

La cytométrie en flux :
une approche pertinente pour l'étude des
cellules épithéliales mammaires bovines

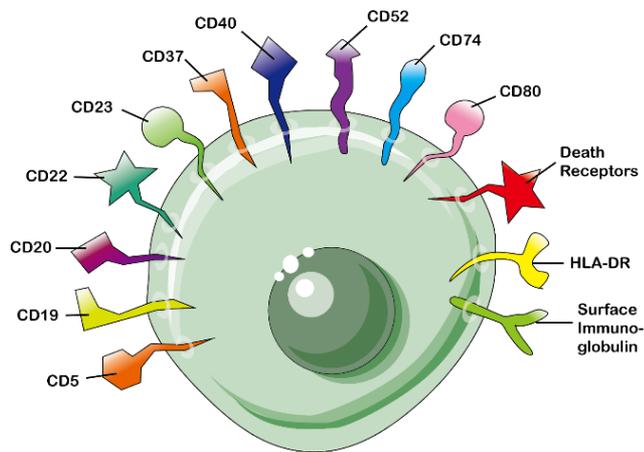
Laurence FINOT, Eric CHANAT, Marion BOUTINAUD,
Sergine EVIN, Pierre GERMON et Frédéric DESSAUGE

UMR-1348

PHYSIOLOGIE, ENVIRONNEMENT
ET GÉNÉTIQUE POUR L'ANIMAL
ET LES SYSTÈMES D'ÉLEVAGE (PEGASE)

La cytométrie en flux

Technologie qui permet d'identifier et de caractériser de manière quantitative et qualitative des populations cellulaires.

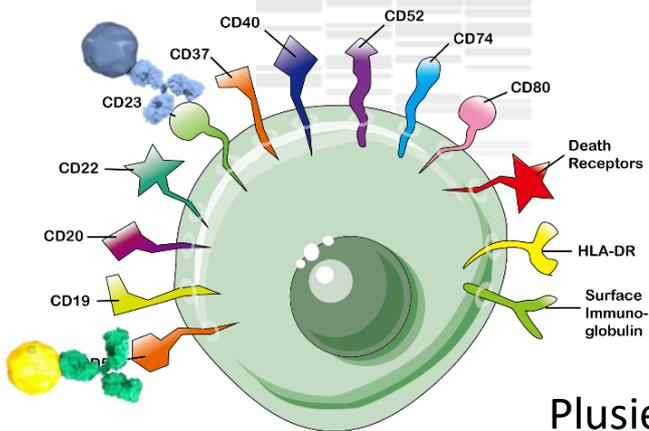


Présence de protéines exprimées à la surface des cellules : **marqueurs de surface** (CD, *cluster de différenciation*) .

Ces **marqueurs** permettent de distinguer:

- ✓ Des populations/sous-populations cellulaires
- ✓ Un état de différenciation cellulaire
- ✓ Des cellules vivantes / apoptotiques / mortes

