



**HAL**  
open science

## Caractérisation des cellules épithéliales mammaires chez la vache laitière

Florence Dufreneix

► **To cite this version:**

Florence Dufreneix. Caractérisation des cellules épithéliales mammaires chez la vache laitière . Sciences du Vivant [q-bio]. 2015. dumas-01252765

**HAL Id: dumas-01252765**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01252765>**

Submitted on 8 Jan 2016

**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.

AGROCAMPUS  
OUEST

CFR Angers

CFR Rennes



Année universitaire : 2014-2015

Spécialité :

**Sciences de l'Animal pour l'élevage de demain**

Spécialisation (et option éventuelle) :

.....

### Mémoire de Fin d'Études

d'Ingénieur de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage

de Master de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage

d'un autre établissement (étudiant arrivé en M2)

## Caractérisation des cellules épithéliales mammaires chez la vache laitière

Florence DUFRENEIX



**Soutenu à RENNES**

**le 19 juin 2015**

#### **Devant le jury composé de :**

Maître de stage : Frédéric DESSAUGE

Enseignant référent : Vanessa LOLLIVIER, Lucile MONTAGNE

Autres membres du jury (Nom, Qualité) Sandrine TRUCHET (rapportrice), François FERRIERE (membre du jury), Emmanuelle MOREAU (membre du jury).

*Les analyses et les conclusions de ce travail d'étudiant n'engagent que la responsabilité de son auteur et non celle d'AGROCAMPUS OUEST*



## Remerciements

Je voudrais remercier **Jaap Van Milgen** de m'avoir accueillie pendant ces six mois de stages au sein de l'unité PEGASE ainsi que **Hélène Quesnel** pour son accueil au sein de l'équipe Lactation.

Un grand merci à **Frédéric Dessauge** pour ton soutien, ton encadrement tout le long du stage, de m'avoir laissée en autonomie tout en étant présent aux moments clés, pour les discussions scientifiques que nous avons eu, d'avoir partagé ton bureau avec moi bien que je le déconseille aux futures personnes au risque de recevoir un ballon (lancé de façon tout à fait incontrôlée, bien sûr^^) et de m'avoir transmis une partie de ton savoir « d'infographiste ».

**Laurence Finot** pour la prise en main des techniques en début de stage et tous tes conseils techniques et scientifiques, ton autodérision, ta bonne humeur et ta présence colorée (je me souviendrai longtemps de tes collants multicolores !).

L'équipe ne serait pas complète sans **Marie-Hélène Perruchot** et **Frédérique Mayeur** que je remercie pour leurs conseils, leur bonne humeur et les fous rires en salle de culture. Merci aussi à Marie-Hélène pour la formation en cytométrie. Continuez comme ça tous les quatre vous êtes une super équipe !

A l'équipe Lactation dans son ensemble pour sa bonne entente et son pique-nique et plus particulièrement **Vanessa Lollivier** pour m'avoir laissée son bureau pendant six mois, **Sandra Wiart** pour la formation en histologie, **Éric Chanat** et **Magdalena Turrubiarte** : Merci !

Merci également à **Philippe Faverdin** pour son aide précieuse sur les analyses de données de production laitière et à **Jean-Marc Aubry** pour les matinées de pesées des chevrettes et pour le sirop d'érable.



## Liste des abréviations

AFC	Analyse factorielle des correspondances
APC	Allophycocyanin
ARN	Acide ribonucléïque
BSA	Bovine serum albumin
CD	Cluster of differentiation
CDH1	Cadherin 1
CK	Cytokératine
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
EGF	Epidermal growth factor
EpCAM	Epithelial cell adhesion molecule
FABP3	Fatty acid binding protein 3
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FMO	Fluorescence minus one
IGF	Insuline-like growth factor
IgG	Immunoglobuline G
INRA	Institut national de la recherche agronomique
ITS	Insulin transferrin selenium
KRT	Kératine
PAF	Paraformaldéhyde
PE	Phycoerythrin
PS	Prise de sang
RT-qPCR	Reverse transcription and quantitative polymerase chain reaction
SVF	Sérum de veau fétal



## Liste des illustrations

Figure 1 : Schéma structural de la glande mammaire bovine et de l'organisation d'une alvéole mammaire.

Figure 2 : Hiérarchie de différenciation des cellules souches mammaires en cellules différenciées.

Figure 3 : Stratégie expérimentale de prélèvement de tissus de la glande mammaire au cours de la lactation.

Figure 4 : Evolution au cours du temps de la production laitière des cinq vaches de l'expérience.

Figure 5 : Diagramme de Gantt des différentes phases de déroulement du stage.

Figure 6 : Sortie du logiciel R de l'analyse factorielle des correspondances.

Figure 7 : Evolution des populations  $\text{EpCAM}^+$ ,  $\text{CD49f}^+$ ,  $\text{CD24}^+$ ,  $\text{CD10}^+$  et  $\text{CD49f}^+\text{EpCAM}^-$  au cours des différents prélèvements.

Figure 8 : Evolution des populations de cellules  $\text{CD49f}^+$ ,  $\text{CD49f}^+\text{CD24}^-$  et de l'expression du gène KRT19 en fonction de la production laitière.

Figure 9 : Evolution de l'expression du gène KRT19 en fonction de la production laitière.

Figure 10 : Evolution de la population  $\text{EpCAM}^+$  en fonction de la production laitière en B2 et en B3.

Figure 11 : Coupes histologiques de tissus de glande mammaire de génisse et de vache en lactation.

Figure 12 : Comparaison des populations de cellules monomarquées chez la génisse et la vache en lactation.

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Protocole de marquage de la cytométrie en flux





## Sommaire

Introduction.....	1
Matériels et méthodes.....	3
I. Phase expérimentale <i>in vivo</i> .....	3
II. Phase expérimentale <i>ex vivo</i> : digestion des tissus.....	3
III. Culture des cellules.....	3
IV. Phénotypage par cytométrie en flux.....	4
V. Expression des gènes par RT-qPCR.....	4
VI. Structure des tissus par histologie.....	5
VII. Analyse statistique.....	5
Résultats.....	6
I. Phénotypage des cellules épithéliales et myoépithéliales mammaires chez la vache laitière au cours de la lactation.....	7
A. Données zootechniques.....	7
B. Analyse globale des différentes variables mesurées.....	7
C. Evolution des populations cellulaires au cours de la lactation.....	8
1. Analyse des populations monomarquées.....	8
2. Analyse des populations doublement marquées.....	8
D. Evolution des populations cellulaires à des moments précis (B1, B2, B3 ou B4).....	8
1. Les populations de cellules avant le pic de lactation (B1) sont de type épithélial.....	8
2. Et pour les autres biopsies ?.....	9
II. Analyse des populations cellulaires de la glande mammaire à des stades physiologiques différents : puberté vs. Lactation.....	10
A. Des différences au niveau structural.....	10
B. Les populations cellulaires de la glande mammaire sont stables entre les stades physiologiques.....	10
Discussion.....	12
Conclusion.....	17
Bibliographie.....	18
Résumé.....	20

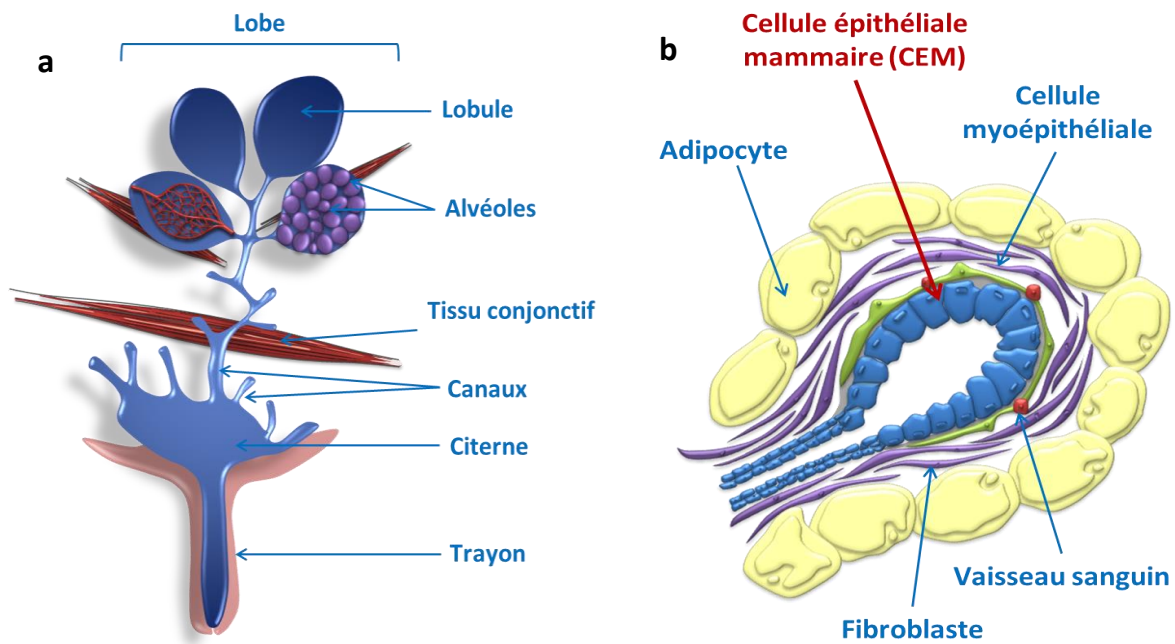


Figure 1 : Schéma structural de la glande mammaire bovine (a) et de l'organisation d'une alvéole mammaire (b) (adapté de Delouis et Richard, 1991).

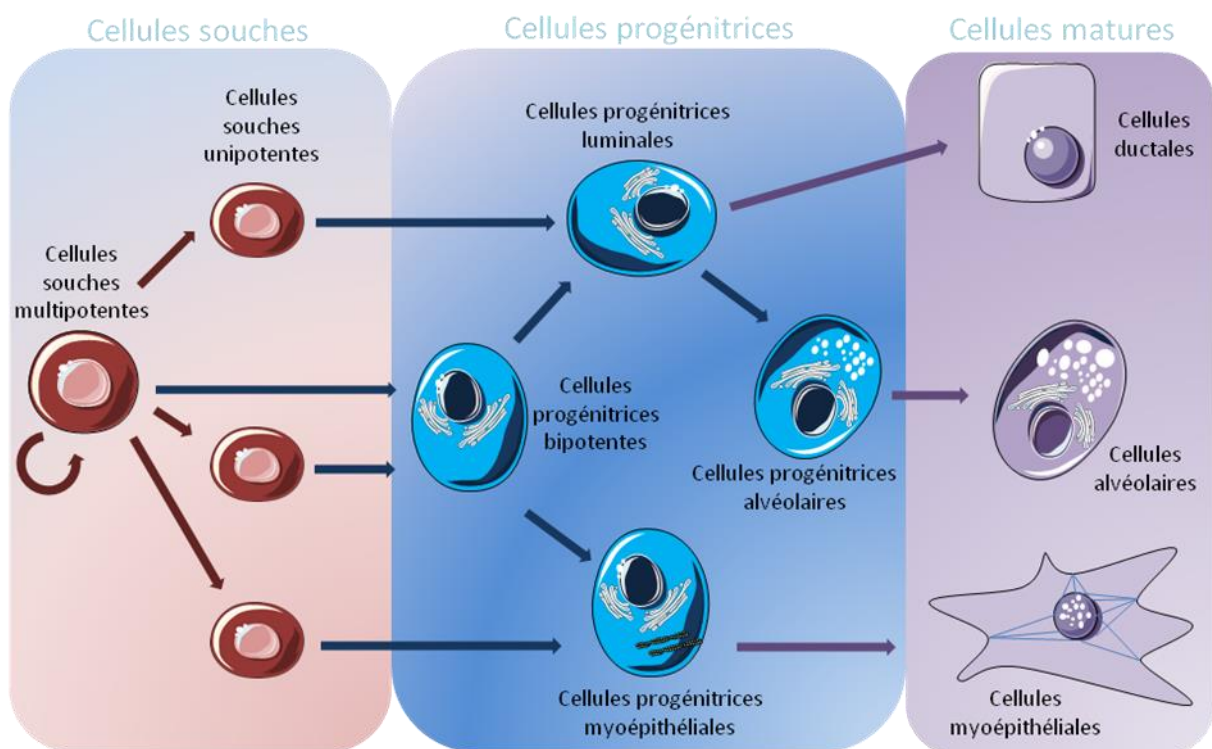


Figure 2 : Hiérarchie de différenciation des cellules souches mammaires en cellules différenciées (Dessaige F 2013. Présentation HDR)

## Introduction

Depuis 1984, la filière laitière de l'Union Européenne a été régulée par un système de quotas ce qui a permis de limiter et de stabiliser la production laitière jusqu'à nos jours. Cependant, le contexte actuel n'étant plus ce qu'il était 20 ans auparavant, ces quotas ont été supprimés en 2015. La filière laitière doit donc se réorganiser pour continuer à produire en absence de quotas et dans un cadre où de nouveaux défis apparaissent. En effet, la demande mondiale pour le lait et les produits laitiers augmente d'année en année, notamment en Chine. D'autre part, cette filière doit également répondre aux attentes de la société vis-à-vis de l'impact environnemental lié à l'élevage de bovins. Ainsi, dans ce cadre où de nombreux défis sont à relever, la recherche sur la fonction de lactation chez la vache laitière et notamment sur le fonctionnement de la glande mammaire apparaît comme un levier important dans la compréhension de l'adaptation des animaux à de nouvelles pratiques d'élevage.

