

## **Effet de l'aspirine et de l'acide nordihydroguaiarétique sur la sécrétion des caséines du lait par la cellule épithéliale mammaire**

Michèle OLLIVIER-BOUSQUET, Marie-Christine LACROIX

avec la collaboration technique de Michèle DAHIREL

*Laboratoire de Physiologie de la Lactation,  
I.N.R.A., 78350 Jouy-en-Josas, France.*

---

**Summary.** *Effect of aspirin and nor-dihydroguaiaretic acid on mammary epithelial cell secretion of milk caseins.*

Phospholipase A<sub>2</sub> and arachidonic acid mimic the stimulatory effect of prolactin on casein exocytosis. We suggest that prolactin by activating phospholipase A<sub>2</sub>, induces a release of arachidonic acid which is metabolized by a cyclooxygenase pathway leading to prostaglandins, prostacyclins and thromboxanes, a lipoxygenase pathway leading to hydroperoxides and leukotrienes and an epoxygenase pathway. The effects of prolactin and of the major products of arachidonic acid metabolism were studied by incubating mammary gland fragments of lactating rabbit and by measuring neosynthesized caseins and prostaglandins F (PGF<sub>2 $\alpha$</sub> ) in the incubation medium.

Aspirin (10<sup>-3</sup> M) which strongly decreases PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  synthesis did not modify exocytosis or prolactin stimulation of exocytosis. However, in some cases where prolactin did not stimulate exocytosis, aspirin could restore this stimulation. Nor-dihydroguaiaretic acid (10  $\mu$ M), an inhibitor of lipoxygenases, increased PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  synthesis in the presence of prolactin. In parallel, this inhibitor increased casein exocytosis but inhibited prolactin stimulation. These results are consistent with the action of arachidonic acid metabolites in the regulation of casein exocytosis. We suggest a dual control by the metabolites of the lipoxygenase and the cyclooxygenase pathways.

---

### **Introduction.**

La prolactine stimule la sécrétion des caséines du lait. La phospholipase A<sub>2</sub> et l'acide arachidonique exogène miment cet effet (Ollivier-Bousquet, 1984). De plus, la prolactine provoque en quelques minutes une augmentation de l'acide arachidonique libre intracellulaire (Blachier et Ollivier-Bousquet, 1984). L'ensemble de ces résultats nous a conduit à faire l'hypothèse que la prolactine, après fixation à son récepteur membranaire, activerait les phospholipases A<sub>2</sub> et provoquerait une hydrolyse accrue des membranes et une libération d'acide arachidonique conformément à un mécanisme décrit dans plusieurs cas de stimulation hormonale de la sécrétion (Laychock et Putney, 1982). Le métabolisme de l'acide arachidonique est contrôlé enzymatiquement grâce à l'activité des cyclo-oxygénases, des lipoxy-

génases (Samuelsson, 1983) et des époxygénases (Snyder *et al.*, 1983). Le rôle des métabolites de l'acide arachidonique dans la glande mammaire est assez peu connu. Les résultats sont variables selon les espèces et selon que l'étude est réalisée en fin de gestation (phase de développement de la glande) ou en lactation (phase sécrétoire de la glande). C'est ainsi que dans les explants de glande mammaire de souris en gestation, les phospholipases A<sub>2</sub> et C et les prostaglandines stimulent l'activité ornithine décarboxylase (Rillema, *et al.*, 1983). De plus, les produits de l'activité des lipoxygénases sont nécessaires à l'action lactogène de la prolactine (Rillema, 1984). Au contraire, dans les explants de glande mammaire de lapines en gestation, la prostaglandine F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) n'est pas lactogène (Houdebine et Lacroix, 1980). Enfin, dans la cellule mammaire de lapine en lactation, les dérivés cyclo-oxygénasiques ne paraissent pas jouer un rôle principal dans la stimulation prolactinique (Ollivier-Bousquet, 1982) contrairement aux dérivés lipoxygénasiques (Ollivier-Bousquet, 1984).