Le principe de la cytométrie en flux

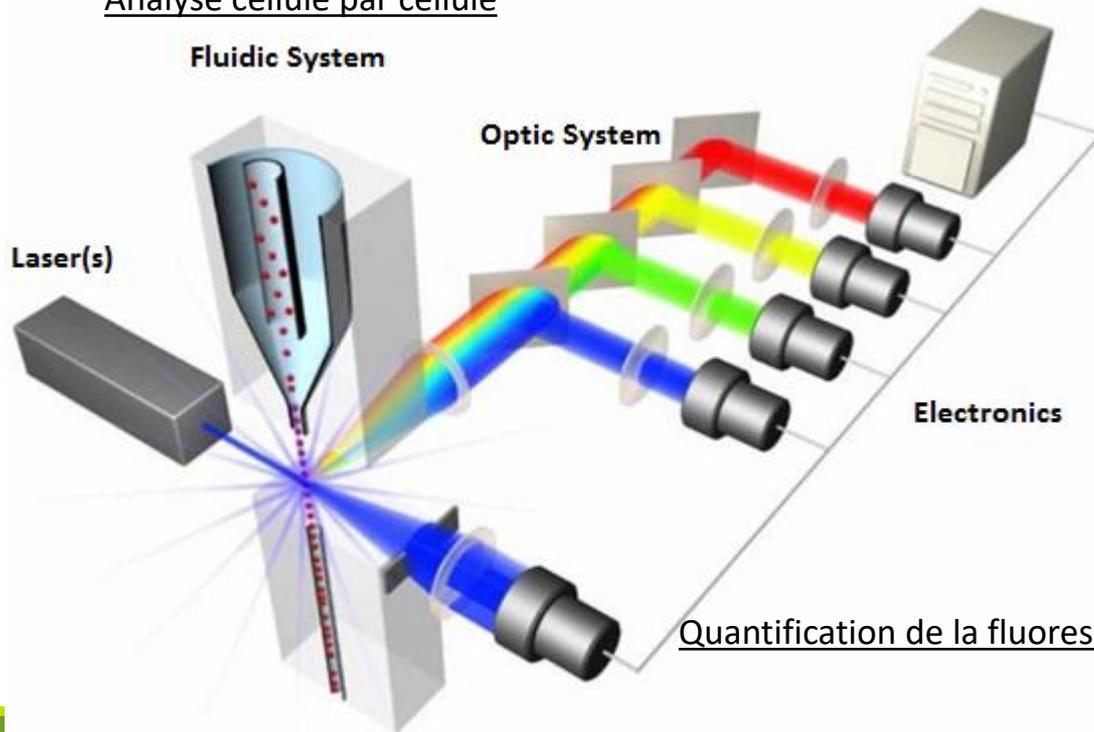


Marquage : anticorps couplés à un fluorochrome

	Vioblu	Viogreen	FITC	PE	PerCP	PE-VIO770	APC	APC-Vio770
Couleur d'émission (fluorescence)	Blue	Vert	Vert	Jaune	Rouge	Infrarouge	Rouge	Infrarouge
Excitation laser (nm)	405	405	488	488 ou 561	488	488 ou 561	561 ou 635	561 ou 635

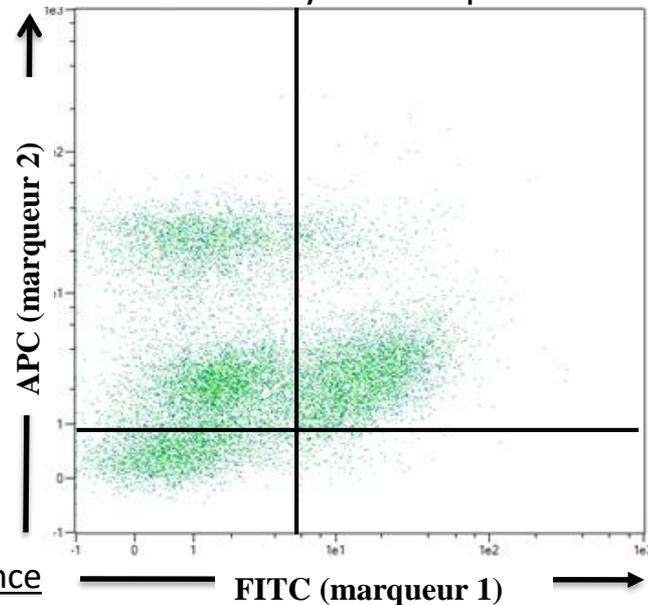
Plusieurs paramètres analysés simultanément pour chaque cellule

