuil 5 %.

L'écart entre le THS nocturne et diurne (exprimé en kg/h ou en %) est plus lié aux variations du THS diurne que du THS nocturne ($r = 0,57$ et $0,20$, respectivement pour l'écart exprimé en kg/h).

On retrouve la corrélation entre le niveau initial de production laitière des animaux et la quantité de lait perdu : plus les animaux produisent de lait (et ont donc des THS nocturnes et diurnes élevés), plus ils

perdent de lait le jour de l'omission de la traite ($r = -0,50$ et $-0,58$). Par ailleurs, plus la différence entre les THS diurne et nocturne est importante, plus les pertes de lait exprimées en kg/j sont élevées ($r = -0,38$ et $-0,36$ respectivement pour les différences exprimées en kg/h et en %). Cette corrélation est toujours significative mais plus faible si on considère les pertes relatives de lait donc de manière indépendante du niveau initial de production laitière (*i.e.* exprimée en %). En effet, le coefficient de corrélation est $-0,28$ et $-0,27$ respectivement pour les différences entre THS diurne et nocturne exprimées en kg/h et en %.

La **Figure 4** ci-dessous montre que la différence entre les THS diurne et nocturne, exprimée en pourcents, diminue quand le stade de lactation des animaux avance. Elle suggère aussi qu'intra stade de lactation (exception faite des animaux en fin de lactation), plus la différence entre les THS diurne et nocturne est grande, plus les pertes de lait en pourcents sont élevées.

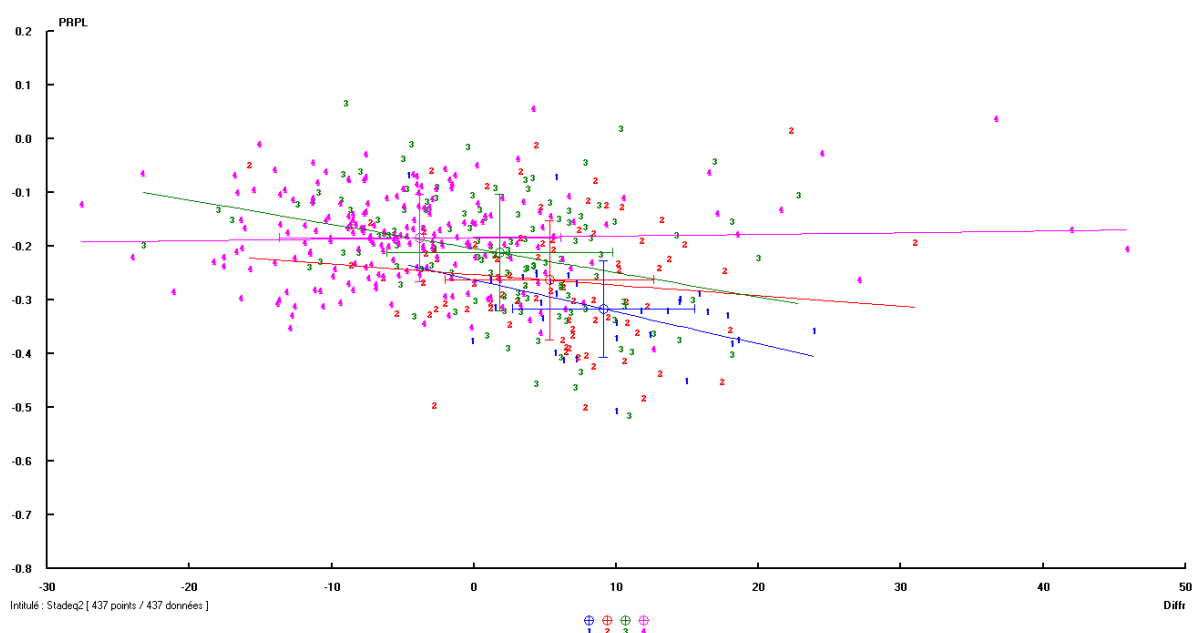


Figure 4 : Evolution des pertes de lait exprimées en % mesurées le jour de l'omission de la traite en fonction de l'écart entre les taux horaire de sécrétion diurne et nocturne (exprimées en %) de la période cTDM (n = 437 individus). Code couleur des points du graphiques : bleu = stade 24-50 jours, rouge = stade 51-100 jours, vert = stade 101-180 jours, rose = stade 181-311 jours.