Etant donné le rôle important de ces métabolites dans plusieurs phénomènes sécrétoires (Metz *et al.*, 1983 ; Morgan et Pek, 1984 ; Canonico *et al.*, 1985), il nous a paru intéressant de préciser leur rôle dans la cellule mammaire en lactation. Pour cela, nous avons utilisé deux inhibiteurs du métabolisme de l'acide arachidonique, l'aspirine (inhibiteur des cyclo-oxygénases) et le NDGA (acide nordihydroguaiarétique, inhibiteur des lipoxygénases) et nous avons étudié leurs effets sur la sécrétion des caséines du lait parallèlement à leur pouvoir inhibiteur sur la sécrétion des PGF<sub>2α</sub>. Les PGF<sub>2α</sub> ne sont pas stockées dans les cellules et sont très rapidement sécrétées après leur synthèse. La mesure des PGF<sub>2α</sub> sécrétées dans le milieu permet donc une bonne évaluation de leur néosynthèse.

## Matériel et méthodes.

Des lapines néozélandaises sont abattues au 15<sup>e</sup> jour de la lactation et des fragments de glande mammaire sont prélevés immédiatement.

*Incubation* : Ces fragments sont incubés dans un milieu de Hank's bicarbonaté et oxygéné à 95 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub> à 37 °C. Après une préincubation de 30 min soit dans le milieu d'incubation seul, soit en présence d'aspirine (10<sup>-3</sup>M) (Aspegic) ou de NGDA (10 μm) (Sigma), puis un marquage de 3 min par la <sup>3</sup>H-L-leucine (40 μCi/ml) (CEA, Saclay) et un lavage abondant, la prolactine (10 μg/ml) (NIH) ainsi que l'aspirine (10<sup>-3</sup>M) et le NGDA (10 μM) soit seuls, soit associés à la prolactine sont ajoutés aux milieux. Le NGDA a été dissous dans du DMSO (diméthylsulfoxyde, concentration finale 0,02 %). Cette concentration de DMSO ne modifie pas la sécrétion témoin.

*Dosage des caséines* : Après une heure d'incubation à partir du début du marquage, les milieux sont prélevés et le dosage des caséines dans le milieu et les tissus est réalisé selon la méthode décrite précédemment (Ollivier-Bousquet, 1980).

*Dosage des prostaglandines* : Des fragments sont incubés dans les mêmes conditions. Après une heure d'incubation en présence de prolactine, d'aspirine et de

NGDA, les milieux sont prélevés et filtrés sur Millipore pour éliminer les débris cellulaires. Les  $PGF_{2\alpha}$  sécrétées sont mesurées par radioimmuno-essai (Kann et Lacroix, 1982).

*Analyse statistique* : Le calcul de la moyenne et de l'erreur standard a été fait sur la totalité des données (la moyenne des données obtenues dans les milieux témoins et les milieux plus prolactine est effectuée sur l'ensemble d'un grand nombre d'expériences). Les expériences sont de type apparié. Le témoin et le traité ne diffèrent que par l'addition de l'hormone ou de l'inhibiteur. La comparaison entre les couples de valeur provenant du même animal a été faite par un test t de Student sur les différences appariées.

## Résultats.

*Effet de l'aspirine.* — Après une heure d'incubation en présence d'aspirine ( $10^{-3}M$ ), la sécrétion des  $PGF_{2\alpha}$  dans le milieu (fig. 1) est diminuée d'environ 60 %. En présence d'aspirine ( $10^{-3}M$ ) plus prolactine, la sécrétion des  $PGF_{2\alpha}$

