



**HAL**  
open science

# Le turnover des cellules dans la glande mammaire évalué par immunohistochimie, comme indicateur de la production de lait

Sandra Wiart, Marion Boutinaud

## ► To cite this version:

Sandra Wiart, Marion Boutinaud. Le turnover des cellules dans la glande mammaire évalué par immunohistochimie, comme indicateur de la production de lait. XXVIème Congrès de l'Association Française d'Histotechnologie (AFH), Jun 2013, Rennes, France. hal-01210607

**HAL Id: hal-01210607**

**<https://hal.science/hal-01210607>**

Submitted on 6 Jun 2020

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

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

# Le turnover des cellules dans la glande mammaire évalué par immunohistochimie, indicateur de la production de lait

**Sandra WIART**, Marion Boutinaud  
Equipe Physiologie de la Lactation et Synthèse du lait



# PLAN

**\* STRUCTURE DE LA GLANDE  
MAMMAIRE**

**\* PRINCIPES DES MARQUAGES EN  
IMMUNOHISTOLOGIE**

**\* TRAITEMENT D'IMAGE**

**\* ETUDE SUR DES ANIMAUX**

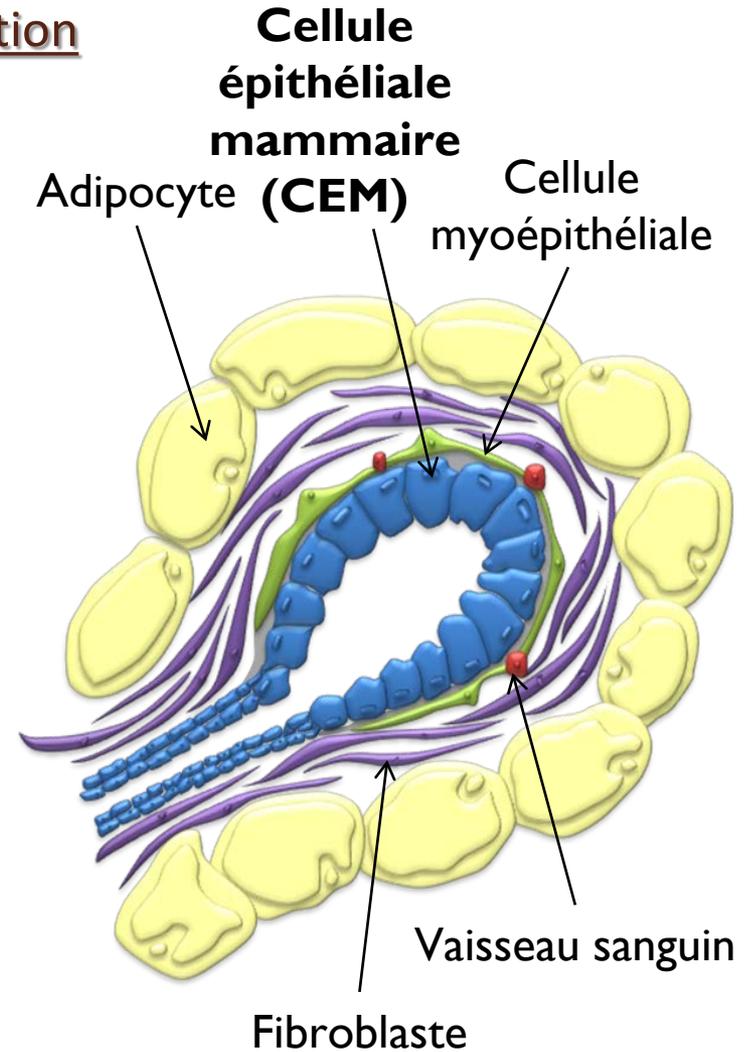
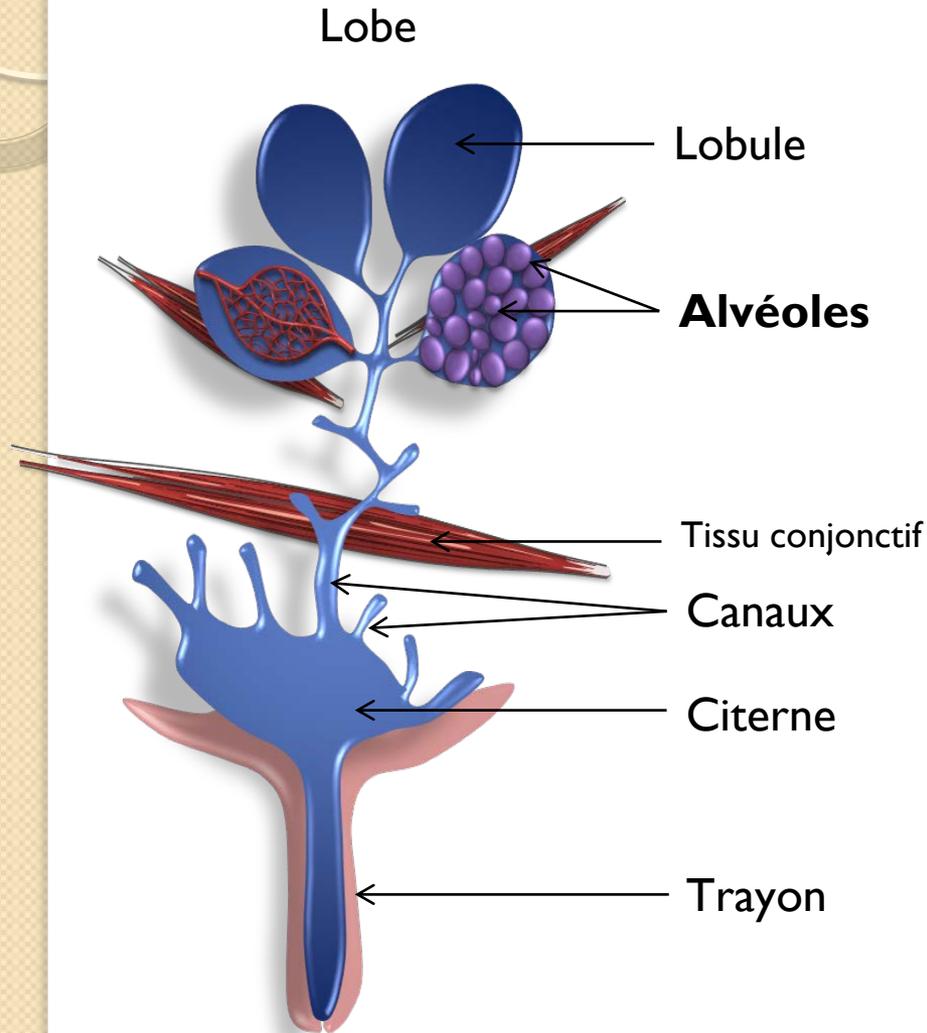
**\* RÉSULTATS DE L'ÉTUDE**