La glande mammaire (**Figure 1a**) est un organe dynamique dédié à la production de lait dont les cellules sont renouvelées à 50% au cours d'une lactation (Capuco *et al.* 2001). La fonction de production est assurée par les cellules épithéliales mammaires sécrétrices au sein des alvéoles (**Figure 1b**). Il a été montré que ces cellules épithéliales variaient en nombre et en activité au cours de la lactation. L'augmentation de la production de lait en début de lactation est ainsi due à une augmentation du nombre et de l'activité des cellules épithéliales sécrétrices et à l'inverse la diminution de production est liée à une diminution de ces mêmes cellules et de leur activité (Stefanon *et al.* 2002).

Cependant, la glande mammaire n'est pas composée exclusivement de cellules épithéliales sécrétrices (i.e. différenciées). Ellis et Capuco ont montré en 2002 qu'il existait au sein de la glande mammaire bovine des cellules souches, c'est-à-dire des cellules capables de donner naissance à n'importe quel type cellulaire. Depuis, il a été établi chez le modèle murin que ces cellules souches épithéliales étaient capables de se différencier en cellules progénitrices, des cellules engagées dans une voie de différenciation mais gardant des capacités de prolifération importantes, et que ces cellules elles-mêmes donnaient naissance aux cellules épithéliales différenciées responsables de la synthèse du lait (Capuco *et al.* 2012) (**Figure 2**). En plus de ces trois types de populations de cellules épithéliales : souches, progénitrices et différenciées, la glande mammaire est peuplée par d'autres populations de cellules : des cellules myoépithéliales servant à l'éjection du lait (notamment au moment de la traite), des fibroblastes qui permettent le soutien des cellules entre elles (production de matrice extracellulaire), d'adipocytes stockant les réserves et de cellules endothéliales qui apportent les nutriments à la glande mammaire par le biais des vaisseaux sanguins (**Figure 1b**).



Toutes ces populations contribuent par leur fonction à la production de lait. Aujourd'hui, l'évolution et la plasticité de ces cellules au cours d'un cycle de lactation ne sont pas connues chez la vache laitière. De plus, la caractérisation phénotypique de ces cellules permettant de les discriminer spécifiquement n'est pas encore aboutie.

Le développement de la cytométrie en flux a permis d'ouvrir de nouvelles voies dans le phénotypage de la glande mammaire. En effet, cette technique basée sur la reconnaissance des molécules situées à la surface des cellules permet une approche mono-cellulaire qui n'était pas permise par les autres techniques utilisées classiquement comme la RT-qPCR et le western blot. De plus, l'utilisation simultanée de plusieurs marqueurs permet la détection de populations de cellules plus rares. Ainsi en 2012, l'utilisation de cette technique a permis de phénotyper chez la vache laitière des populations de cellules souches, progénitrices et sécrétrices par l'expression de leurs marqueurs de surface CD49f et CD24 (Rauner et Barash, 2012). Chez la femme, un résultat similaire a été obtenu (Ghebeh *et al.* 2013) avec l'utilisation du double marquage CD49f et EpCAM. Ceci a permis d'établir l'existence d'un remplacement du marqueur de surface CD49f par le marqueur EpCAM au cours de la différenciation des cellules souches en cellules sécrétrices. Ainsi, les marqueurs de surface CD49f et CD24 sont plutôt caractéristiques des cellules épithéliales mammaires souches et progénitrices et le marqueur de surface EpCAM en combinaison avec CD49f est caractéristique des cellules épithéliales mammaires sécrétrices (i.e. différenciées). Les cellules myoépithéliales ont quant à elles été identifiées en immunohistochimie par le marqueur de surface CD10 (Safayi *et al.* 2012). Ce marqueur peut donc être utilisé en cytométrie en flux pour l'identification des cellules myoépithéliales. Les autres types cellulaires qui composent la glande mammaire comme les adipocytes, les fibroblastes et les cellules endothéliales possèdent beaucoup moins de marqueurs référencés dans la bibliographie que ce soit en cytométrie en flux, en RT-qPCR ou western blot. Les données existantes sont référencées chez l'homme (Yang *et al.* 2014 ; Sarrío *et al.* 2012) et ne croisent actuellement pas avec les outils utilisés en bovin.

L'objectif de ce stage a donc été de s'intéresser à l'évolution de ces différentes populations présentes au sein de la glande mammaire pendant la lactation et à deux stades physiologiques contrastés (génisse / vache en lactation) en centrant notre analyse d'étude sur des marqueurs des cellules épithéliales mammaires souches, progénitrices et sécrétrices ainsi que sur les cellules myoépithéliales.

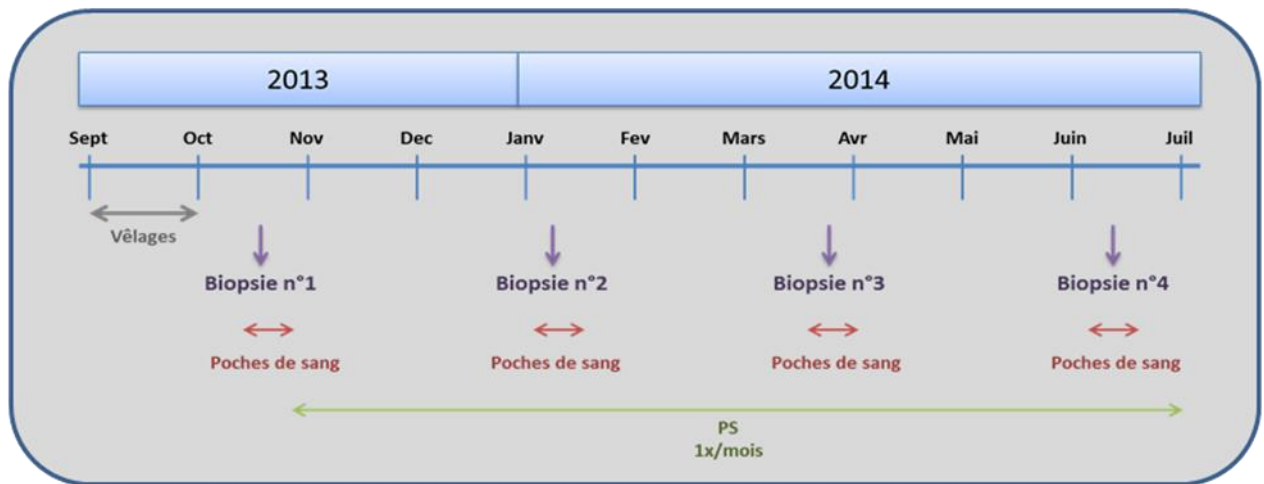


Figure 3 : Stratégie expérimentale de prélèvement de tissus de glande mammaire au cours de la lactation (PS : Prise de sang).

## Matériels et méthodes

### I. Phase expérimentale *in vivo*

L'expérimentation *in vivo* a été réalisée à la ferme de Méjusseume (St Gilles - INRA). La première expérience portait sur cinq vaches primipares de race Prim'Holstein traitées deux fois par jours et recevant la même alimentation. Ces cinq vaches ont été suivies tout le long de leur lactation, du vêlage en septembre jusqu'au tarissement en juillet. Au cours de leurs lactations, quatre prélèvements de tissus (biopsies) ont été réalisés sur les quartiers arrières droit et gauche de chacune des vaches (**Figure 3**). En parallèle de ces prélèvements, la production laitière, le taux butyreux, le taux protéique et le taux de cellules ont été mesurés quotidiennement. Les carottes de tissus issus des différentes biopsies ont été cryocongelées à  $-196^{\circ}\text{C}$  dans de l'azote liquide avant d'être utilisées pour la deuxième partie de l'expérience.

La deuxième expérience portait sur une génisse de 21 mois (pubère et non gestante) et une vache multipare en lactation. Ces deux vaches ont été euthanasiées ce qui a permis le prélèvement de morceaux de tissus (explants) à différents endroits de la glande mammaire.

### II. Phase expérimentale *ex vivo* : digestion des tissus

Les tissus sont décongelés et mis sous agitation pendant trois heures à  $37^{\circ}\text{C}$  dans un milieu de digestion (DMEM-F12 (Gibco, 31331-028), 5% de Sérum de Veau Fétal (SVF, Gibco, 10270-106), insuline (Sigma, 15523) à  $5\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , hydrocortisone (Sigma, H-0888) à  $1\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) avec 7 000 U par mL de collagénase type II (Worthington, 54N15271) et 2 000 U par mL de hyaluronidase (Sigma, H3506-G1) de façon à dissocier les cellules entre elles. L'ensemble est ensuite centrifugé (5 minutes à 500g à  $4^{\circ}\text{C}$ ) puis 2 mL de trypsine-EDTA (Sigma, T4049-100ML) sont ajoutés au culot pour achever la dissociation. Après centrifugation, le culot composé de cellules et de reste de tissus est passé sur un filtre de diamètre  $70\ \mu\text{m}$  (Miltenyi Biotec), lavé avec une solution de lavage (rinsing solution (Miltenyi Biotec), Bovine Serum Albumine (BSA, Miltenyi, 130-091-376) 5%) pour obtenir une solution avec des cellules individualisées. Une partie des cellules ainsi obtenues est mise en culture et l'autre partie est utilisée pour le phénotypage par cytométrie en flux.

### III. Culture des cellules

Les cellules sont mises en culture dans des flasks T25 contenant le milieu de culture : DMEM-F12, antibiotique (Gibco, 15240-062) 1X, EGF (Sigma, E-4269) à  $10\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ , IGF-1 (Sigma, I3769-5OUG) à  $10\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ , hydrocortisone à  $5\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ , SVF 10% et Insuline transferrin selenium (ITS, Sigma, I3146-5ML) 0.25X. Les flasks sont mises dans une étuve à  $37^{\circ}\text{C}$  et 5% de  $\text{CO}_2$ .



Tableau 1: Protocole de marquage de la cytométrie en flux (Non marquées : tubes où aucun anticorps est ajouté, FMO : fluorescence minus one ou contrôle négatif, Multi : tube où les quatre anticorps sont ajoutés)

	N°	IP	EpCAM	Isotype EpCAM	CD49f	Isotype CD49f	CD24	Isotype CD24	CD10	Isotype CD10
Non marquées	1	X								
FMO EpCAM	2	X		X	X		X		X	
FMO CD49f	3	X	X			X	X		X	
FMO CD24	4	X	X		X			X	X	
FMO CD10	5	X	X		X		X			X
Multi	6	X	X		x		X		X	

#### IV. Phénotypage par cytométrie en flux

Après digestion, les cellules sont reprises dans du tampon FACS Buffer (Rinsing solution, BSA 5%) puis réparties dans des tubes à la concentration de 200 000 cellules par tube. Elles sont incubées 20 minutes dans la glace pendant 20 minutes à l'abri de la lumière, avec les anticorps suivants : anti-CD336 (EpCAM) couplé Vioblue (Miltenyi Biotec, 130-097-324), mouse IgG1 couplé Vioblue (Miltenyi Biotec, 130-099-089), anti-CD49f couplé FITC (Miltenyi Biotec, 130-097-245), rat IgG2a couplé FITC (Miltenyi Biotec, 130-102-653), anti-CD24 couplé APC (Miltenyi Biotec, 130-102-733), rat IgG2b couplé APC (Miltenyi Biotec, 130-102-664), anti-CD10 couplé PE-Vio770 (Miltenyi Biotec, 130-100-421), mouse IgG1 couplé PE-vio770 (Miltenyi Biotec, 130-096-654). Le protocole de marquage est indiqué dans le **Tableau 1**. Un contrôle négatif pour chaque anticorps est réalisé par la technique des FMO qui consiste à mettre tous les anticorps utilisés sauf un. Les cellules sont centrifugées et reprises dans 300 µL de tampon FACS Buffer puis analysées au cytomètre de flux (Miltenyi Biotec, MACS Quant) après ajout extemporanément d'1 µL d'iodure de propidium (Miltenyi Biotec, 130-093-233) pour marquer les cellules mortes.