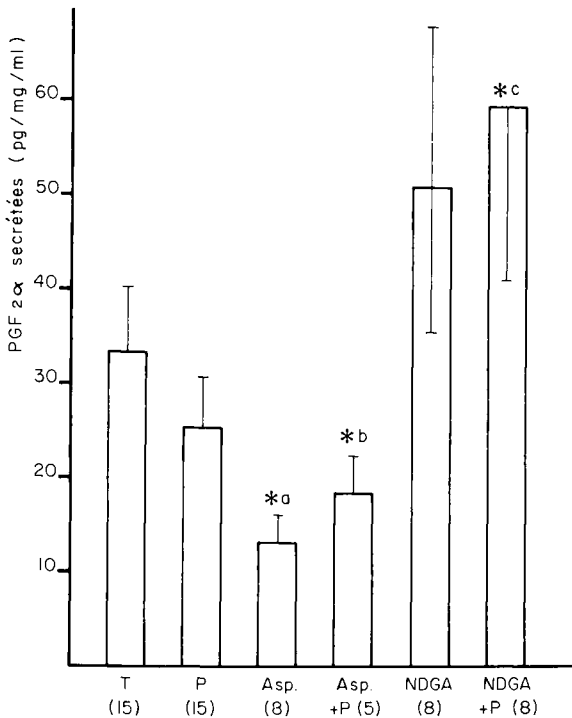


FIG. 1. — *Effet de l'aspirine et du NDGA sur la sécrétion des  $PGF_{2\alpha}$ .* Les fragments provenant de la glande mammaire d'un même animal sont incubés pendant 60 min dans un milieu de Hank's (T) contenant ou non 10  $\mu$ g/ml de prolactine (P),  $10^{-3}$  M d'aspirine (Asp.), 10  $\mu$ M de NDGA ou l'association aspirine plus prolactine (Asp + P) et NDGA plus prolactine (NDGA + P). Moyennes  $\pm$  ES. Entre parenthèses = nombres d'animaux.

a = significativement inférieur au groupe témoin  $p < 0,05$  ; b = significativement inférieur au groupe prolactine  $p < 0,05$  ; c = significativement supérieur au groupe prolactine  $p < 0,05$ .

bien que légèrement augmentée reste significativement inférieure à celle mesurée en présence de prolactine.

Comme nous l'avons montré précédemment, la prolactine stimule la sécrétion des caséines (fig. 2). L'aspirine ( $10^{-3}$ M) ne modifie pas la sécrétion des caséines ni la stimulation prolactinique de la sécrétion. Toutefois, si on considère la

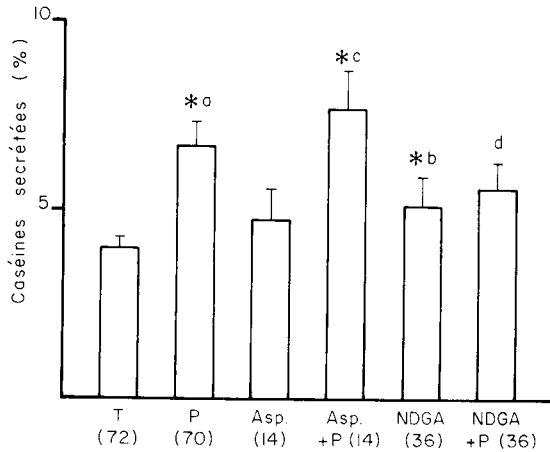


FIG. 2. — Effet de l'aspirine et du NDGA sur la sécrétion des caséines. Les fragments provenant de la glande mammaire d'un même animal sont préincubés pendant 30 min dans un milieu de Hank's (T) contenant ou non l'aspirine ( $10^{-3}$  M) et le NDGA ( $10 \mu\text{M}$ ), marqués pendant 3 min par  $40 \mu\text{Ci/ml}$  de  $^3\text{H-L-Leucine}$ , lavés et incubés dans le même milieu contenant ou non  $10 \mu\text{g/ml}$  de prolactine (P),  $10^{-3}$  M d'aspirine (Asp.),  $10 \mu\text{M}$  de NDGA ou l'association aspirine + prolactine (Asp + P) et NDGA plus prolactine (NDGA + P). Moyennes  $\pm$  ES. Entre-parenthèses = nombre d'animaux.

a = significativement supérieur au groupe témoin  $p < 0,001$ ; b = significativement supérieur au groupe témoin  $p < 0,01$ ; c = significativement supérieur au groupe aspirine  $p < 0,05$ ; d = N.S. par rapport au groupe NDGA.

réponse à la prolactine des fragments, animal par animal, on constate que dans un petit nombre de cas (5 sur 15), la prolactine n'exerce pas d'effet stimulant. Ces expériences ont été analysées séparément. Pour cela, nous avons fait la moyenne des valeurs obtenues avec les expériences réalisées avec les cinq animaux dont les fragments ne montrent pas de stimulation de sécrétion quand ils sont incubés en présence de prolactine. L'analyse statistique a été faite par un test t de Student sur les différences appariées. La figure 3 montre que dans ces fragments, l'aspirine ne modifie pas la sécrétion des caséines mais l'association aspirine ( $10^{-3}$ M) plus prolactine ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) exerce un effet stimulant. On peut donc en conclure que : 1 — tous les fragments de glande mammaire ne répondent pas de la même façon à la stimulation prolactinique bien que l'effet soit statistiquement significatif sur un grand nombre d'expériences ; 2 — dans le cas où les fragments ne sont pas stimulables par la prolactine, l'inhibition de l'activité des cyclo-oxygénases rétablit la stimulation prolactinique.