**\* CONCLUSION**

# LA GLANDE MAMMAIRE CHEZ LES RUMINANTS LAITIERS

# La glande mammaire:

l'organe central lié à la fonction de lactation

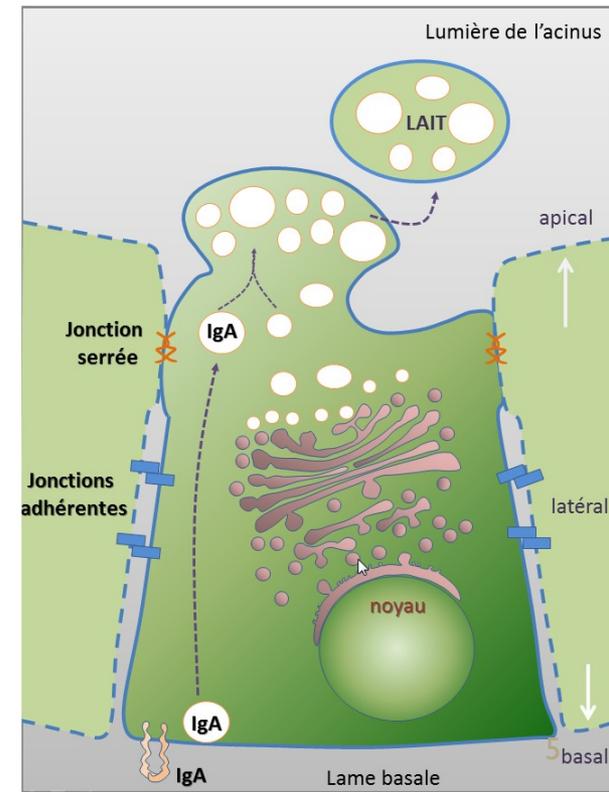


# La synthèse du lait

- Les cellules épithéliales mammaires sont responsables de la synthèse du lait.
- Le potentiel de production des mamelles des ruminants laitiers dépend du nombre et de l'activité métabolique des CEM.

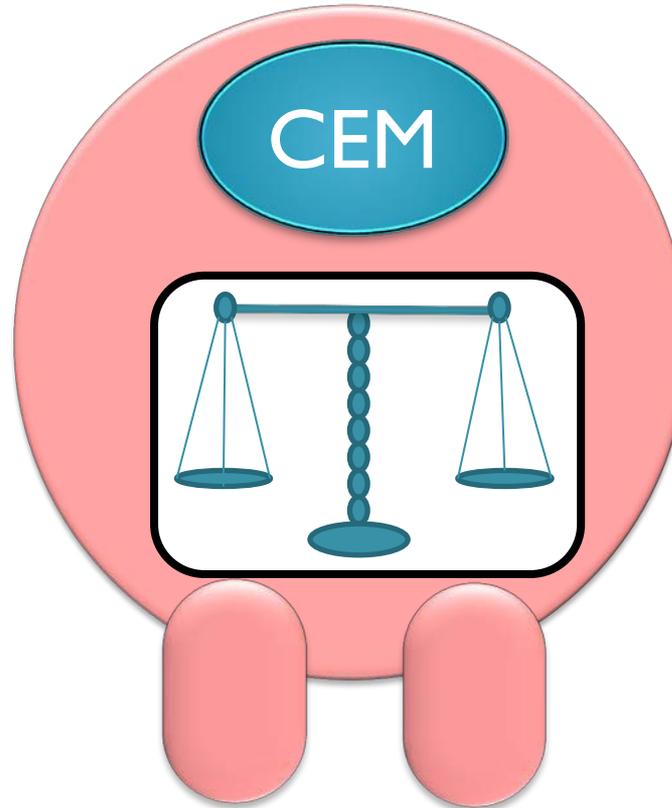
Les CEM possèdent une machinerie nécessaire à la sécrétion des constituants du lait :

- Caséines et protéines solubles
- Globules gras
- Lactose



# Le turnover des CEM

Prolifération



Mort cellulaire

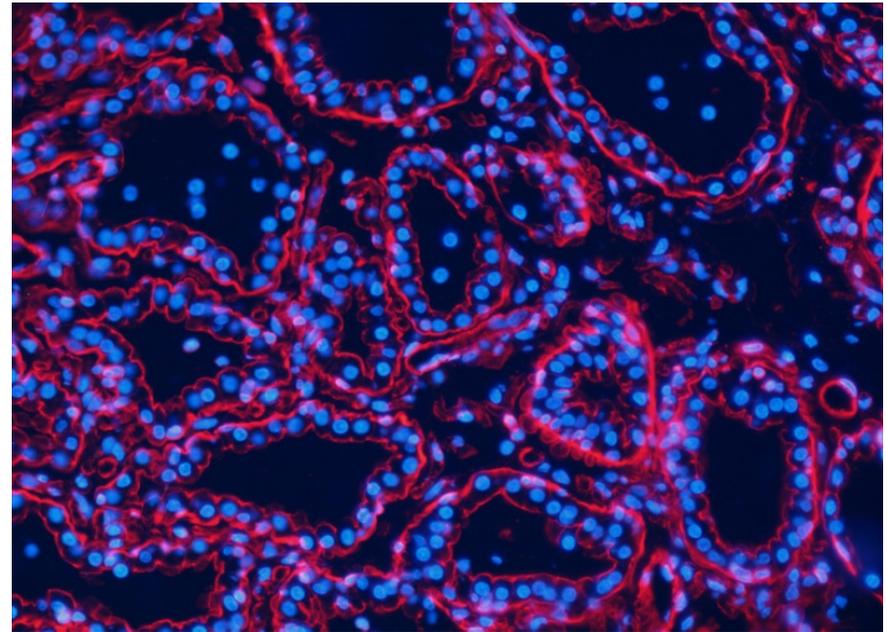
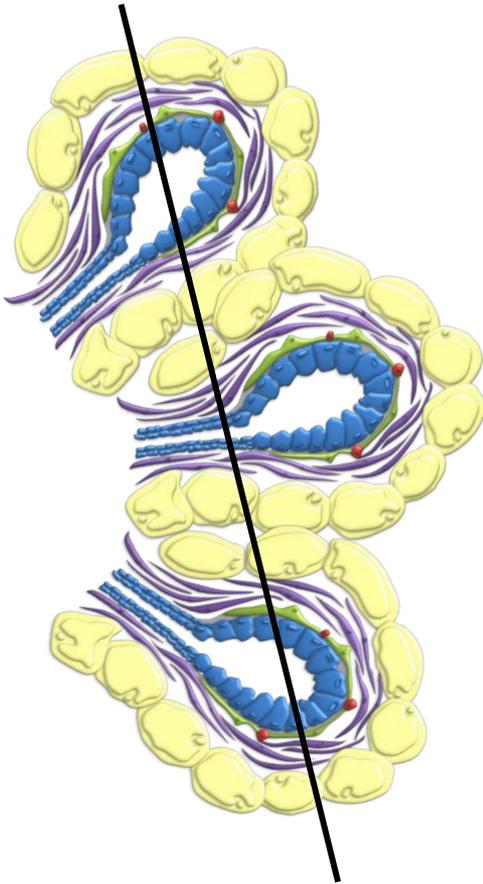
Le turnover ou renouvellement cellulaire dépend de deux phénomènes cellulaires qui sont la prolifération et mort cellulaire.

