



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-02299629>

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.

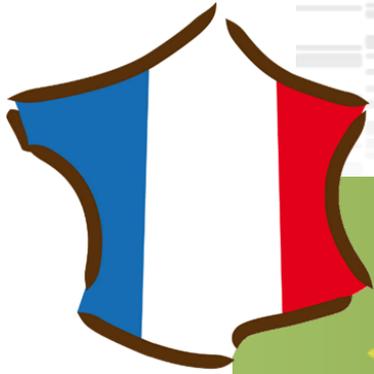
L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



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



2nd pays producteur de lait dans l'UE



La Bretagne : 1^{er} bassin laitier en France

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



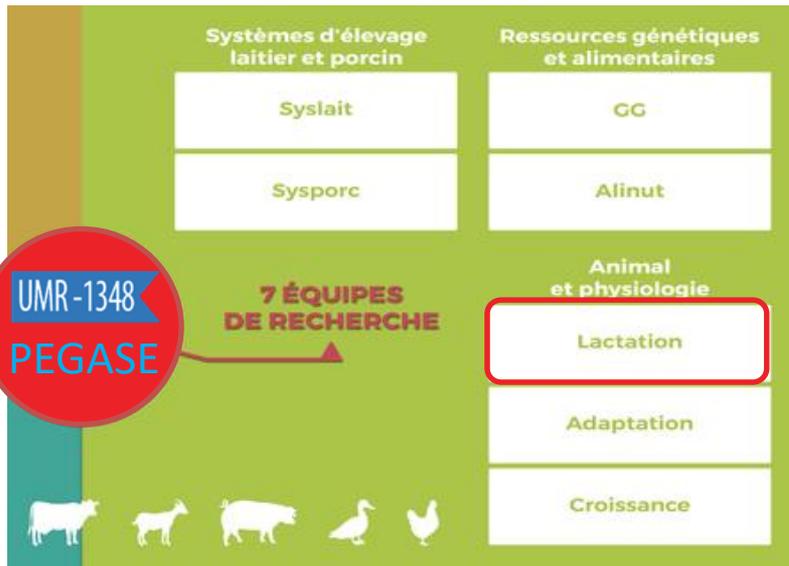
83% du lait produit : lait de vache

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)

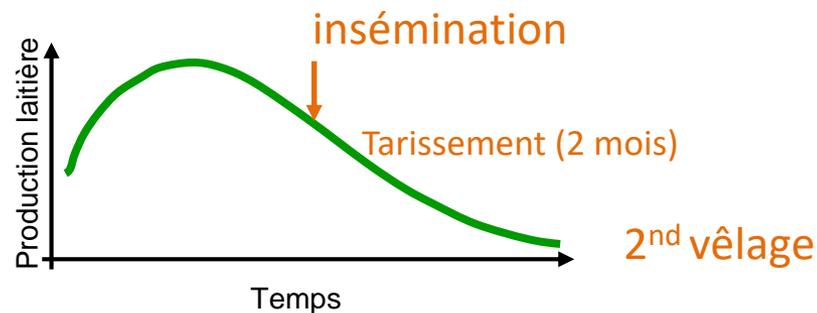
1^{er} vêlage

Première lactation

2^{de}

← Animal en croissance → ← Lactation → ← Lactation

- Maturité sexuelle: 10 mois
- Age à la 1^{ère} insémination: 13 mois
- Gestation: 9 mois
- Age au 1^{er} vêlage: 26 mois