Analyse cellule par cellule



Quantification de la fluorescence

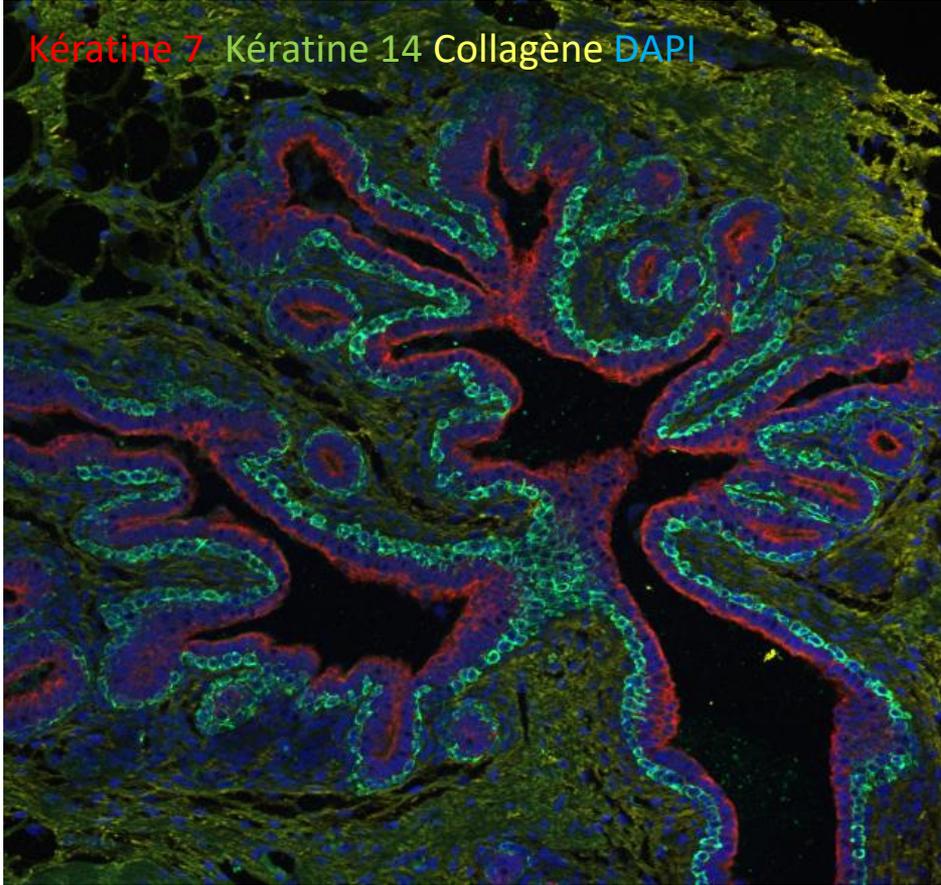
Profil cytométrique



Les cellules épithéliales dans la glande mammaire

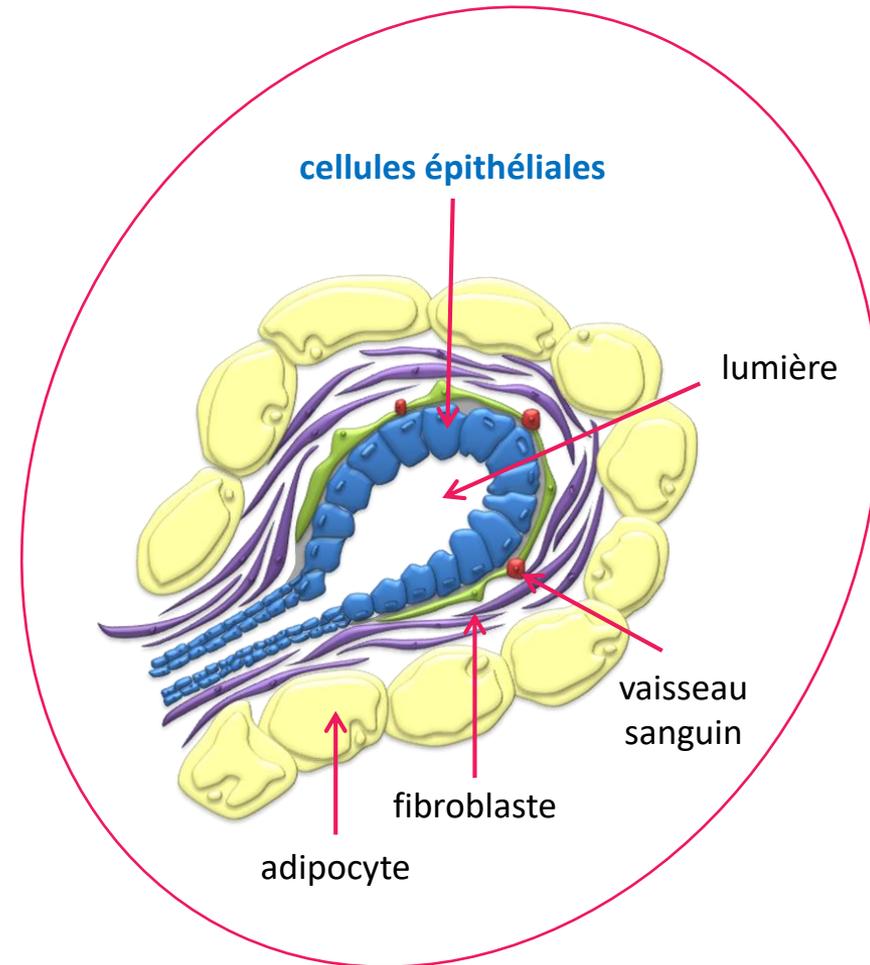
Coupe de tissu mammaire de vaches Holstein pubères (17 mois d'âge)(2)