L'analyse des résultats de cytométrie se fait par le logiciel MACS Quant (Miltenyi Biotec). Après exclusion des doublets de cellules, des cellules mortes et sélection des populations d'intérêt, les FMO sont utilisées pour fixer le seuil de fluorescence. Les résultats sont exprimés en pourcentages de chaque population de cellules marquées.

#### V. Expression des gènes par RT-qPCR

Les ARN des tissus ont été extraits dans du trizol (Thermo Scientific, 15596-018) par broyage des tissus au broyeur à Billes Precellys 24 (Bertin Technologies). Après ajout de chloroforme (Thermo Scientific, C4920/08) et d'éthanol 70% pour isoler et précipiter les ARN, ils sont récupérés et purifiés par utilisation du kit RNeasy Kit (Qiagen, 74104) selon la notice fournie du kit. Les ARN sont quantifiés par spectrophotométrie avec le Nanodrop (Labtech) et leur intégrité est mesurée avec le bioanalyseur (Agilent). L'ADN complémentaire (ADNc) a été obtenu par rétrotranscription des ARN avec le ViloSuperscript kit sur le thermocycler PTC-100 (MJ Research Inc, programme : 10 min à 25°C, 45 min à 42°C et 5 min à 85°C). Les ADNc sont dilués au 1/50<sup>ème</sup> avec de l'eau stérile. L'expression des gènes est réalisée par qPCR en utilisant l'appareil StepOne (Applied Biosystems, 10 min à 95°C, 40 cycles à 95 °C et 1 min à 60°C suivi d'un programme pour obtenir les courbes de dissociation). Les primers des gènes de référence utilisés sont : ARN ribosomal 18S (forward CAAATTACCCACTCCCGACCC, reverse AATGGATCCTCGCGGAAGG), Peptidylprolyl isomerase A (forward GGATTTATGTGCCAGGGTGGTGA, reverse CAAGATGCCAGGACCTGTATG) et Protéine ribosomale large, P0 (forward CAACCCTGAAGTGCTTGACAT, reverse AGGCAGATGGATCAGCCA). Les



gènes testés sont : KRT14 (forward GCAGATCGAGAGCCTCAAG, reverse GGCCTCTCAGGGAGTTCAT), KRT18 (forward ATACCTACCGCCGTCTGCT, reverse GGATGGTTTGCCTGGAGTT), KRT19 (forward GGCGGGCAACGAGAAGC, reverse CGAGAATCTGGTCCCGCAG), CDH1 (forward GAAGAACAGCACGTACACGGC, reverse CCTCTGGCAGAAGTCCATGGT) et FABP3 (forward GCGTTCTCTGTCGTCTTTCCC, reverse CTGTGTTCTTGAAGGTGCTTTGTG).

## VI. Structure des tissus par histologie

Les tissus de glande mammaire prélevés pour l'histologie ont été fixés avec du paraformaldéhyde (PAF) 4% et congelés à -80°C dans un cryoconservateur. Des micro-coupes de 5 µm d'épaisseur ont été réalisées à l'aide d'un microtome (ThermoShardon) puis montées sur des lames SuperFrost Plus (Labo-Moderne, Paris, France). Après décongélation puis réhydratation, les coupes ont été colorées à l'éosine / hématoxyline puis montées sous lamelle. L'observation des coupes a été réalisée à l'aide d'un microscope (Nikon Eclipse).

## VII. Analyse statistique

Nous avons testé la normalité des résultats de cytométrie en flux et de RT-qPCR à l'aide du logiciel R (<http://www.r-project.org>) ce qui a permis l'utilisation de tests paramétriques. Ces données ont été analysées par un modèle d'ANOVA unique ( $Y_{ik} = \mu + \alpha_i + \beta X_{ijk} + \gamma_i X_{ik} + \varepsilon_{ik}$ ) avec Y la variable à expliquer,  $\mu$  la moyenne,  $X_{ik}$  est une variable explicative quantitative (ici le temps de prélèvement B1, B2, B3 ou B4), i représente le niveau du facteur, k représente l'indice de répétition et  $\varepsilon$  la résiduelle. Les résultats ont été considérés comme significatifs lorsque  $P < 0.05$ . Les tendances étaient considérées lorsque  $P < 0.1$ .

Les données de cytométrie en flux ont été rentrées dans un tableau de contingence qui a été utilisé pour la réalisation de l'analyse factorielle des correspondances (AFC).

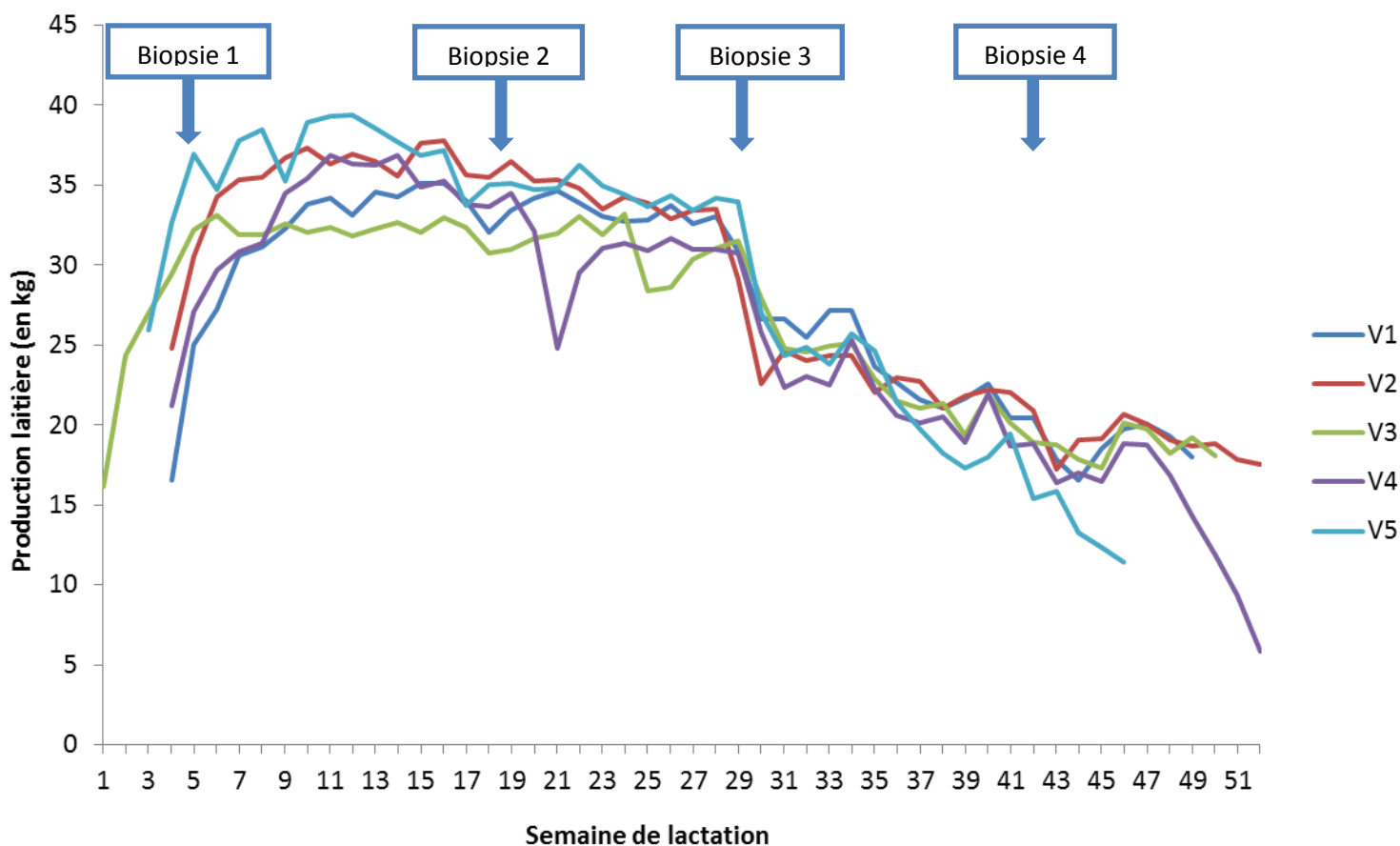


Figure 4 : Evolution au cours du temps de la production laitière des cinq vaches de l'expérience. Les dates de prélèvements des différentes biopsies sont indiquées.

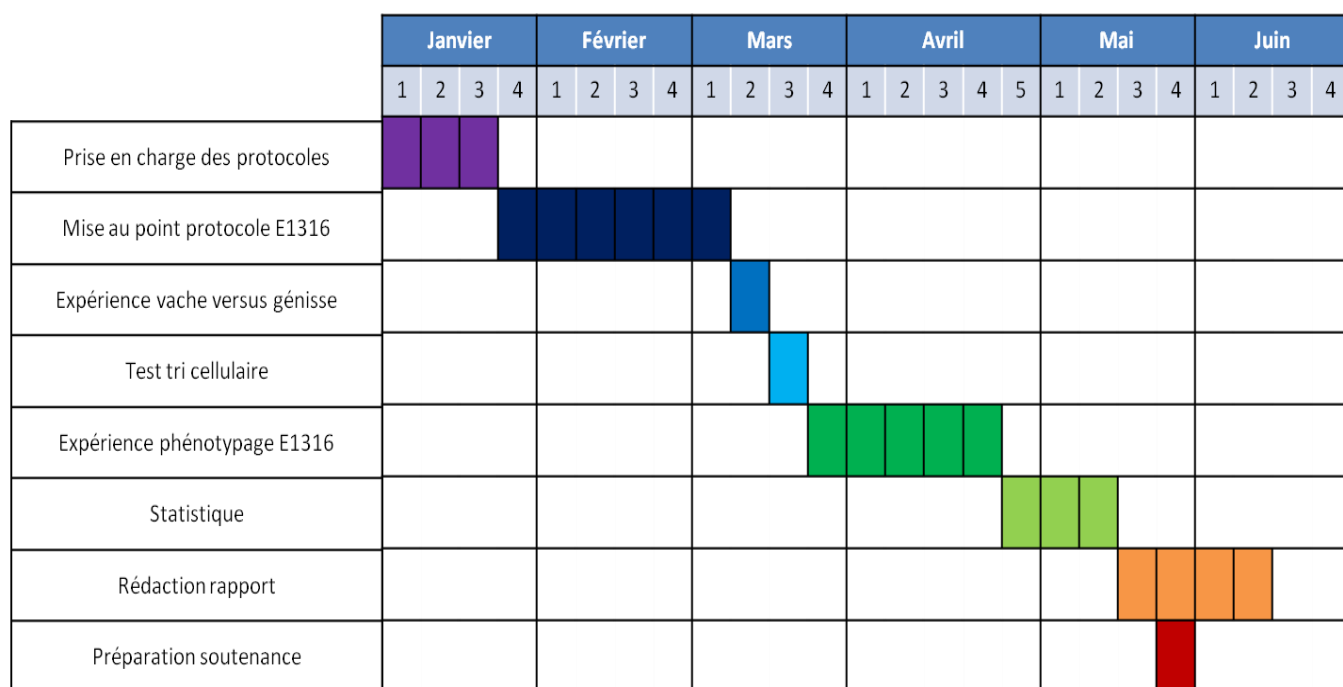


Figure 5 : Diagramme de Gantt des différentes phases de déroulement du stage.