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

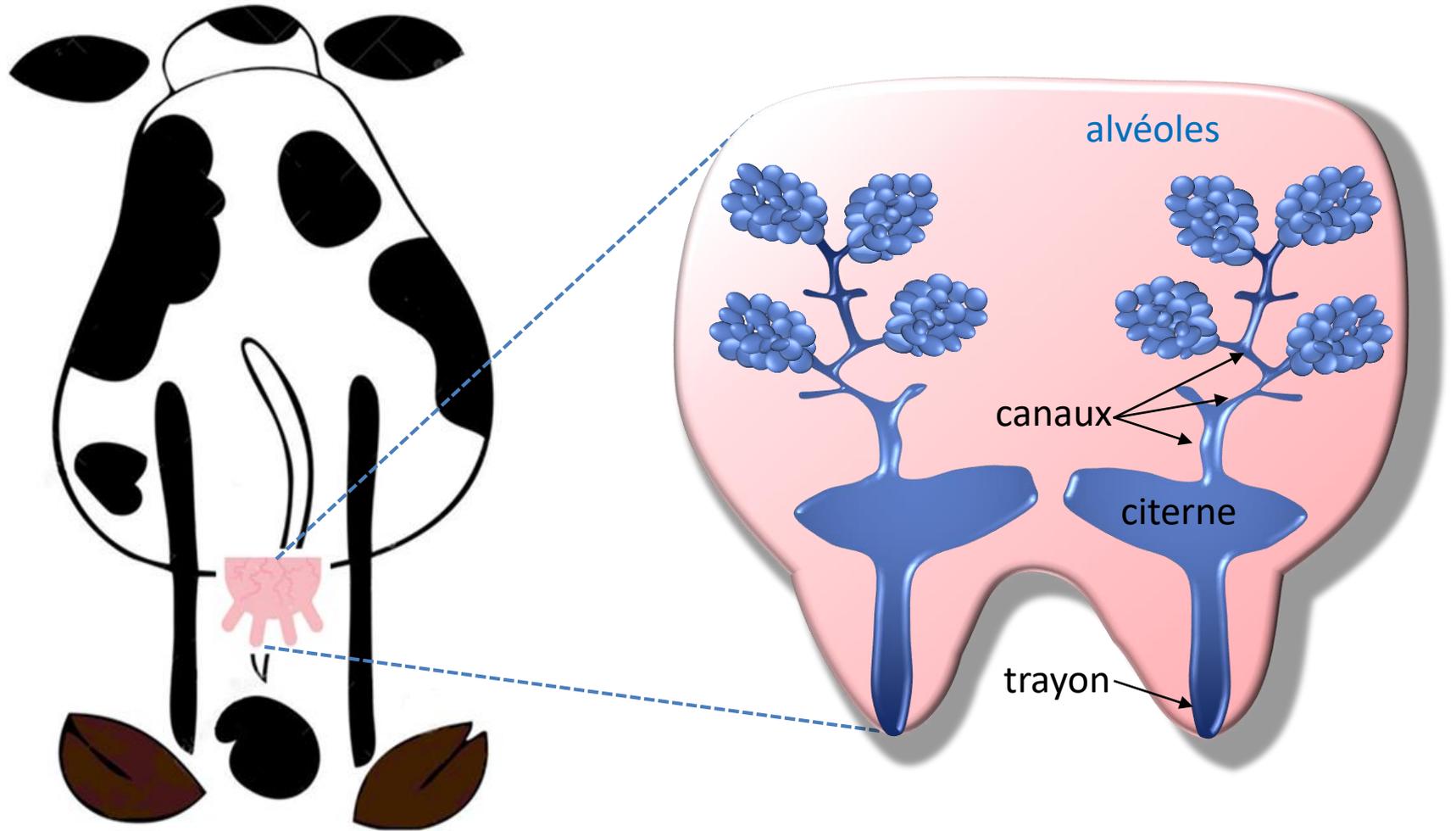
Naissance

26 mois

36 mois

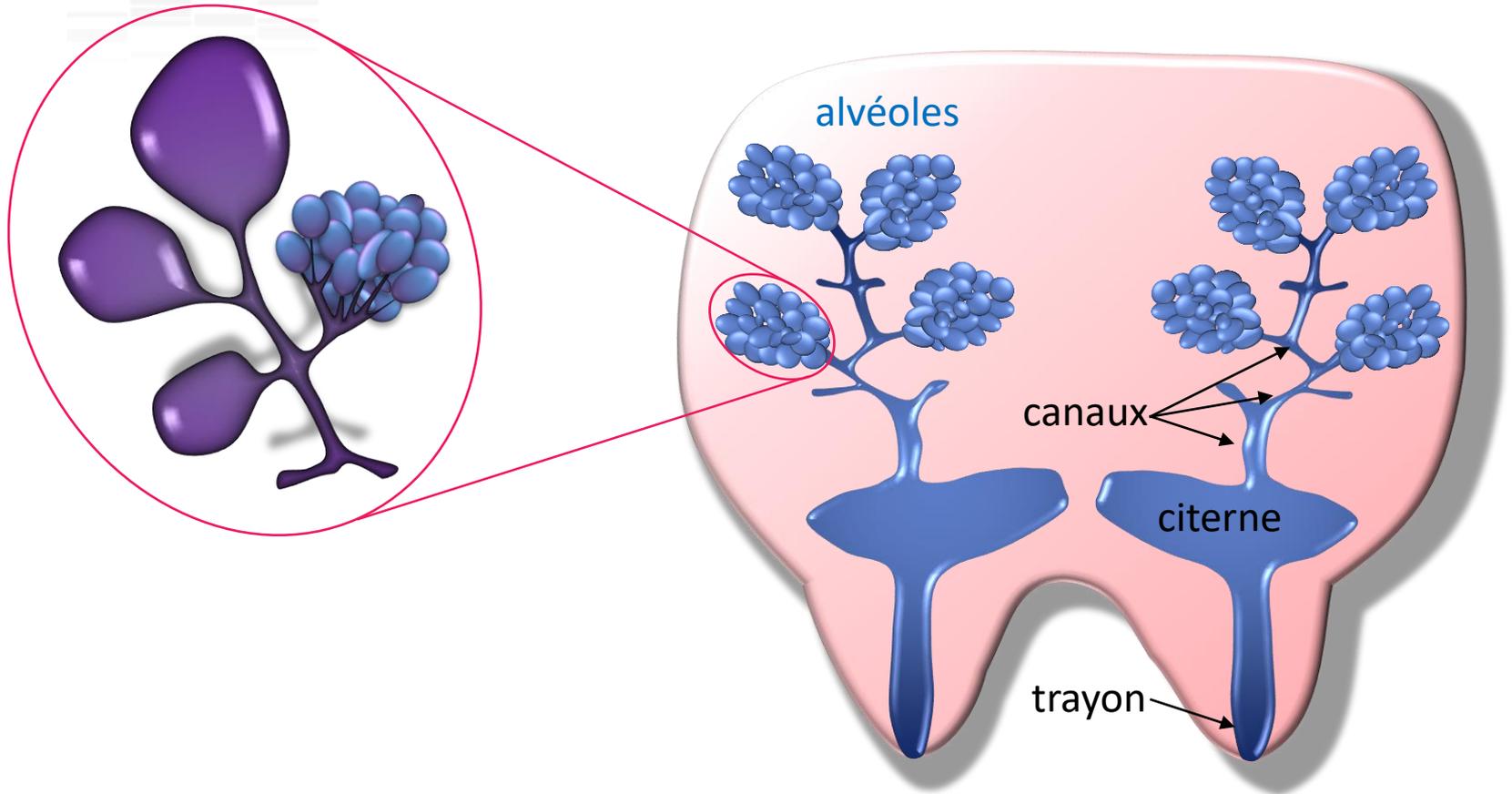
Age

La glande mammaire : organe central de la lactation

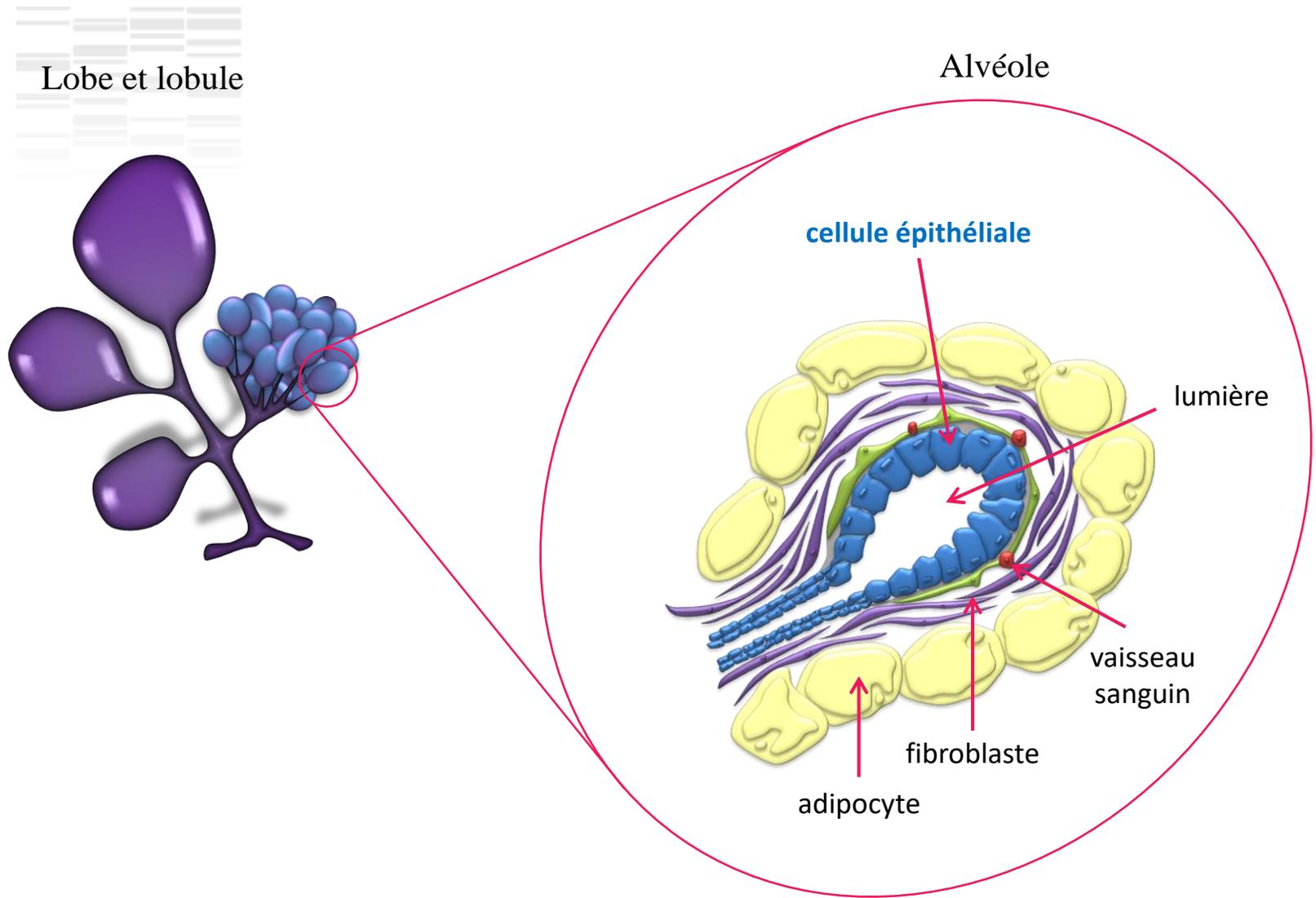


La glande mammaire : organe central de la lactation

Lobe et lobule



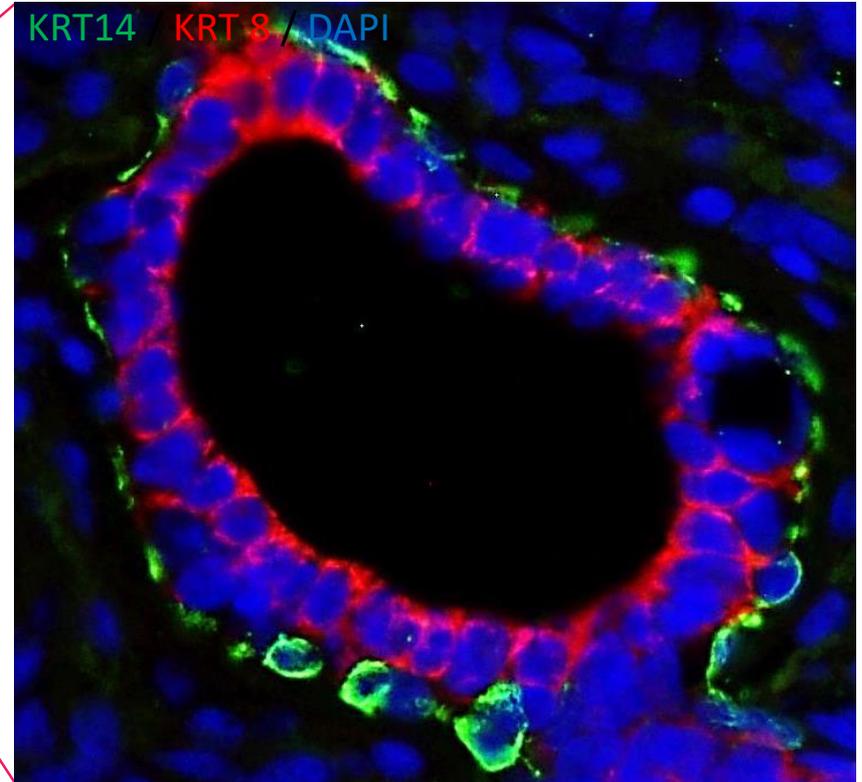
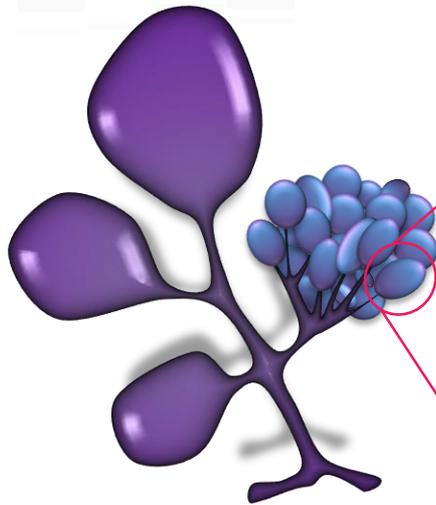
La glande mammaire : organe central de la lactation