*Effet du NDGA.* — Le NDGA inhibe les lipoxycgénases (Parker, 1982) mais des effets inhibiteurs ont aussi été décrits sur les cyclo-oxygénases (Metz *et al.*,

1983). Dans nos conditions expérimentales, le NDGA n'inhibe pas la sécrétion des  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (fig. 1). En présence de NDGA plus prolactine, la sécrétion des  $\text{PGF}_{2\alpha}$  dans le milieu est significativement augmentée par rapport à la sécrétion des fragments incubés en présence de prolactine.

Comme nous l'avons montré précédemment, le NDGA n'inhibe pas la sécrétion des caséines. Au contraire, 10  $\mu\text{M}$  de NDGA provoque une augmentation du niveau de base de la sécrétion (fig. 2).

Cependant, en présence de NDGA, la prolactine n'a plus d'effet stimulant sur la sécrétion des caséines.

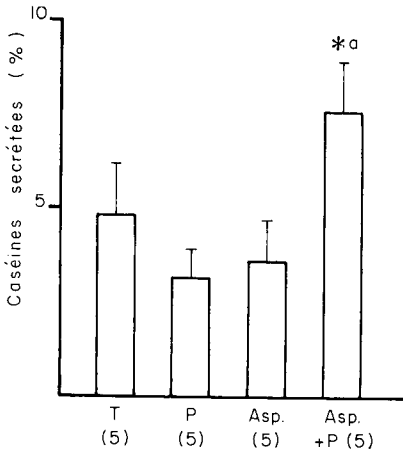


FIG. 3. — Effet de l'aspirine sur la sécrétion des caséines dans les fragments de glandes mammaires de lapines en lactation non stimulables par la prolactine. Les fragments ont été traités de la même manière que ceux de la fig. 2. Moyennes  $\pm$  ES (5 animaux).

a = significativement supérieur au groupe aspirine  $p < 0,05$ .

## Discussion.

Les résultats obtenus montrent que le métabolisme de l'acide arachidonique joue un rôle dans le contrôle de la sécrétion des caséines du lait. L'utilisation d'inhibiteurs des cyclo-oxygénases et des lipoxygénases permet d'évaluer par différence le rôle de ces deux voies métaboliques.

L'inhibition des cyclo-oxygénases par des drogues anti-inflammatoires varie considérablement selon les tissus (Higgs et Vane, 1983). Il était donc important de tester l'activité de l'aspirine sur les cellules épithéliales mammaires de lapines en lactation. Aux doses utilisées, l'aspirine diminue fortement la synthèse des  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . Dans ce cas, ni l'activité sécrétoire de base, ni la stimulation prolactinique ne paraissent affectées. On peut donc faire l'hypothèse que les  $\text{PGF}_{2\alpha}$  ne sont pas l'agent principal de la stimulation prolactinique. Toutefois, l'analyse des résultats individuels montre que pour les fragments de tissu mammaire de lapine en lactation qui ne présentent pas de stimulation de l'exocytose sous l'effet de la prolactine, l'addition d'aspirine au milieu d'incubation restaure l'effet stimulant.

Il apparaît donc clairement que les produits de la voie cyclo-oxygénasique contrôlent en partie la réponse prolactinique avec une amplitude variable selon les individus. Ce contrôle peut s'exercer directement sur l'exocytose des caséines. Ceci serait en accord avec l'inhibition de la stimulation prolactinique par les  $\text{PGF}_{2\alpha}$ .

exogènes (Ollivier-Bousquet, 1982). Ce contrôle pourrait aussi être le résultat d'une accessibilité du substrat modifiée vers une voie cyclo-oxygénasique laissant peu de substrat disponible vers la voie lipoxygénasique stimulante.