En conclusion, plus les THS sont élevés, plus la différence de THS jour/ nuit est élevée, mais ce dernier caractère serait surtout relié au THS diurne. La différence de THS jour/ nuit dépendrait également du stade de lactation, et diminuerait lorsque la lactation avance.

Même s'ils ne démontrent pas un lien fort entre les écarts de taux horaires de sécrétion diurne et nocturne et les variations de production laitière, ces résultats suggèrent que les vaches sensibles aux intervalles longs, toléreraient moins bien l'omission d'une traite.

Annexe 2 : Débit moyen d'émission du lait à la traite et de la lactosémie lors de la monotraite

Cette partie du document de thèse vise à présenter succinctement les résultats sur les phénotypes mesurés lors de la monotraite. Les phénotypes concernés sont le débit d'émission du lait à la traite et la lactosémie.

a- Matériel et méthodes

Le débit moyen d'émission du lait à la traite du matin a été recalculé en divisant la quantité de lait collectée à la traite du matin par la durée de la traite du matin enregistrée par la salle de traite (compteur à lait Boumatic-2050®). Les valeurs journalières ont ensuite été moyennées sur la période expérimentale considérée (n = 152).

Les échantillons de sang ont été prélevés dans le veine coccygienne à l'aide de tubes héparinisés de 5 mL (VT-050SHL, Venoject, Terumo Europe, Leuven, Belgique) 1 à 1,5 h avant la traite du matin aux jours -3, 0, 1, 3, 7, 21, 23, et 28 de l'expérimentation (où le jour 1 est le premier jour de la période de monotraite, ODM). Le sang a été centrifugé à 2,264 g pendant 15 min, le plasma a été prélevé puis stocké à -20 °C jusqu'à analyse. La lactosémie a ensuite été dosée selon le protocole décrit par Guinard-Flament et al. (2011a). Les valeurs journalières ont ensuite été moyennées sur la période expérimentale considérée (J-3 et J0 pour cTDM, J1 pour ODM d1, J1, 3, et 7 pour ODM et 28 pour pTDM2).

b- Résultats et discussion

Tableau 1. Moyennes \pm ET du débit moyen d'émission du lait à la traite et de la lactosémie mesurés le matin au cours des différentes périodes expérimentales (cTDM, ODM d1, ODM et pTDM2).

	cTDM	ODM d1	ODM	pTDM2	n
Débit moyen matin, kg/min	2.60 \pm 0.88	2.56 \pm 1.38	2.79 \pm 0.86	2.51 \pm 0.80	152
Lactosémie matin, mg/L	25.1 \pm 12.60	181.9 \pm 159.44	149.9 \pm 148.29	24.5 \pm 14.11	

Tableau 2. Lsmeans \pm SEM de l'effet de la période expérimentale (cTDM, ODM d1, ODM, pTDM2) sur le débit moyen d'émission du lait à la traite du matin et sur la lactosémie matin.

	cTDM	ODM d1	ODM	pTDM2
Débit moyen matin, kg/min	2.63 \pm 0.073 ^b	2.58 \pm 0.076 ^b	2.83 \pm 0.073 ^a	2.55 \pm 0.073 ^b
Lactosémie matin, mg/L	32.6 \pm 6.92 ^c	174.6 \pm 6.64 ^a	145.7 \pm 6.54 ^b	51.7 \pm 10.03 ^c

Le débit d'émission du lait à la traite n'a pas été modifié le premier jour de monotraite, mais était augmenté lors des trois semaines de monotraite. Au retour à deux traites par jour, il était revenu à un niveau comparable à son niveau initial. L'augmentation de débit observée lors de la période de monotraite pourrait indiquer une augmentation de la pression d'éjection du lait au moment de la traite sous l'effet d'une quantité plus importante de lait stocké dans la glande mammaire. En revanche, contrairement aux résultats observés lors de l'intervalle unique de 24 h, le débit moyen d'émission du lait n'a pas été

augmenté au premier jour de monotraite alors qu'en moyenne les débits moyens d'émission du lait à la traite étaient supérieurs dans cet essai (2,6 contre 2,0 kg/min pour l'intervalle unique de 24 h).