La glande mammaire : organe central de la lactation

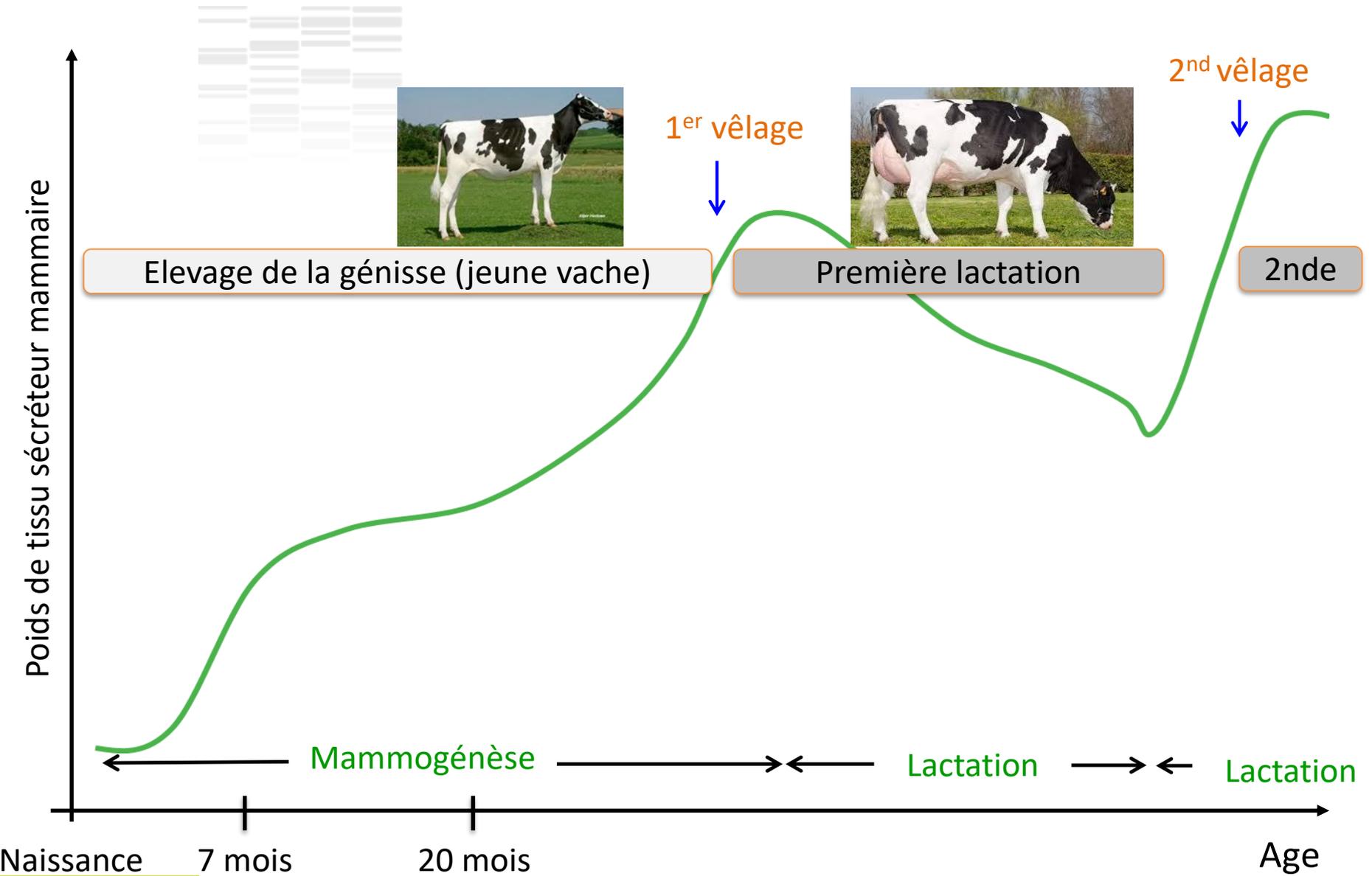
Lobe et lobule

Alvéole

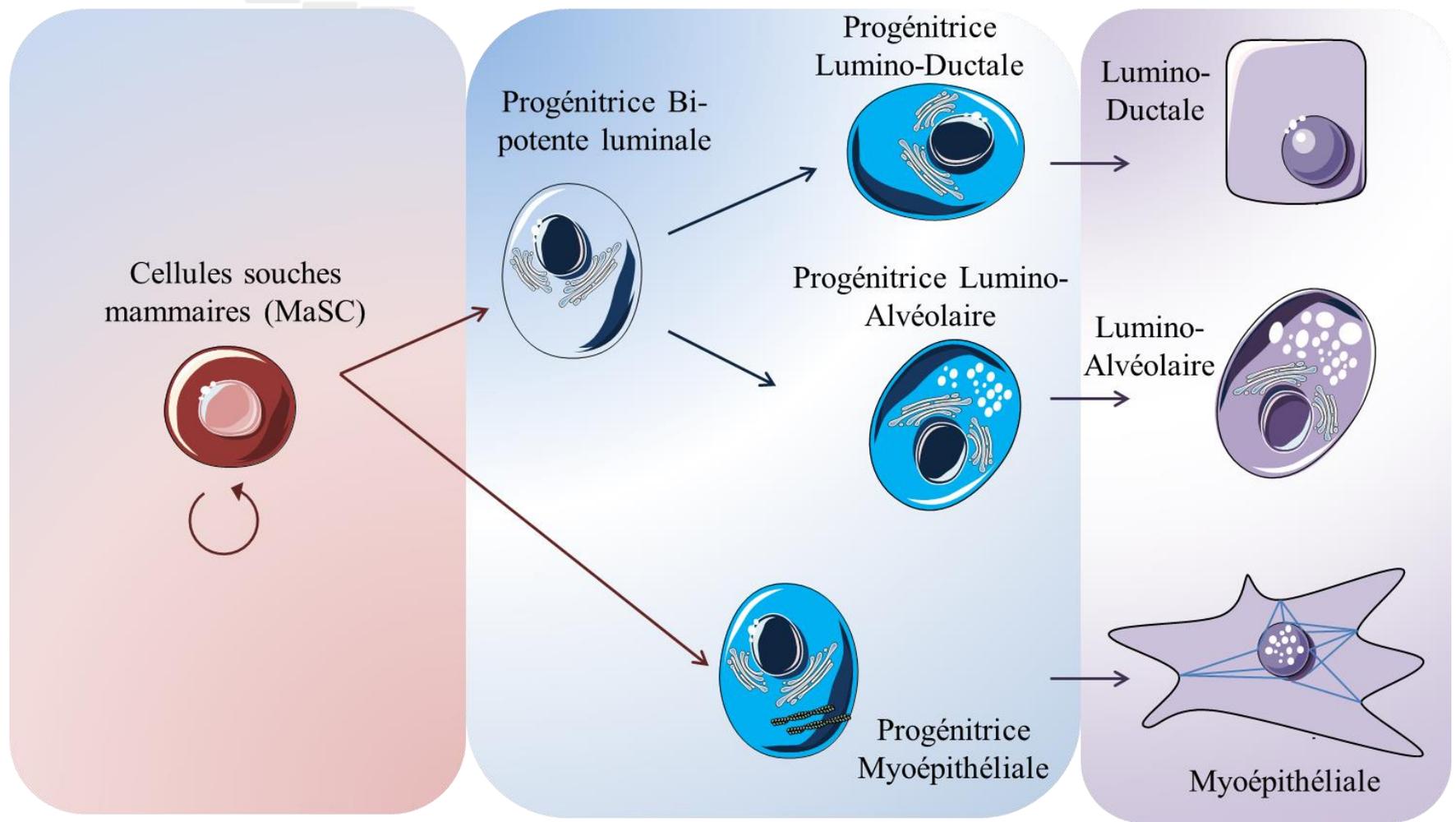


D'après Finot, 2018

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



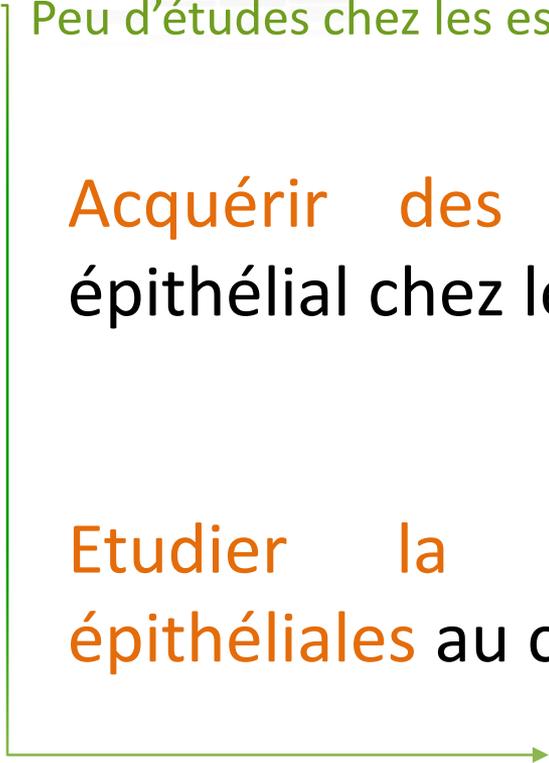
Le lignage épithélial : enjeu pour la recherche en Agronomie



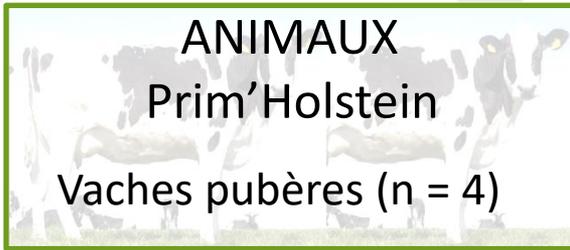
Peu d'études chez les espèces de rente (vaches)

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)

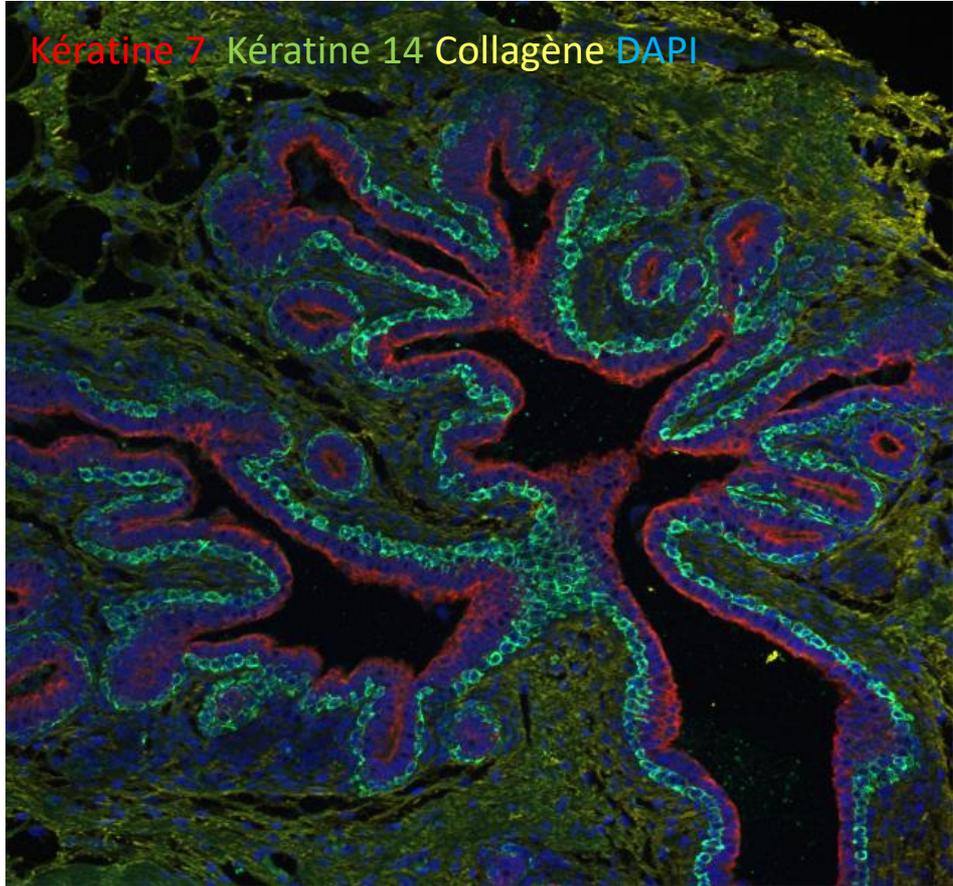
TISSU MAMMAIRE

Coupe de tissu
paraffiné

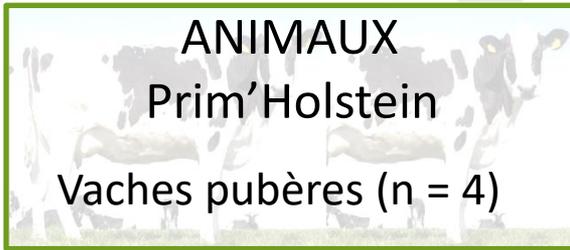
IMMUNO-
FLUORESCENCE



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



Stratégie expérimentale : matériel & méthodes



TISSU MAMMAIRE

Coupe de tissu
paraffiné

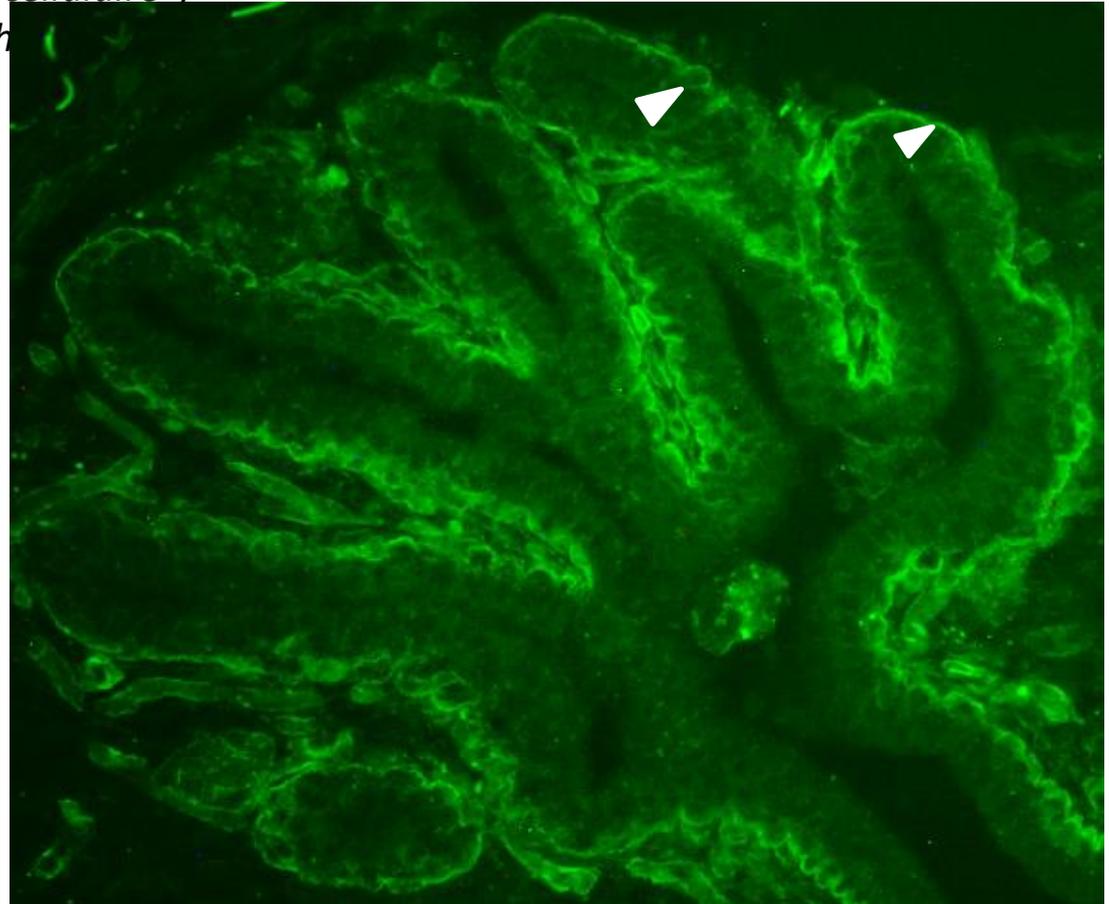


Marquage des kératines

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

- CD49_f Intégrine $\alpha 6$

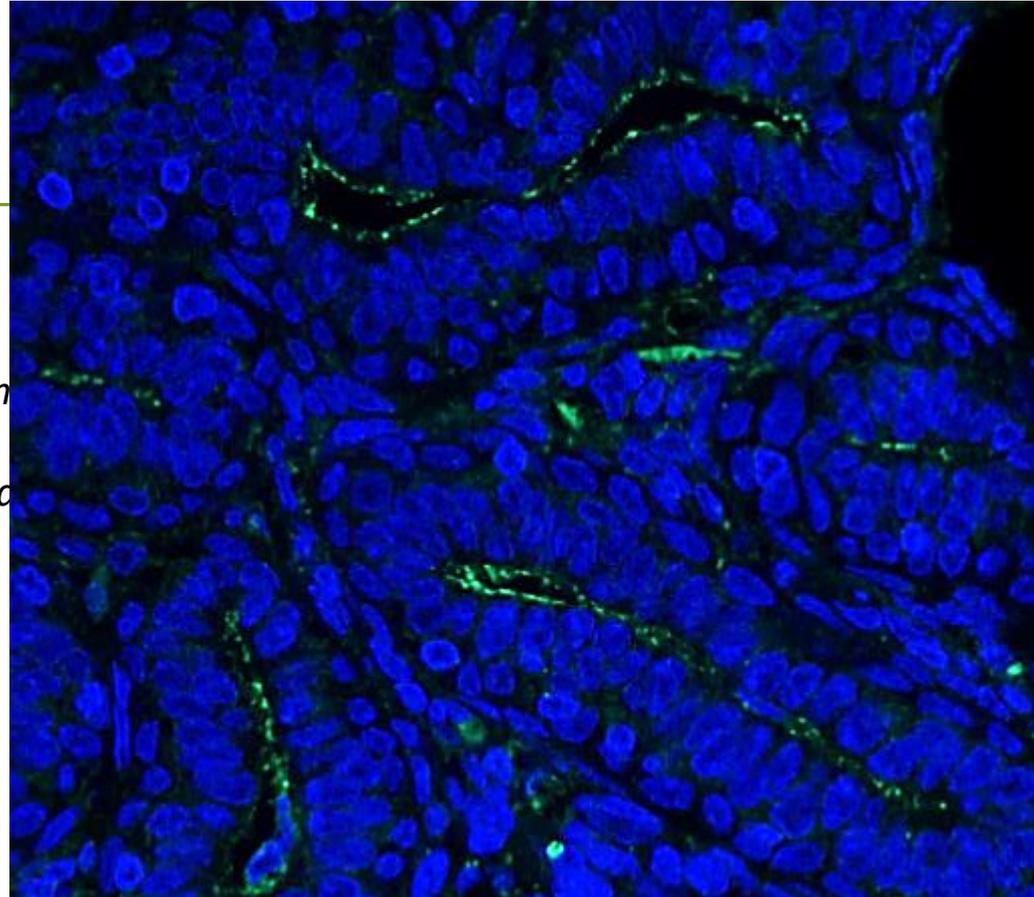
Protéine d'adhésion des cellules épithéliales à la matrice extracellulaire / exprimée par les cellules souches mammaires