Kératine 7 Kératine 14 Collagène DAPI



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

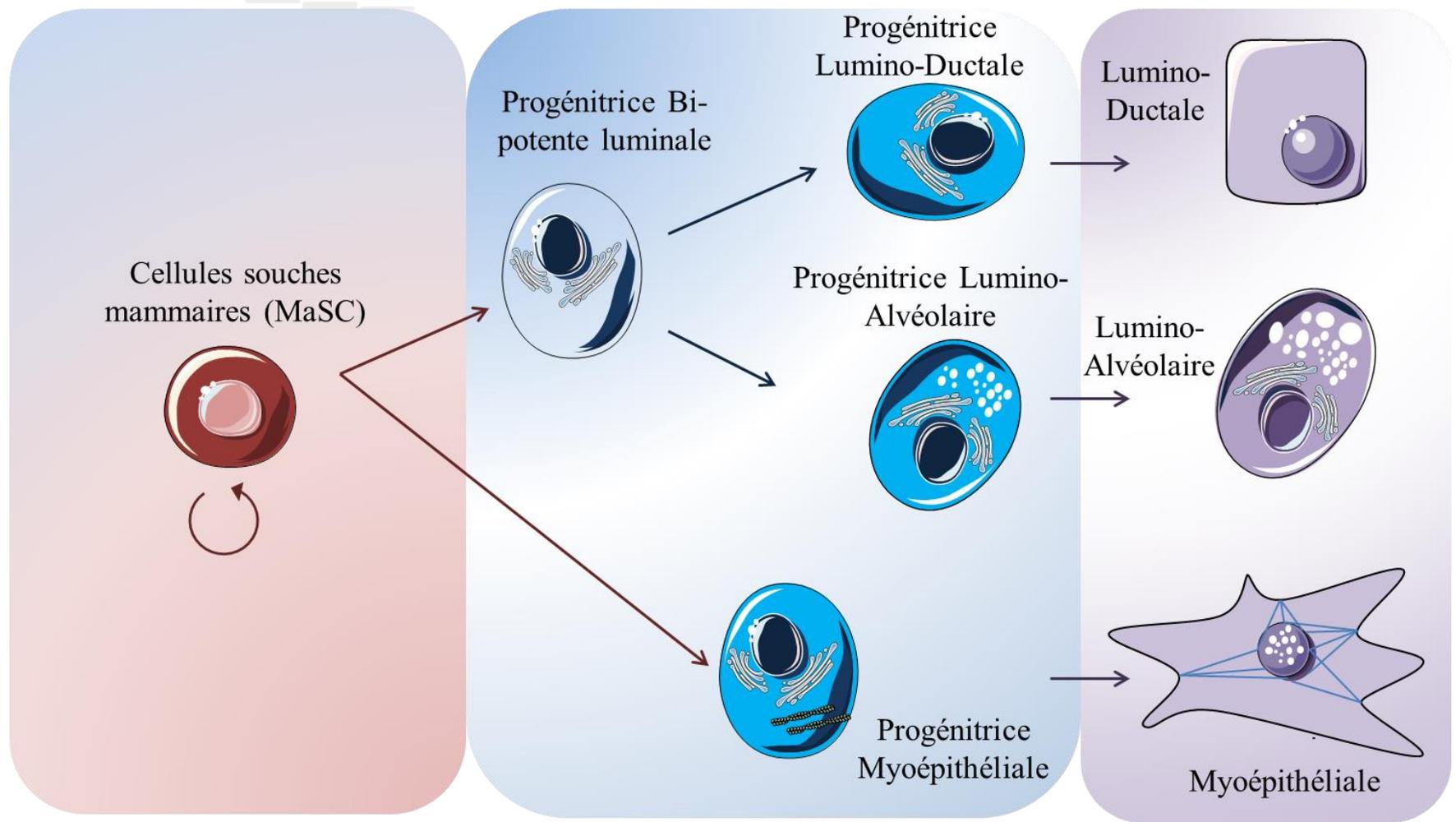
Alvéole (1)



