



**HAL**  
open science

## Caractérisation du lignage épithélial de la glande mammaire bovine

Laurence Finot, Eric Chanat, Marie-Hélène Perruchot, Florence Dufreneix,  
Frederic Dessauge

### ► To cite this version:

Laurence Finot, Eric Chanat, Marie-Hélène Perruchot, Florence Dufreneix, Frederic Dessauge. Caractérisation du lignage épithélial de la glande mammaire bovine. 23.Congrès de l'association française de cytométrie, Sep 2019, Rennes, France. hal-02299629

**HAL Id: hal-02299629**

**<https://hal.science/hal-02299629v1>**

Submitted on 5 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.



# Caractérisation du lignage épithélial de la glande mammaire bovine

Laurence FINOT, Eric CHANAT, Marie-Hélène PERRUCHOT, Florence DUFRENEIX et Frédéric DESSAUGE

# Contexte économique : l'élevage laitier bovin en France



2<sup>nd</sup> pays producteur de lait dans l'UE



La Bretagne : 1<sup>er</sup> bassin laitier en France

14.000 exploitations totalisant un cheptel de 750.000 vaches  
5 Milliards de litre de lait / an



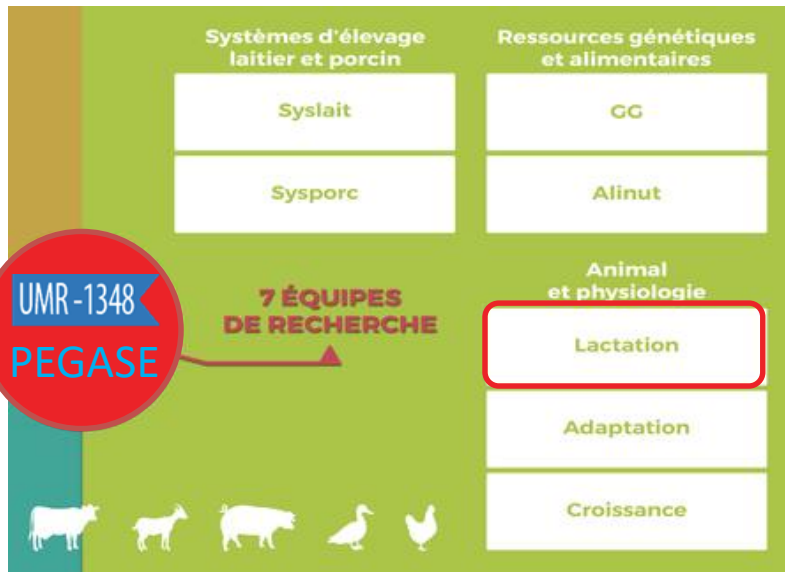
83% du lait produit : lait de vache

8 vaches / 10 sont de race Prim'Holstein

# Accompagner la transition agro-écologique pour une nouvelle agriculture plus vertueuse

Les attentes sur la production de lait (citoyens, consommateurs, agriculteurs, industrie et législateurs )

- Pour l'animal : santé, bien-être, longévité,...
- Pour l'environnement : réduire les impacts environnementaux, bio-ressource, recyclage, ...
- Pour les consommateurs et les acteurs de la filière : qualité des produits, territoire,...



## Mission:

Recherche & enseignement sur la biologie de la production animale et les systèmes de productions animales.

## Objectifs:

- Comprendre et prédire les interactions animaux / systèmes d'élevage avec l'environnement
- Contribuer à concevoir des modèles d'élevage plus respectueux

# L'élevage des vaches laitières



Elevage de la génisse (jeune vache)

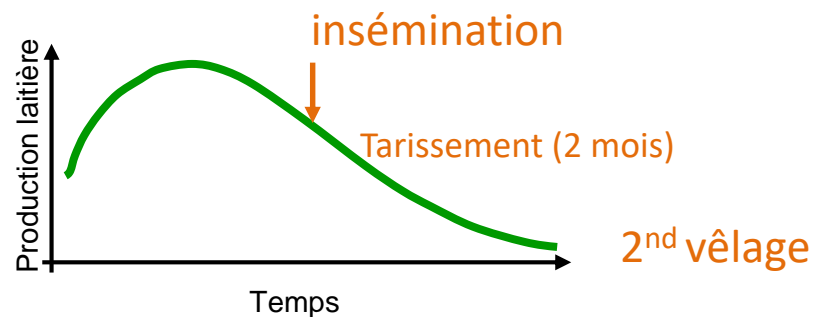
1<sup>er</sup> vêlage

Première lactation

2<sup>de</sup>

← Animal en croissance → ← Lactation → ← Lactation

- Maturité sexuelle: 10 mois
- Age à la 1<sup>ère</sup> insémination: 13 mois
- Gestation: 9 mois
- Age au 1<sup>er</sup> vêlage: 26 mois