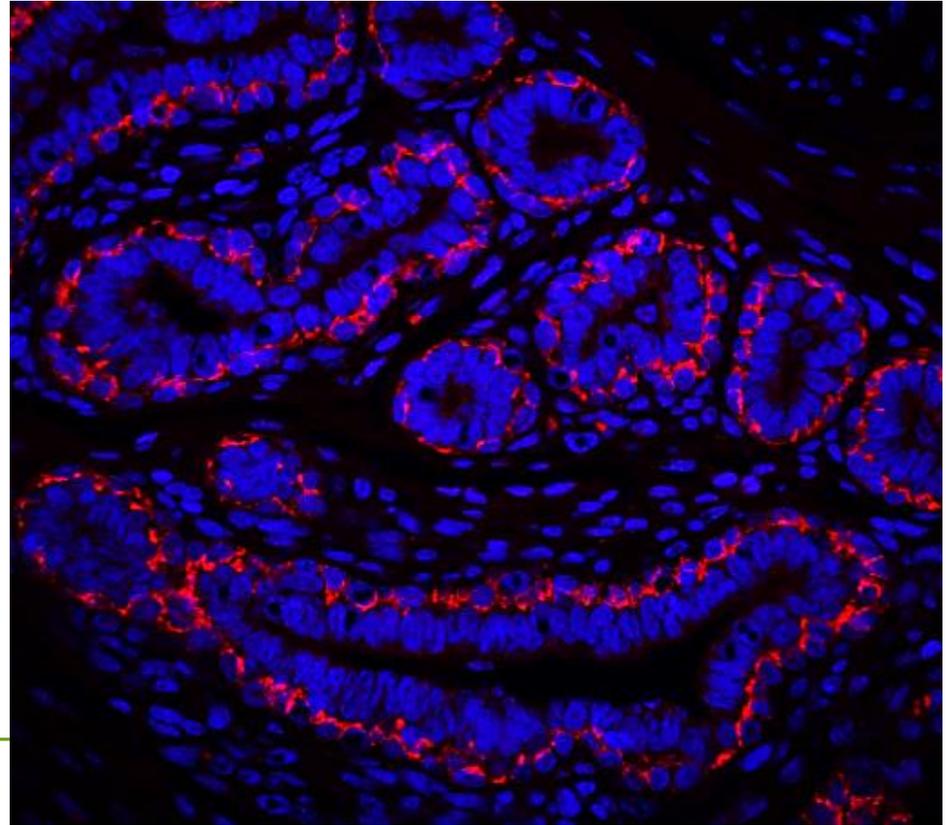




- CD24 Heat Stable Antigen

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



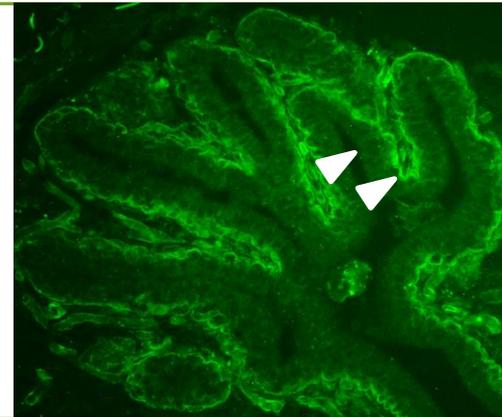


-
- CD10 Métallo-endorpeptidase
 membranaire

*Protéine exprimée par les cellules
basales/myoépithéliales*

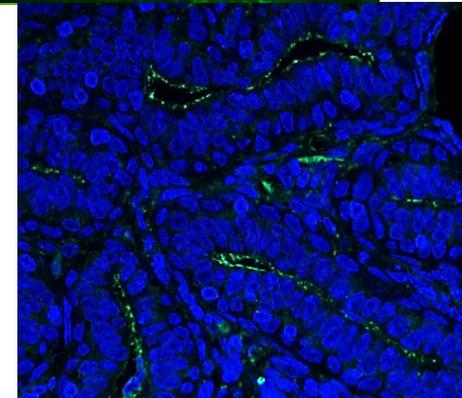
- CD49_f Intégrine α6

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



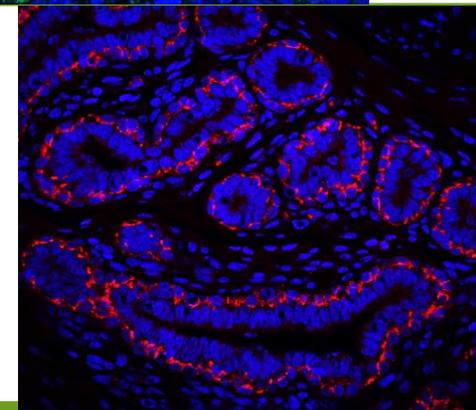
- CD24 Heat Stable Antigen

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

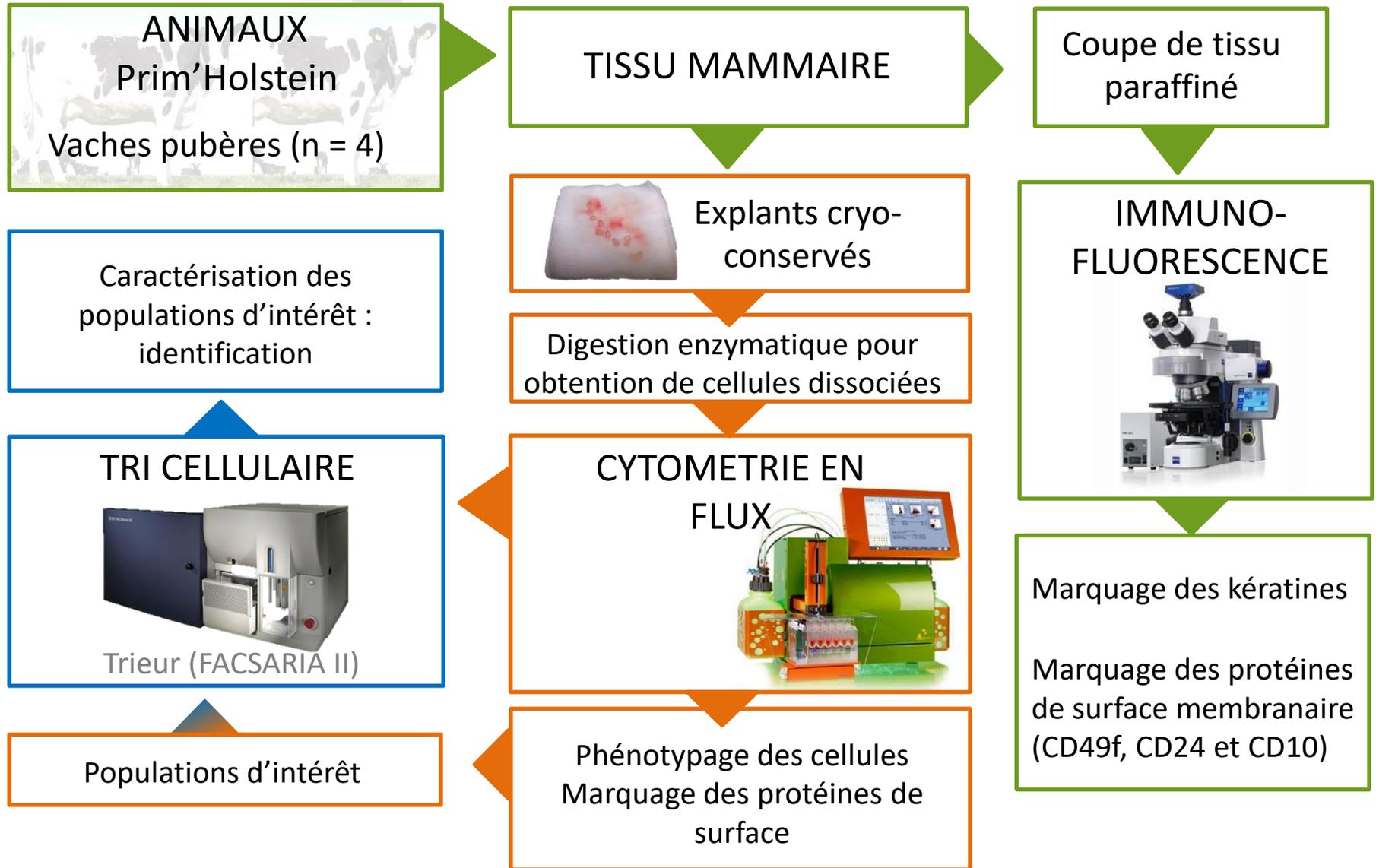


- CD10 Métallo-endorpeptidase membranaire

Protéine exprimée par les cellules basales/myoépithéliales

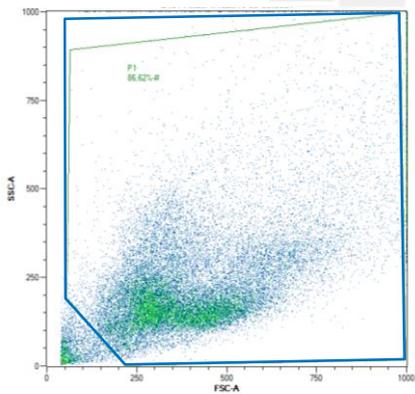


Stratégie expérimentale : matériel & méthodes

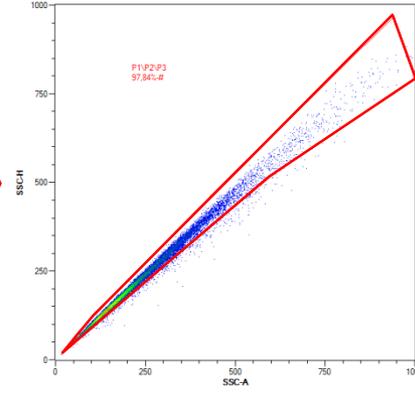
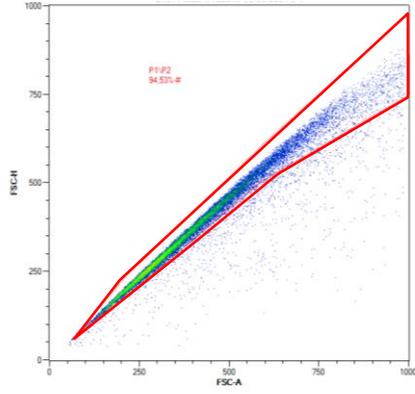


Stratégie d'analyse en cytométrie en flux

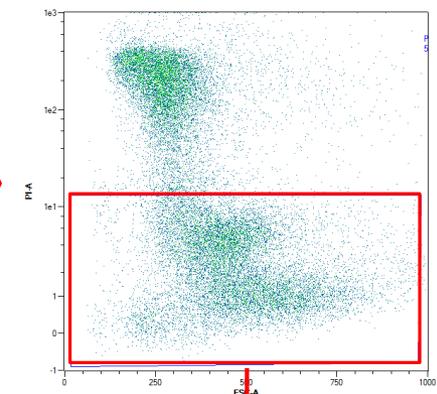
Sélection des cellules
(exclusion des débris & particules)



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



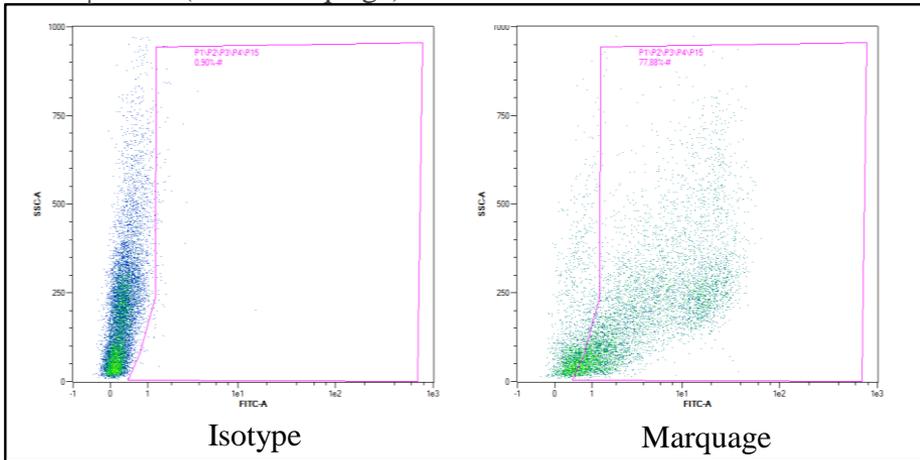
Sélection des cellules vivantes
(au Iodure de Propidium ou IP)