Il n'est pas possible actuellement de choisir entre ces différentes possibilités. On peut cependant rapprocher ces données des résultats décrits dans différents tissus sécréteurs. Ainsi, les prostaglandines stimulent la sécrétion de l'insuline dans des îlots pancréatiques de rats (Johnson *et al.*, 1973) et dans des pancréas de rats perfusés (Nishi *et al.*, 1982). Au contraire, des inhibiteurs de cyclo-oxygénase augmentent la sécrétion d'insuline (Broadie *et al.*, 1981 ; Metz *et al.*, 1981) et des niveaux élevés de prostaglandines peuvent parfois être associés avec la suppression de la sécrétion d'insuline (Burr et Sharp, 1974 ; Robertson, 1981). De plus, dans les cellules hypophysaires en culture, l'indométacine, un inhibiteur puissant de l'activité des cyclo-oxygénases (Higgs et Vane, 1983) ne modifie pas la sécrétion de base de la prolactine et amplifie l'effet stimulant de l'acide arachidonique (Canonica *et al.*, 1985).

L'inhibition des lipoxygénases par le NDGA a été fréquemment utilisée (Parker, 1982). Malheureusement, la spécificité de cet inhibiteur n'a pas été démontrée. Ainsi, le NDGA inhibe la synthèse des prostaglandines dans les cellules pancréatiques (Metz *et al.*, 1983). Pour tester sa spécificité dans la cellule mammaire, il ne nous était pas possible actuellement de mesurer l'effet direct de cet inhibiteur sur les produits de la voie lipoxygénasique. Toutefois, nous avons pu mettre en évidence que dans les conditions expérimentales utilisées, le NDGA n'inhibe pas la voie cyclo-oxygénasique et provoque même une augmentation de sécrétion des  $\text{PGF}_{2\alpha}$  dans le milieu quand il est associé à la prolactine. Cette augmentation peut être due soit à une utilisation accrue du précurseur, l'acide arachidonique, dans la voie des cyclo-oxygénases ou des époxygénases, la voie des lipoxygénases étant bloquée, soit à la levée d'une interaction entre les produits lipoxygénasiques et cyclo-oxygénasiques.

En présence de NDGA, la sécrétion de base des caséines est stimulée. Ces résultats sont à rapprocher des observations faites dans les îlots pancréatiques (Morgan and Peck, 1984) où le NDGA provoque une stimulation de sécrétion du glucagon qui est abolie par un inhibiteur de synthèse des prostaglandines. Si tel était le cas pour les fragments mammaires, on pourrait supposer que certaines prostaglandines joueraient un rôle sur la sécrétion de base des caséines. Cependant, en présence de NDGA, la prolactine n'exerce plus de stimulation sur la sécrétion. L'effet stimulant de l'hormone peut donc être attribué aux métabolites de la voie lipoxygénasique.

L'ensemble de ces résultats montre que les métabolites de l'acide arachidonique exercent des effets régulateurs sur la sécrétion des caséines. Ils font apparaître que le niveau de base de la sécrétion et la stimulation de cette sécrétion sont deux phénomènes qui peuvent être contrôlés indépendamment.

*En conclusion*, nous suggérons que certains produits du métabolisme de l'acide arachidonique par la voie cyclo-oxygénasique jouent un rôle stimulant sur la sécrétion de base des caséines et ont un rôle inhibiteur sur la stimulation de la

sécrétion. Les métabolites issus de la voie lipoxygénasique seraient responsables de la stimulation.

11<sup>e</sup> Réunion du groupe Développement I.N.R.A.,  
Montpellier, 22-24 mai 1985.