La lactosémie augmente de manière très importante au cours de la première journée de monotraite (**Tableau 1**). Cette augmentation de lactosémie est due à la modification de la perméabilité de l'épithélium mammaire survenant après les 16 à 18 premières heures d'accumulation du lait dans la glande mammaire (Stelwagen et al., 1997; Guinard-Flament et al., 2011a). Le lactose étant un des composés osmotiques majeurs du lait, l'efflux de lactose dans le compartiment sanguin permise par une perméabilité accrue de l'épithélium mammaire pourrait être partiellement responsable de la diminution du lait observée lors de l'allongement de l'intervalle entre traites.

Tableau 3. Héritabilité \pm erreur type de la moyenne de la lactosémie durant la période de contrôle (cTDM) et durant le premier jour de monotraite (ODM d1) : calcul réalisé sur les données transformées selon une fonction log.

Lactose sanguin h ² , unités	cTDM	ODM d1	n
	0.47 \pm 0.160	0.36 \pm 0.146	261

Les effectifs d'animaux (n = 261) étaient trop faibles pour permettre une analyse puissante et fiable des paramètres génétiques sur la lactosémie (**Tableau 3**). Les résultats présentés ici doivent donc être interprétés comme une première approximation de ce qui pourrait être observé avec un dispositif plus adéquat. La lactosémie est un caractère d'héritabilité moyenne. Cette héritabilité semble être plus faible au premier jour de monotraite, suggérant que les variations de lactosémie au premier jour de monotraite sont davantage dues à des facteurs environnementaux qu'à la génétique de l'animal.

Tableau 4. Estimation des corrélations phénotypiques et génétiques entre le débit moyen d'émission du lait à la traite (cTDM), la lactosémie (cTDM et ODM d1) et la production laitière initiale (cTDM), les pertes de lait lors du passage en monotraite (kg/j et %), les gains de lait au retour à deux traites par jour (kg/j) et le taux de récupération (%).

	Corrélations phénotypiques			Corrélations génétiques
	Débit moyen cTDM kg/min	Lactosémie cTDM mg/L	Lactosémie ODM d1 mg/L	Lactosémie ODM d1 unités
Production laitière cTDM, kg/j	0.55***	NS	0.18***	0.29 \pm 0.475
Pertes, kg/j	-0.54***	NS	NS	-0.05 \pm 0.627
Pertes, %	-0.33***	-0.11*	0.20***	0.09 \pm 0.755
Gains, kg/j	0.46***	NS	-0.15**	0.06 \pm 0.441
Taux de récupération, %	NS	NS	NS	-0.18 \pm 0.495

En période contrôle, des débits moyens d'émission du lait à la traite du matin plus élevés étaient associés à un niveau initial de production laitière plus important, à des pertes de lait plus importantes au

passage en monotraite et également à des gains (kg/j) plus importants au retour à deux traites par jour. Le débit initial étant corrélé positivement à la production laitière initiale, il n'est pas possible d'affirmer l'existence d'une influence distincte du débit à celle de la production laitière sur les variations de production laitière.

L'analyse des corrélations phénotypiques montre que la lactosémie initiale était corrélée négativement et très faiblement aux pertes de lait relatives, tandis que la lactosémie au premier jour de monotraite était corrélée positivement et faiblement à la production laitière initiale et aux pertes de lait relatives, et négativement aux gains de lait au retour à deux traites par jour. Ainsi, plus la lactosémie initiale serait élevée, moins les pertes relatives observées au passage en monotraite seraient importantes. En revanche, une lactosémie élevée lors du premier jour de monotraite, traduisant une plus grande augmentation de la perméabilité de l'épithélium mammaire, serait associée à des pertes en lait supérieures au passage en monotraite et à des gains supérieurs au retour à deux traites par jour. Sur une sous-partie du jeu de données, Guinard-Flament et al. (2011a ou b) avaient observé une corrélation similaire entre la lactosémie à J1 et les pertes de lait relatives ($r = 0,21$; $n = 86$) et avaient aussi rapporté une corrélation plus forte avec les gains (kg/j ; $r = -0,40$) et le taux de récupération ($r = -0,40$), corrélation qui n'est pas observée ici. Ces corrélations phénotypiques n'ont pas été retrouvées au niveau génétique. La lactosémie au premier jour de monotraite n'était pas génétiquement corrélée à la production laitière initiale), ni aux réponses (pertes et gains) à trois semaines de monotraite car les corrélations génétiques estimées ne sont pas significativement différentes de zéro. Le faible effectif d'individus inclus dans l'analyse pourrait expliquer ces écart-types élevés.