## Résultats

### Préambule :

Deux expériences de phénotypage ont été réalisées. La première a été faite à partir d'explants de glandes mammaires prélevés par biopsies au niveau des quartiers arrières droit et gauche de cinq vaches primipares au cours de la lactation. La **Figure 4** représente les moments où ont été effectuées les biopsies tout au long de la lactation. Dans la suite de ce rapport, nous utiliserons les abréviations B1, B2, B3 et B4 pour se référer aux 4 moments de prélèvements par biopsie. La deuxième expérience a été réalisée à partir d'explants de glandes mammaires prélevés après euthanasie d'une génisse de 21 mois et d'une vache multipare en lactation. Pour ces deux expériences, immédiatement après les prélèvements, les explants de tissus ont été cryoconservés dans l'azote liquide (-196°C) en attendant d'être traités. Au cours de ce stage, une partie de ces explants ont été décongelés, digérés enzymatiquement puis filtrés de façon à obtenir une suspension de cellules individualisées. Une partie des cellules ainsi obtenues a été mise en culture, l'autre partie a été marquée avec un panel de quatre anticorps (EpCAM, CD49f, CD24 et CD10) et phénotypée par cytométrie en flux. D'autre part, une partie des explants de tissus issue des biopsies a été broyée (avant ce stage) de façon à extraire l'ARN qui a permis par RT-qPCR de mesurer l'expression de cinq gènes d'intérêts (KRT14, KRT18, KRT19, CDH1 et FABP3). Enfin, une partie des explants issus de la génisse et de la vache a été fixée dans du paraformaldéhyde (PAF) puis congelée à -80°C dans un cryoconservateur avant d'être coupée et déposée sur lame. Un marquage éosine / hématoxyline a été réalisé pour permettre l'analyse morphologique des glandes mammaires. La **Figure 5** représente les différentes phases de déroulement de ces expériences au cours du stage.

Dans un premier temps, nous avons analysé les résultats issus des biopsies de la première expérience. Après avoir tracé les courbes de lactation des cinq vaches, nous avons analysé l'évolution des marqueurs en cytométrie et l'expression des gènes sur l'ensemble de la lactation. Dans un deuxième temps nous nous sommes intéressés aux données de chacune des biopsies prises individuellement et nous avons confronté les données de chaque biopsie à la production laitière correspondant au même temps de prélèvement. Enfin, nous avons analysé la deuxième expérience correspondant à la comparaison des populations mammaires entre la génisse et la vache en lactation. Nous avons d'abord comparé les résultats structuraux issus des lames histologiques puis nous avons comparé les résultats de la cytométrie en flux.

CA factor map

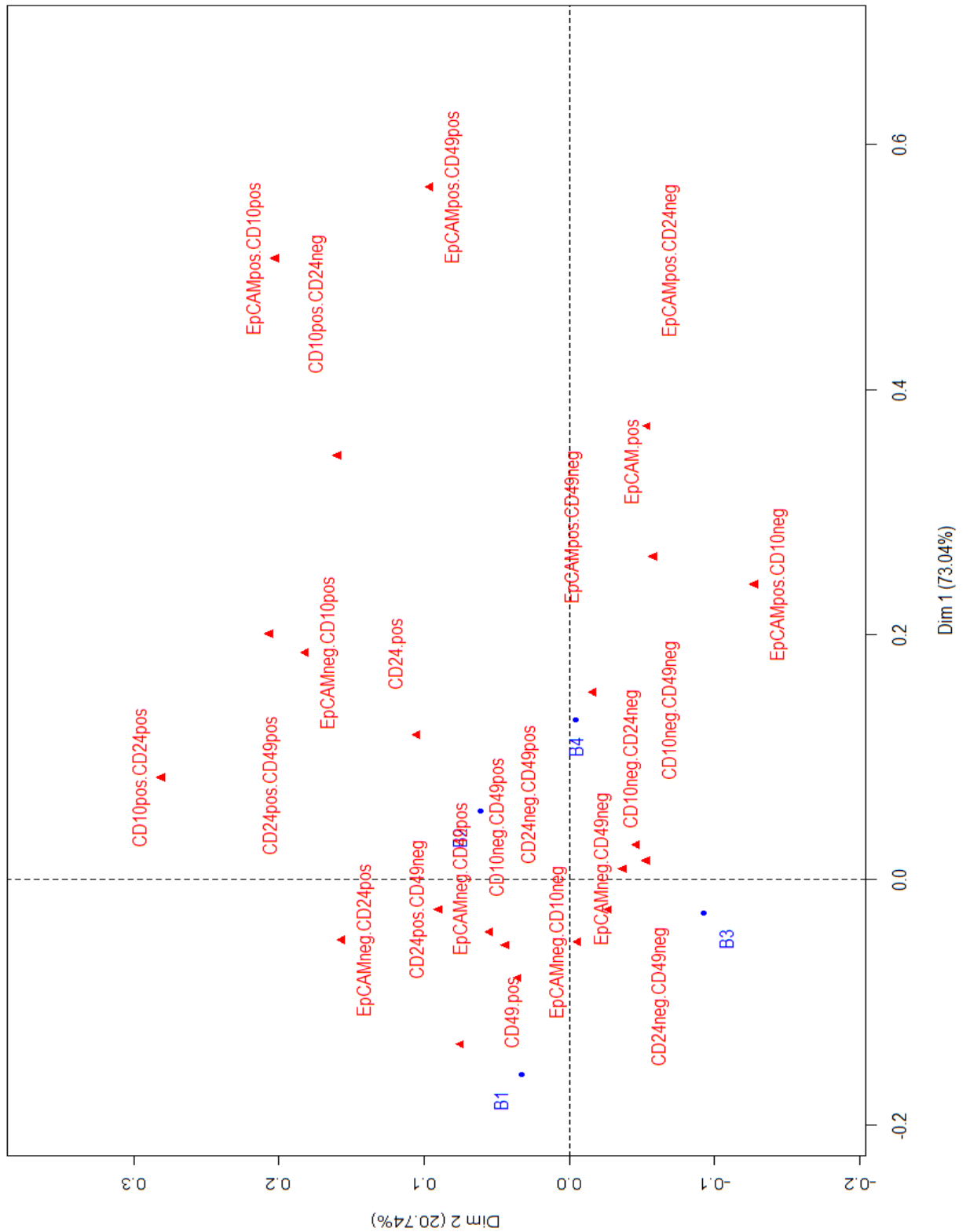


Figure 6 : Sortie du logiciel R de l'analyse factorielle des correspondances. Chaque point représente une variable (en rouge) ou un temps de prélèvement (en bleu).

## I. Phénotypage des cellules épithéliales et myoépithéliales mammaires chez la vache laitière au cours de la lactation

Dans cette partie nous nous sommes intéressés aux résultats issus de la première expérience qui correspond aux prélèvements de biopsies réalisés à différents temps au cours de la lactation chez cinq vaches primipares.

### A. Données zootechniques

Tout d'abord, nous avons analysé les courbes de production laitière de chacune de ces vaches (**Figure 4**). Les quatre temps de prélèvements B1, B2, B3 et B4 sont positionnés à la date où ils ont été effectués. Pour les cinq vaches, nous observons une courbe de production classique avec une augmentation de la production dans les premières semaines suivant le vêlage suivi d'une diminution progressive de cette production jusqu'au tarissement. La chute brutale de la production laitière observée juste après la troisième biopsie est expliquée par le changement d'alimentation des vaches. En effet, à cette période les vaches sont mises à l'herbe et le concentré cesse d'être distribué. Par ailleurs, la courbe de lactation de la vache V4 nous montre que cette vache a déclaré une mammite entre la deuxième et la troisième biopsie.

### B. Analyse globale des différentes variables mesurées

L'analyse des données de phénotypage nous a permis de générer 1120 données représentant les proportions des différentes populations cellulaires monomarquées et doublement marquées. Dans un premier temps, nous avons donc cherché à représenter visuellement ces différentes variables avec les différents temps de prélèvements (B1, B2, B3, B4) en utilisant une analyse factorielle des correspondances (AFC). La **Figure 6** correspond à la sortie du logiciel de statistique où n'ont été représentées que les vingt premières variables expliquant cette répartition de façon à rendre le graphique plus lisible. Sur cette figure, chaque variable est représentée par un point. Plus deux variables sont proches et plus elles ont des caractéristiques communes : proportion de cellules similaire, présence de ces variables sur les mêmes temps de biopsie... De cette manière, nous avons discriminé les populations de cellules situées sous l'axe horizontal qui ont comme profil commun de ne pas exprimer le marqueur CD49f (CD49f<sup>-</sup>). De la même manière, les populations situées à droite de l'axe vertical expriment majoritairement EpCAM (EpCAM<sup>+</sup>). Cette représentation nous a permis de mettre en évidence quelques liens statistiques entre les variables, c'est-à-dire entre les différentes populations de cellules et les quatre biopsies. La première biopsie B1, correspondant au début de lactation, est relativement proche de la population de cellules CD49f<sup>+</sup> qui caractérise la population de cellules épithéliales. Les deuxième et troisième biopsies montrent une grande dispersion avec les



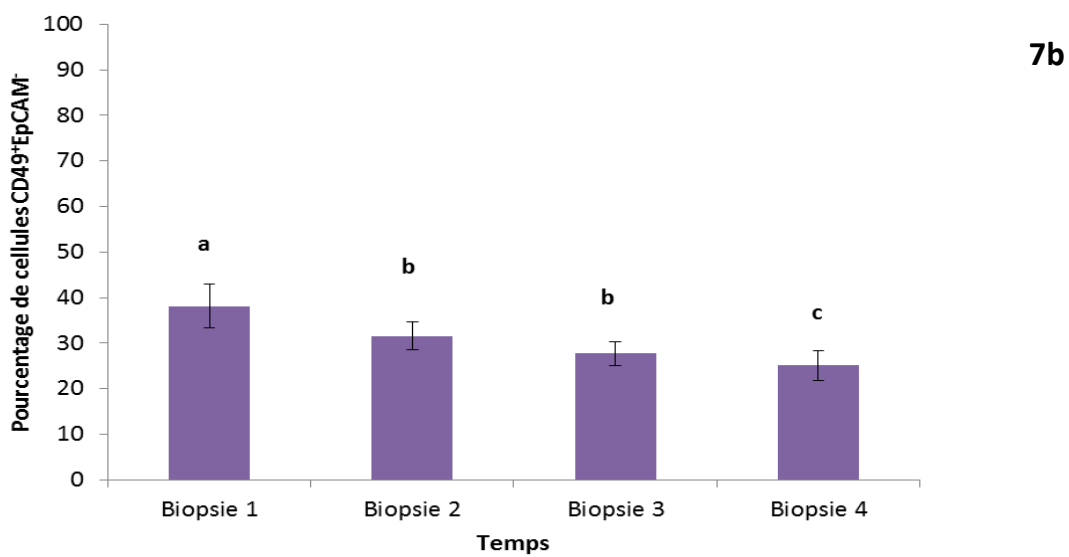
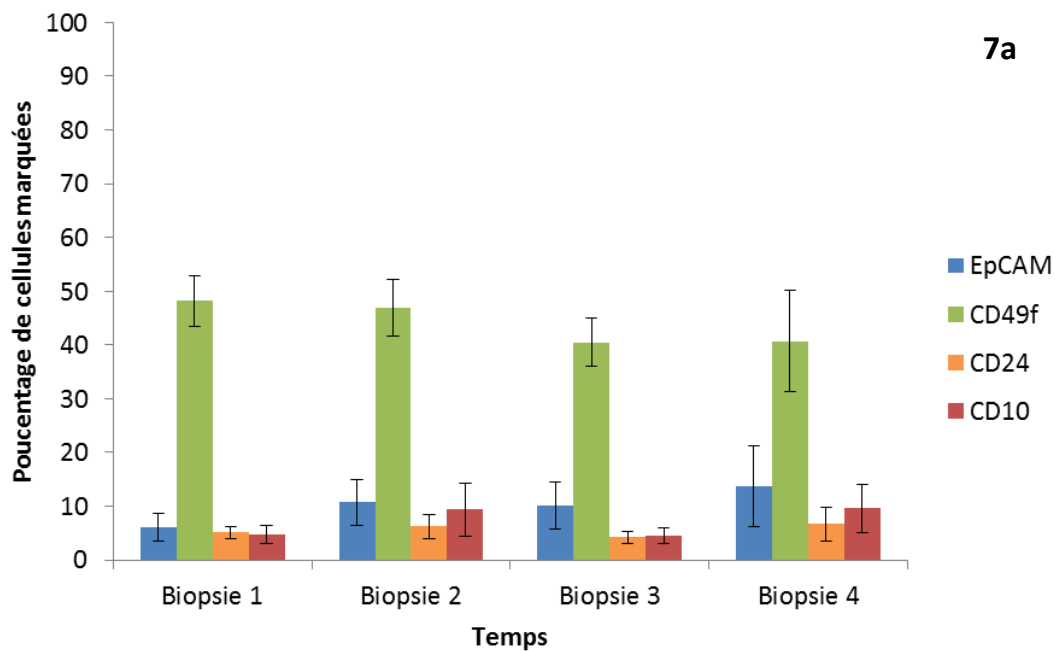


Figure 7 : Evolution des populations EpCAM<sup>+</sup>, CD49f<sup>+</sup>, CD24<sup>+</sup>, CD10<sup>+</sup> (a) et CD49f<sup>+</sup>EpCAM<sup>-</sup> (b) au cours des différents prélèvements (B1, B2, B3 et B4).