Pour les mono-marquages :

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

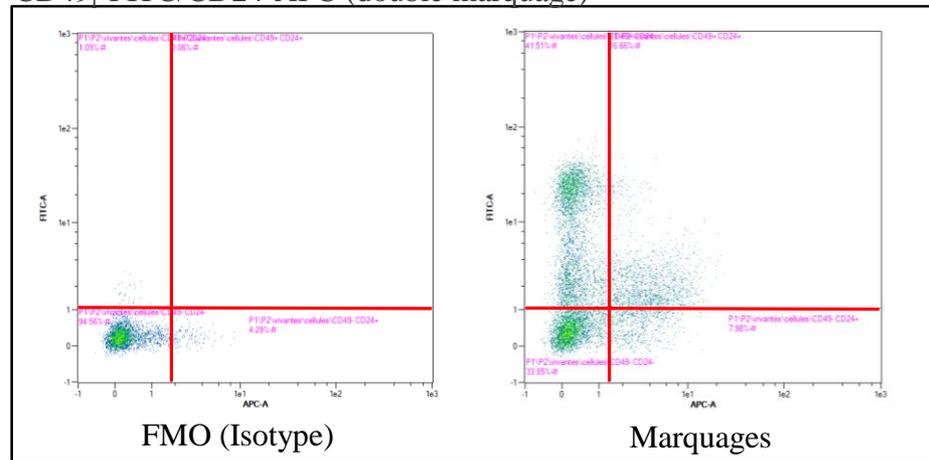
CD49_f-FITC (monomarquage)



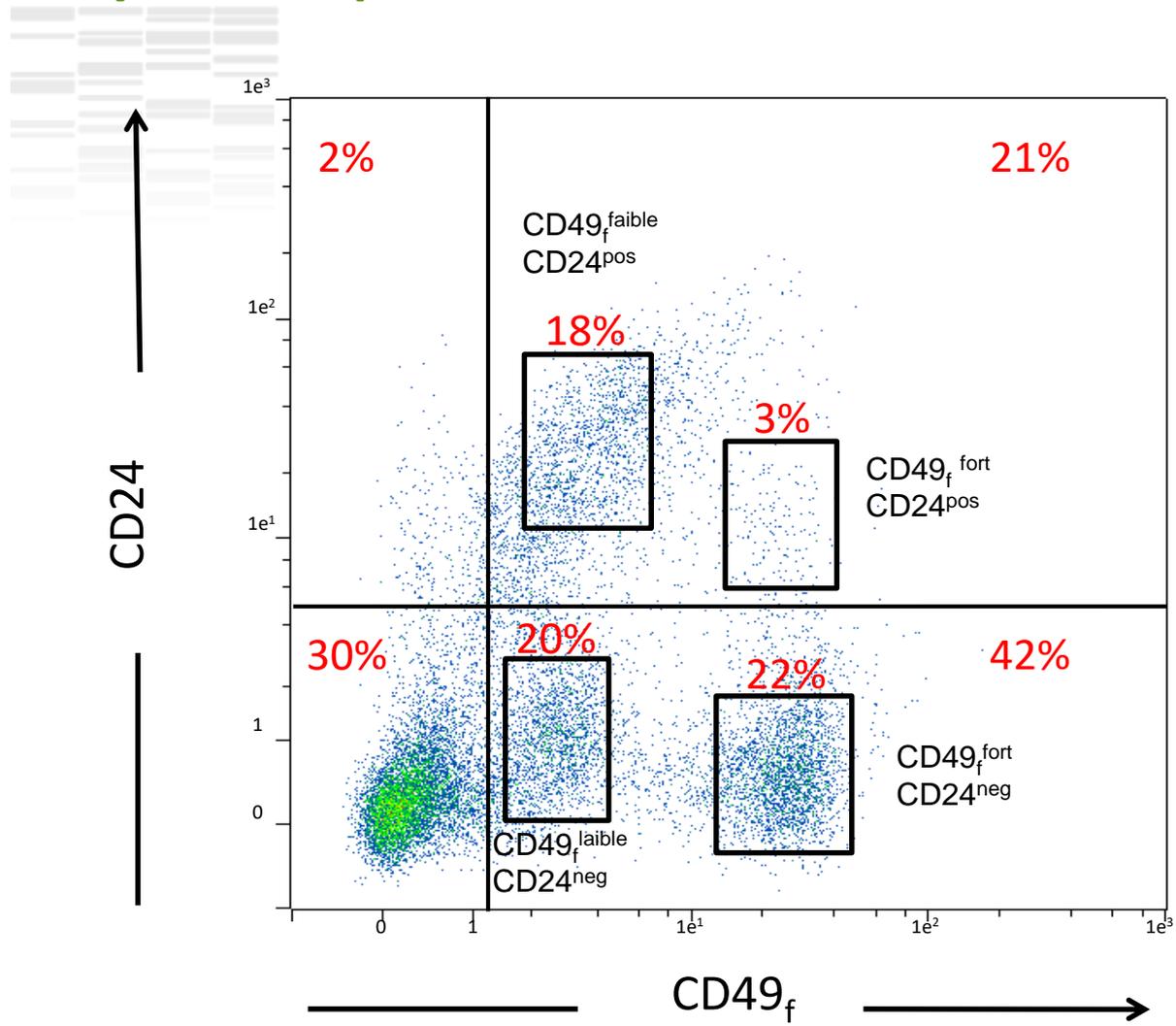
Pour les multi-marquages:

utilisation de la technique des FMO prenant en compte les isotopes

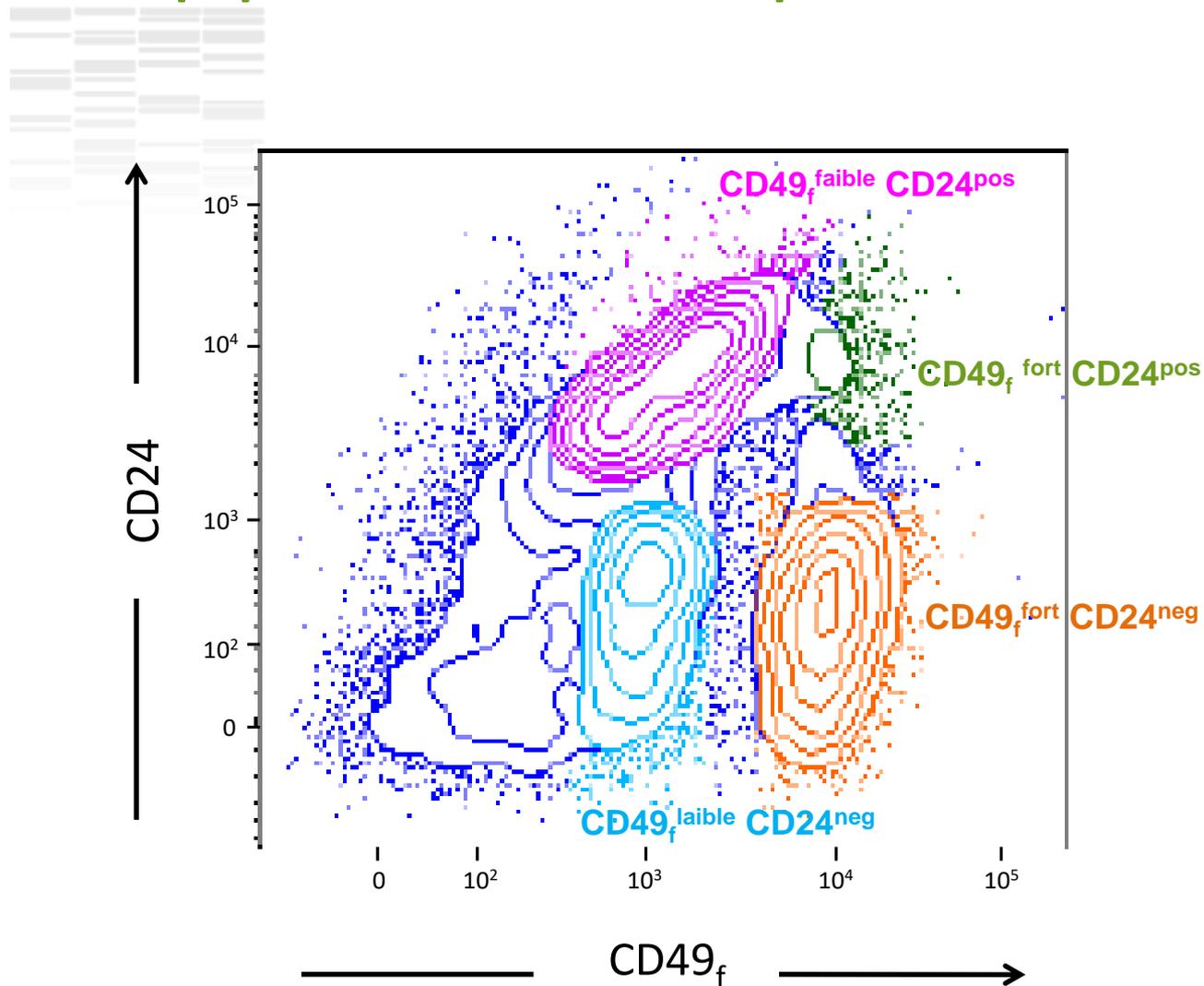
CD49_f-FITC/CD24-APC (double marquage)