- Lactation: 10 mois
- 9.000 L lait/vache/an (Hostein)
- Rang de lactation: 2.5

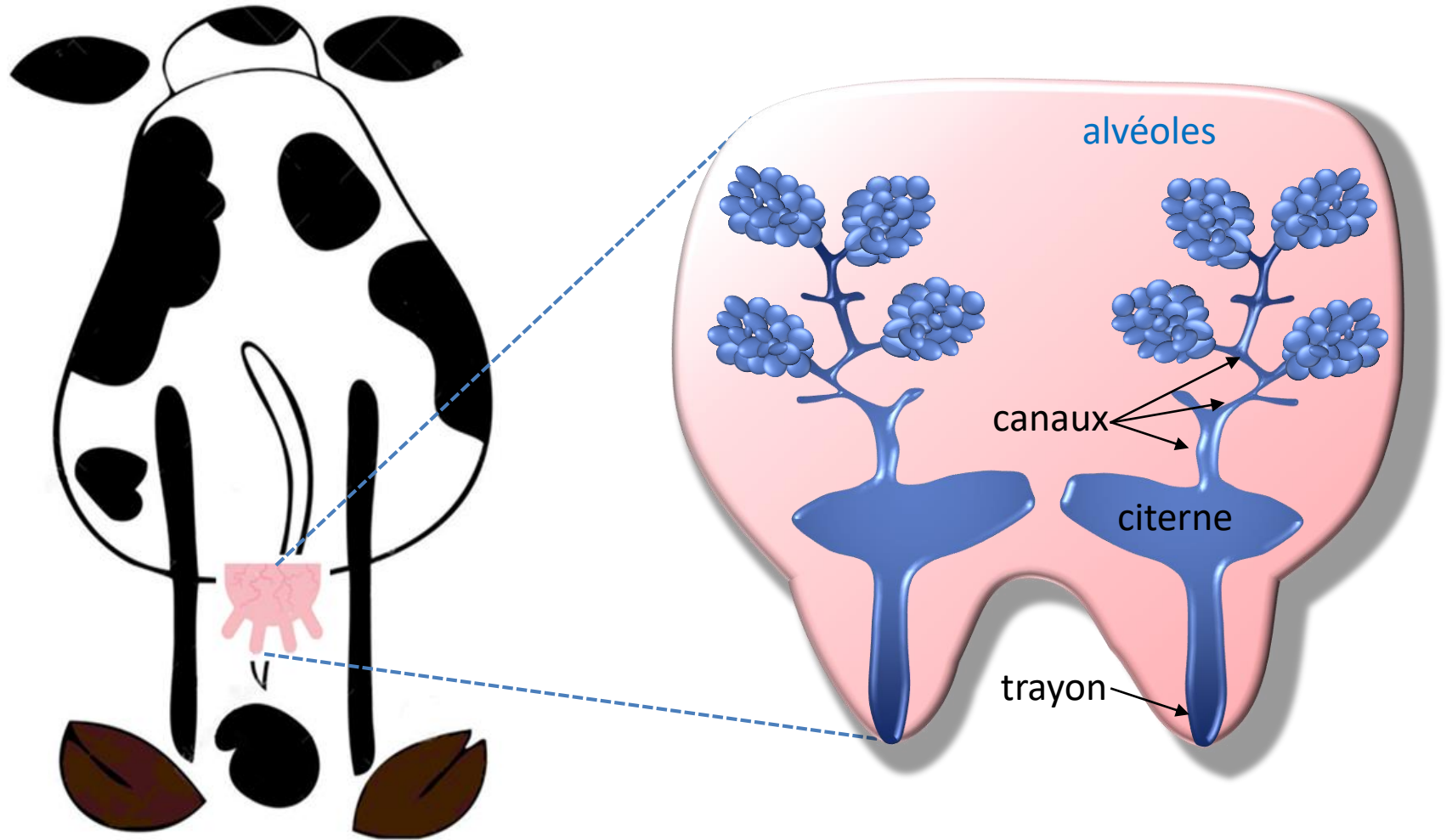
Naissance

26 mois

36 mois

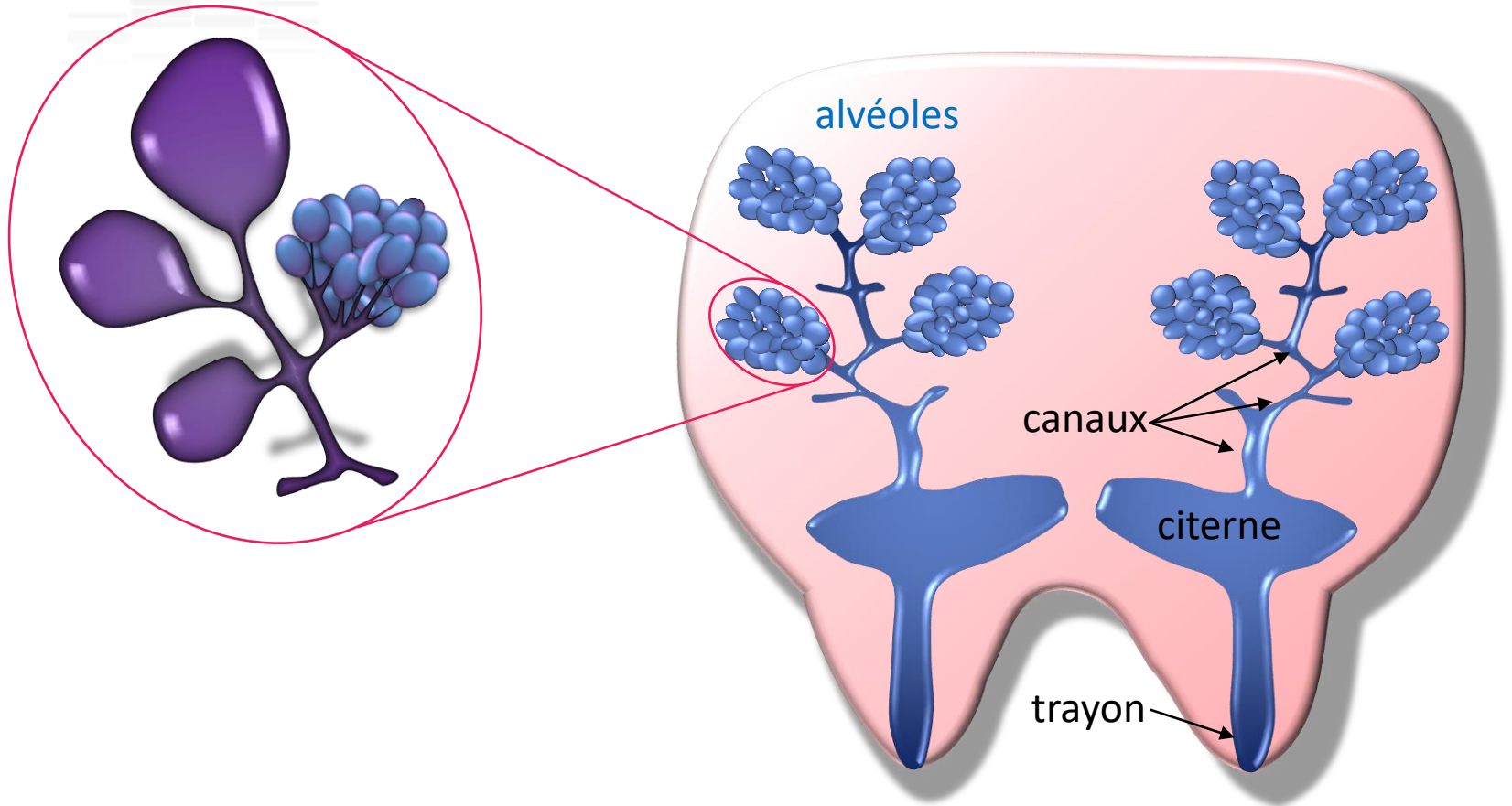
Age

# La glande mammaire : organe central de la lactation

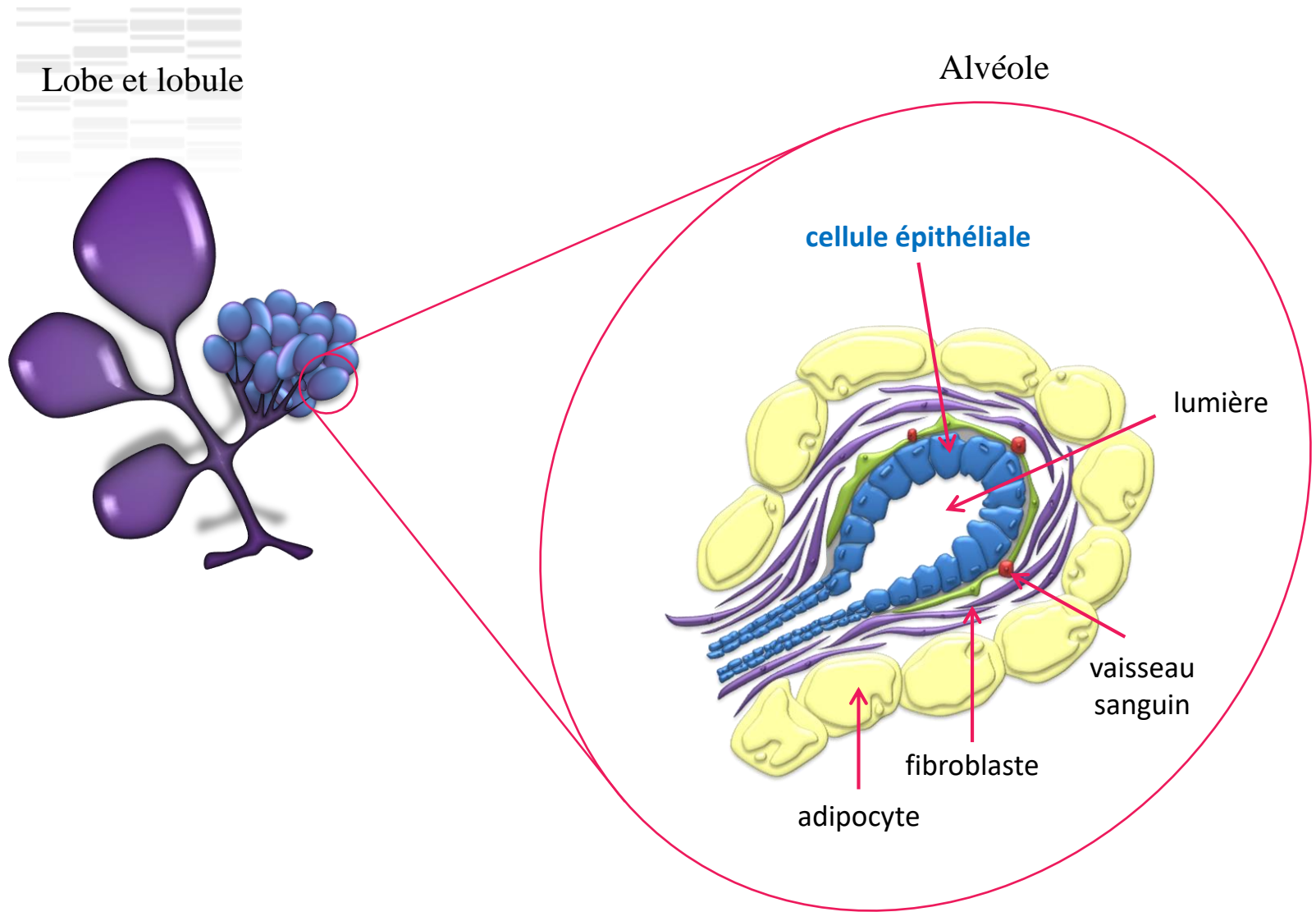


# La glande mammaire : organe central de la lactation

Lobe et lobule



# La glande mammaire : organe central de la lactation

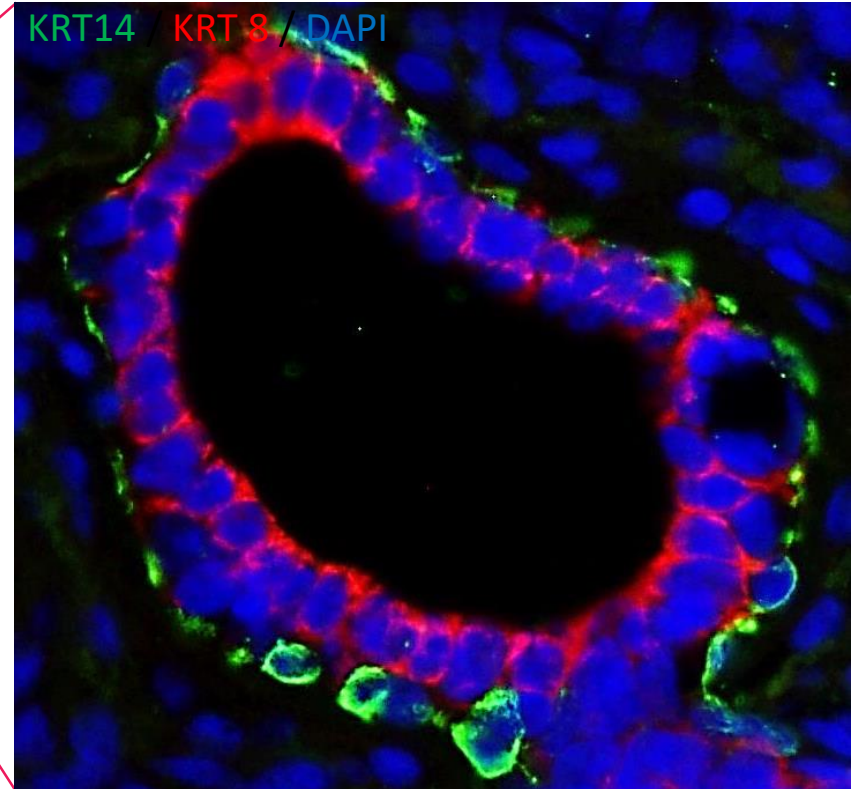
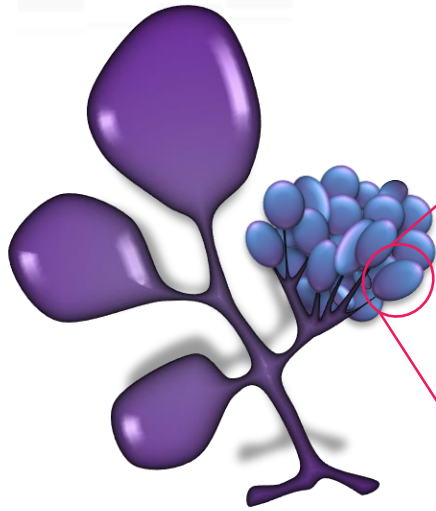




# La glande mammaire : organe central de la lactation

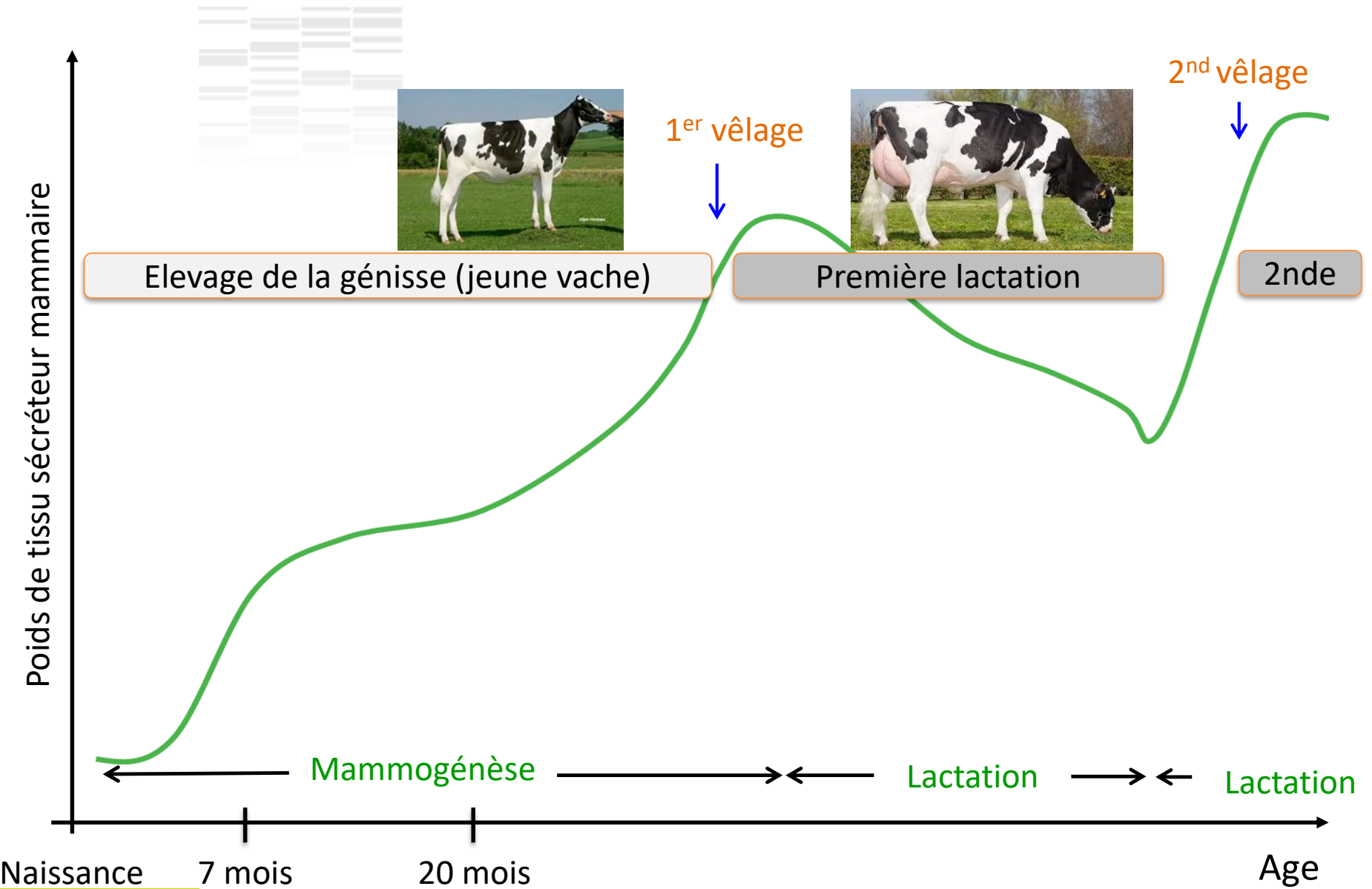
Lobe et lobule

Alvéole

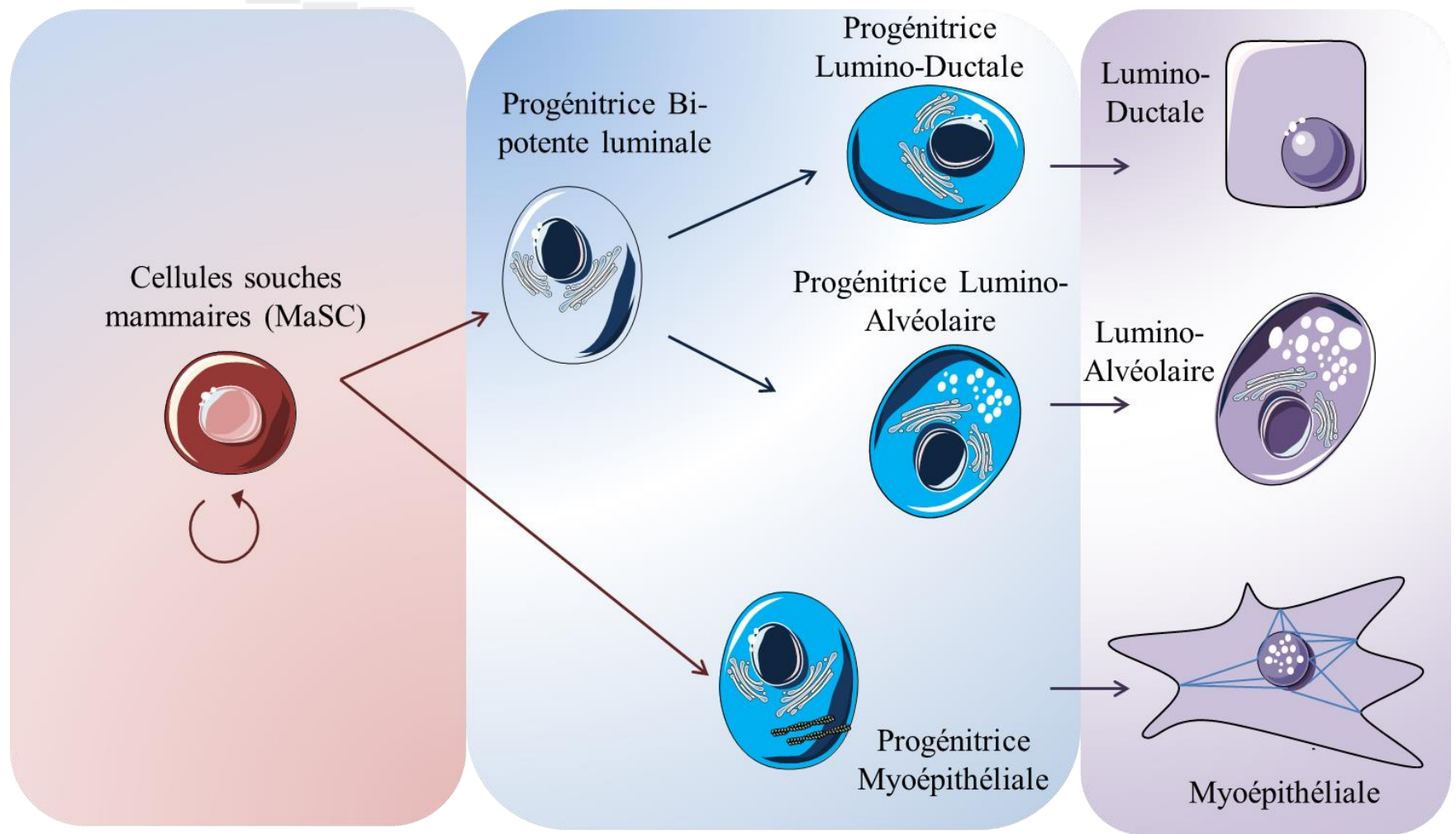


*D'après Finot, 2018*

# La dynamique de développement de la glande mammaire



# Le lignage épithélial chez la souris : de la cellule souche aux cellules différenciées



Les MaSC et le lignage sont très étudiés chez la souris (*DeOme et al, 1959*) et la femme