(2) *Mammary Epithelial Cell Lineage Changes During Cow's Life.*
Finot L, Chanat E, Dessauge F. *J Mammary Gland Biol Neop.* 2019.

(1) D'après Delouis et Richard, 1991

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



Objectifs de thèse :

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

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

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

Stratégie expérimentale : matériel & méthodes

ANIMAUX
Prim'Holstein

Stade 1 : Puberté (n=4)

Stade 2 : Lactation (n=4)

Stade 3 : Tarissement (n=3)

TISSU MAMMAIRE



Explants cryo-
conservés

Digestion enzymatique pour
obtention de cellules dissociées

CYTOMETRIE EN FLUX

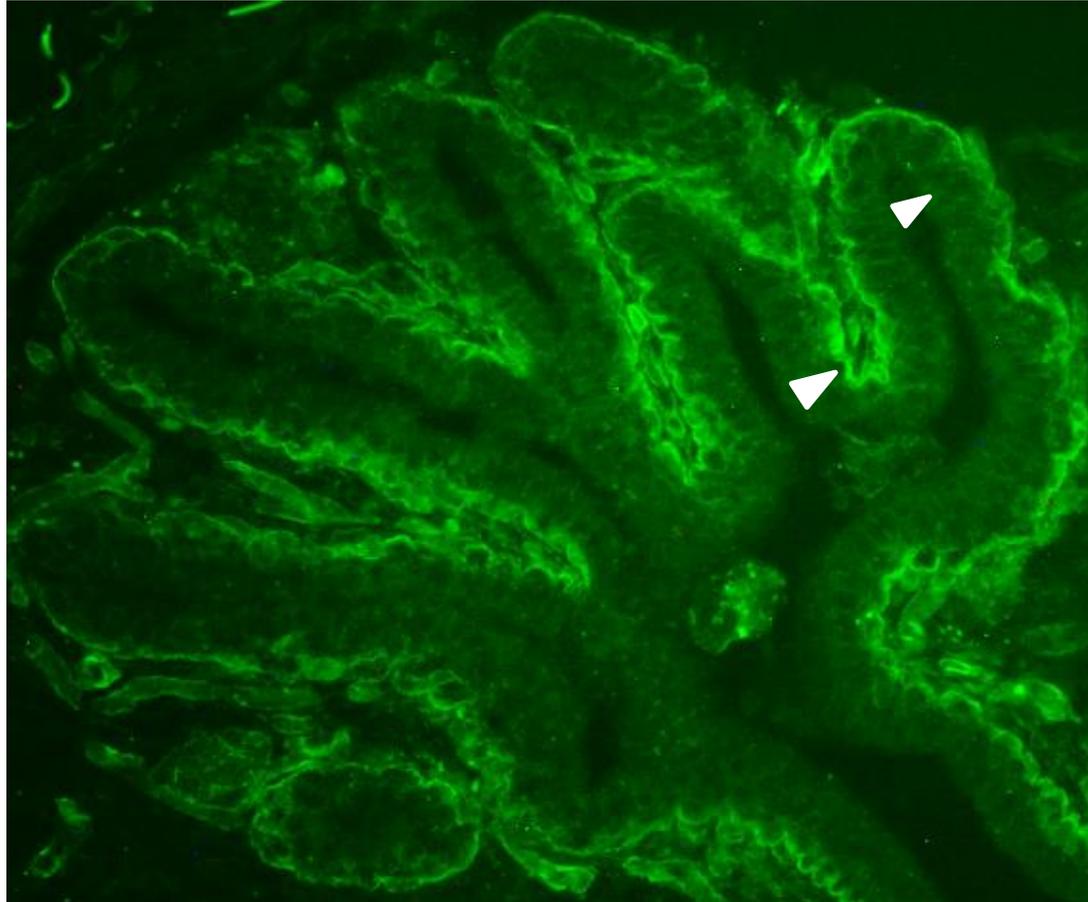


Marqueurs de surface : validation

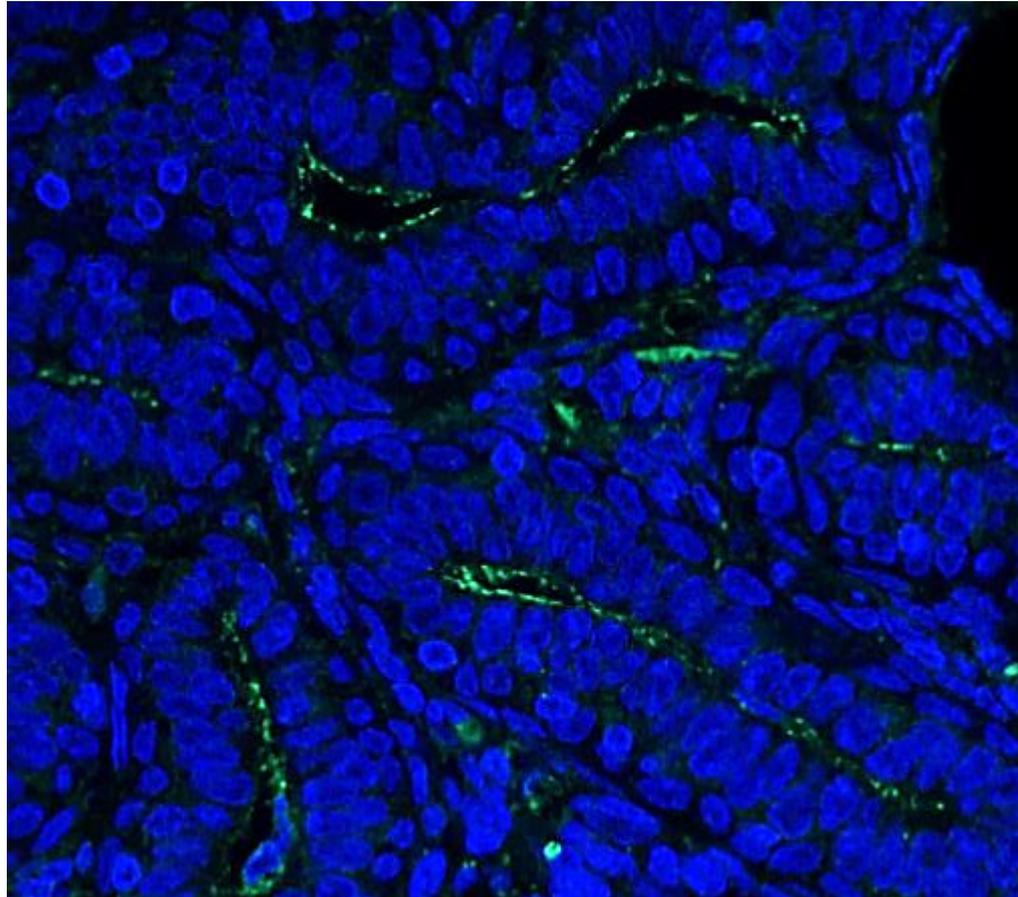
- ✓ Western Blot (cellules triées)
- ✓ Immunofluorescence (coupe de tissu)