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

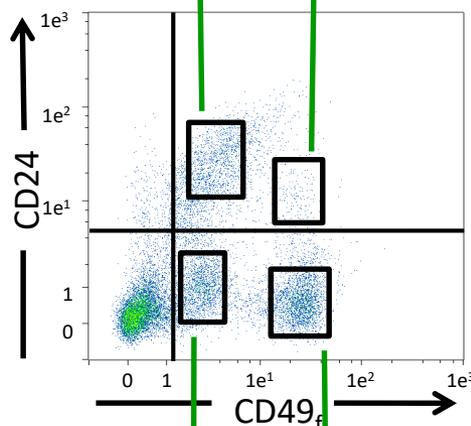
Cellules CD49_f^{fort} CD24^{pos}

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

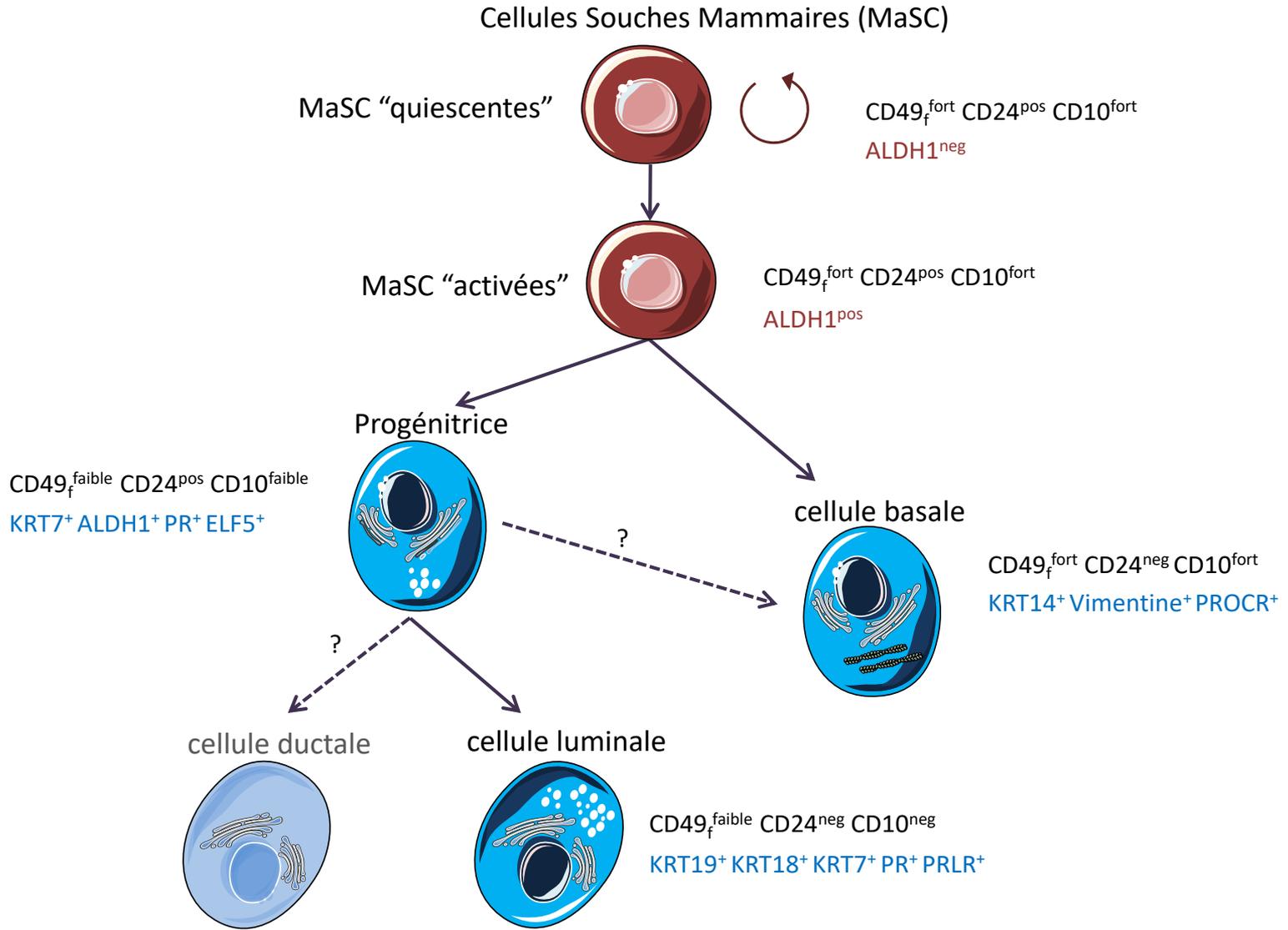
Pas d'activité ALDH1

Gènes exprimés : *KRT14*,
Vimentine, *PROCR*

Cellules luminales

Cellules basales

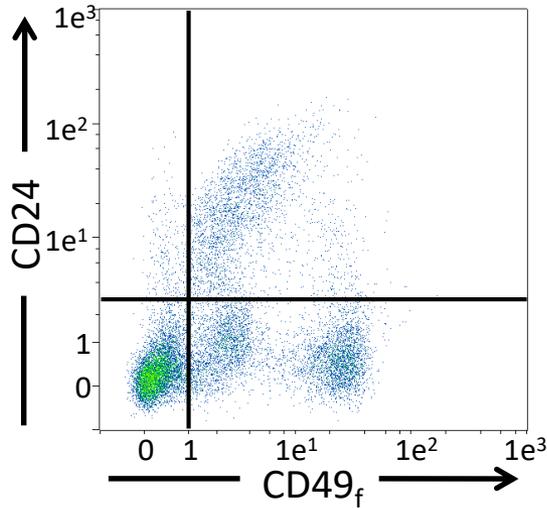
Le lignage épithélial mammaire à la puberté chez le bovin



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

Vaches pubères

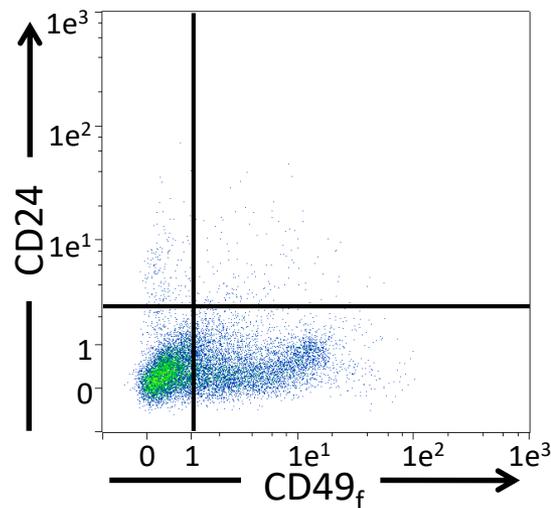
17 mois
(n = 4)



Cellules progénitrices

Vaches en lactation

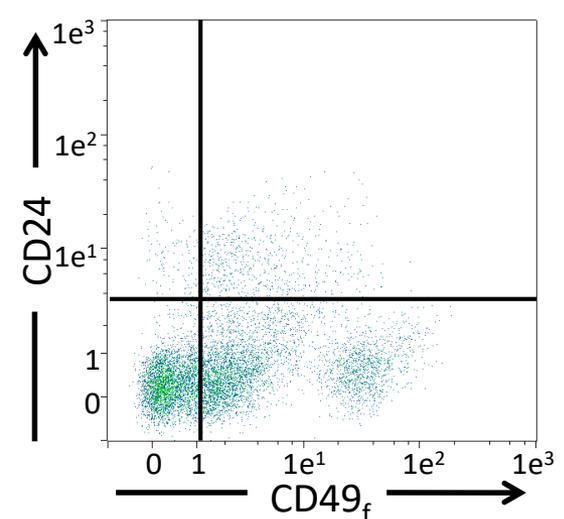
4^{ème} lactation (35kg lait/jour)
(n = 4)



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
Cellules luminales			
CD49 _f ^{faible} CD24 ^{neg}	19.8 (\pm 1.2)	21.2 (\pm 2.4)	28.7 (\pm 7.0)
CD49 _f ^{med} CD24 ^{neg}	1.4 ^b (\pm 0.2)	7.2 ^a (\pm 1.6)	7.1 ^a (\pm 1.6)
Cellules basales			
CD49 _f ^{fort} CD24 ^{neg}	22.1 ^a (\pm 1.6)	2.4 ^c (\pm 0.9)	11.7 ^b (\pm 1.8)
Cellules progénitrices			
CD49 _f ^{faible} CD24 ^{pos}	18.6 ^a (\pm 3.4)	1.6 ^c (\pm 0.4)	3.0 ^b (\pm 0.3)
Cellules souches putatives			
CD49 _f ^{fort} CD24 ^{pos}	3.3 ^a (\pm 0.3)	1.5 ^b (\pm 0.5)	0.4 ^b (\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...

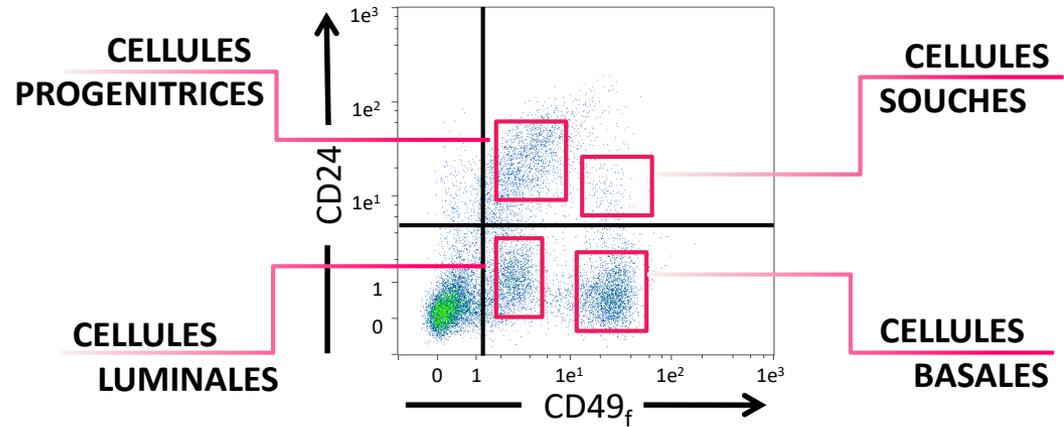
- *cytométrie en flux*



- *Tri cellulaire*



Identifier / caractériser les populations épithéliales



OUTIL de PHENOTYPAGE des cellules épithéliales

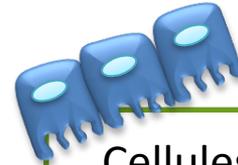
Identifier le type de cellules épithéliales

Approches complémentaires pour étudier les cellules mammaires en agronomie



In vivo / Ex vivo

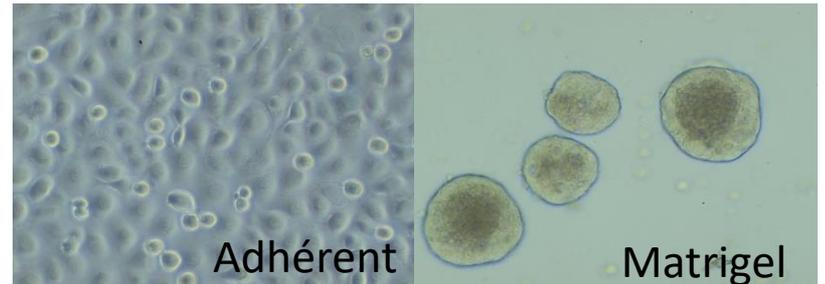
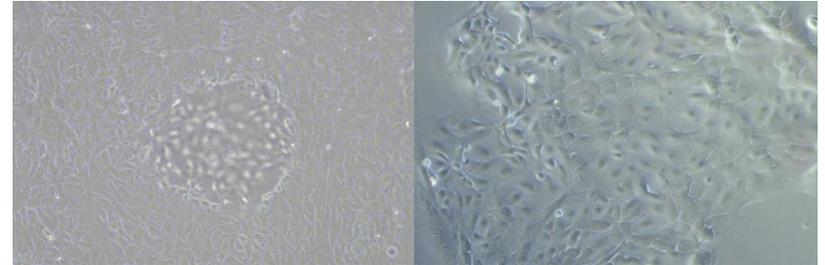
Tissu / biopsie de glande mammaire



In vitro

Cellules dissociées (culture primaire)

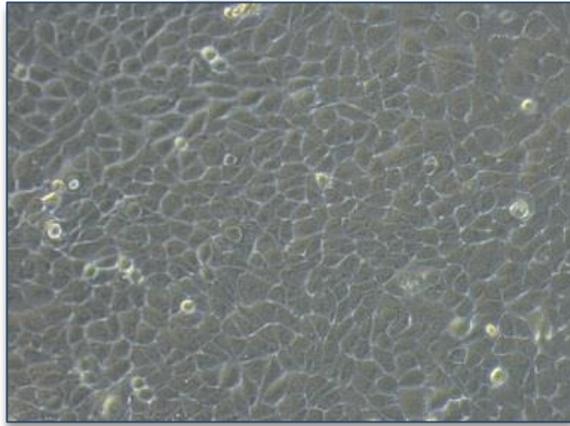
Lignées cellules épithéliales mammaires



Adhérent

Matrigel

Les deux lignées cellulaires épithéliales mammaires bovines



(MAC-T)

(Holstein en lactation-gravide)⁽¹⁾



(BME-UV1)