Pendant la lactation, les CEM prolifèrent et meurent par apoptose.

# IMMUNOHISTOLOGIE

MARQUAGES SUR DES COUPES  
CONGELÉES DE TISSUS MAMMAIRES  
OBTENUS APRÈS PRÉLÈVEMENTS SUR  
LES ANIMAUX.

# Coupes de glande mammaire

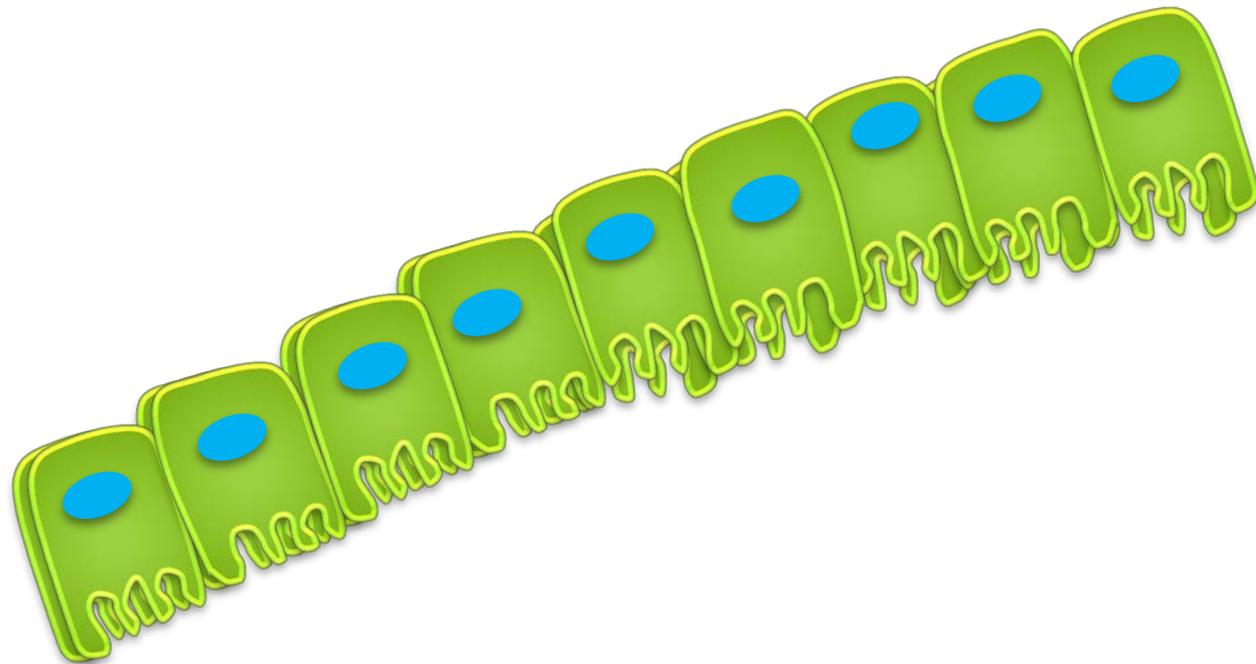


Bleu = noyaux des cellules.

Rouge = membrane des cellules épithéliales  
structure du tissu mammaire en alvéoles.



# Marquage du noyau de toutes les cellules



Tous les noyaux des cellules sont marqués avec du DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole).

Le DAPI est une molécule fluorescente capable de se lier fortement aux bases adénine (A) et thymine (T) de l'ADN.

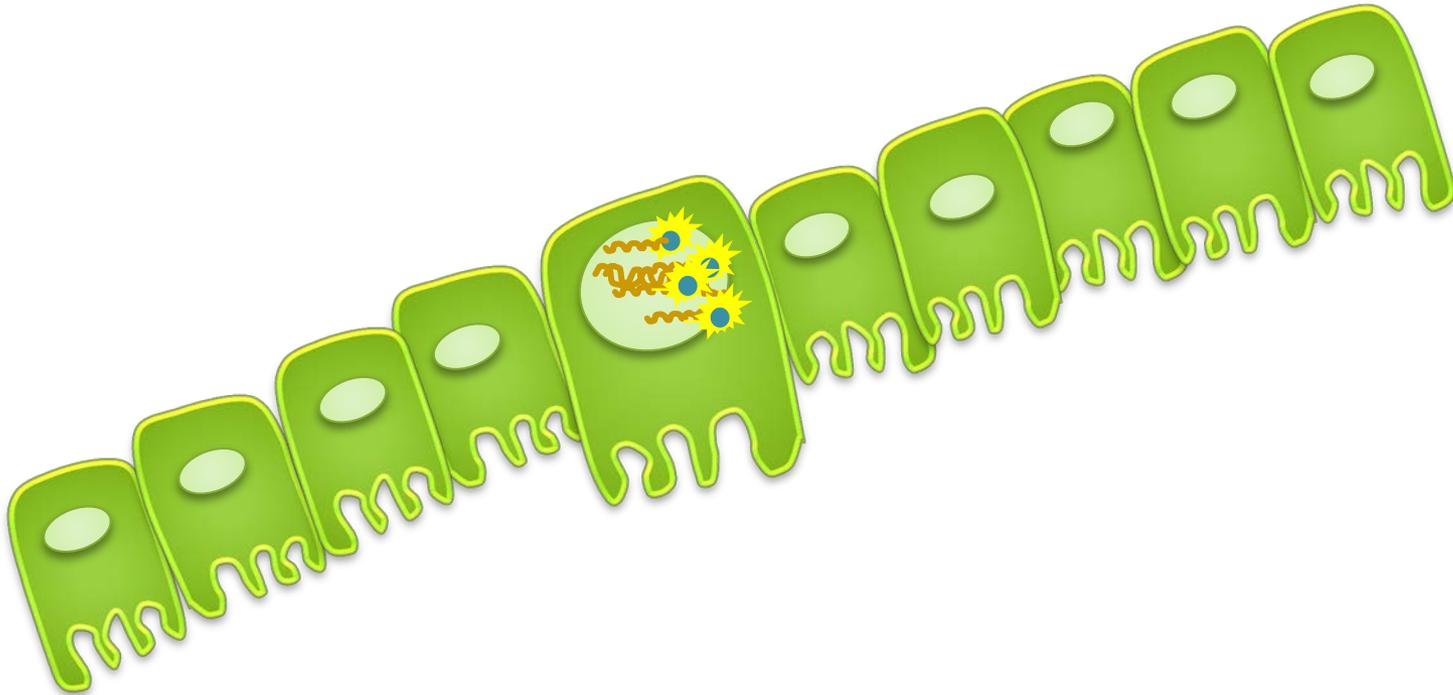
# Marquage de la prolifération cellulaire



La prolifération cellulaire est mise en évidence par le marquage PCNA (Prolifération Cell Nuclear Antigen).

Cette protéine est exprimée dans la phase S de la mitose correspondant à la phase de réplication de l'ADN.