# Le lignage épithélial : enjeu pour la recherche en Agronomie



Peu d'études chez les espèces de rente (vaches)

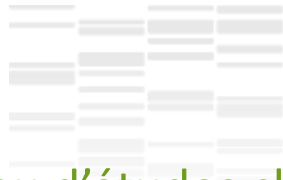
Frein : développement méthodologique pour adapter les outils (première étude chez la vache en 1981)

Intérêt grandissant en Agronomie (*Ellis et Capuco, 2002 in Tissue and cell*)

Lien entre cellules souches, développement et régénération du tissu sécréteur mammaire : cellules cibles pour des approches visant à renforcer le tissu sécréteur



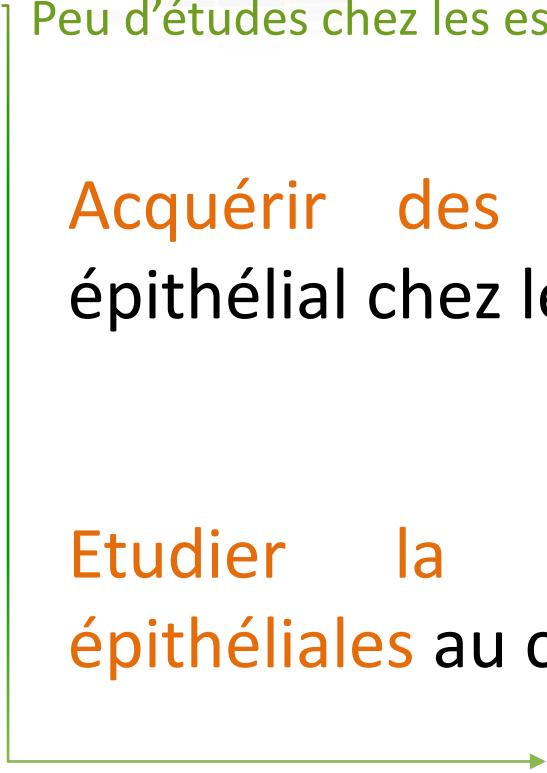
# Le lignage épithélial : enjeu pour la recherche en Agronomie



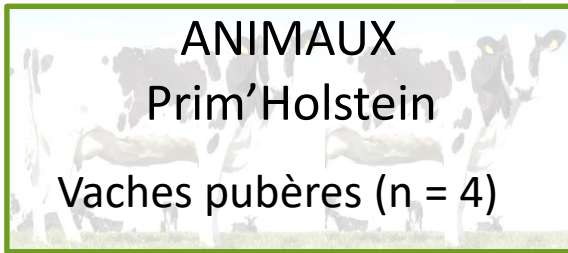
Peu d'études chez les espèces de rente (vaches)

Acquérir des connaissances sur le lignage épithélial chez le bovin laitier

Etudier la dynamique des populations épithéliales au cours de la « carrière » de la vache



# Stratégie expérimentale : matériel & méthodes



TISSU MAMMAIRE

Coupe de tissu  
paraffiné



Marquage des kératines  
  
Marquage des protéines  
de surface membranaire  
(CD49f, CD24 et CD10)

# Stratégie expérimentale : matériel & méthodes

ANIMAUX  
Prim'Holstein  
Vaches pubères (n = 4)

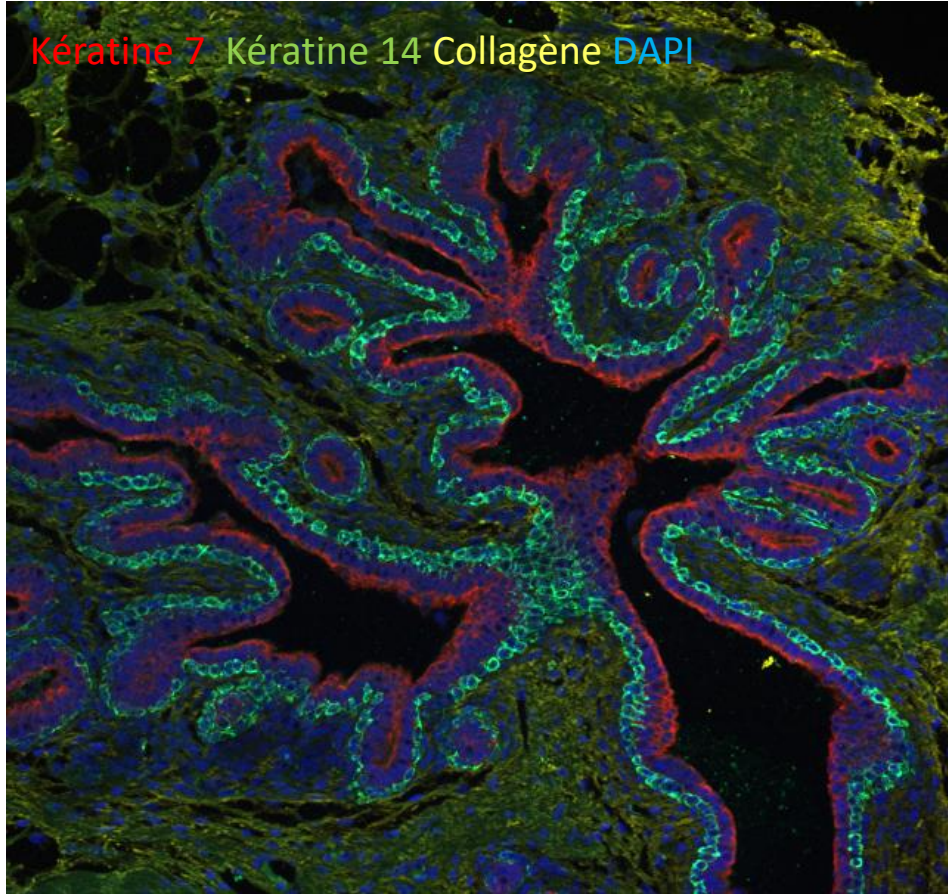
TISSU MAMMAIRE

Coupe de tissu  
paraffiné

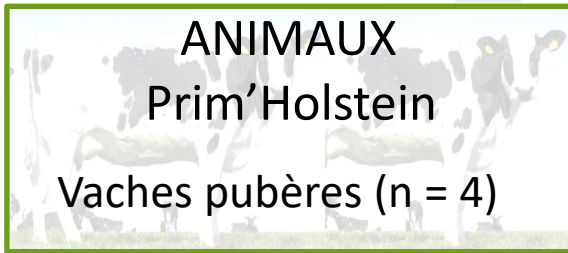
IMMUNO-  
FLUORESCENCE



Marquage des kératines  
KRT7 : cellules luminales  
KRT 14 : cellules basales  
/myoépithéliales  
Collagène : matrice  
extracellulaire



# Stratégie expérimentale : matériel & méthodes



TISSU MAMMAIRE

Coupe de tissu  
paraffiné



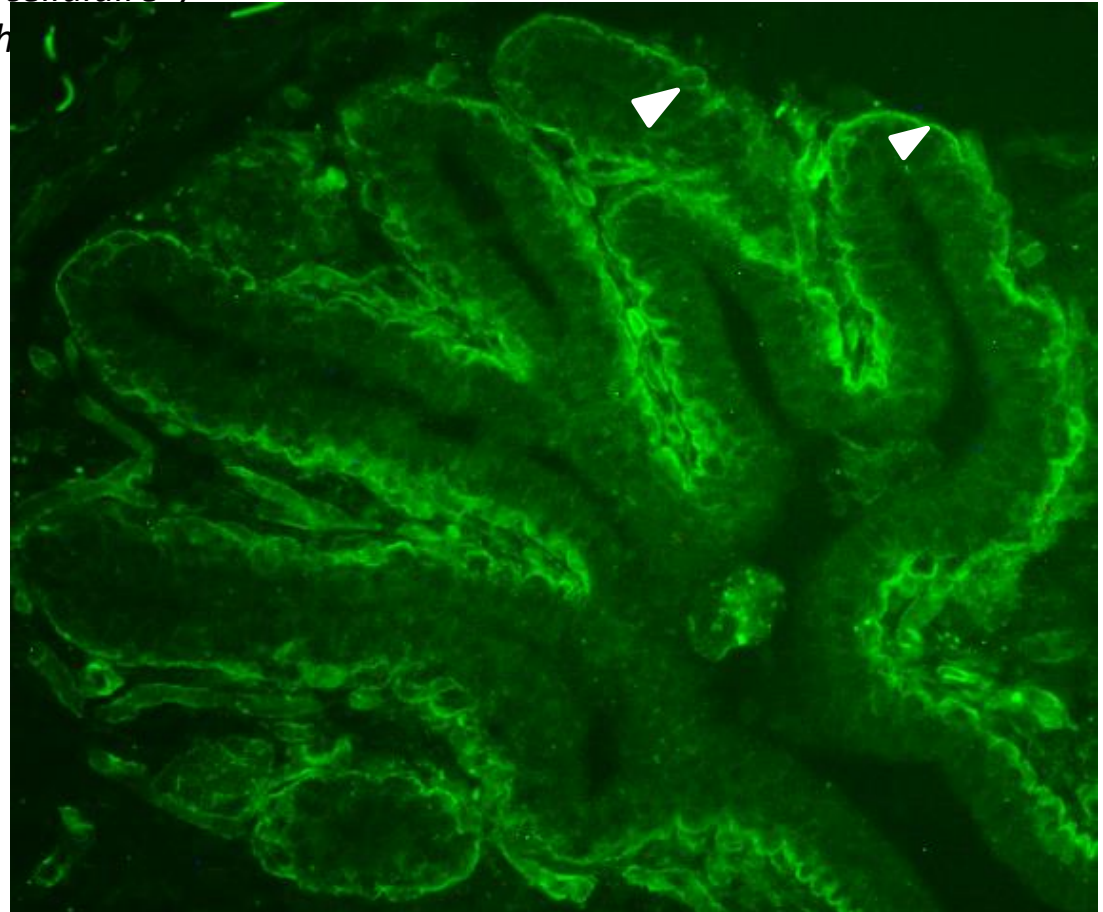
Marquage des kératines

Marquage des protéines  
de surface membranaire  
(CD49f, CD24 et CD10)



- CD49<sub>f</sub> Intégrine  $\alpha 6$

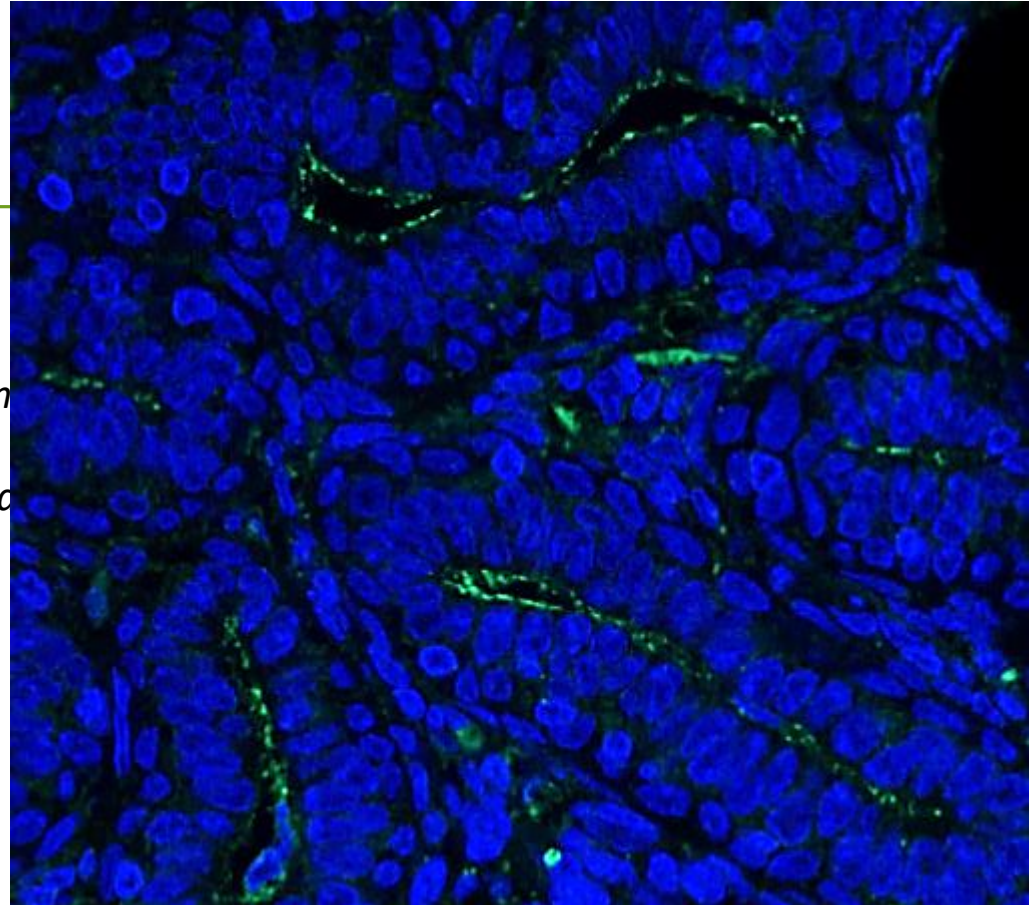
*Protéine d'adhésion des cellules épithéliales à la matrice extracellulaire / exprimée par les cellules souches mammaires*