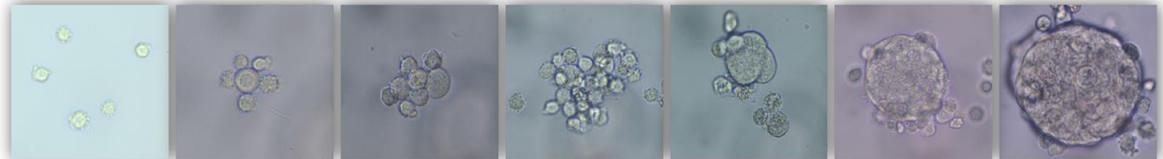
(Holstein en lactation)⁽²⁾

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

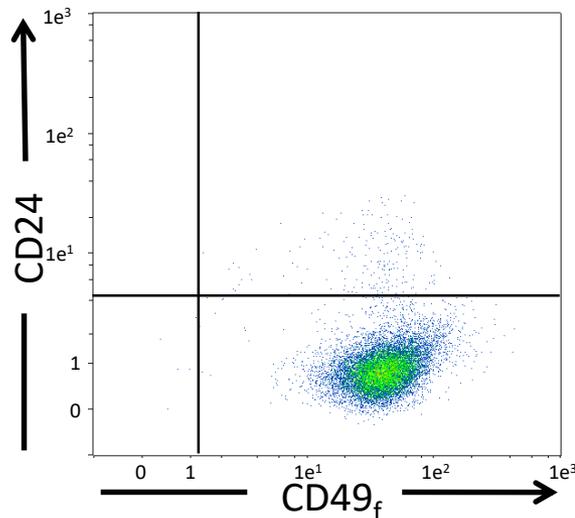
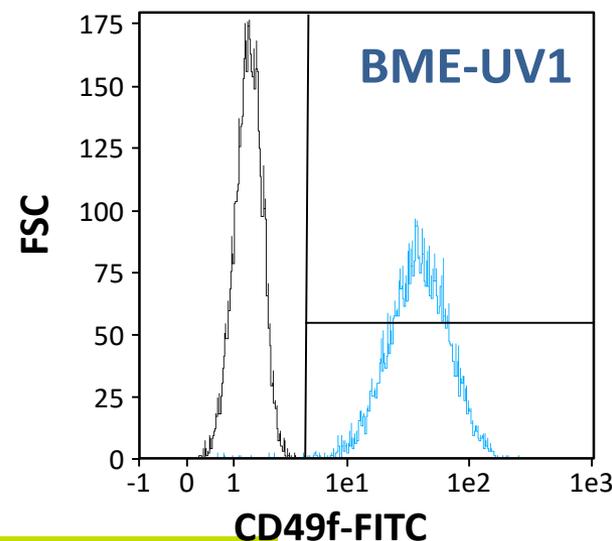
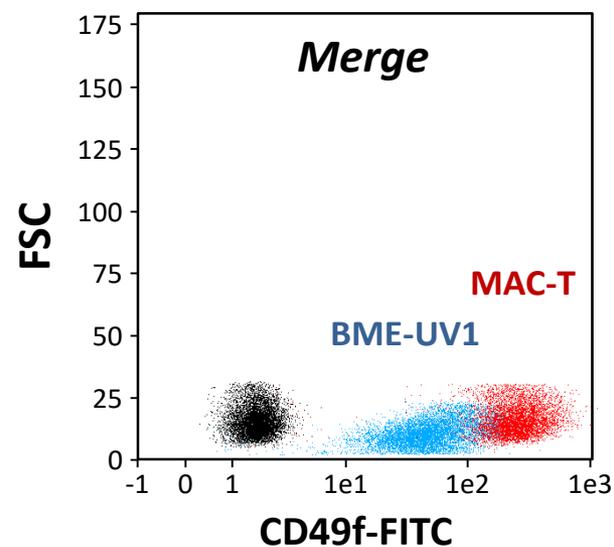
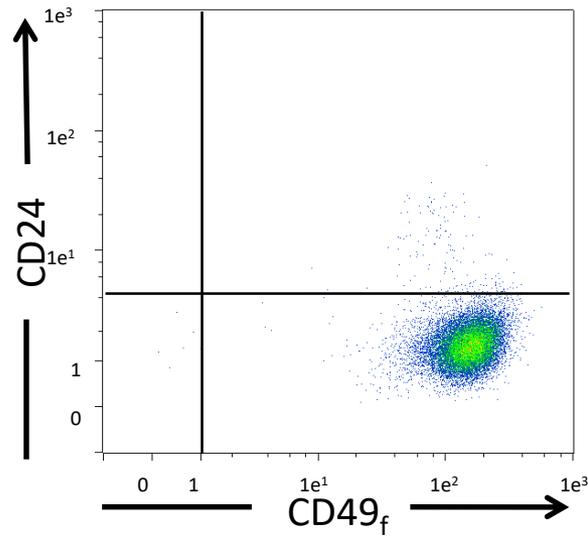
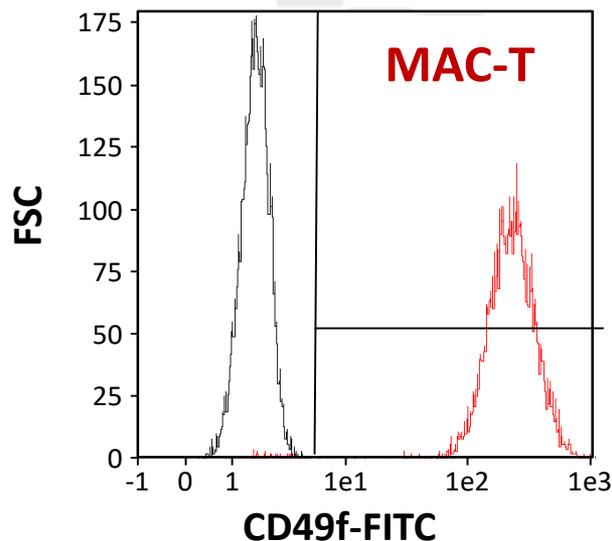
Condition **2D** (adhérent)



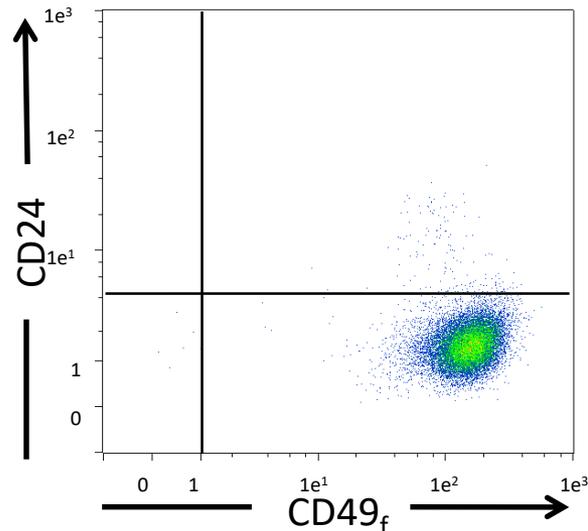
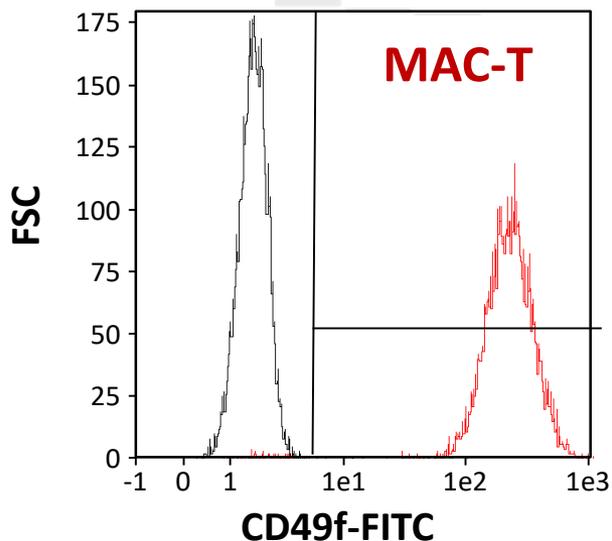
Conditions **3D** (Matrigel ou ULA)



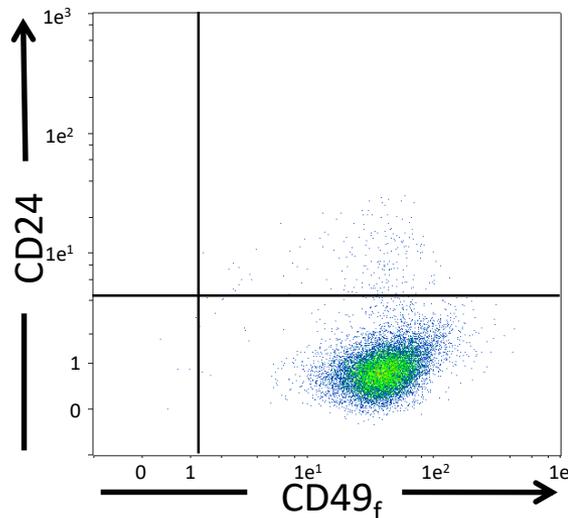
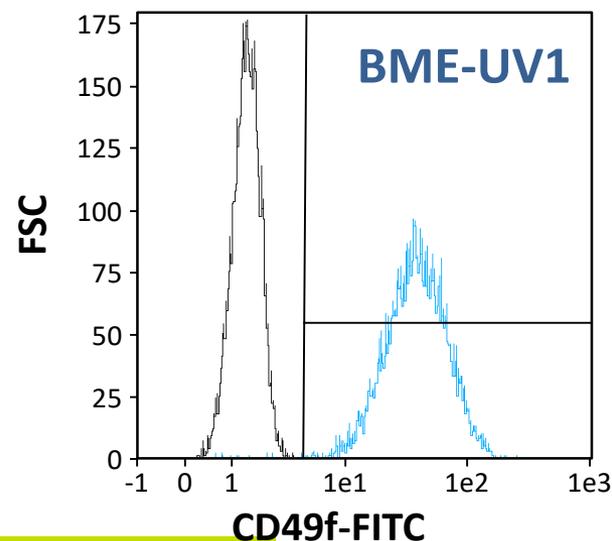
Confirmation du phénotypage des lignées de cellules épithéliales mammaires bovines



Confirmation du phénotypage des lignées de cellules épithéliales mammaires bovines



MAC-T
CD49f^{fort} CD24^{neg}
Lignées de cellules
basales



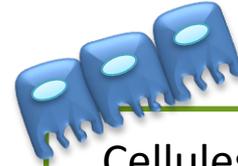
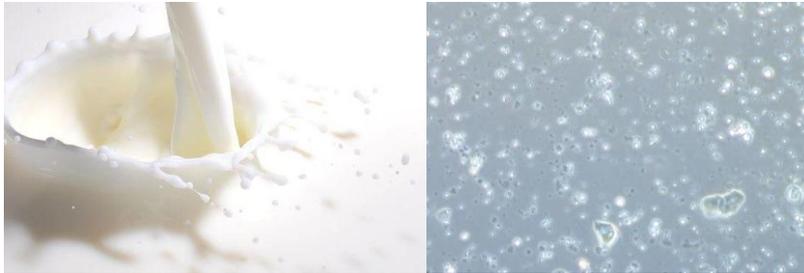
BME-UV1
CD49f^{med} CD24^{neg}
Lignées de cellules
luminales

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



In vivo / Ex vivo

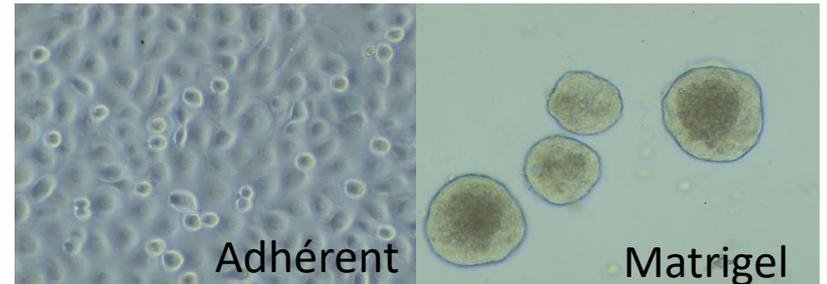
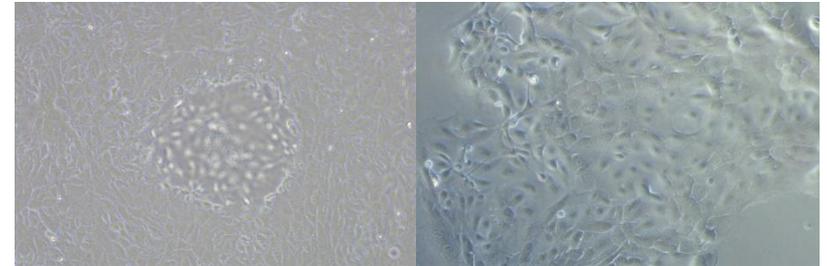
Cellules du lait



In vitro

Cellules dissociées (culture primaire)