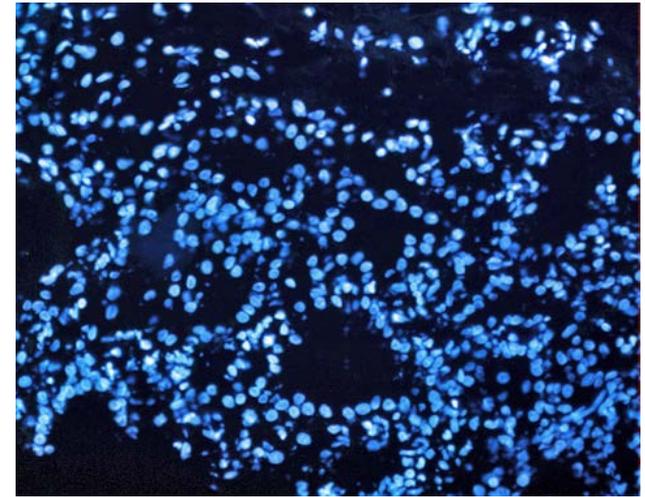
## Marquage de la mort cellulaire ou Apoptose (mort cellulaire programmée).



Une cellule morte en apoptose va avoir son ADN qui se fragmente.  
La mort cellulaire est mise en évidence par le marquage TUNEL  
Un nucléotide marqué est fixé par une enzyme aux extrémités OH de l'ADN.

# TRAITEMENT D'IMAGE IMAGE J

# Traitement d'image :



Utilisation du logiciel libre Image J

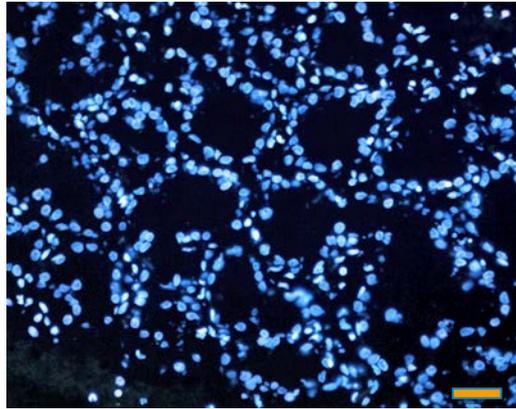
## Détermination du nombre de noyaux sur coupes histologiques de GM

- 1/ Passage d'une photo en couleur à une photo noire et blanche.
- 2/ Ajustement du seuil entre le noir et le blanc pour identifier correctement les noyaux.
- 3/ Création d'une photo avec des particules noires (= noyaux )sur fond blanc.
- 4/ Analyse de ces particules en ayant définir certains critères (aire et circularité).
- 5/ Comptage automatique, visualisation de toutes les particules comptées.
- 6/ Exportation du résultat obtenu vers un fichier excel.

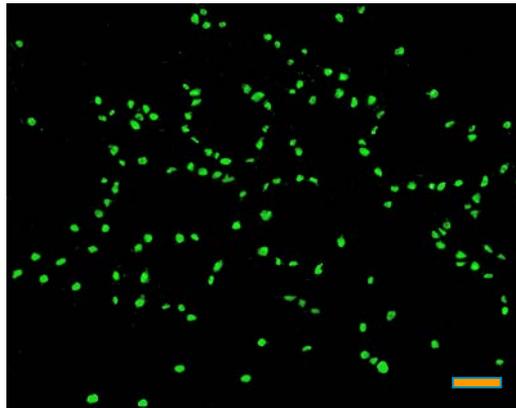
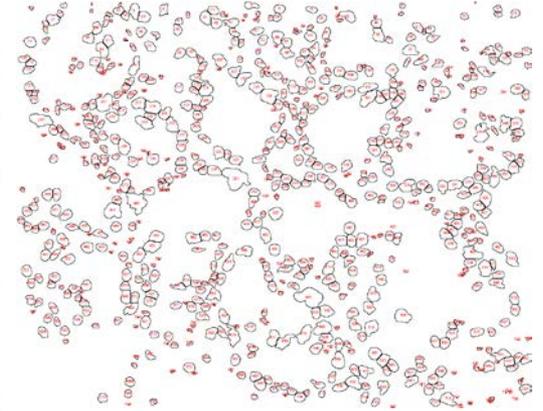
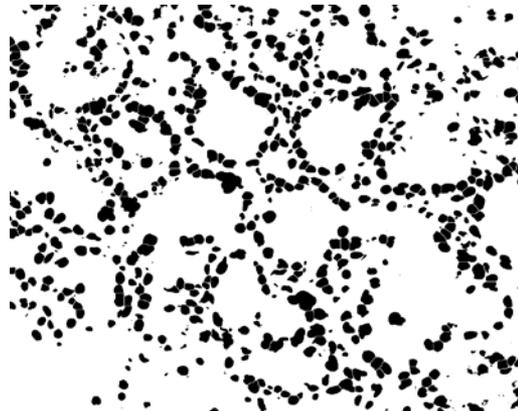
# Traitement d'image :

Calcul du taux par exemple celui de la prolifération

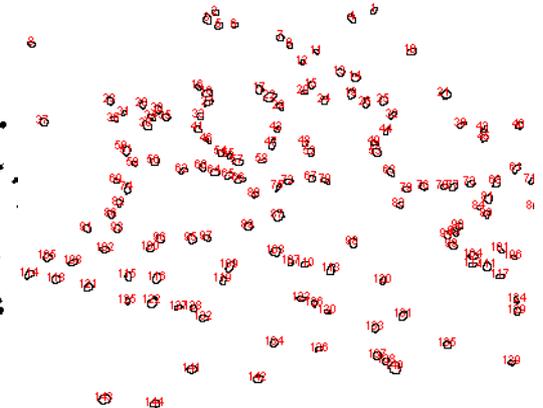
Nbre 733



20 µm



20 µm



Nbre 142

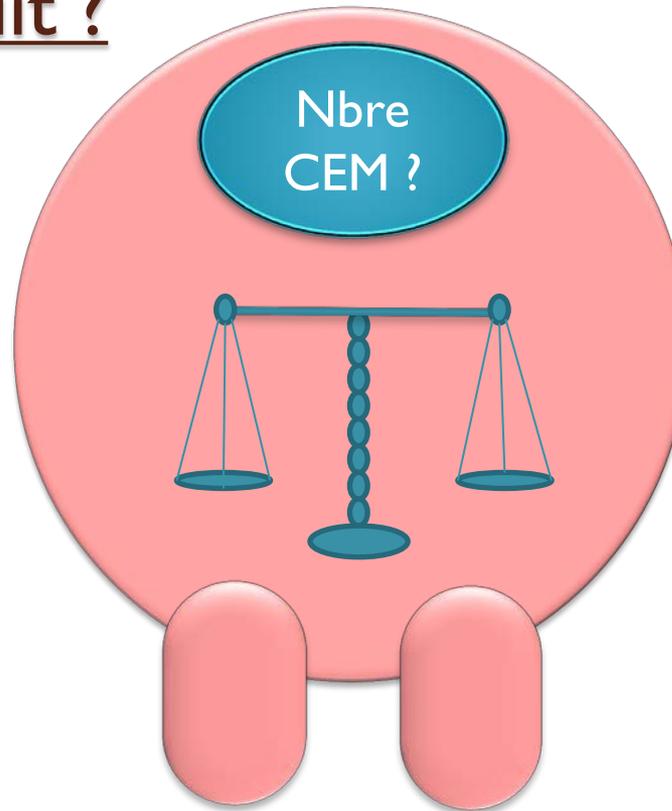
Taux = 19.3 %



# **ETUDE DU TURNOVER SUR DES CHÈVRES EN LACTATION**

# Y a-t-il un lien entre le turnover et la quantité de lait produit ?

Prolifération ?