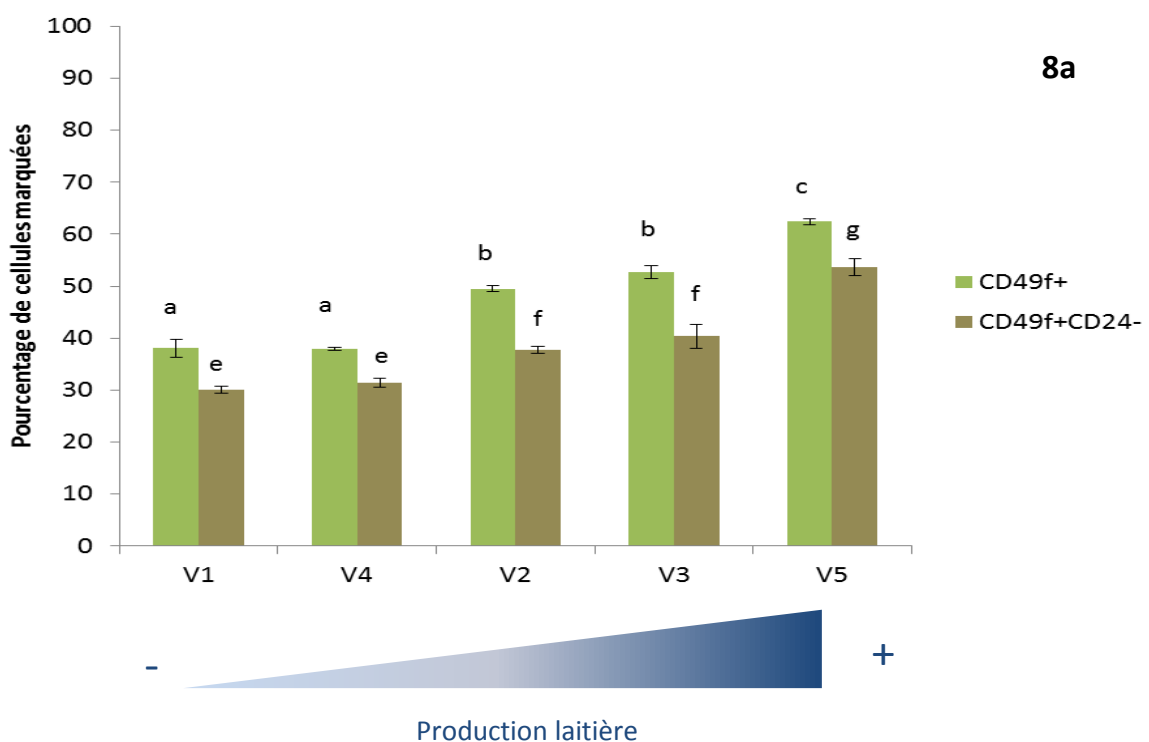


Figure 8a : Evolution des populations de cellules CD49f<sup>+</sup>, CD49f<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> en fonction de la production laitière.

différentes populations de cellules qui les entourent. Ce résultat indique que les populations de cellules identifiées par les marqueurs utilisés lors de nos expériences sont peu présentes à ces deux temps de prélèvements. Enfin, la biopsie 4, qui correspond à la fin de la lactation, est proche de la population de cellules marquées EpCAM<sup>+</sup>CD49f.

### C. Evolution des populations cellulaires au cours de la lactation

#### 1. Analyse des populations monomarquées

Dans un premier temps, nous avons cherché à savoir si les populations monomarquées EpCAM<sup>+</sup>, CD49f<sup>+</sup>, CD24<sup>+</sup> et CD10<sup>+</sup> variaient significativement au cours du temps. La **Figure 7a** représente les variations de ces populations au cours de la lactation. De manière intéressante, parmi les 4 marqueurs choisis, il n'y a aucune modification significative de leur expression au cours du temps lorsqu'ils sont analysés séparément.

#### 2. Analyse des populations doublement marquées

Afin d'affiner le phénotypage des populations cellulaires présentes nous avons analysé l'ensemble des populations doublement marquées avec notre panel de 4 marqueurs soit un total de 24 populations. De la même façon que pour les monomarquées, pour 23 de ces populations nous n'avons pas observé de variations significatives au cours des différents temps de prélèvements (B1, B2, B3 et B4). La **Figure 7b** nous présente le résultat de la population CD49f<sup>+</sup>EpCAM<sup>-</sup>. Cette population diminue progressivement entre les quatre biopsies. La diminution est plus forte entre la B1 et la B2 d'une part et entre la B3 et la B4 d'autre part. La diminution entre la B2 et B3 n'est quant à elle pas significative.

### D. Evolution des populations cellulaires à des moments précis (B1, B2, B3 ou B4)

Après avoir analysé nos résultats de manière temporelle, nous avons cherché à étudier s'il existait des corrélations entre la production laitière à un moment précis de la lactation et une/des populations cellulaires. Dans cet objectif, nous avons moyenné les productions laitières sur les 8 jours précédant chaque biopsie que nous avons confrontées aux données de phénotypage.

#### 1. Les populations de cellules avant le pic de lactation (B1) sont de type épithélial

Sur l'ensemble des données obtenues par cytométrie en flux et RT-qPCR, nous n'observons pas de variations significatives de ces données par rapport à la production laitière des vaches au moment de la biopsie 1 mis à part pour les marqueurs présentés ci-dessous.

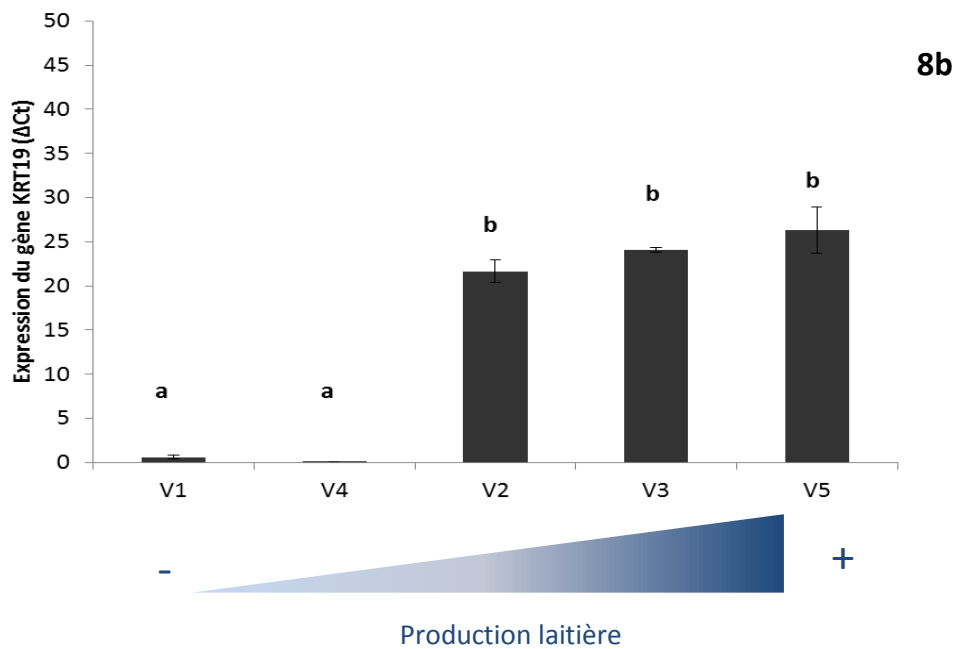


Figure 8b : Evolution de l'expression du gène KRT19 en fonction de la production laitière en B1.

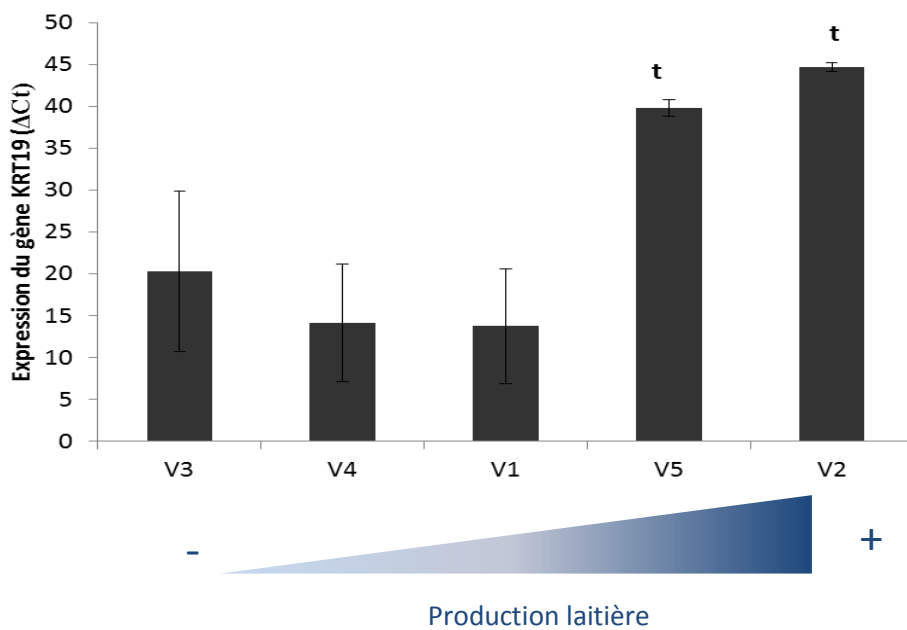


Figure 9 : Evolution de l'expression du gène KRT19 en fonction de la production laitière en B3.

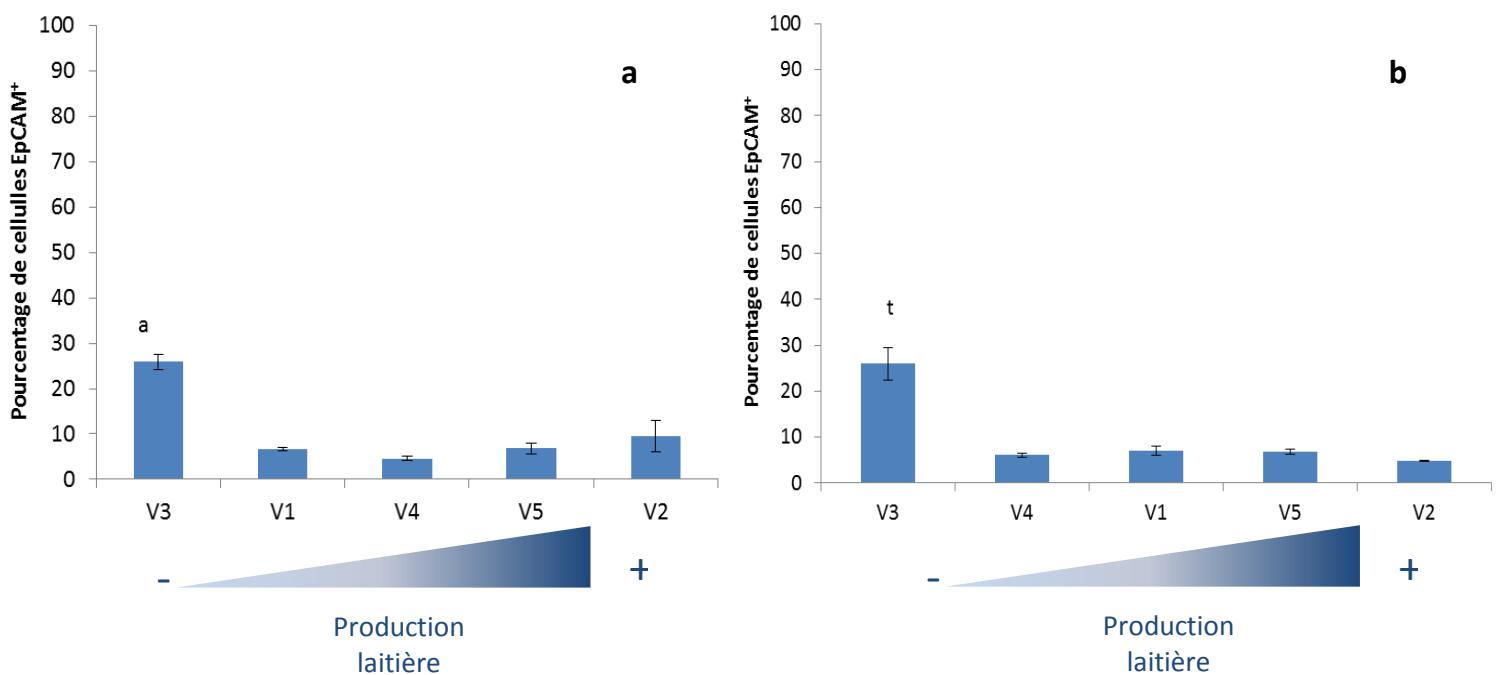


Figure 10 : Evolution de la population EpCAM<sup>+</sup> en fonction de la production laitière en B2 (a) et en B3 (b).