Lignées cellules épithéliales mammaires



Adhérent

Matrigel

Distinction des cellules épithéliales parmi les cellules totales du lait

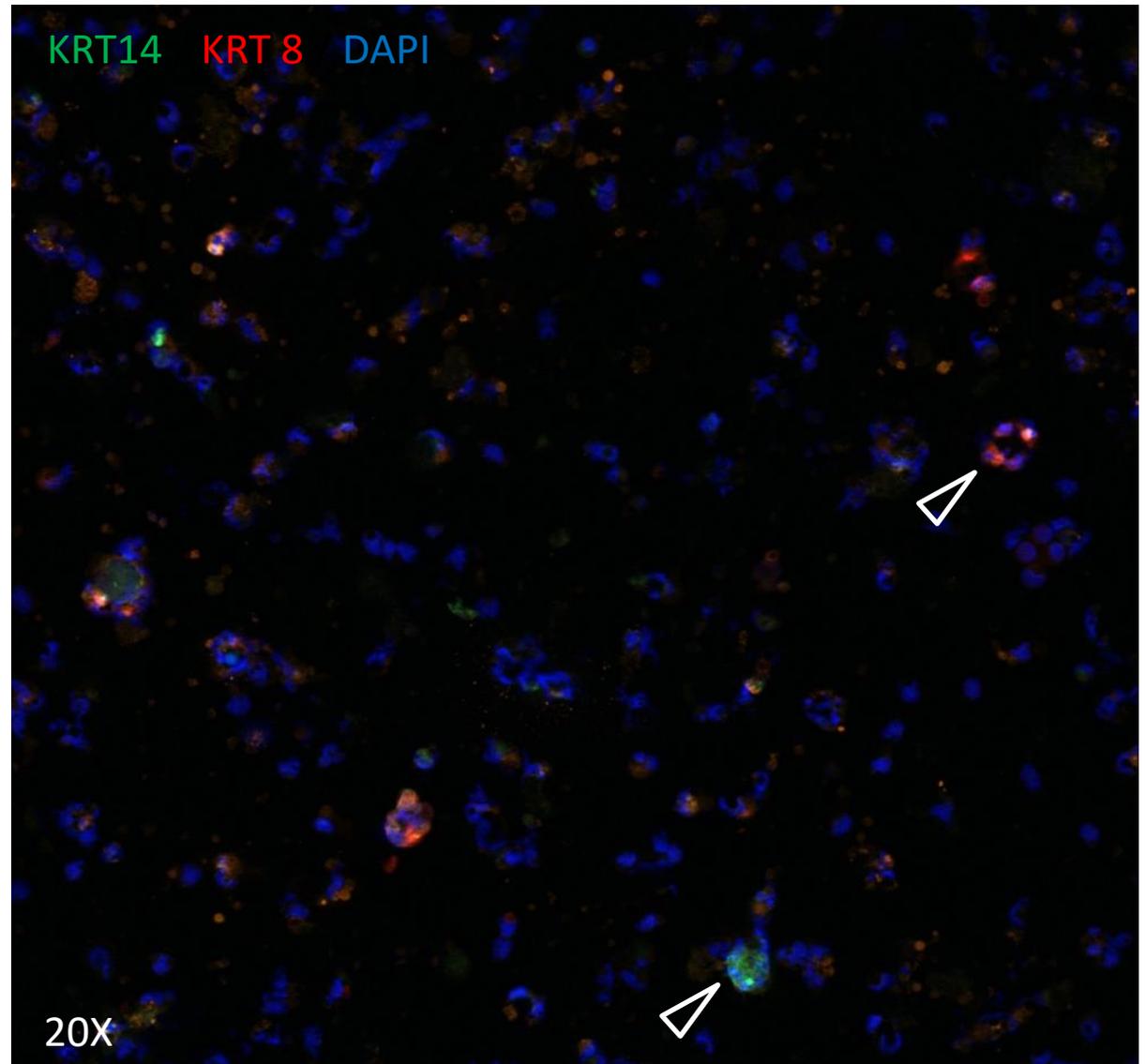


ImmunoFluorescence :

cellules basales (KRT14)
cellules luminales (KRT8)

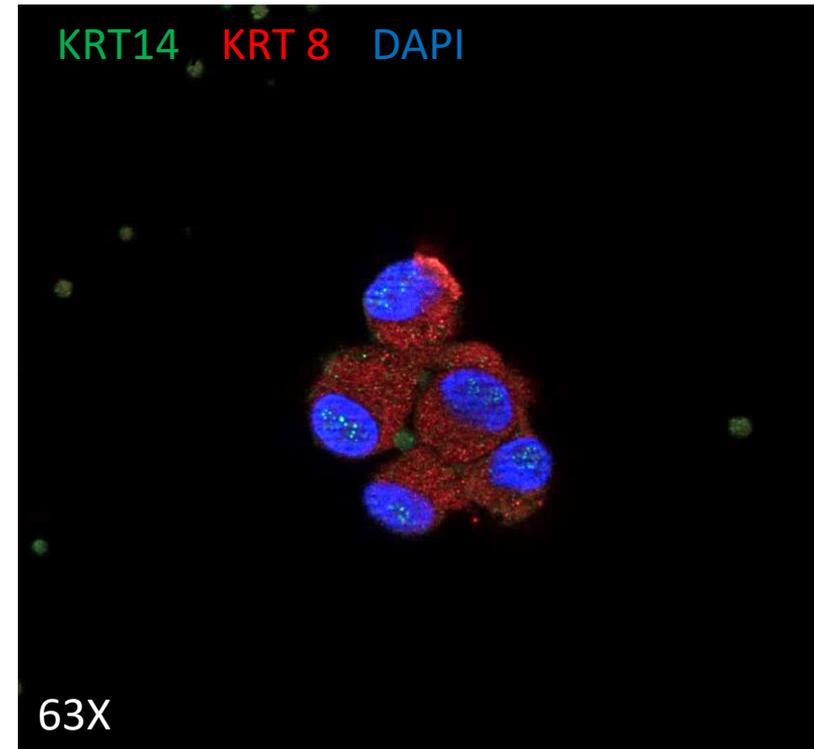
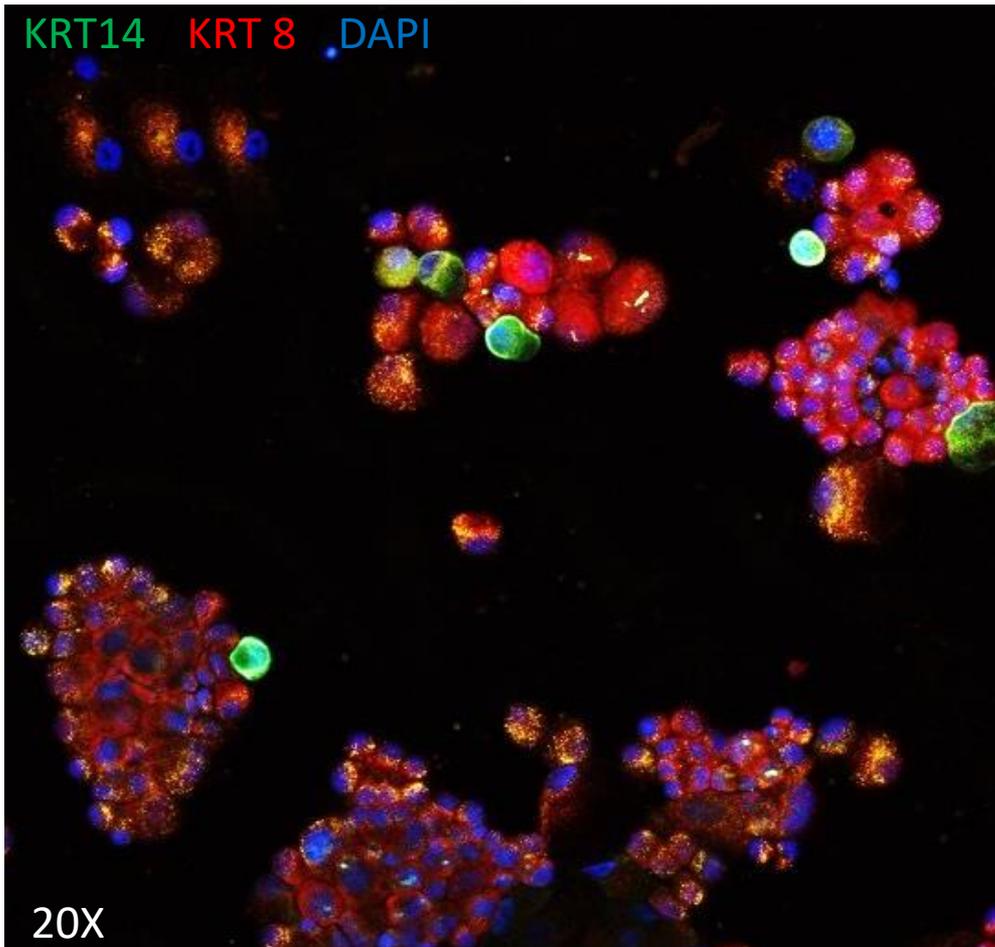
Peu de cellules épithéliales

Cellules luminales, basales?

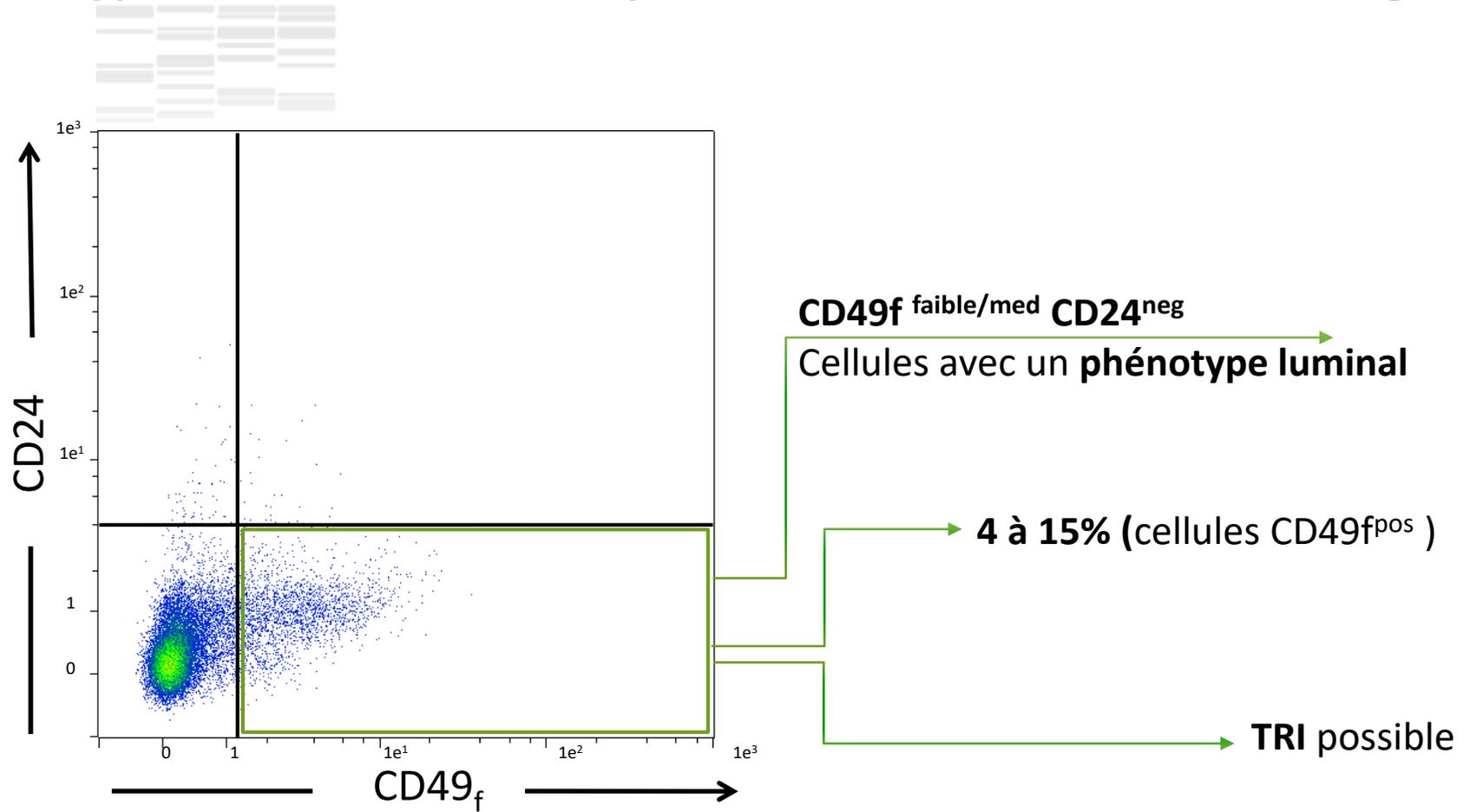


Les cellules épithéliales du lait sont majoritairement des cellules luminales

Après culture en support adhérent des cellules totales du lait



Phénotyper les cellules du lait pour maîtriser son échantillonnage



CD49f faible/med CD24^{neg}
Cellules avec un **phénotype luminal**

4 à 15% (cellules CD49f^{pos})

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