## Références

- BLACHIER F., OLLIVIER-BOUSQUET M., 1984. Données récentes sur l'exocytose des caséines du lait : métabolisme de l'acide arachidonique dans les cellules épithéliales mammaires. *Biol. Cell*, **51**, 26a.
- BROADIE T. A., BYBEE D., FLETCHER J. R., O'BRIEN J., 1981. Indomethacin-induced augmentation of insulin release. *J. Surg. Res.*, **30**, 275-280.
- BURR I. M., SHARP R., 1974. Effects of prostaglandin E and epinephrine on the dynamics of insulin release *in vitro*. *Endocrinology*, **94**, 835-839.
- CANONICO P. L., JUDD A. M., KOIKE K., VALDENEGRO C. A., Mac LEOD R., 1985. Arachidonate stimulates prolactin release *in vitro* : a role for the fatty acid and its metabolites as intracellular regulator(s) in mammatrophs. *Endocrinology*, **116**, 218-225.
- HIGGS G. A., VANE J. R., 1983. Inhibition of cyclo-oxygenase and lipoxigenase *Brit. med. Bull.*, **39**, 265-270.
- HOUBEINE L. M., LACROIX M. C., 1980. Effet de l'indométhacine sur l'action lactogène de la prolactine. *Biochimie*, **62**, 441-444.
- JOHNSON D. G., FUJIMOTO W. Y., WILLIAMS R. H., 1973. Enhanced release of insulin by prostaglandins in isolated pancreatic islets. *Diabetes*, **22**, 658-663.
- KANN G., LACROIX M. C., 1982. Effects of systemic administration of indomethacin to cyclic ewes on endometrial concentrations of prostaglandins. Effects on estrous cycle length and on progesterone, luteinizing hormone and prolactin patterns. *Prostaglandins*, **23**, 527-541.
- LAYCHOCK S. G., PUTNEY J. W., 1982. Roles of phospholipid metabolism in secretory cells, 53-105. In *Cellular regulation of secretion and release*. Acad. Press Inc.
- METZ S. A., FUJIMOTO W. Y., ROBERTSON R. P., 1983. A role for the lipoxigenase pathway of arachidonic acid metabolism in glucose- and glucagon-induced insulin secretion. *Life Sci.*, **32**, 903-910.
- METZ S. A., ROBERTSON R. P., FUJIMOTO W. Y., 1981. Inhibition of prostaglandin E synthesis augments glucose-induced insulin secretion in cultured pancreas. *Diabetes*, **30**, 551-557.
- MORGAN R. P., PEK S. B., 1984. Role of arachidonate lipoxigenase and cyclo-oxygenase products in insulin and glucagon secretion from rat pancreatic islets. *Metabolism*, **33**, 928-935.
- NISHI S., SEINO Y., SEINO S., TSUDA K., TAKEMURA J., ISHIDA H., IMURA H., 1982. Stimulation of somatostatin and insulin responses to glucose from the isolated perfused rat pancreas. *Prostaglandins Leukotrienes Med.*, **8**, 593-597.
- OLLIVIER-BOUSQUET M., 1980. Effet des agents lysosomotropes sur la stimulation par la prolactine de la sécrétion des protéines du lait. *Biol. Cell*, **39**, 21-30.
- OLLIVIER-BOUSQUET M., 1982. Effet de l'acide arachidonique sur la sécrétion des caséines du lait *in vitro*. *C.R. Acad. Sci. Paris*, **294**, 669-672.
- OLLIVIER-BOUSQUET M., 1984. Effet de la prolactine sur la sécrétion des caséines du lait : métabolisme de l'acide arachidonique. *Biol. Cell*, **51**, 327-334.
- PARKER C. W., 1982. Leukotrienes : their metabolism, structure and role in allergic responses. In B. SAMUELSSON, P. PAOLETTI, *Adv. prostaglandins, thromboxanes and leukotrienes research*, vol. **9**, 115-126, Raven Press, New York.
- RILLEMA J. A., WING L-Y. C., FOLEY K. A., 1983. Effects of phospholipases on ornithine decarboxylase activity in mammary gland explants from midpregnant mice. *Endocrinology*, **113**, 2024-2028.
- RILLEMA J. A., 1984. Effect of NDGA, a lipoxigenase inhibitor, on prolactin actions in mouse mammary gland explants. *Prostaglandins Leukotrienes Med.*, **16**, 89-94.

- ROBERTSON R. P., 1981. Prostaglandins, glucose homeostasis and diabetes mellitus. *Med. Clin. North Am.*, **65**, 759-771.
- SAMUELSSON B., 1983. From studies of biochemical mechanism to novel biological mediators : prostaglandin endoperoxides, thromboxanes and leukotrienes. *Biosci. Rep.* **3**, 791-813.
- SNYDER G. D., CAPDEVILA J., CHALOS N., MANNA S., FALCK J. R., 1983. Action of luteinizing hormone-releasing hormone : involvement of novel arachidonic acid metabolites. *Proc. nat. Acad. Sci. USA*, **80**, 3504-3507.
- WING L-Y. C., RILLEMA J. A., 1983. Prostaglandin stimulation of ornithine decarboxylase activity in mammary gland explants from mid-pregnant mice. *Prostaglandins*, **25**, 321-333.
-