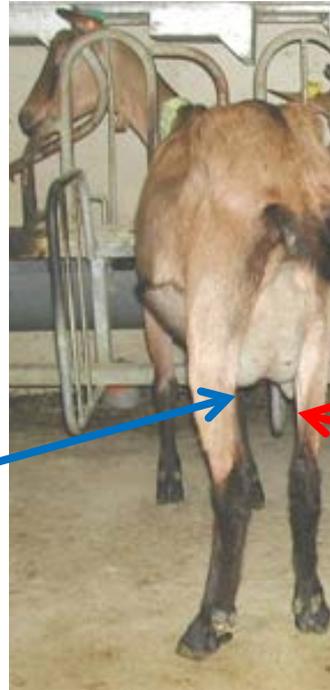


Mort cellulaire ?



Quantité de lait ?

# Matériel et Méthode (1/5)



**Mamelle traite  
toutes les 12 h**

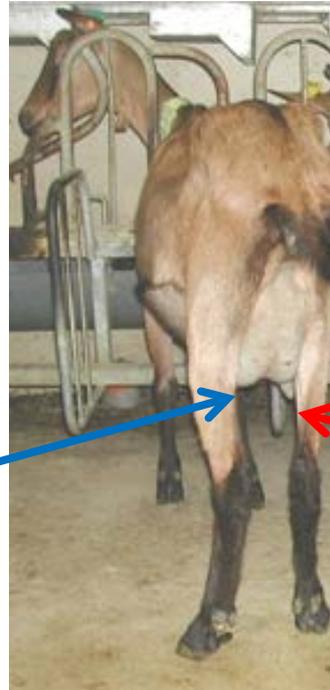
**Mamelle avec 36h  
d'accumulation du lait**

## **8 chèvres en lactation :**

Mamelle gauche accumulation de lait pendant 12h (soit 2 traites/jour)

Mamelle droite accumulation de lait pendant 36h (début de tarissement)

# Matériel et Méthode (2/5)



**Mamelle traite  
toutes les 12 h**

**Mamelle avec 36h  
d'accumulation du lait**

## **Mesures :**

- Mesure de production de lait par demi-mamelle.
- Prélèvement de la glande mammaire par biopsie.



# Matériel et Méthode (3/5)

## \* Biopsies :

Prélèvements de tissus mammaires par biopsie à l'aide d'un pistolet automatique sur animal vigile en lactation.

### Une biopsie :

Longueur = 1 cm

Largueur = 2 mm

Poids = 20 mg



# Matériel et Méthode (4/5)

- Fixation

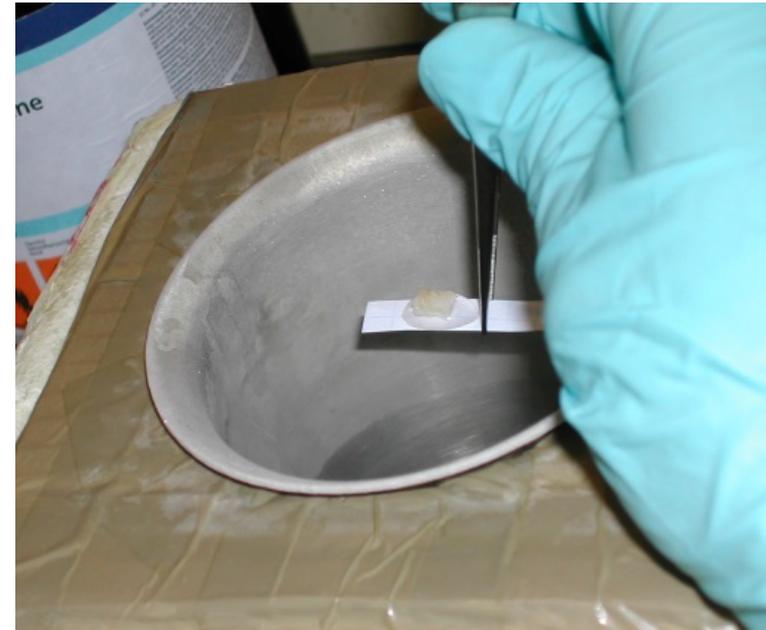
Fixation dans du paraformaldehyde 4% (2h) puis 24 h à 0.4%.  
Cryoconservation par imprégnation dans du sucrose (72h).

- Congélation

La biopsie est enrobée dans du tissu teck\*  
puis plongée dans un bain d'isopentane  
refroidi avec de l'azote liquide

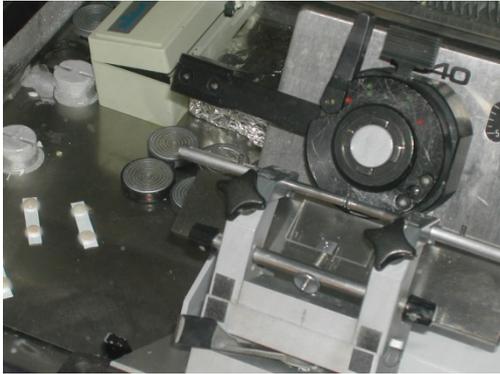
- Conservation des échantillons à -80°C

\*Colle solide à T°basse



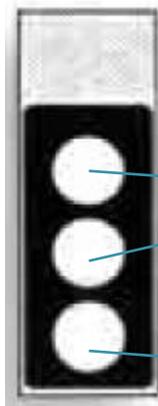
# Matériel et Méthode (5/5)

- Coupes



Découpe des biopsies à l'aide d'un cryotome réfrigéré à  $-30^{\circ}\text{C}$ .

Coupes de  $7\ \mu\text{m}$  déposées sur des lames 3 puits préalablement coatées.



Echantillon

Contrôle -

1 à 5 lames par biopsie  
1 à 3 coupes par puits

# Exemple de marquage (PCNA)

## Marquage :

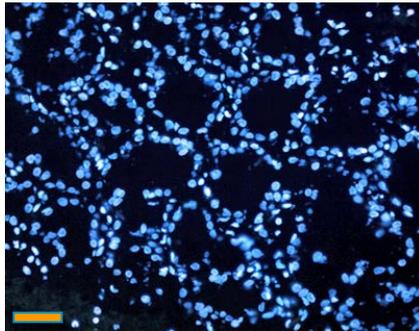
1. Perméabilisation du tissu avec  $H_2O_2$  et un détergeant.
2. Saturation du tissu avec du PBS-BSA.
3. Réaction antigène-anticorps
  - Anticorps primaire monoclonal (anti-PCNA fait chez la souris)
  - Anticorps secondaire lapin (anti-souris IgG conjugué à Alexa).
4. Lavages
5. Coloration au DAPI
6. Rinçage, séchage et montage des lames.