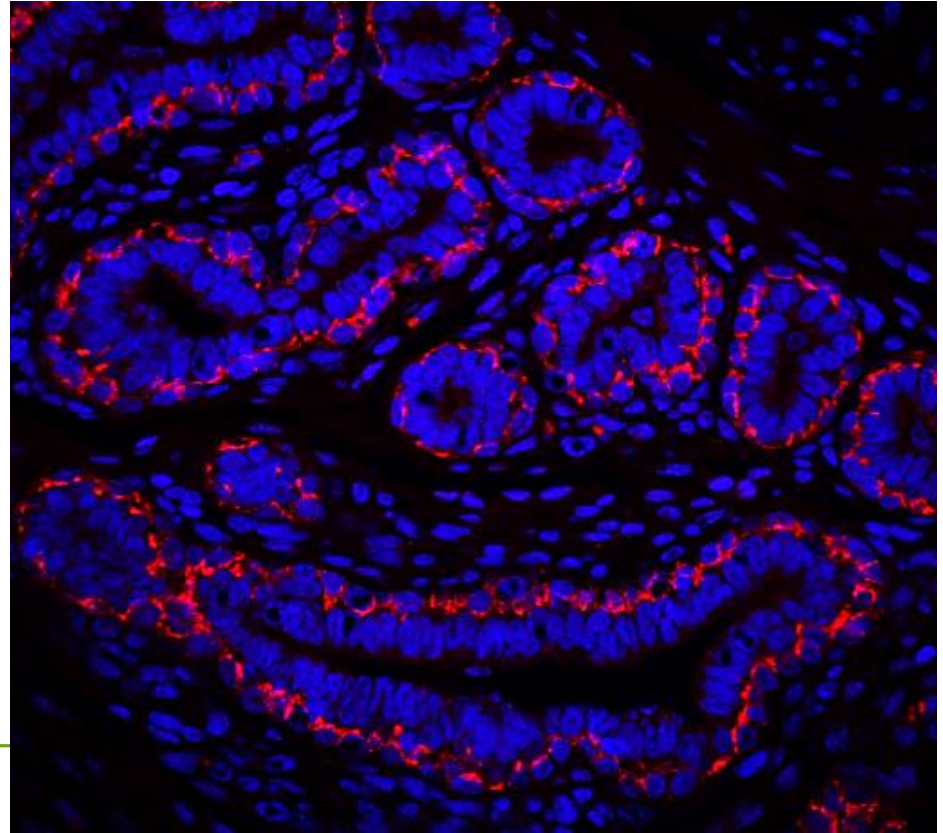




- CD24 Heat Stable Antigen

*Protéine impliquée dans la prolifération  
l'adhésion des cellules (exprimée par  
cellules prolifératives / associée à  
cellules souches et progénitrices)*



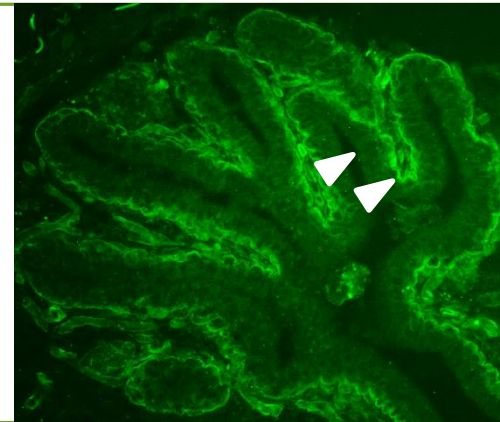


- 
- CD10      Métallo-endorpeptidase  
                  membranaire

*Protéine exprimée par les cellules  
basales/myoépithéliales*

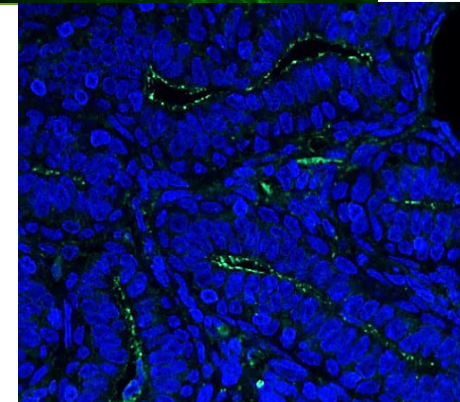
- CD49<sub>f</sub> Intégrine α6

*Protéine d'adhésion des cellules épithéliales à la matrice extracellulaire / exprimée par les cellules souches adultes mammaires*



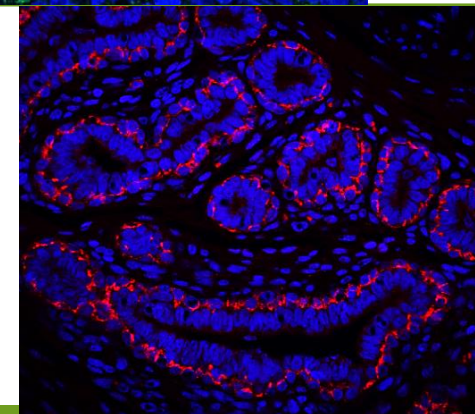
- CD24 Heat Stable Antigen

*Protéine impliquée dans la prolifération et l'adhésion des cellules (exprimée par les cellules prolifératives / associée aux cellules souches et progénitrices)*

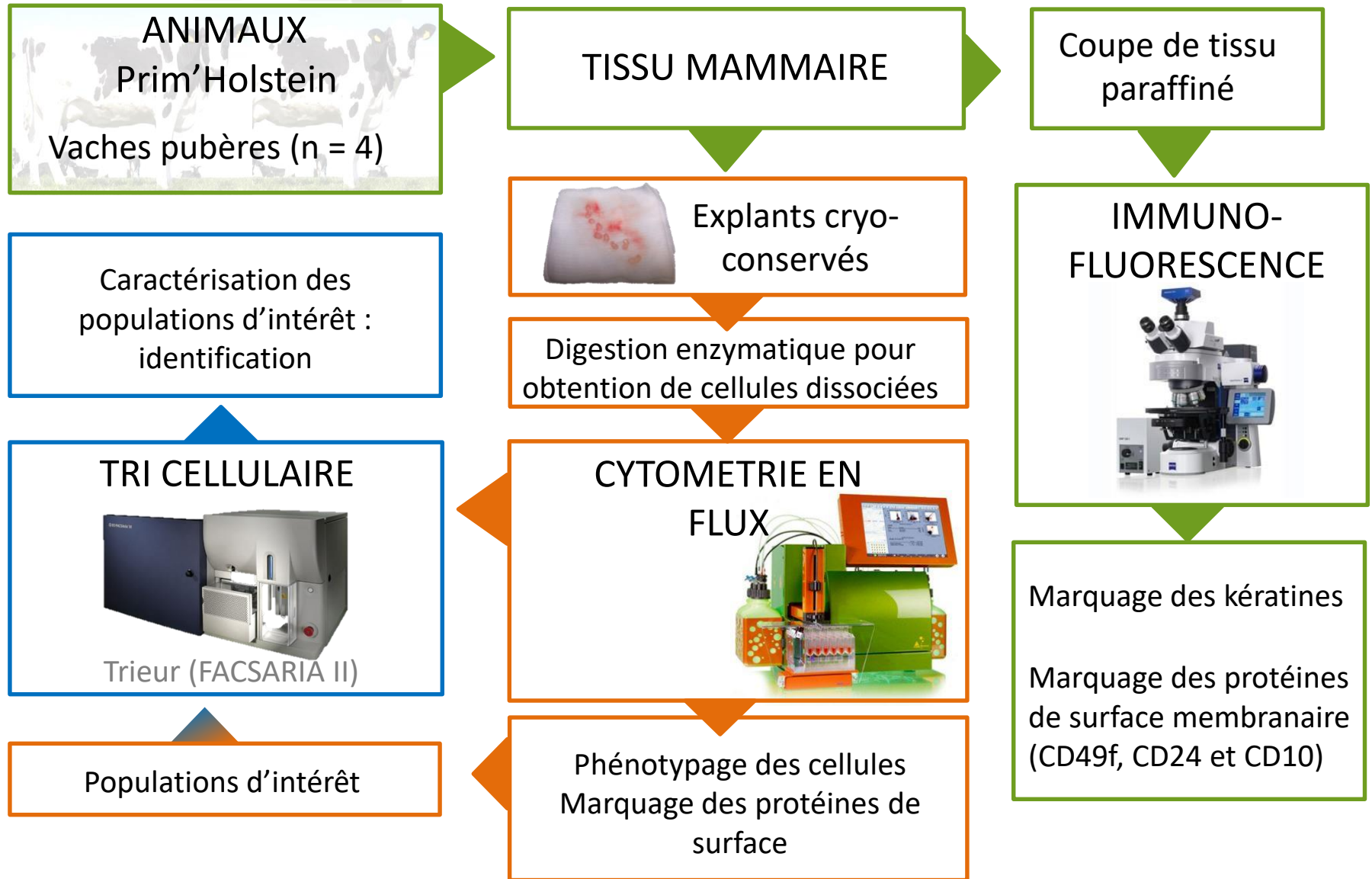


- CD10 Métallo-endorpeptidase membranaire

*Protéine exprimée par les cellules basales/myoépithéliales*

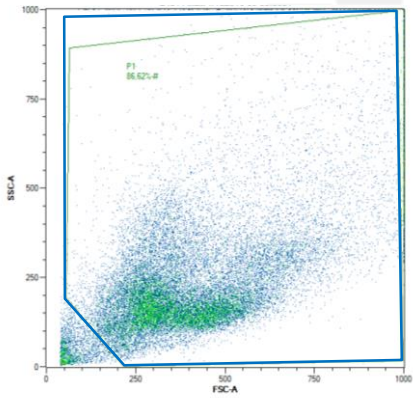


# Stratégie expérimentale : matériel & méthodes

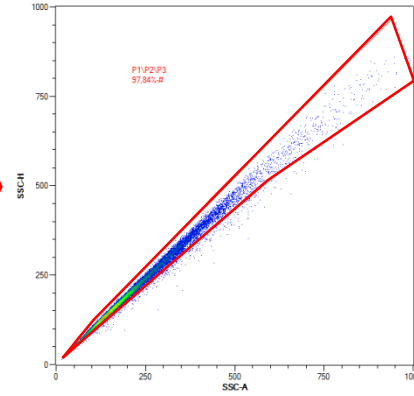
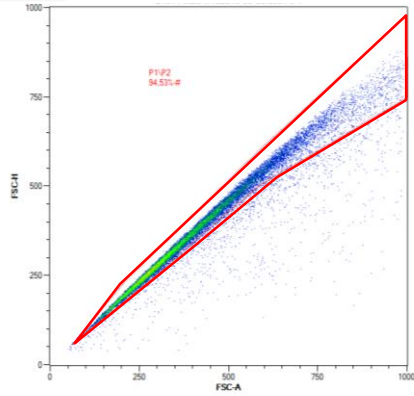


# Stratégie d'analyse en cytométrie en flux

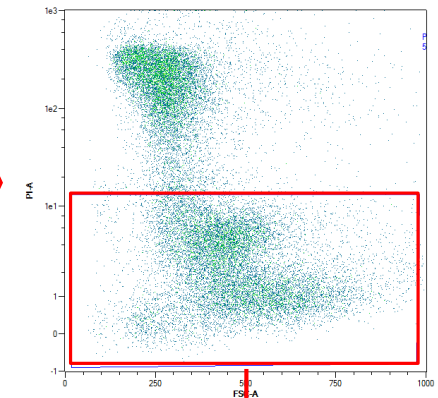
Sélection des cellules  
(exclusion des débris & particules)



Exclusion des doublets de cellules  
sur critères de taille (FSC) et de granulométrie (SSC)



Sélection des cellules vivantes  
(au Iodure de Propidium ou IP)



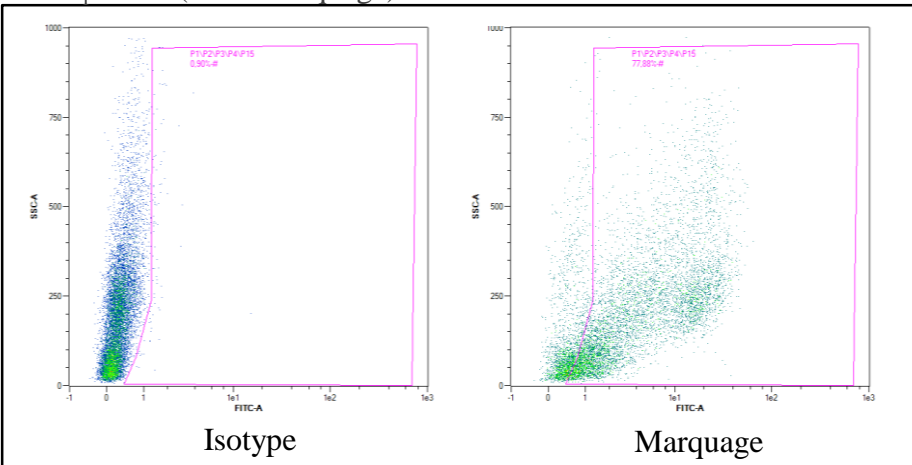
Pour les mono-marquages :

utilisation d'un isotype pour chaque marquage réalisé (anticorps)