Tableau 5. Corrélations phénotypiques et génétiques du débit moyen d'émission du lait à la traite et de la lactosémie à la traite du matin durant le premier jour de monotraite (ODM d1) avec les valeurs de ces mêmes caractères durant la période de contrôle (cTDM) et les trois semaines de monotraite (ODM).

ODM d1	Corrélation phénotypique		Corrélation génétique
	cTDM	ODM	cTDM
Débit moyen matin, kg/min	0.61***	0.60***	
Lactosémie, mg/L	0.25***		0.27 ±0.438

Le débit moyen d'émission du lait mesuré à la traite du matin au premier jour de monotraite était corrélé positivement à ses valeurs initiales (cTDM) et moyenne sur trois semaines de monotraite. Ce caractère variait donc dans le même sens sur le premier intervalle de traite prolongé.

La lactosémie au premier jour de monotraite (ODM d1) était peu corrélée phénotypiquement et pas corrélée génétiquement à sa valeur initiale (cTDM). Cette absence de corrélation génétique est là encore associée à un écart-type élevé.

Abstract

This study aimed to enhance knowledge on dairy cows robustness and to enable the identification of adaptable cows through the characterization of the adaptability of the mammary gland, the organ responsible for lactation. The methodology used to characterize the adaptability of the mammary gland consisted in describing inter-individual variability in milk yield responses profiles to a perturbation and then identifying phenotypes and/or genotypes that modulated the adaptive characteristics. The mammary gland functioning was challenged by using two different lengthening of milking interval as a perturbation on dairy cows usually milked twice-daily (TDM): a single extended milking interval of 24h (24h-MI) and a 3-wk once-daily milking (ODM). For each of them, the two components of adaptability, resistance and resilience, were estimated by milk yield loss in % when switching cows to 24h-MI or ODM and milk recovery:loss ratio when switching cows back to TDM. Four individual responses profiles, defined by the association of specific resistance and resilience modalities, were found with 3 being common between 24h-MI and ODM. These profiles were characterized by udder compliance (= ability to distend) and mammary inflammation. Milk yield responses were also found to be heritable ($h^2= 0.32$ for milk yield losses and 0.63 for milk yield recovery (kg/d), respectively), so that it could be possible to select animals on these adaptability traits. The genomic regions related to these responses were partly different from regions controlling milk production traits during TDM, so that adaptability of the mammary gland to a reduced milking frequency might depend upon a specific genetic determinism.

Keywords: dairy cow, mammary gland, adaptability, once-daily milking, genetic determinism

Résumé

La thèse avait pour objectif de caractériser l'adaptabilité de la glande mammaire, organe support de la fonction de lactation, afin de contribuer à l'étude de la robustesse des vaches laitières et à l'identification de vaches adaptables. L'approche utilisée pour caractériser l'adaptabilité de la glande mammaire consistait à décrire les réponses inter-individuelles de production laitière lors d'une perturbation, puis à identifier des critères phénotypiques et/ou génétiques modulant les caractéristiques adaptatives. Deux modalités d'allongement de l'intervalle entre traites ont été choisies pour perturber le fonctionnement de la glande mammaire : un intervalle de traite unique de 24h (24h-MI) et 3 semaines de monotraite (ODM). Les 2 composantes de l'adaptabilité, à savoir la résistance et la résilience, ont été respectivement estimées par les pertes de lait lors de l'allongement de l'intervalle entre traites et par le taux de récupération au retour à 2 traites par jour. Quatre profils de réponse, définis par leur association des modalités de résistance et de résilience, ont été mis en évidence, dont 3 étaient communs aux 2 perturbations (24h-MI et ODM). Ces profils étaient caractérisés par la compliance de la glande mammaire (c'est-à-dire son aptitude à se distendre) et par son état inflammatoire. Les réponses de production laitière seraient des caractères héritables ($h^2 = 0.32$ pour les pertes de lait en kg/j et 0.63 pour la récupération de lait (kg/d), respectivement) ouvrant des perspectives de sélection des vaches sur ces caractères adaptatifs. Les zones du génome influant ces réponses seraient partiellement différentes de celles contrôlant le niveau de production laitière à 2 traites par jour, suggérant un déterminisme génétique spécifique à ces réponses adaptatives.