## Observation :

Observation des coupes au microscope en fluorescence .  
Capture d'images sur différentes zones de la coupe  
à un grossissement x200.

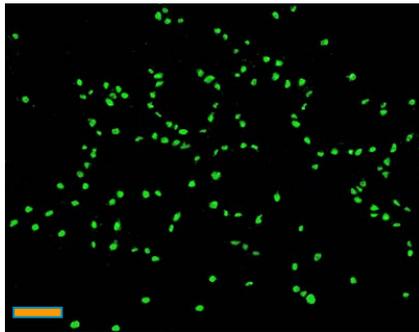
# Acquisition des images pour le PCNA

Pour un échantillon de biopsie



8 images en bleu

Environ 800 noyaux par image soit 6400 cellules marquées



8 images en vert

Environ 152 noyaux par image soit 1216 cellules marquées

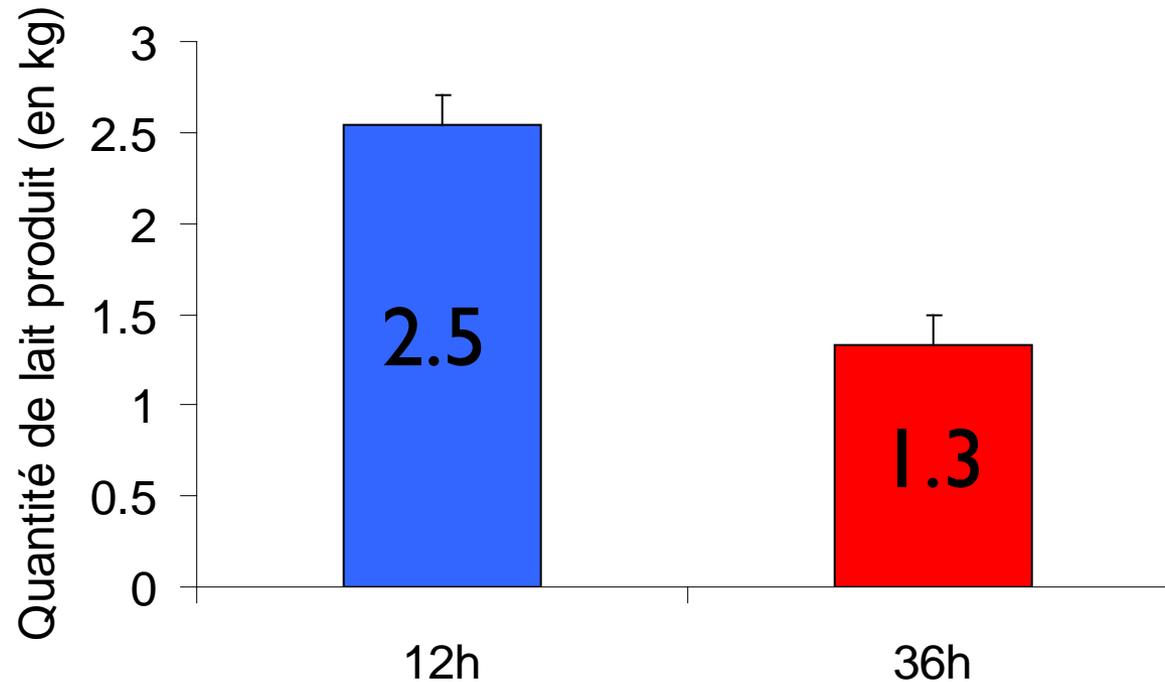
20µm

Une chèvre → 2 biopsies (1 par demi-mamelle) → 32 images (16 bleu, 16 vert)

Pour le marquage PCNA sur 8 chèvres, 256 images ont été traitées.

# ° RESULTATS

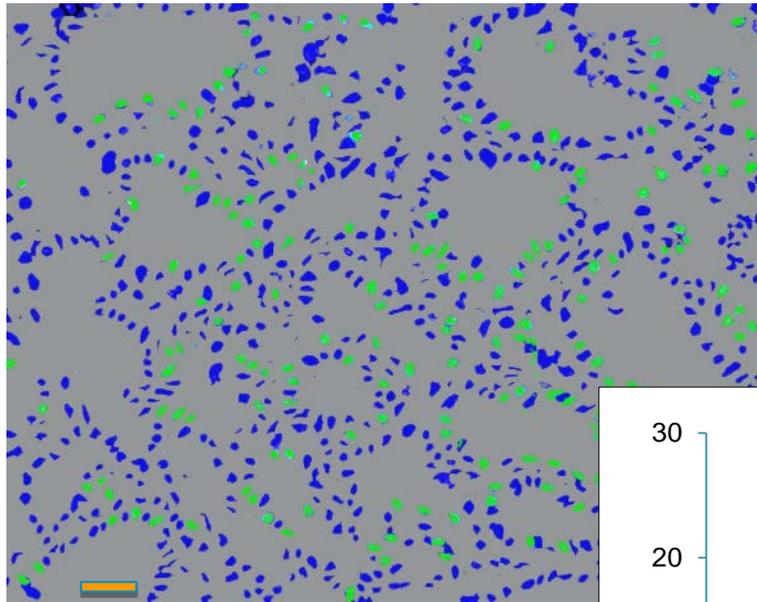
## Production de lait par demi-mamelle



On observe une baisse de la production de lait avec 2.5 kg dans les demi-mamelles traites tous les 12h et 1.3 kg de lait pour les demi-mamelles qui ont subi une accumulation de 36h.

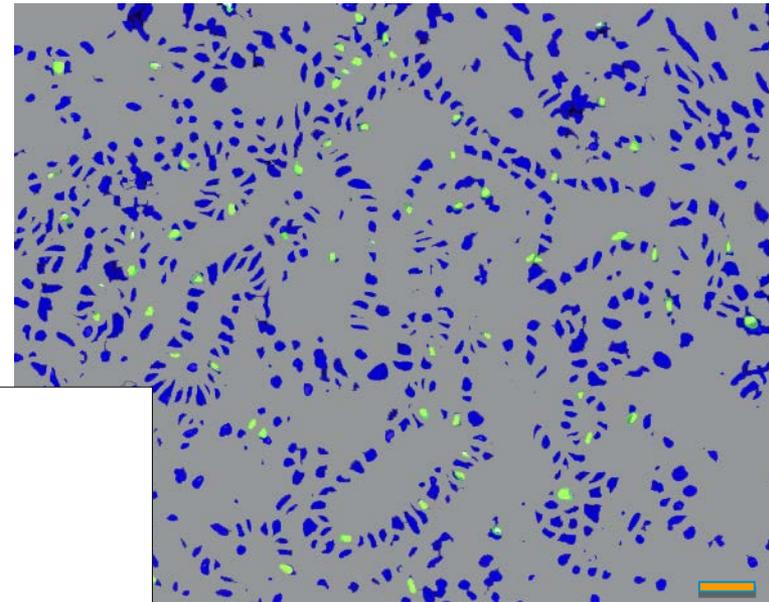
## Taux de prolifération cellulaire dans la glande mammaire