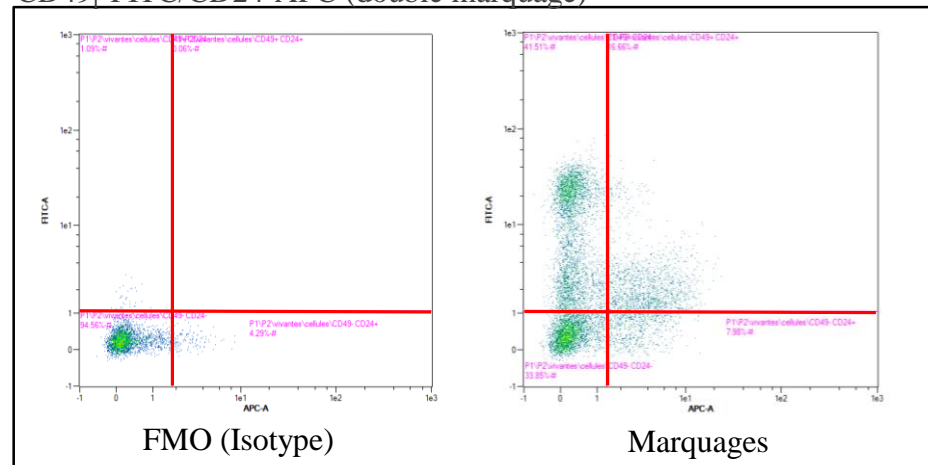
Pour les multi-marquages:

utilisation de la technique des FMO prenant en compte les isotypes

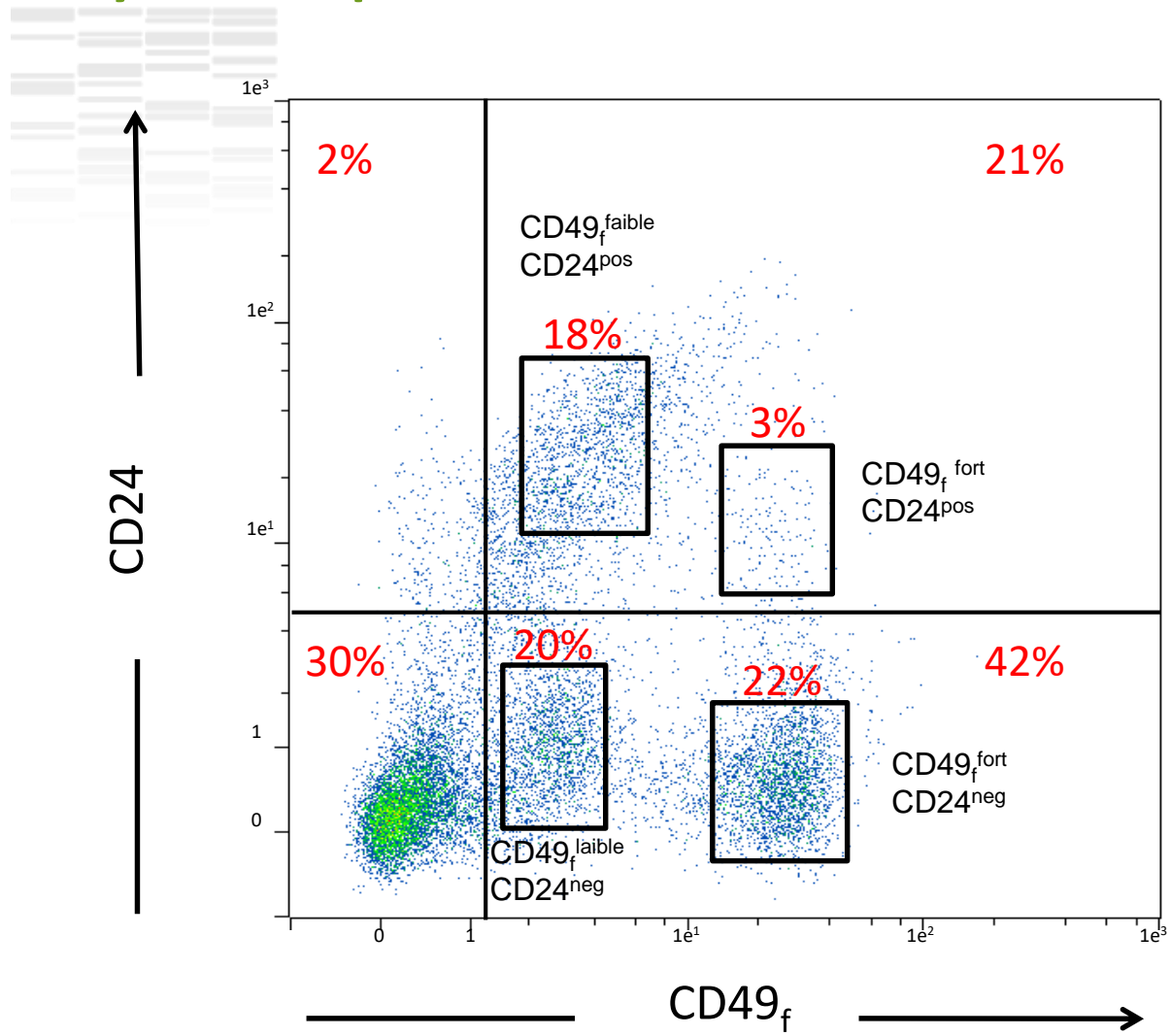
CD49<sub>f</sub>-FITC (monomarquage)



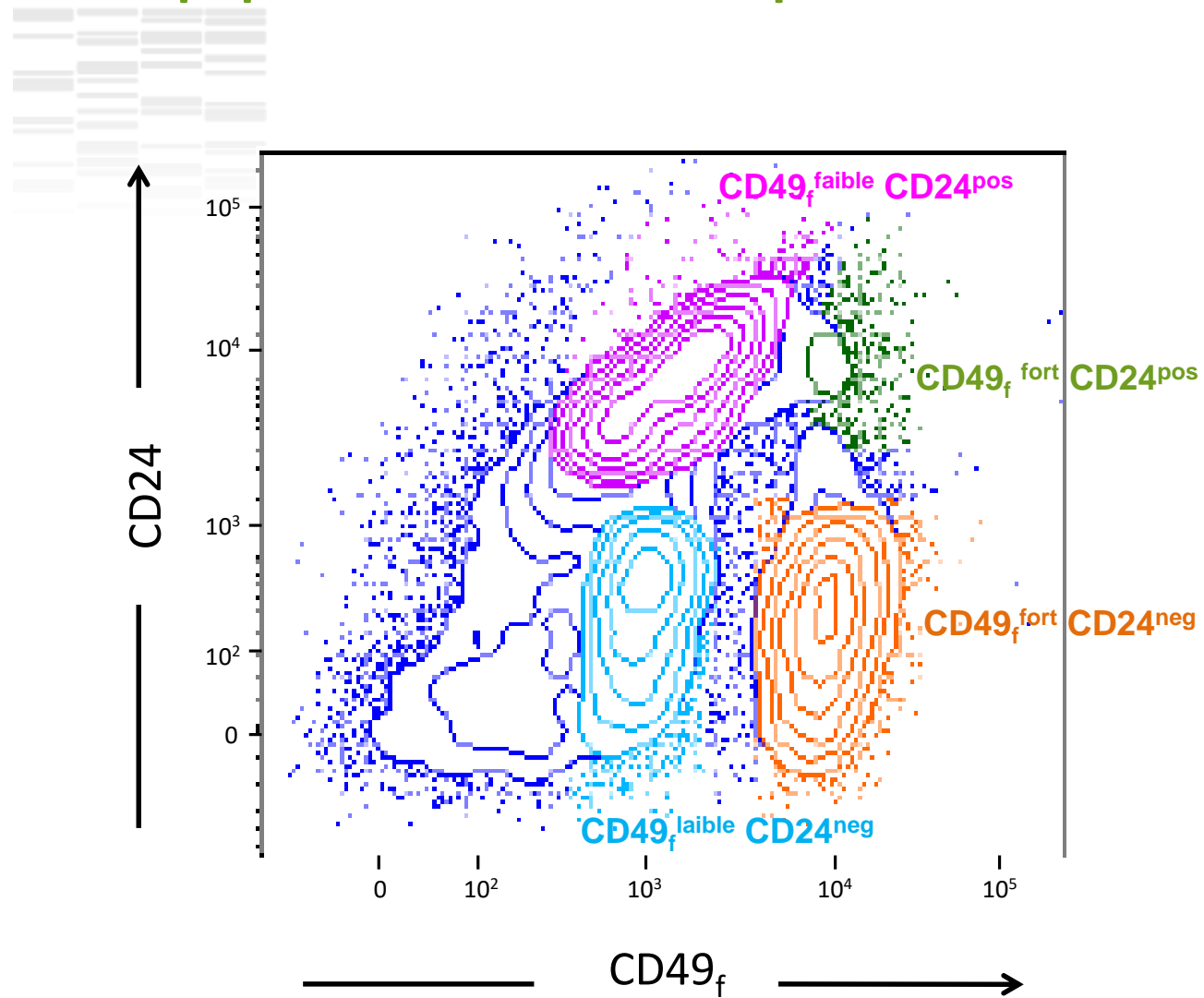
CD49<sub>f</sub>-FITC/CD24-APC (double marquage)



# Profil cytométrique des cellules mammaires à la puberté



# Tri des populations cellulaires épithéliales d'intérêt





# Les caractéristiques des populations cellulaires permettent de les identifier

**Cellules  $CD49_f^{faible} CD24^{pos}$**

Pas de mammosphère

CD10 expression

Activité ALDH1

Gènes exprimés : *KRT7, KRT18, KI67, ELF5*

**Cellules  $CD49_f^{faible} CD24^{neg}$**

Pas de mammosphère

Pas d'expression CD10

Activité ALDH1

Gènes exprimés : *KRT7, KRT18, KRT19, PR, PRLR*

**Cellules progénitrices**

**Cellules souches**

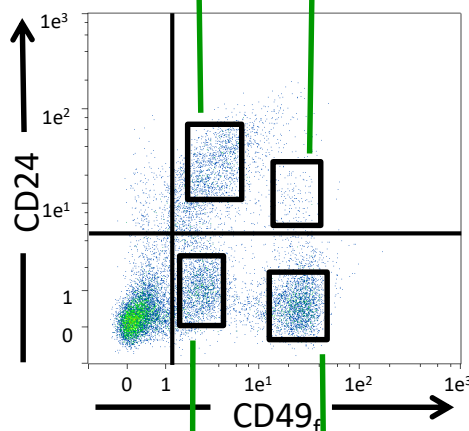
**Cellules  $CD49_f^{fort} CD24^{pos}$**