Mots clés : vache laitière, glande mammaire, adaptabilité, monotraite, déterminisme génétique

RÉSUMÉ

ABSTRACT

Caractérisation de l'adaptation de la glande mammaire des vaches laitières à l'allongement de l'intervalle entre traites

La thèse avait pour objectif de caractériser l'adaptabilité de la glande mammaire, organe support de la fonction de lactation, afin de contribuer à l'étude de la robustesse des vaches laitières et à l'identification de vaches adaptables. L'approche utilisée pour caractériser l'adaptabilité de la glande mammaire consistait à décrire les réponses inter-individuelles de production laitière lors d'une perturbation, puis à identifier des critères phénotypiques et/ou génétiques modulant les caractéristiques adaptatives. Deux modalités d'allongement de l'intervalle entre traites ont été choisies pour perturber le fonctionnement de la glande mammaire : un intervalle de traite unique de 24h (24h-MI) et 3 semaines de monotraite (ODM). Les 2 composantes de l'adaptabilité, à savoir la résistance et la résilience, ont été respectivement estimées par les pertes de lait lors de l'allongement de l'intervalle entre traites et par le taux de récupération au retour à 2 traites par jour. Quatre profils de réponse, définis par leur association des modalités de résistance et de résilience, ont été mis en évidence, dont 3 étaient communs aux 2 perturbations (24h-MI et ODM). Ces profils étaient caractérisés par la compliance de la glande mammaire (c'est-à-dire son aptitude à se distendre) et par son état inflammatoire. Les réponses de production laitière seraient des caractères héritables ($h^2 = 0.32$ pour les pertes de lait en kg/j et 0.63 pour la récupération de lait (kg/d), respectivement) ouvrant des perspectives de sélection des vaches sur ces caractères adaptatifs. Les zones du génome influant ces réponses seraient partiellement différentes de celles contrôlant le niveau de production laitière à 2 traites par jour, suggérant un déterminisme génétique spécifique à ces réponses adaptatives.

Mots-clefs : vache laitière, glande mammaire, adaptabilité, monotraite, déterminisme génétique

Characterization of dairy cows' mammary gland adaptation in response to the lengthening of milking interval

This study aimed to enhance knowledge on dairy cows robustness and to enable the identification of adaptable cows through the characterization of the adaptability of the mammary gland, the organ responsible for lactation. The methodology used to characterize the adaptability of the mammary gland consisted in describing inter individual variability in milk yield responses profiles to a perturbation and then identifying phenotypes and/or genotypes that modulated the adaptive characteristics. The mammary gland functioning was challenged by using two different lengthening of milking interval as a perturbation on dairy cows usually milked twice-daily (TDM): a single extended milking interval of 24h (24h-MI) and a 3-wk once-daily milking (ODM). For each of them, the two components of adaptability, resistance and resilience, were estimated by milk yield loss in % when switching cows to 24h-MI or ODM and milk recovery:loss ratio when switching cows back to TDM. Four individual responses profiles, defined by the association of specific resistance and resilience modalities, were found with 3 being common between 24h-MI and ODM. These profiles were characterized by udder compliance (= ability to distend) and mammary inflammation. Milk yield responses were also found to be heritable ($h^2 = 0.32$ for milk yield losses and 0.63 for milk yield recovery (kg/d), respectively), so that it could be possible to select animals on these adaptability traits. The genomic regions related to these responses were partly different from regions controlling milk production traits during TDM, so that adaptability of the mammary gland to a reduced milking frequency might depend upon a specific genetic determinism.

Keywords: dairy cow, mammary gland, adaptability, once-daily milking, genetic determinism



AGROCAMPUS OUEST • Institut supérieur des sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage
65 rue de Saint-Brieuc – CS84215 – F-35042 Rennes Cedex
Tél. : 02 23 48 50 00
www.agrocampus-ouest.fr