12h

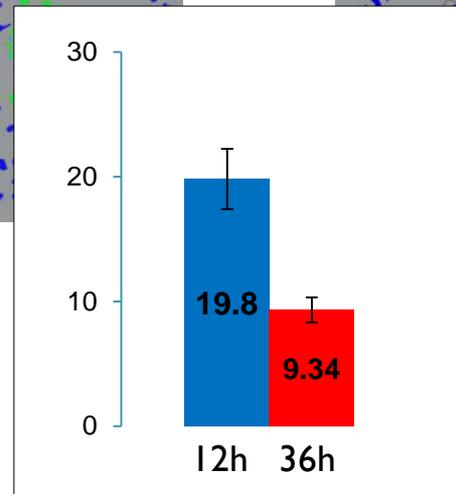


20 μm

36h



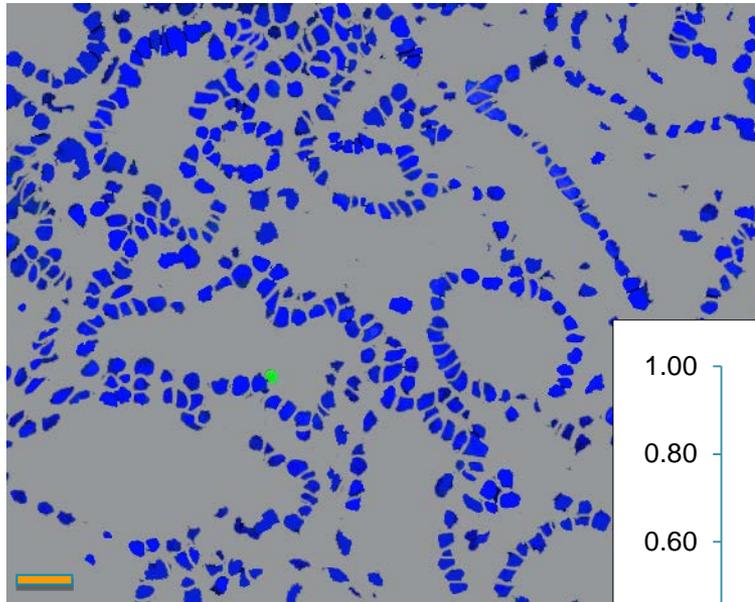
20 μm



On observe une diminution du taux de cellules en prolifération dans le tissu mammaire après 36h d'accumulation de lait, comparé à 12h d'accumulation. Soit 19.8 contre 9.3% ( $p < 0.01$ ).

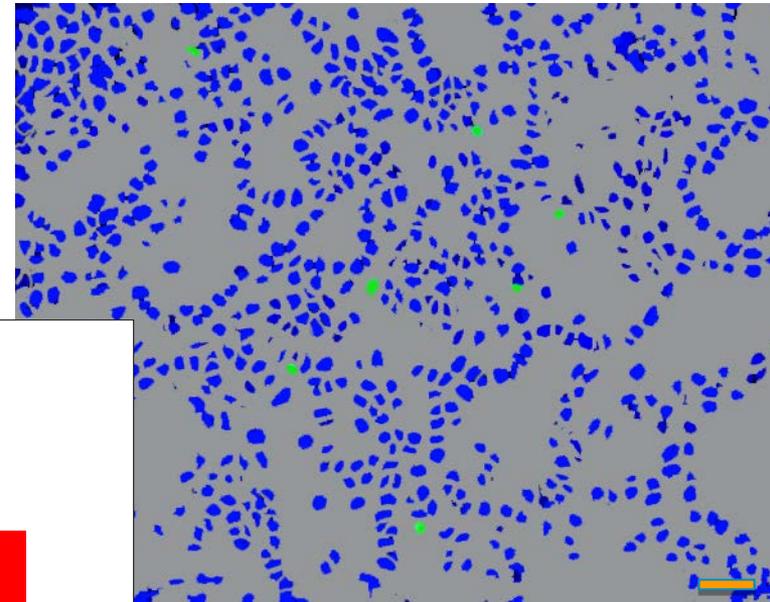
# Taux de mort cellulaire dans la glande mammaire