Formation de mammosphère

Forte expression de CD10

Activité ALDH1

Gènes exprimés : *KRT14, KRT7, KRT18, ELF5*



**Cellules  $CD49_f^{fort} CD24^{neg}$**

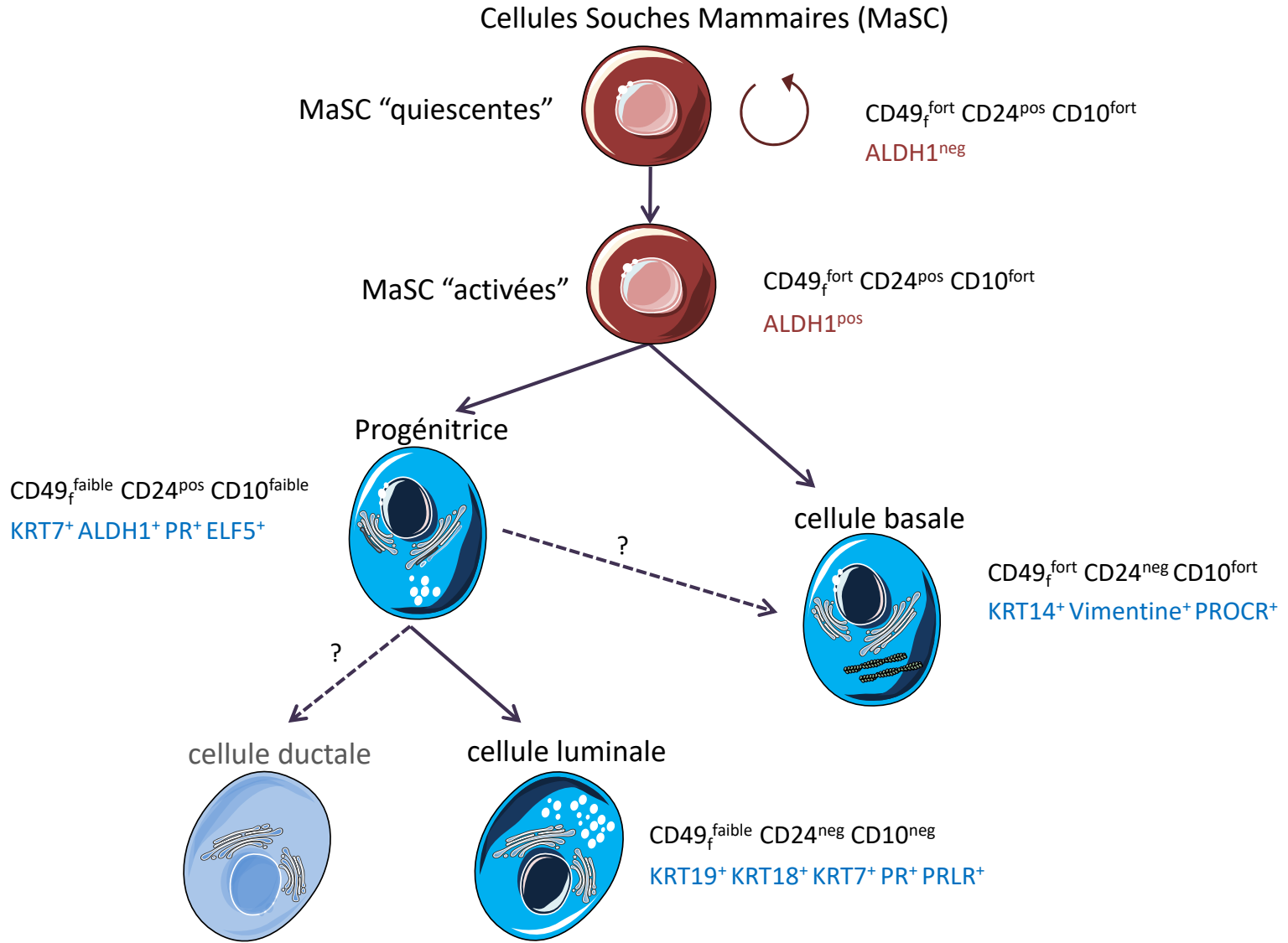
Formation de mammosphère

Forte expression de CD10

Pas d'activité ALDH1

Gènes exprimés : *KRT14, Vimentine, PROCR*

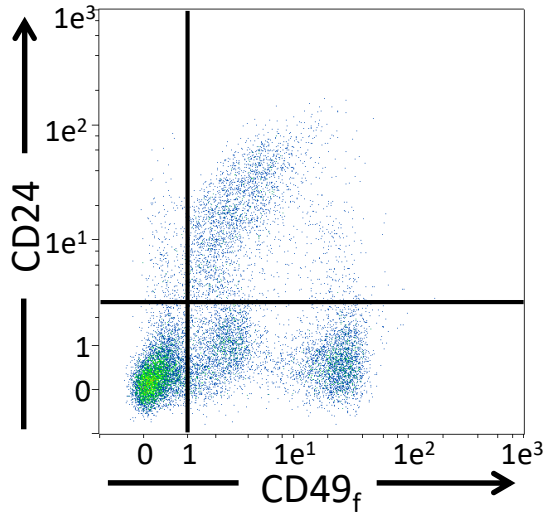
# Le lignage épithélial mammaire à la puberté chez le bovin



# Evolution des populations cellulaires épithéliales à 3 stades physiologiques clés chez la vache laitière

Vaches pubères

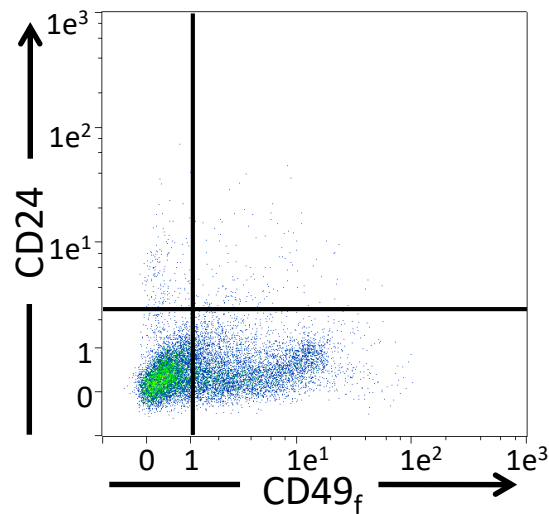
17 mois  
(n = 4)



Cellules progénitrices

Vaches en lactation

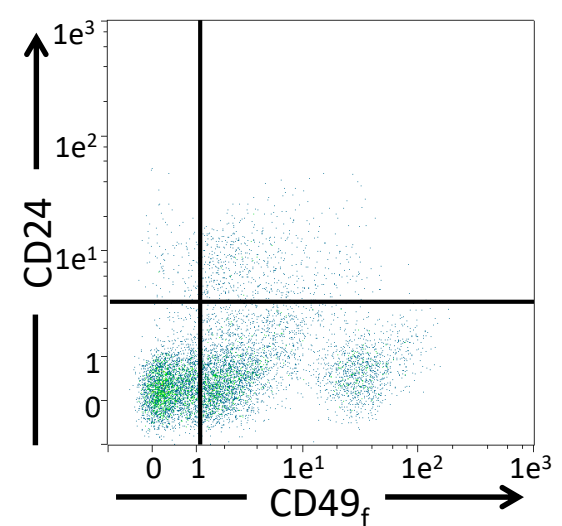
4<sup>ème</sup> lactation (35kg lait/jour)  
(n = 4)



Cellules luminales (sécrétrices)

Vaches tarées

Tarissement de 5 ans  
(n = 3)



Cellules luminales et basales

# Comparaison des populations épithéliales selon le stade physiologique

% de cellules ( $\pm$ SEM)	Puberté	Lactation	Tarissement
<b>Cellules luminales</b>			
CD49 <sub>f</sub> <sup>faible</sup> CD24 <sup>neg</sup>	19.8 ( $\pm$ 1.2)	21.2 ( $\pm$ 2.4)	28.7 ( $\pm$ 7.0)
CD49 <sub>f</sub> <sup>med</sup> CD24 <sup>neg</sup>	1.4 <sup>b</sup> ( $\pm$ 0.2)	7.2 <sup>a</sup> ( $\pm$ 1.6)	7.1 <sup>a</sup> ( $\pm$ 1.6)
<b>Cellules basales</b>			
CD49 <sub>f</sub> <sup>fort</sup> CD24 <sup>neg</sup>	22.1 <sup>a</sup> ( $\pm$ 1.6)	2.4 <sup>c</sup> ( $\pm$ 0.9)	11.7 <sup>b</sup> ( $\pm$ 1.8)
<b>Cellules progénitrices</b>			
CD49 <sub>f</sub> <sup>faible</sup> CD24 <sup>pos</sup>	18.6 <sup>a</sup> ( $\pm$ 3.4)	1.6 <sup>c</sup> ( $\pm$ 0.4)	3.0 <sup>b</sup> ( $\pm$ 0.3)
<b>Cellules souches putatives</b>			
CD49 <sub>f</sub> <sup>fort</sup> CD24 <sup>pos</sup>	3.3 <sup>a</sup> ( $\pm$ 0.3)	1.5 <sup>b</sup> ( $\pm$ 0.5)	0.4 <sup>b</sup> ( $\pm$ 0.0)

Les différences significatives ( $p < 0,05$ ) entre stades physiologiques sont indiquées par des lettres (a, b et c)

# L'approche de la cytométrie en flux...

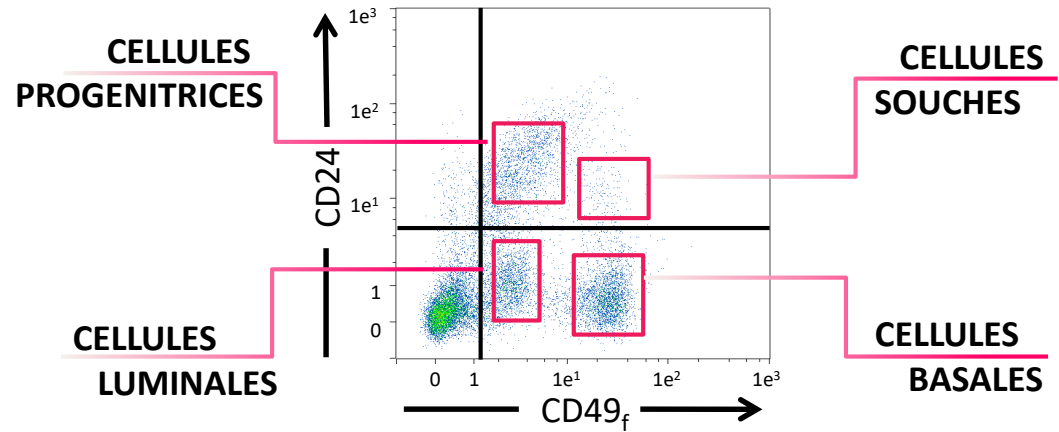
- *cytométrie en flux*



- *Tri cellulaire*



Identifier / caractériser les populations épithéliales



OUTIL de PHENOTYPAGE des cellules épithéliales

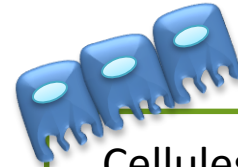
*Identifier le type de cellules épithéliales*

# Approches complémentaires pour étudier les cellules mammaires en agronomie



*In vivo / Ex vivo*

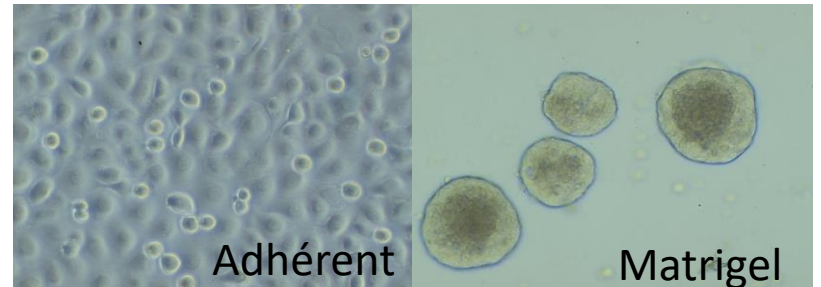
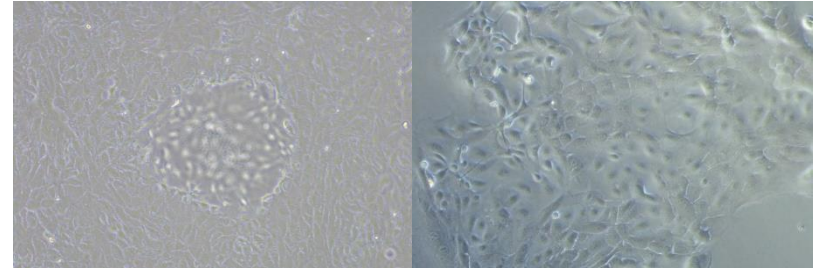
Tissu / biopsie de glande mammaire



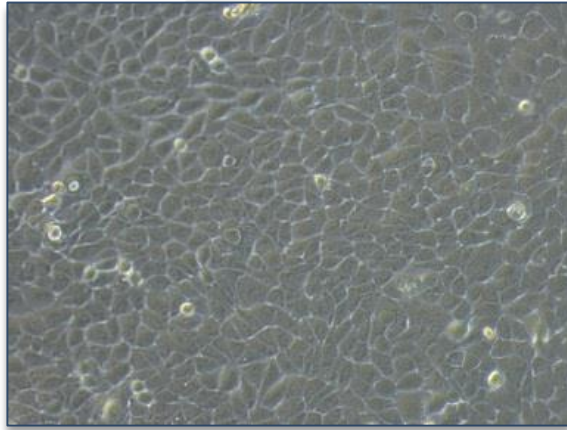
*In vitro*

Cellules dissociées (culture primaire)

Lignées cellules épithéliales mammaires

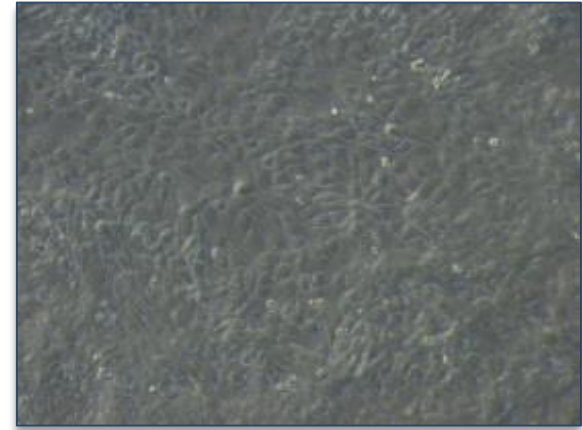


# Les deux lignées cellulaires épithéliales mammaires bovines



(MAC-T)

(Holstein en lactation-gravide)<sup>(1)</sup>



(BME-UV1)

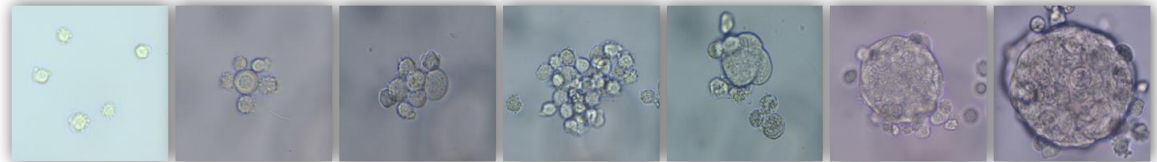
(Holstein en lactation)<sup>(2)</sup>

Sélection (clonale) d'après caractéristiques morphologiques typiques épithéliales  
Cellules (avant transfection) cultivées en adhérentes  
Expression faible des caséines