La **Figure 8a (page précédente)** représente l'évolution des populations CD49f<sup>+</sup> et CD49f<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> en fonction de la production laitière au moment de la biopsie 1. En abscisse, les vaches ont été classées de manière croissante en fonction de leur niveau de production de lait. Cette représentation nous a permis de mettre en évidence une différence significative de la proportion de cellules marquées CD49f entre les vaches (idem pour la population CD49f<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup>). En effet, nous avons constaté que ces deux populations augmentaient progressivement lorsque la production laitière devenait plus élevée. Nous avons choisi la même représentation (**Figure 8b**) pour exprimer les résultats de l'expression du gène de la cytokératine 19 (KRT19). Nous avons fait le même constat que pour les deux populations identifiées précédemment, à savoir que l'expression du gène KRT19 augmentait significativement avec la production laitière. Cependant, à la différence des deux populations présentées ci-dessus dont la croissance était progressive avec la production laitière, l'expression du gène KRT19 permet de différencier deux groupes distincts. Le premier groupe composé des vaches V1 et V4 correspond aux productions laitières les plus faibles et exprime peu le gène KRT19 ( $\Delta Ct < 5$ ). À l'inverse, le deuxième groupe où se trouvent les vaches V2, V3 et V5, qui ont les productions laitières les plus élevées, exprime fortement le gène KRT19.

En résumé, la population CD49f<sup>+</sup> et le gène KRT19 semblent être de bons marqueurs des cellules de type épithélial et pourraient expliquer les différences de production laitière en début de lactation.

## *2. Et pour les autres biopsies ?*

Nous avons procédé de la même manière pour les trois autres biopsies c'est-à-dire en confrontant les données issues de la cytométrie en flux et de la RT-qPCR avec la production laitière à chacune des biopsies 2, 3 et 4.

Pour 23 des 24 populations de cellules et 4 des 5 gènes dont nous avons regardé les variations en fonction de la production laitière, nous n'avons pas trouvé de variations significatives. La **Figure 9** montre les résultats d'expression du gène KRT19 au moment de la biopsie 3. Les résultats sont similaires à ceux obtenus pour le même gène en B1 avec une plus faible différence : là où les résultats étaient significatifs au moment de la biopsie 1 (**Figure 8b**), nous n'observons plus qu'une tendance.

L'analyse statistique de nos résultats, nous a également permis de mettre en évidence que la glande mammaire de la vache V3, dont la production laitière était la plus faible en B2 et en B3 (**Figure 10a et b respectivement**), possédait plus de cellules EpCAM<sup>+</sup>. Ce résultat suggère qu'il existerait un lien entre le niveau de production en milieu de lactation et le marqueur EpCAM.

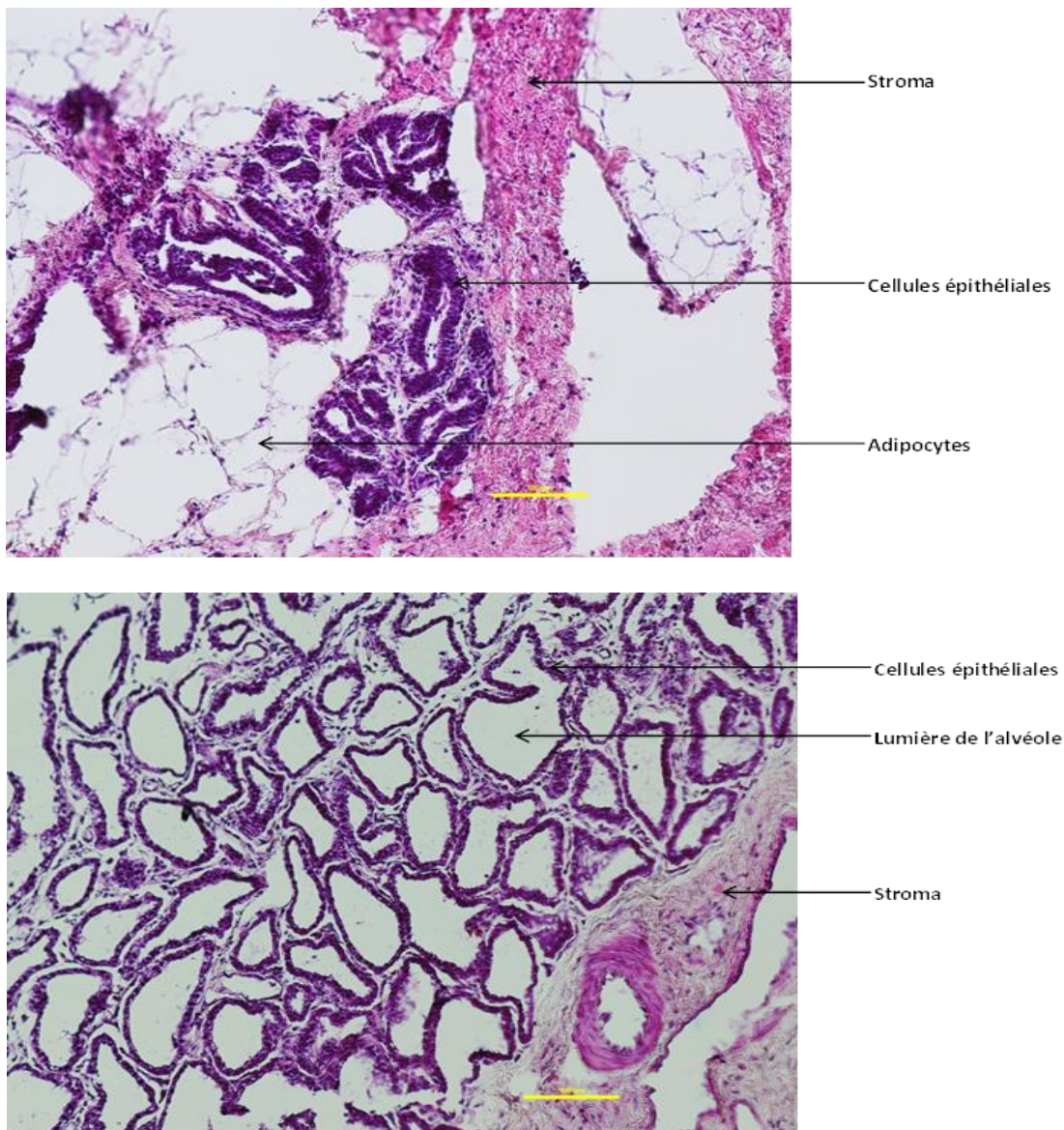


Figure 11 : Coupes histologiques de tissus de glande mammaire de génisse (a) et de vache en lactation (b). Marquage éosine / hématoxyline (St Gilles, S. Wiart, 07/05/2015).

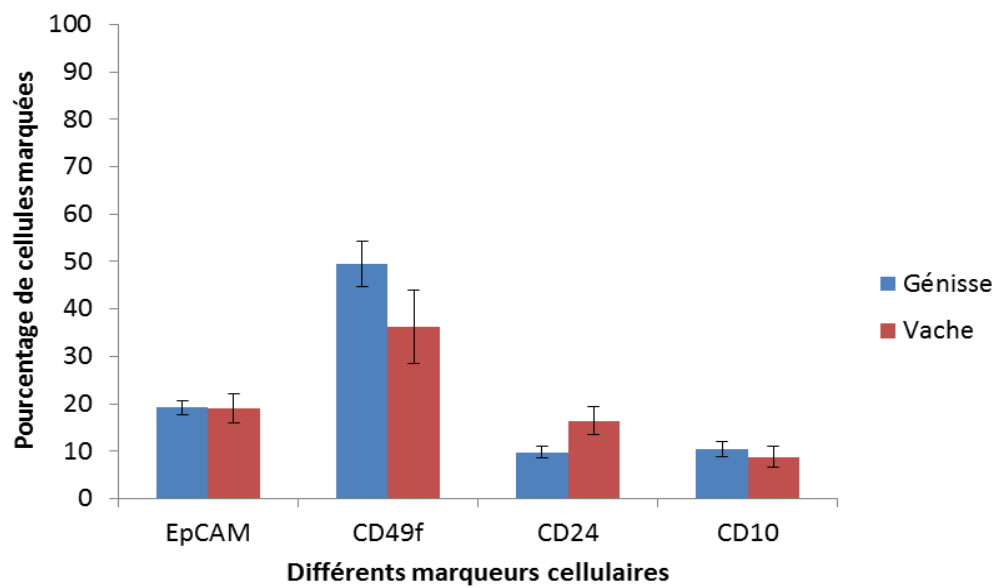


Figure 12 : Comparaison des populations de cellules monomarquées chez la génisse et la vache en lactation.

## II. Analyse des populations cellulaires de la glande mammaire à des stades physiologiques différents : puberté vs. lactation

Au cours de ce stage, nous avons également cherché à mettre en évidence des différences phénotypiques au niveau de la glande mammaire entre une génisse pubère (donc non lactante) et une vache multipare en milieu de lactation. Les résultats obtenus correspondent à la deuxième expérience où des explants de glande mammaire à ces deux stades physiologiques ont été d'une part analysés en histologie (marquage éosine / hématoxyline) pour observer les structures cellulaires de la glande mammaire et d'autre part phénotypés par cytométrie en flux.

### A. Des différences au niveau structural

Avant de phénotyper finement les cellules de la glande mammaire chez ces deux animaux, nous avons cherché à savoir si les glandes mammaires présentaient des structures tissulaires différentes. Les **Figure 11a et b** représentent des coupes histologiques de tissus mammaires issues d'une génisse (21 mois) et d'une vache en lactation (3 ans) respectivement. Nous avons ainsi constaté que le tissu mammaire de génisse présentait quelques alvéoles peu développées entourées par des adipocytes et du stroma (**Figure 11a**). Le tissu de vache quant à lui est essentiellement composé d'alvéoles mammaires différenciées (**Figure 11b**). Le tissu adipeux a disparu et le stroma occupe une proportion moins importante que chez la génisse. Ainsi, nous avons bien observé que ces deux animaux avaient des glandes mammaires très contrastées à la fois au niveau de leur structure mais aussi au niveau de leur état de différenciation.

### B. Les populations cellulaires de la glande mammaire sont stables entre les stades physiologiques

Le phénotypage par cytométrie en flux des explants issus des glandes mammaires des deux animaux nous ont permis d'obtenir les données relatives aux quatre populations monomarquées (EpCAM<sup>+</sup>, CD49f<sup>+</sup>, CD24<sup>+</sup> et CD10<sup>+</sup>) ainsi que celles relatives aux 24 populations doublement marquées. L'analyse statistique a permis la comparaison des deux stades physiologiques pour chacune de ces populations. La **Figure 12** nous présente les résultats obtenus pour les populations monomarquées. Entre les deux stades, pubère non lactant versus lactant, les populations de cellules monomarquées ne présentent pas de variations significatives. En effet, les deux animaux (génisse et vache en lactation) possèdent tous les deux environ 20% de cellules EpCAM<sup>+</sup>, 40-50% de cellules CD49f<sup>+</sup>, 10-20% de CD24<sup>+</sup> et 10% de CD10<sup>+</sup>. De même, l'analyse des populations doublement marquées en fonction du stade physiologique ne montre pas de variations de ces populations. Ainsi,



les données issues du phénotypage cellulaire par cytométrie en flux ne permettent pas de retrouver les différences observées lors de l'observation des coupes histologiques.