12h

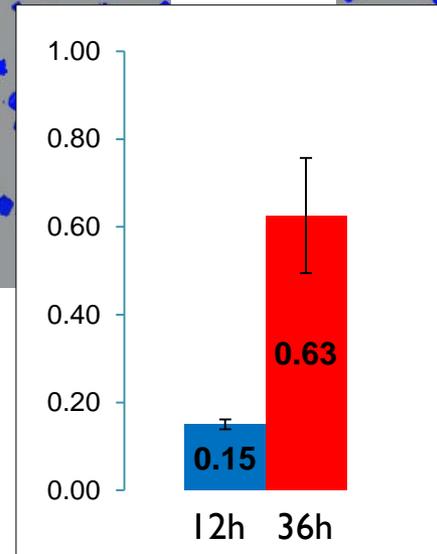


20 μm

36h

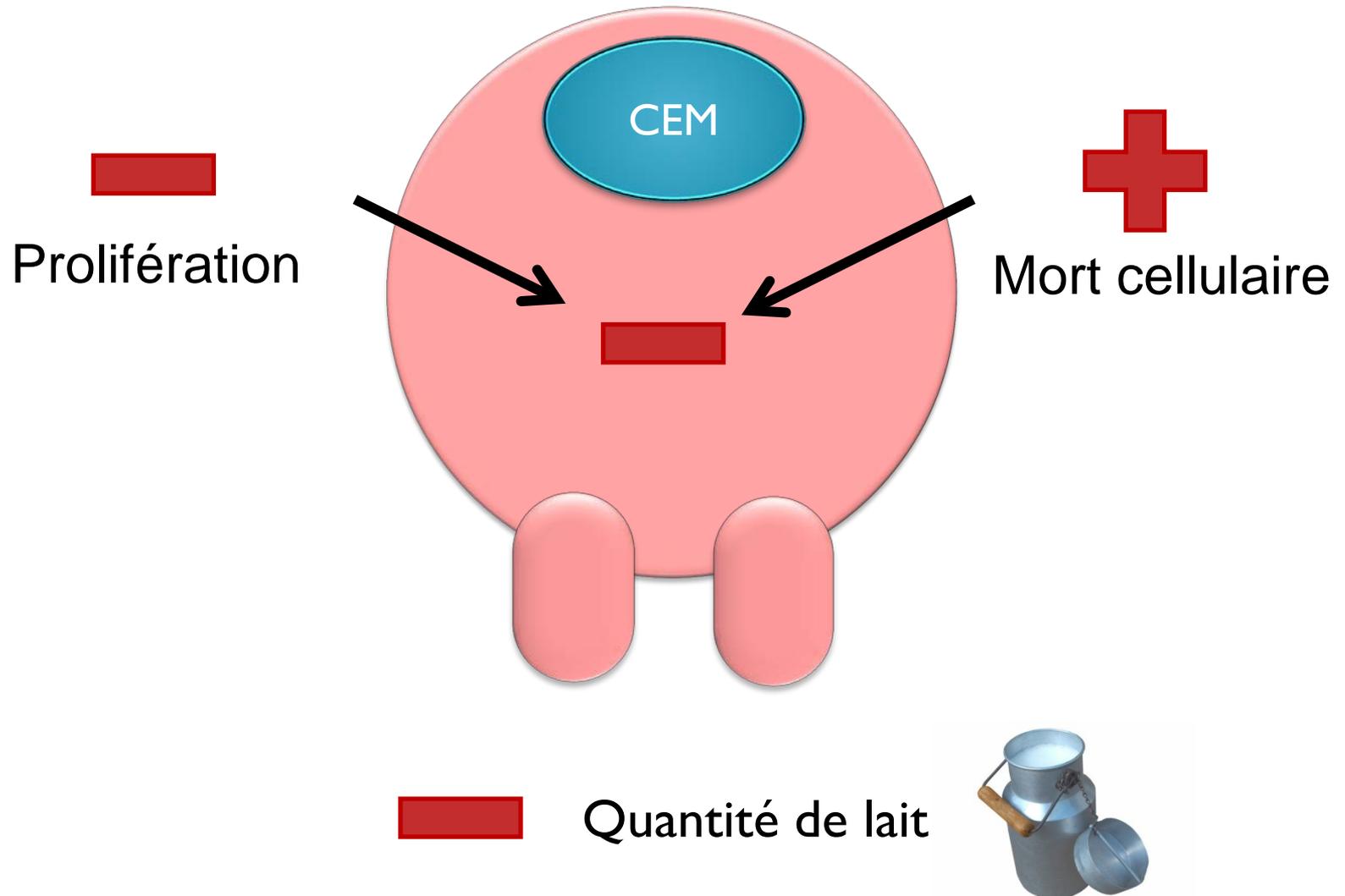


20 μm



On observe une augmentation du taux de cellules mortes par apoptose dans le tissu mammaire après 36h d'accumulation de lait, comparé à 12h d'accumulation. Soit 0.63 contre 0.15% ( $p < 0.001$ )

## Conclusion de l'étude 36h d'accumulation de lait :



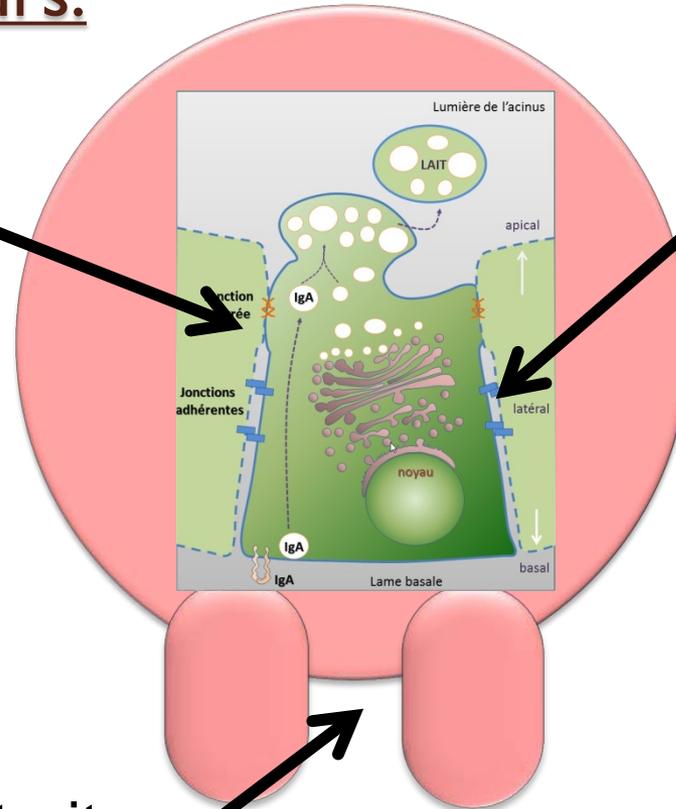


# CONCLUSION

**Il existe bien une relation entre le turnover des cellules mammaires et la production du lait.**

## La quantité de lait produit peut être modifiée par d'autres facteurs:

Hormones :  
Prolactine,.....



Perméabilité de  
l'épithélium, en  
lien avec les  
jonctions serrées

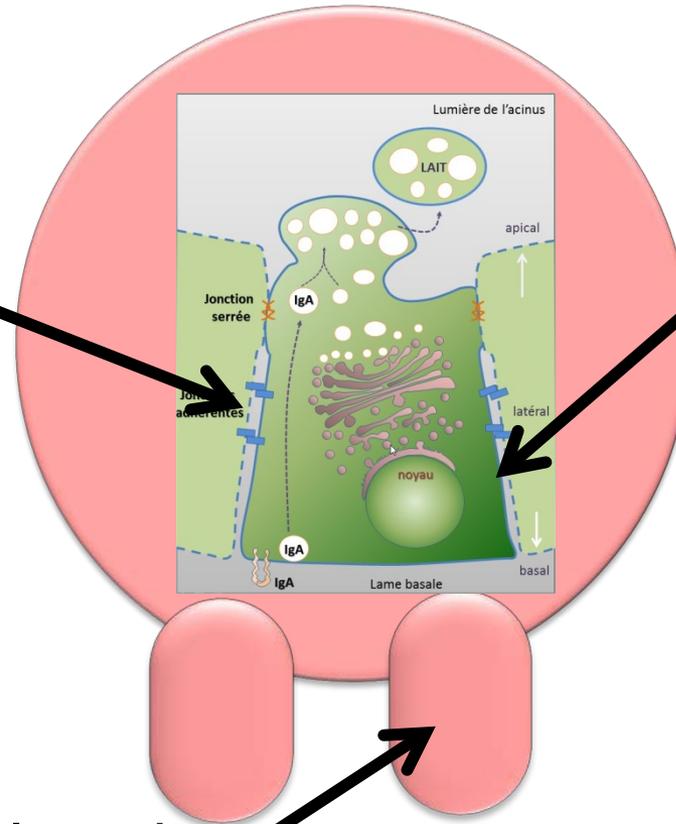
Fréquence de traite

Nous avons mis en place des essais sur animaux pour étudier les effets de ces facteurs sur le turnover.

# Relation entre turnover et production du lait

Inhibition de la libération de Prolactine.

(Boutinaud et al. JDS 2012)



Induction de l'ouverture des jonctions serrées chez la chèvre.

(Ben Cheldy et al. JDS 2010)

Monotraite chez la vache.

(Boutinaud, Galio et al. Soumis BMC Genomics)

Ces facteurs ont entraîné une baisse de production du lait.

Nous avons retrouvé une diminution de la prolifération associée à une augmentation de la mort cellulaire dans la glande mammaire.



**Merci de votre attention**

# Marquage Tunel

- 1- Décongélation.
- 2- Perméabilisation du tissu par du citrate de sodium et un détergeant à chaud.
- 3- Perméabilisation avec de la protéinase K à chaud.
- 4-fixation du nucléotide à l'aide de l'enzyme 1h à 37°C
- 5- Blocage et arrêt de la réaction
- 6- Lavages
- 7- coloration au Dapi
- 8- Rinçage, séchage et montage des lames.