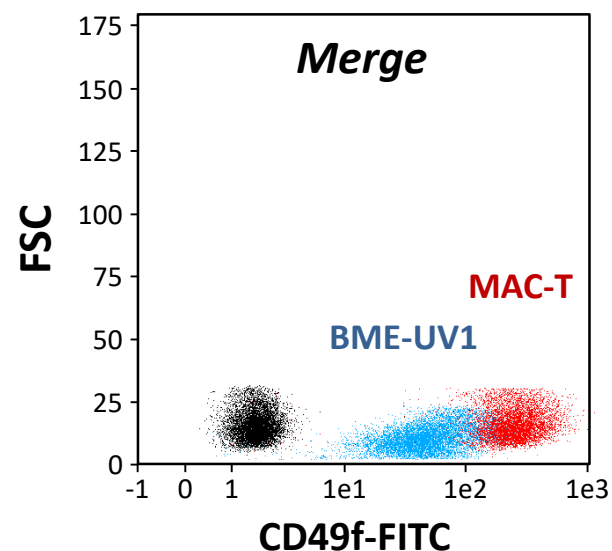
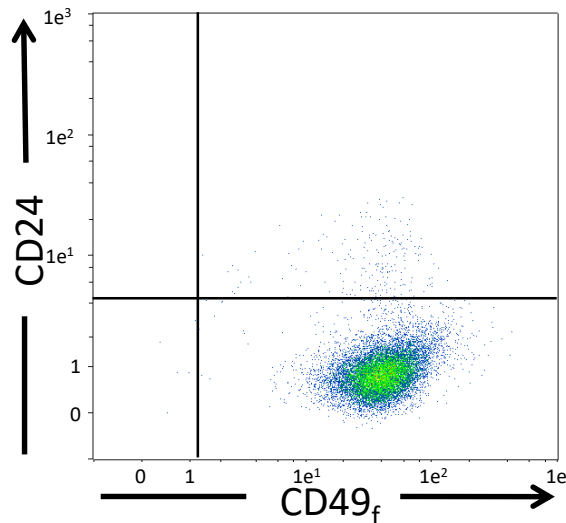
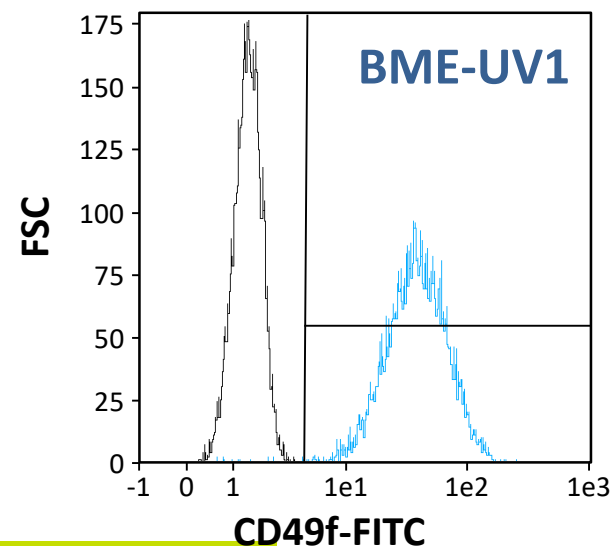
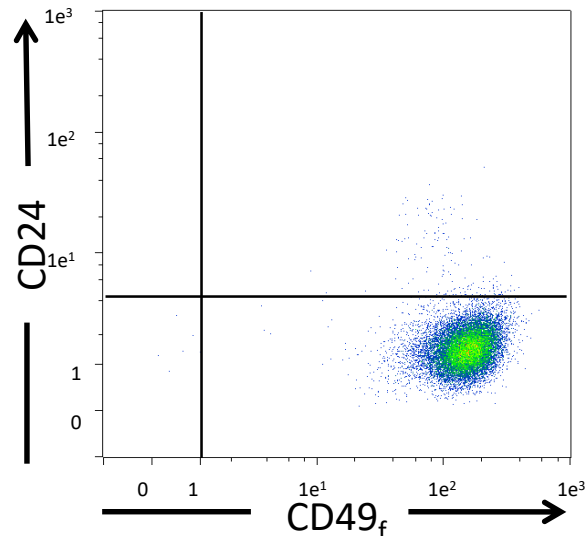
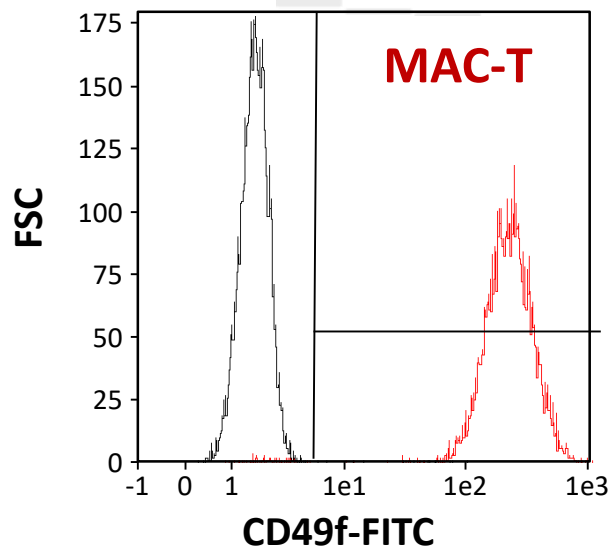
Condition **2D** (adhérent)



Conditions **3D** (Matrigel ou ULA)

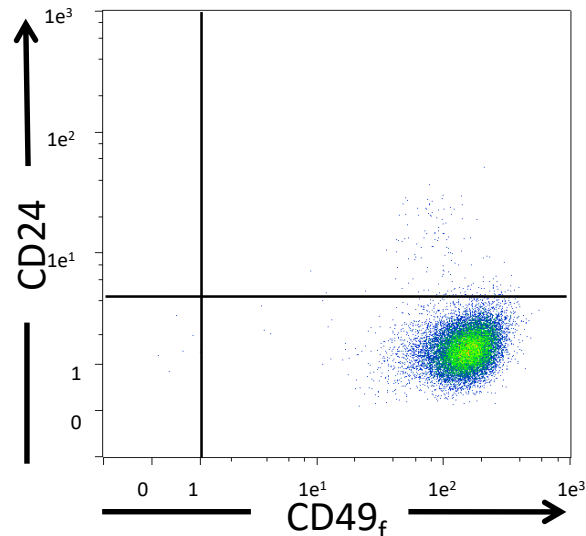
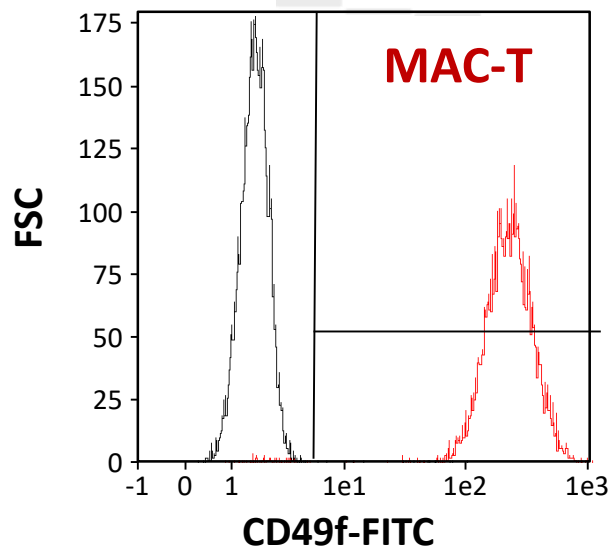


# Confirmation du phénotypage des lignées de cellules épithéliales mammaires bovines

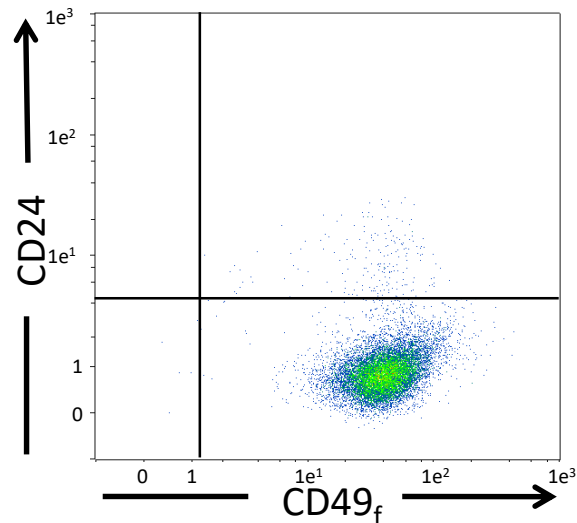
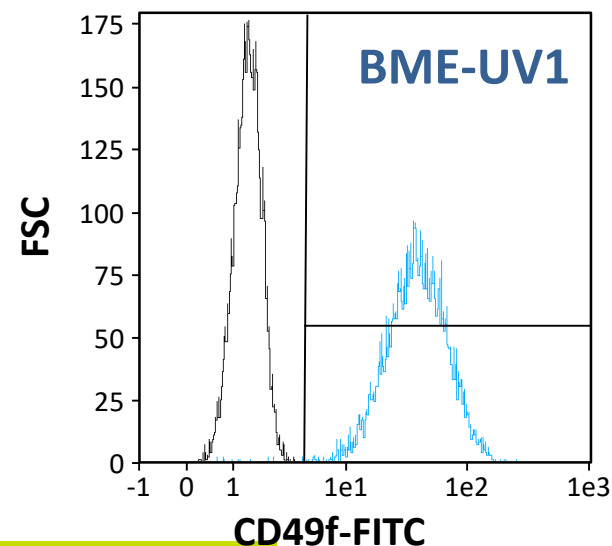




# Confirmation du phénotypage des lignées de cellules épithéliales mammaires bovines



**MAC-T**  
CD49f<sup>fort</sup> CD24<sup>neg</sup>  
Lignées de cellules  
basales



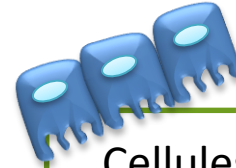
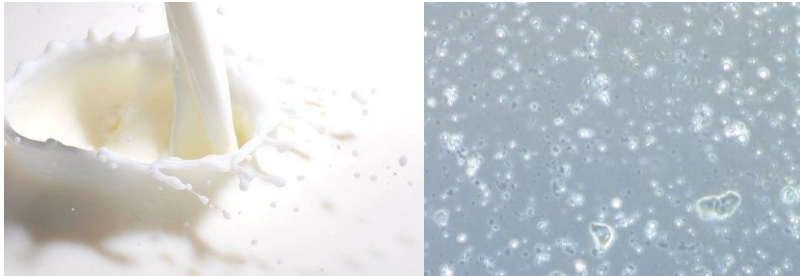
**BME-UV1**  
CD49f<sup>med</sup> CD24<sup>neg</sup>  
Lignées de cellules  
luminales

# Récupérer les cellules épithéliales dans le lait pour étudier les cellules mammaires



*In vivo / Ex vivo*

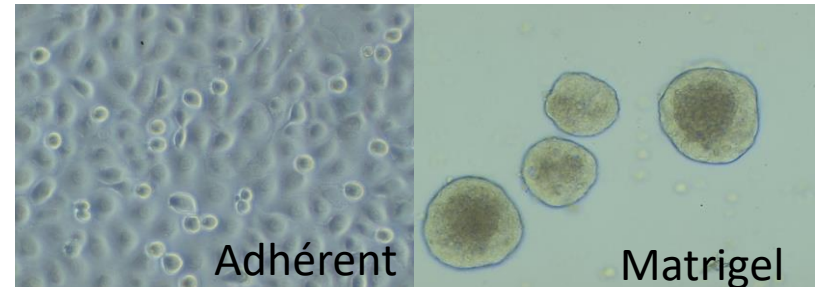
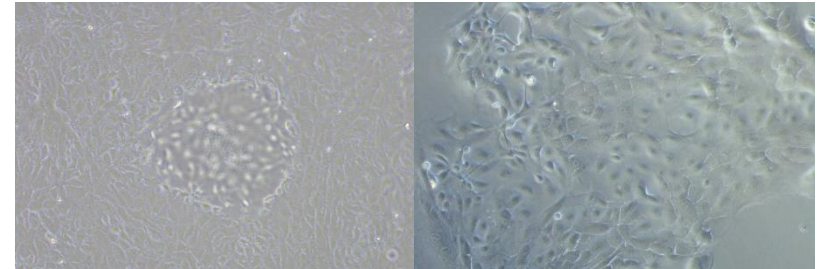
Cellules du lait



*In vitro*

Cellules dissociées (culture primaire)