## Discussion

Nous avons cherché au cours ce stage à caractériser les différentes populations de cellules épithéliales et myoépithéliales mammaires à différents stades physiologiques (génisse / vache en lactation) chez la vache laitière ainsi qu'au cours de la lactation. Globalement, les résultats que nous avons obtenus révèlent que la majorité des populations caractérisées par notre panel d'anticorps et nos gènes reste constante dans le temps que ce soit au cours de la lactation ou entre deux stades physiologiques contrastés. Certaines populations de cellules ou certains gènes présentent néanmoins des variations. Ainsi, la population  $CD49f^+EpCAM^-$  diminue significativement au cours de la lactation (**Figure 7b**). De même, les populations  $CD49f^+$  et  $CD49f^+CD24^-$  (**Figure 8a**) augmentent avec la production laitière en début de lactation (B1). Au niveau de l'expression des gènes, le gène KRT19 augmente également avec la production laitière au temps de prélèvements B1 et B3 (**Figure 8b et 9**). Enfin, la vache V3 dont la production est la plus faible par rapport aux autres vaches en B2 et B3 possède une population de cellules  $EpCAM^+$  élevée (**Figure 10a et b**).

La glande mammaire est un organe composé de différentes populations de cellules ([Delouis et Richard 1991](#)) : les cellules épithéliales sécrétrices dont la fonction est la production de lait, les cellules myoépithéliales qui se contractent au moment de la traite pour éjecter le lait, les adipocytes servant de réserve pour les cellules épithéliales, les fibroblastes dont la fonction principale est le soutien des différentes cellules et enfin les cellules endothéliales dont l'organisation en vaisseaux permet l'irrigation de la glande mammaire et donc l'apport de nutriments nécessaire à la synthèse du lait. De plus, [Ellis et Capuco \(2002\)](#) ont montré l'existence chez la vache laitière de cellules souches mammaires c'est-à-dire des cellules capables de se différencier en n'importe quel type cellulaire. Les cellules souches mammaires avaient déjà été mises en évidence chez la souris ([DeOme et al. 1959](#)) ce qui avait conduit à la découverte d'une hiérarchie entre les différentes cellules : une cellule souche murine donne une cellule progénitrice, cellule déjà engagée dans une voie de différenciation mais gardant des capacités de prolifération importantes, qui se sépare en deux lignées. La première lignée donne des cellules progénitrices des myoépithéliales et la deuxième est à l'origine des cellules progénitrices donnant les cellules épithéliales des canaux (ductales/basales) ou des alvéoles (luminales) ([Capuco et al. 2012](#)). Sur la base de ces travaux murins, différentes équipes ont cherché à savoir s'il existait une telle hiérarchie dans la glande mammaire bovine. [Rauner et Barash \(2012\)](#) sont les premiers à avoir publiés les résultats d'un phénotypage de cellules mammaires bovines par la technique de la cytométrie en flux. Ils ont ainsi discriminé différentes populations de cellules (souches, progénitrices et épithéliales sécrétrices) sur la base d'un double marquage CD49f et CD24. [Ghebeh et al. \(2013\)](#) ont quant à eux utilisé chez l'humain un double marquage avec CD49 et EpCAM ce qui leur a permis d'établir que les cellules exprimant EpCAM à leur surface étaient des cellules



épithéliales de type sécrétrice. Moins récemment, d'autres approches ont été utilisées pour caractériser les cellules épithéliales sécrétrices notamment *via* l'expression de protéines et de gènes du cytosquelette (cytokératines), respectivement par western blot et par RT-qPCR. Elles permettent d'identifier les cellules épithéliales sécrétrices ainsi que de les différencier des cellules myoépithéliales. Ainsi, les cellules épithéliales luminales possèdent une expression de cytokératine (CK) 18 forte et une expression de CK14 faible (CK18<sup>+</sup>CK14<sup>-</sup>). A l'inverse, les cellules myoépithéliales sont plutôt de phénotype cellulaire CK18<sup>-</sup>CK14<sup>+</sup> (Borena *et al.* 2013 ; Sharma et Jeong 2013). En ce qui concerne les cellules myoépithéliales, elles peuvent être caractérisées par cytométrie en flux sur la base d'un de leur marqueur de surface : CD10 (Safayi *et al.* 2012). Pour les autres types cellulaires que sont les adipocytes, les fibroblastes et les endothéliales il existe peu de marqueurs permettant de caractériser ces populations chez le bovin. Les marqueurs existants sont essentiellement répertoriés chez l'humain (Yang *et al.* 2014 ; Sarrio *et al.* 2012) et ne croisent actuellement pas avec les outils utilisés en bovin. Différentes techniques peuvent être employées pour réaliser un phénotypage : le western blot qui révèle l'expression des protéines, la RT-qPCR pour l'expression des gènes, la cytométrie en flux pour un phénotypage cellulaire et l'histologie pour la structure des tissus et le marquage immunohistochimique. La technique de la cytométrie en flux présente l'avantage d'utiliser des marqueurs situés à la surface des cellules ce qui permet l'utilisation combinée de plusieurs marqueurs et de mettre ainsi en évidence des populations plus rares.

Les résultats que nous avons obtenus au cours de ce stage ont mis en évidence des variations au niveau de certaines populations de cellules ainsi qu'au niveau de l'expression d'un gène en particulier. En effet, au cours de la lactation, la population CD49f<sup>+</sup>EpCAM<sup>-</sup> diminue significativement entre les différents temps de prélèvements (B1, B2, B3 et B4). Cette population a été caractérisée comme possédant des capacités régénératives et d'auto-renouveaulement au sein de la glande mammaire chez la femme. En effet, l'implantation dans le coussin graisseux mammaire de ces cellules humaines CD49f<sup>+</sup>EpCAM<sup>-</sup> chez une souris dont la glande mammaire a préalablement été enlevée, conduit à la formation d'une nouvelle glande mammaire complète et fonctionnelle d'origine humaine (Eirew *et al.* 2008, Visvader 2009). Ainsi, nous pouvons formuler l'hypothèse que cette population de cellules bovines permettrait le renouvellement des cellules notamment des cellules épithéliales sécrétrices au cours de la lactation et que la diminution de cette population expliquerait en partie la diminution progressive de la production laitière. Pour pouvoir confirmer cette hypothèse, il faudrait isoler cette population par tri cellulaire et la caractériser par des expériences complémentaires de façon à mettre en évidence ses capacités régénératives. Un test de transplantation de cellules souches bovines dans une souris vierge à l'image de ce qui a été fait chez



homme a récemment été tenté. Les glandes mammaires de ces deux animaux ne possédant pas la même structure stromale, la transplantation n'aboutit pas à la formation d'une glande mammaire d'origine bovine chez la souris (Osinska *et al.* 2014 ; Rowson et Aimò 2010).

L'analyse des résultats issus des biopsies comparée à la production laitière à chacun de ces temps nous montre une plus grande variabilité en début de lactation c'est-à-dire en B1. Plus précisément, à ce temps de prélèvement, la population CD49f<sup>+</sup> et le gène KRT19 augmentent progressivement avec la production laitière. En effet, plus une vache a une production laitière élevée et plus sa population CD49f<sup>+</sup> ainsi que l'expression du gène KRT19 sont élevées. Ces deux marqueurs ont déjà été identifiés dans la littérature et sont utilisés comme marqueurs des cellules épithéliales (Shehata *et al.* 2012). De plus, Stefanon *et al.* (2002) ont montré par des tests d'activité, de prolifération et d'apoptose que le nombre et l'activité des cellules épithéliales sécrétrices variaient au cours de la lactation : l'augmentation de la production laitière en début de lactation est liée à une augmentation du nombre et de l'activité de ces cellules productrices de lait. Par la suite, la diminution progressive de la production de lait correspond à la baisse de cette population de cellules et de leur activité. Les résultats que nous avons obtenus vont également dans ce sens. En effet, les marqueurs épithéliaux CD49f<sup>+</sup> et le gène KRT19 nous ont permis de différencier en début de lactation les vaches moins productrices (V1 et V4) des vaches les plus productrices (V2, V3 et V5). Une analyse plus poussée de la population CD49f<sup>+</sup> nous permettrait d'affiner ces résultats. En effet, les données de cytométrie en flux relatives à cette population nous permettent de différencier les cellules épithéliales luminales (i.e. sécrétrices) des cellules épithéliales basales, constitutives des canaux. La confrontation de ces deux populations CD49f<sup>+</sup> luminales et basales avec les données de production laitière de la B1 nous permettrait de déterminer plus précisément laquelle de ces deux populations influence la production laitière en début de lactation.

Nos résultats nous ont par ailleurs permis d'identifier le cas particulier de la vache V3 au temps de prélèvement B2 et B3 dont la population EpCAM<sup>+</sup> est nettement supérieure aux autres vaches. EpCAM est une molécule qui sert à l'adhésion entre cellules et est référencée dans la littérature humaine (Oakes *et al.* 2014) comme caractéristique des cellules épithéliales sécrétrices. Nous avons analysé la courbe de lactation de cette vache par rapport aux autres vaches et de manière intéressante nous avons constaté que d'une part sa production de lait était plus faible et que d'autre part, cette vache semblait avoir une meilleure persistance sur la période entre B2 et B3 (75% de la production produite au pic pour la vache V3 contre une moyenne de 61% (+3.2%) pour les autres vaches entre B2 et B3). Cependant, les courbes de lactation présentent une chute de la production juste après la B3 due à la mise à l'herbe et à l'arrêt des concentrés dans l'alimentation ce qui n'a pas permis de calculer la persistance de chaque vache sur la totalité de la lactation. Ainsi, il existerait un lien entre une meilleure persistance de la lactation et le nombre de cellules EpCAM<sup>+</sup>. Mais cette



hypothèse doit être vérifiée sur un plus grand nombre d'individu dont les courbes de lactation ne présentent pas de décrochage. Il pourrait être envisagé de phénotyper plus particulièrement cette population EpCAM<sup>+</sup> en utilisant des vaches présentant des persistances différentes : persistance élevée versus persistance faible.

Nous avons posé comme hypothèse en amont de ces expériences que les différentes populations qui composent la glande mammaire bovine évoluaient au cours du temps. De façon générale, les résultats issus de nos deux expériences c'est-à-dire au cours de la lactation et entre deux stades physiologiques contrastés (génisse / vache en lactation) montre que les populations de cellules qui peuplent la glande mammaire restent constantes entre ces deux états physiologiques et au cours d'un cycle de lactation. Quelque soit l'espèce, nous n'avons pas dans la bibliographie d'étude dynamique de la glande mammaire au cours de la lactation ou entre plusieurs stades physiologiques. Cependant, plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ces résultats. Tout d'abord, le phénotypage de la glande mammaire doit être complété par d'autres techniques de façon à affiner les résultats présentés ci-dessus. En effet, l'expression des protéines mesurée par western blot permettrait de confirmer les résultats de cytométrie en flux et de RT-qPCR. De même, un tri cellulaire spécifique sur les différents marqueurs déjà utilisés permettrait d'isoler les populations présentant des variations dans les résultats ci-dessus de façon à préciser leur phénotype et à caractériser leur capacité de différenciation/transdifférenciation. Leur isolement permettrait notamment d'effectuer des tests de formation de mammosphères *in vitro* ainsi que tester d'autres marqueurs que ceux utilisés dans les précédentes expériences.

Deuxièmement, cette stabilité phénotypique des populations mammaires pourrait finalement être la conséquence d'une maturation cellulaire qui aurait eu lieu au moment de la puberté, lorsque la glande se développe. Dans cette période pré-pubère, il a notamment été montré que toutes modifications hormonales ou alimentaires, entraînaient des conséquences irrémédiables sur le potentiel de sécrétion du tissu (Capuco *et al.* 2012 ; Rowson *et al.* 2012 ; Bussard *et Smith*, 2011). Nos résultats suggéreraient ainsi que le phénotype des cellules est établi après la puberté et que les proportions des différentes populations (sur la base des marqueurs que nous avons étudiés) ne varient pas ou peu. Pour pouvoir tester cette hypothèse, il faudra donc s'intéresser à la génisse de 7 mois qui correspond à la période où l'animal termine sa puberté. La comparaison entre vache et génisse a déjà été faite au cours de ce stage, cependant la génisse était âgée de 21 mois et donc sa glande mammaire était déjà développée et l'animal cyclé.

Les faibles variations phénotypiques que nous avons observées pourraient également être liées à un problème méthodologique. En effet, au cours de nos expériences, nous avons mis en évidence que la glande mammaire était un organe relativement hétérogène. Ainsi, le phénotypage d'échantillons issus du même quartier de glande mammaire mais pris à des endroits différents ne relève pas





exactement les mêmes proportions entre les populations de cellules (données de laboratoire). Les biopsies effectuées dans le cadre de notre expérience représentent une petite quantité de tissus (60 mg) comparée aux 40 kg d'une glande mammaire en lactation. Nous pouvons donc nous poser la question de la représentativité de nos échantillons par rapport à l'ensemble de la glande mammaire. En effet, contrairement à la souris où l'intégralité de la glande mammaire peut être prélevée, chez la vache nous sommes contraints de faire nos études sur une faible proportion de l'organe. Pour pouvoir vérifier les résultats que nous avons obtenus c'est-à-dire la stabilité ou non des différentes populations, nous avons planifié de purifier les différentes populations de cellules de chacun des temps de biopsie par tri cellulaire et soumettre ces populations purifiées aux sérums extraits du sang à chacun de ces stades (B1, B2, B3 et B4). De cette façon, si une population de cellules purifiée provenant de la première biopsie (B1) se différencie sous l'action du sérum prélevé en B2, B3 et/ou B4, cela impliquerait que le stade physiologique influence la composition de la glande mammaire. Un tel test nous permettrait donc de valider ou non les résultats que nous avons obtenus au cours des deux expériences que nous avons réalisées.

Enfin, la dernière hypothèse que nous pouvons avancer et qui permettrait d'expliquer pourquoi les populations que nous avons marquées sont stables au cours de la lactation est que dans les différentes expériences réalisées les marqueurs utilisés sont surtout des marqueurs des cellules épithéliales et myoépithéliales. Or lorsque nous observons les coupes histologiques de tissus mammaires de génisse et de vache en lactation, nous observons une disparition des adipocytes et du stroma (composé en majorité de fibroblastes). Ainsi, les populations de cellules épithéliales et myoépithéliales seraient relativement constantes au cours de la lactation. En revanche, il est possible que les populations d'adipocytes et de fibroblastes varient pendant la lactation et que ces variations influencent les cellules épithéliales sécrétrices donc la production laitière. Très récemment, il a d'ailleurs été montré que le tissu adipeux était un réservoir de cellules souches ([Perruchot et al. 2013](#)). Dans des tissus comme le muscle, il est d'ailleurs connu que les adipocytes sont capables de se différencier en cellules musculaires au cours du développement. De fait, on peut aisément imaginer que dans la glande mammaire, le tissu adipeux jouerait le rôle de « réservoir » à cellules souches qui serait à la base de la plasticité mammaire au cours de ses différents cycles de développement. La prochaine étape du phénotypage de la glande mammaire serait donc de trouver des marqueurs des adipocytes pour pouvoir suivre leur évolution au cours du temps et les isoler afin d'évaluer leur capacité de différenciation en cellules épithéliales mammaires.



## Conclusion

L'objectif de ce stage était de pouvoir corrélérer un phénotype particulier à un stade physiologique particulier qu'il soit au moment de la lactation ou au moment de la vie de la vache. Nos résultats nous montre qu'une population  $CD49f^+EpCAM^-$  possédant des capacités de renouvellement diminue au cours de lactation ce qui laisse supposer que cette population joue un rôle dans le renouvellement de la glande mammaire pendant la lactation. Les autres variations observées sont surtout situées en début de lactation et concernent des cellules identifiées par des marqueurs de type épithélial ( $CD49f$  et  $KRT19$ ). Enfin, la vache V3 possédant une population de cellules  $EpCAM^+$  et une production de lait plus faible que les autres vaches nous amène à nous poser la question du lien entre ces cellules  $EpCAM^+$  et la persistance de lactation. Cependant, les résultats de ces deux expériences nous montrent que la majorité des populations caractérisées par nos marqueurs restent constante au cours du temps.



## Bibliographie

- Borena BM, Bussche L, Burvenich C, Duchateau L, Van de Walle GR** 2013. Mammary stem cell research in veterinary science : an update. *Stem cells and development* 22(12), 1743-1751.
- Bussard KM, Smith GH** 2011. The mammary gland microenvironnement directs progenitor cells fate in vivo. *International Journal of cell biology*, ID 451676.
- Capuco AV, Wood DL, Baldwin R, McLeod K and Paape MJ** 2001. Mammary cell number, proliferation, and apoptosis during bovine lactation: relation to milk production and effect of bST. *Journal of Dairy Science* 84, 2177-2187.
- Capuco av, Choudhary RK, Daniels KM, Li RW and Evoke-Clover CM** 2012. Bovine mammary stem cells: cell biology meets production agriculture. *Animal* 6:3, 382-393.
- Delouis C and Richard P** 1991. La Lactation. In: La reproduction chez les mammifères et l'homme. Ch. Thibault and M.C. Levasseur (Eds.). INRA. Paris. p. 487-514.
- DeOme KB, Faulkin LJ, Jr Bern HA and al.** 1959. Development of mammary tumors from hyperplastic alveolar nodules transplanted into gland-free mammary fat pads of female C3H mice. *Cancer research* 19, 515-520.
- Dessaugue F** 2013. Influence des secretions ovariennes sur le potential de production chez les ruminants laitiers. HDR.
- Eirew P, Stingl J, Raouf A, Turashvili V, Aparicio S, Emerman JT and Eaves CJ** 2008. A method to quantifying normal mammary epithelial stem cells with *in vivo* regenerative ability. *Nature Medicine* 14(12), 1384-1389.
- Ellis S and Capuco AV.** 2002. Cell proliferation in bovine mammary epithelium: identification of the primary proliferative cell population. *Tissue & Cell* 34, 155-163.
- Ghebeh H, Sleiman GM, Manogaran PS, Al-Marzou A, Barhoush E, Al-Mohanna FH, Tulbah A, Al-Faqeeh K and Adra CN** 2013. Profiling of normal and malignant breast tissue show CD44<sup>high</sup>/CD24<sup>low</sup> phenotype as a predominant stem/progenitor marker when used in combinaison with EpCAM/CD49f markers. *BMC Cancer* 13, 289.
- Oakes SR, Gallego-Ortega D and Ormandy CJ** 2014. The mammary cellular jierarchy and breast cancer. *Cellular an Molecular Life Sciences* 71, 4301-4324.
- Osińska E, Wicik Z, Godlewski MM, Pawlowski K, Majewska A, Mucha J, Gajewska M and Motyl A** 2014. Comparaison of stem/progenitor cell number and transcriptomic profile in the mammary tissue of dairy and beef breed heifers. *Animal genetics* 55, 383-395.
- Perruchot MH, Lefaucheur L, Barreau C, Casteilla L and Louveau I** 2013. Age-related changes in the features of porcine adult stem cells isolated from adipose tissue and skeletal muscle. *Americal Journal of Physiology* 305(7), 728-738.



**Rauner G and Barash I** 2012. Cell hierarchy and lineage commitment in the bovine mammary gland. Plos ONE 7(1), e30113.

**Rowson AR, Daniels KM, Ellis SE, Hovey RC** 2012. Growth and development of the mammary gland of livestock: a veritable barnyard of opportunities. Seminars in cell & Developmental biology 23, 557-599.

**Safayi S, Korn N, Bertram A, Akers RM, Capuco AV, Pratt SL and Ellis S** 2012. Myoepithelial cell differentiation markers in prepubertal bovine mammary gland: Effect of ovariectomy. Journal of Dairy Science 95, 2965- 2976.

**Sarrío D, Franklin CK, Mackay A, Reis-filho JS, Isacke CM** 2012. Epithelial and Mesenchymal Subpopulations Within Normal Basal Breast Cell Lines Exhibit Distinct Stem Cell/Progenitor Properties. Stem Cell 30, 292–303.

**Sharma N and Jeong DK** 2013. Stem cell research: A novel boulevard towards improved bovine mastitis management. International Journal of Biological Sciences 9, 818-829.

**Shehata M, Teschendorff A, Sharp G, Novcic N, Russell IA, Avril S, Prater M, Eirew P, Caldas C, Watson CJ and Stingl J** 2012. Phenotypic and functional characterization of the luminal cell hierarchy of the mammary gland. Breast Cancer Research 14, R134

**Stefanon B, Colitti M, Gabai G, Knight CH and Wilde CJ** 2002. Mammary apoptosis and lactation persistency in dairy animals. Journal of Dairy Research 69, 37-52.

**Visvader JE** 2009. Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis. Genes & development 23, 2563-2577.

**Yang Y, Xiong L, Wang R, Sun J, Hirche C** 2014. Adipose-derived stem cells from the breast. Journal of Research in Medical Sciences : The Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences 19(2), 112-116 .





Diplôme : Ingénieur agronome  
Spécialité : Production animale  
Spécialisation / option : Science de l'animal et de l'élevage de demain (SAED)  
Enseignant référent : Vanessa Lollivier, Lucile Montagne

Auteur(s) : Florence Dufreneix  
Date de naissance : 30/04/1991

Organisme d'accueil : INRA St Gilles  
Adresse : Domaine de la Prise  
35590 Saint Gilles

Nb pages : 20

Année de soutenance : 2015

Maître de stage : Frédéric Dessauge

Titre français : Caractérisation des cellules épithéliales mammaires chez la vache laitière

Titre anglais : Characterization of mammary epithelial cells of dairy cows

**Résumé:** La recherche sur la fonction de lactation et notamment sur le fonctionnement de la glande mammaire bovine est un outil indispensable pour inscrire la filière laitière dans la durabilité tout en lui permettant de faire face aux défis auxquels elle est confrontée comme l'arrêt des quotas laitiers ou la prise de conscience de l'impact environnemental de l'élevage bovin. La glande mammaire est en effet un organe dynamique composé de plusieurs populations de cellules qui contribuent à la production de lait : les cellules épithéliales souches, progénitrices et sécrétrices, les myoépithéliales, les fibroblastes, les adipocytes et les cellules endothéliales. Différents marqueurs tels que CD49f, CD24, CD10 et EpCAM ou le gène KRT19 permettent de phénotyper ces cellules par la technique de la cytométrie en flux et la RT-qPCR. Au cours de ce stage, nous avons utilisé ces différents marqueurs pour phénotyper les cellules épithéliales souches, progénitrices, sécrétrices et myoépithéliales au cours de la lactation d'une part et entre deux stades physiologiques contrastés (génisse / vache en lactation) d'autre part. Les résultats nous montrent que la majorité de ces populations restent stables au cours des échelles de temps étudiées. Pour les populations présentant des variations, elles concernent d'une part une population impliquée dans le renouvellement mammaire qui diminue au cours de la lactation et d'autre part des populations de type épithélial qui permettent d'expliquer les différences de production en début de lactation. Ces résultats nous ont amené sur de nouvelles hypothèses de travail parmi lesquelles les populations de cellules de la glande mammaire seraient fixées au cours du développement de cet organe ce qui nous amènerait à travailler sur la génisse de 7 mois et d'autre part que les adipocytes pourraient jouer un rôle de réservoir des cellules souches.

**Abstract:** Milking production is currently facing new challenges such as the end of the limit of annual milk's production in the European Union and the realization of the impact on the environment of cow's breeding. On the other hand, the industry has to produce more to answer the increase of dairy products. Thus the research on dairy cow and especially the bovine mammary gland is important. The mammary gland is a dynamic organ composed by different populations such as mammary stem cells, progenitor and differentiated cells, myoepithelial cells, adipocytes, fibroblasts and endothelial cells. All these population of cells contributed to milking production. Some surface cells markers such as CD49f, CD24, CD10 and EpCAM and the KRT49 gene are used to phenotype these cells. We used these makers to characterize the mammary stem progenitor and differentiated cells and myoepithelial cells during lactation and between two stages of development (heifer / lactating cow). We discovered that most of the populations stained were constant during our experiments. One population with regenerative properties decreased during lactation and the other variations concerned epithelial cell type at the beginning of lactation and were linked to the quantity of milk production. This stability among the cells could be due to the fixation of cell populations during the development of the mammary gland. To test this hypothesis, a work on a 7 month-old heifer must be done. On the other hand, the stem cells' reservoir could be situated in the adipocytes population. An extensive study of this population of cell should improve our understanding of the evolution of the mammary gland.

Mots-clés : phénotypage, cellules épithéliales mammaire, vache laitière, cytométrie en flux, RT-qPCR

Key Words: phenotyping, mammary epithelial cells, dairy cows, flow cytometry, RT-qPCR