Lignées cellules épithéliales mammaires



Adhérent

Matrigel

# Distinction des cellules épithéliales parmi les cellules totales du lait

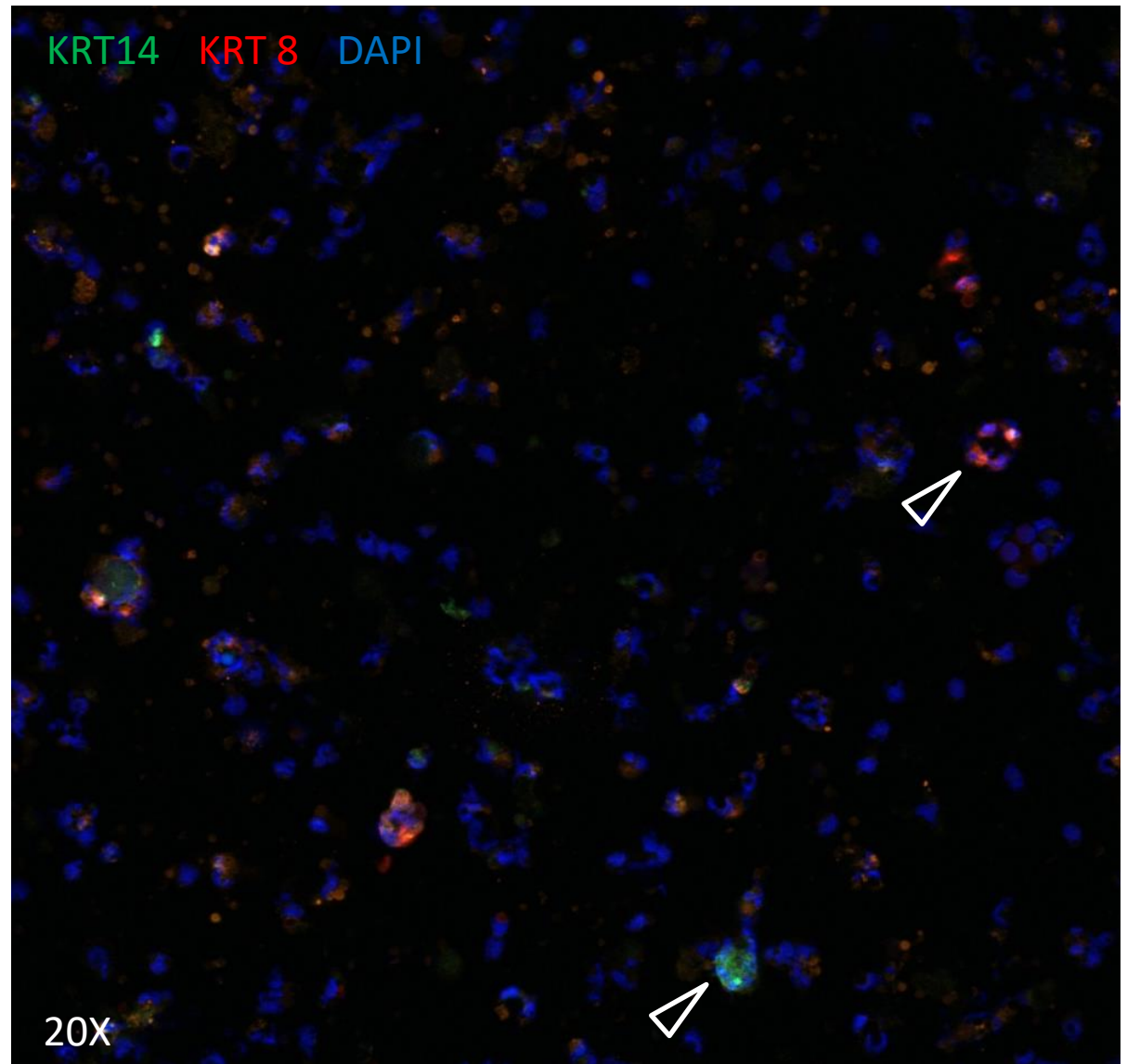


ImmunoFluorescence :

cellules basales (KRT14)  
cellules luminales (KRT8)

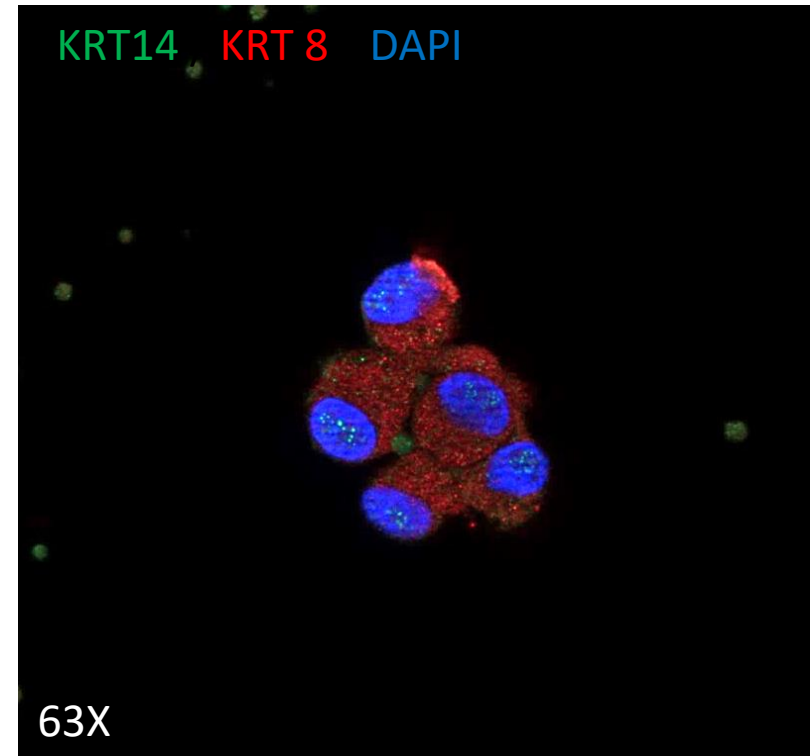
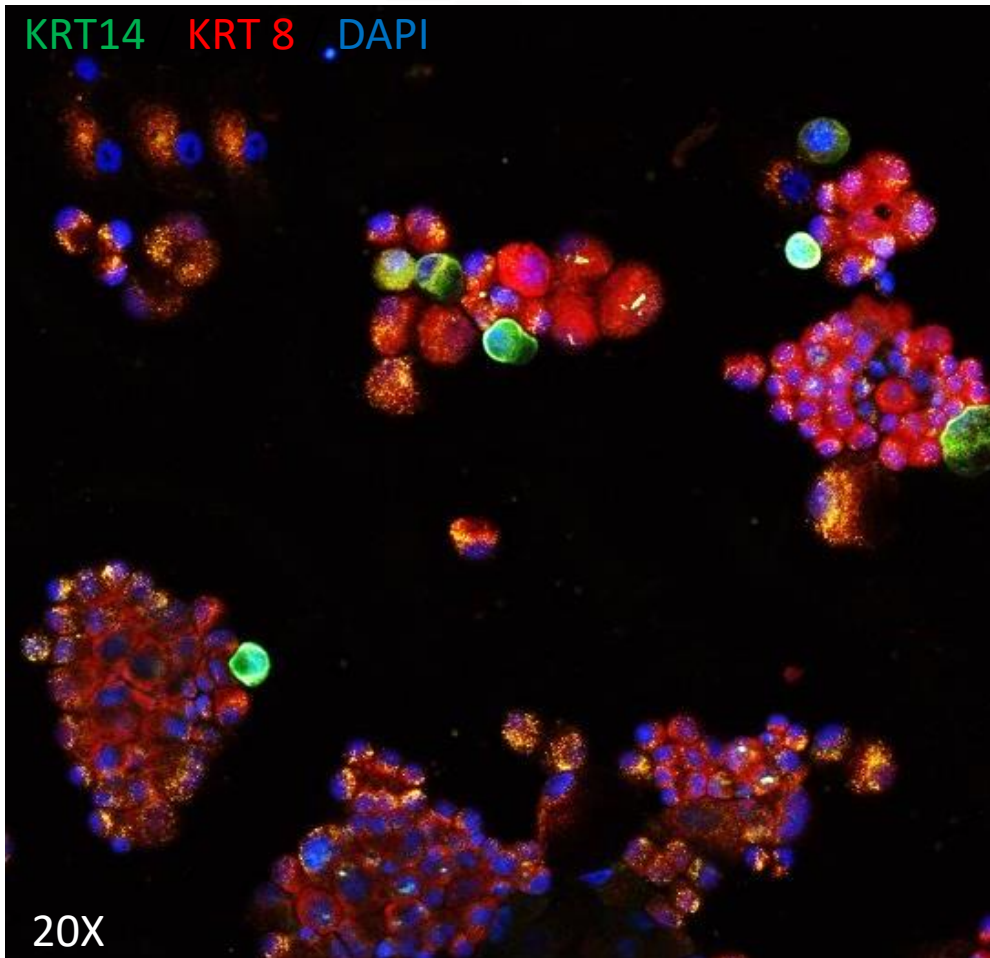
Peu de cellules épithéliales

Cellules luminales, basales?

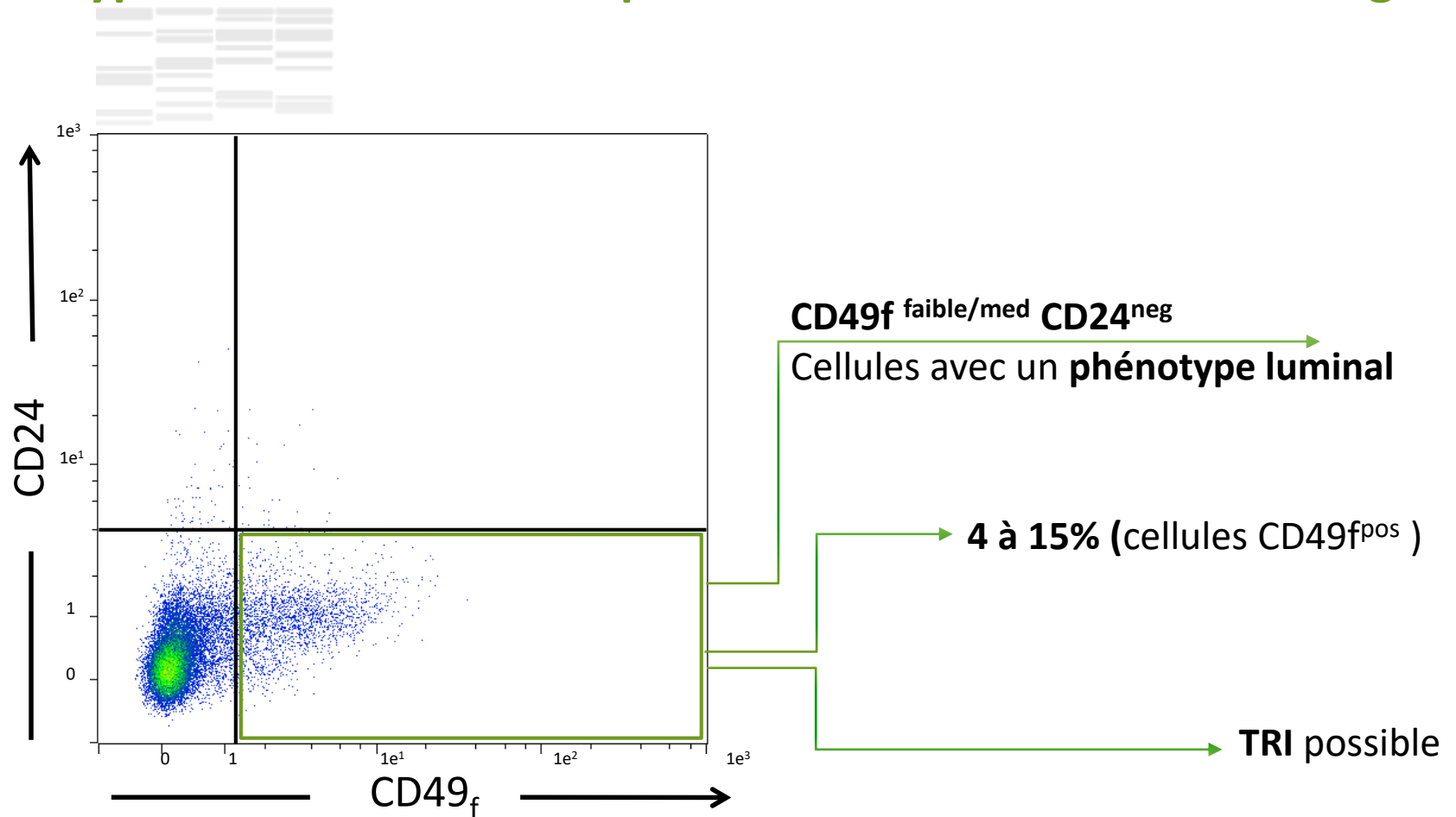


# Les cellules épithéliales du lait sont majoritairement des cellules luminales

Après culture en support adhérent des cellules totales du lait



# Phénotyper les cellules du lait pour maîtriser son échantillonnage



CD49f faible/med CD24<sup>neg</sup>  
Cellules avec un phénotype luminal

4 à 15% (cellules CD49f<sup>pos</sup>)

TRI possible

## En conclusion

### La cytométrie en flux :

- Mise en évidence des populations épithéliales : proposition d'un lignage épithélial mammaire chez la vache laitière
- Etude de la dynamique des populations épithéliales (stades physiologiques : puberté, lactation, tarissement)

*Compléter l'étude de la dynamique des populations avec d'autres stades physiologiques tels que la mammogénèse (pré-puberté, gestation) ou les périodes entre tarissement/lactation*

- Développer un outil de phénotypage des cellules épithéliales

*Immortaliser les différentes populations épithéliales (basales, progénitrices, luminales, souches) après tri : outil biologique*

UMR PEGASE (St-Gilles) : collègues et collaborateurs

Plateformes BIOSIT de RENNES :

CytomeTRI (G. Lacombe et L. Deleurme)

Génomique Environnementale et Humaine (GEH)

Installation Expérimentale de Méjusseaume

*Merci*