- CD49_f Intégrine α6

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

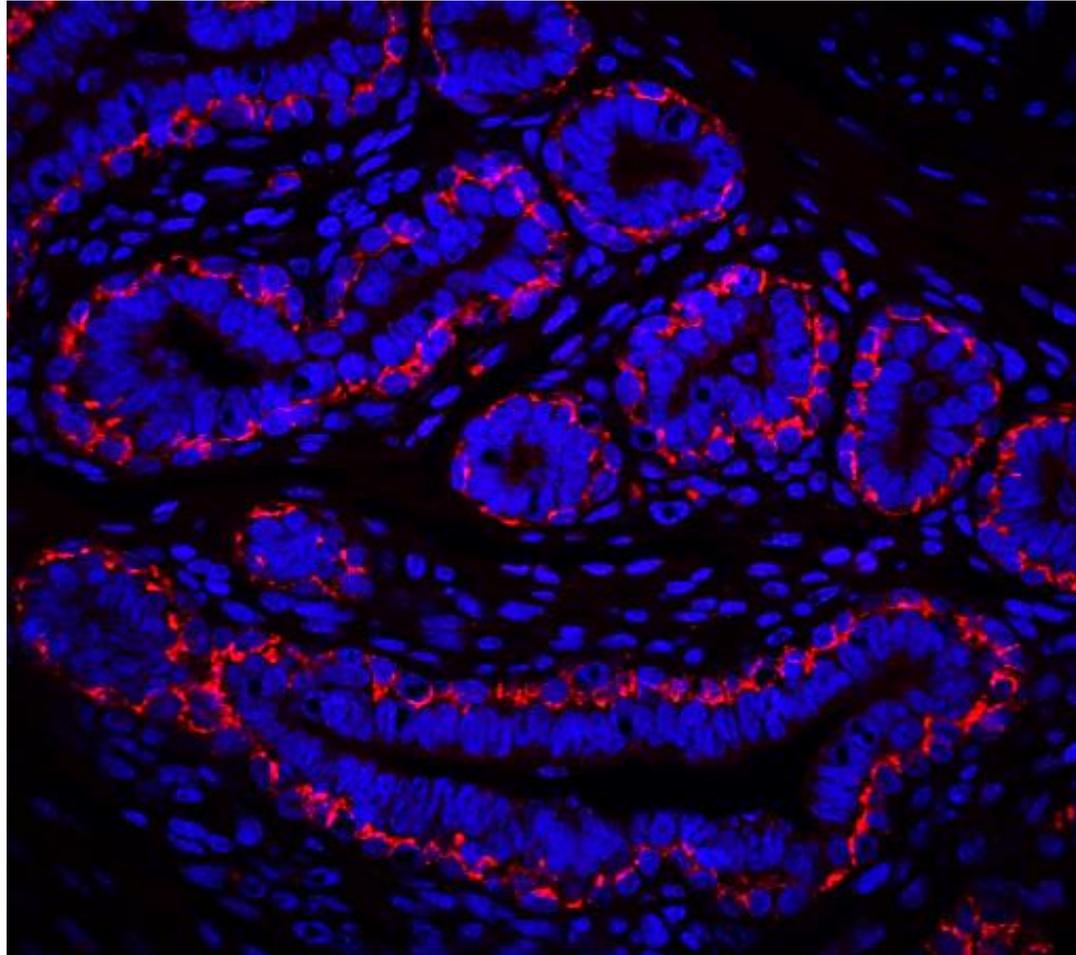


- CD24 Heat Stable Antigen *Protéine impliquée dans la prolifération et l'adhésion des cellules (exprimée par les cellules prolifératives / associée aux cellules souches et progénitrices)*



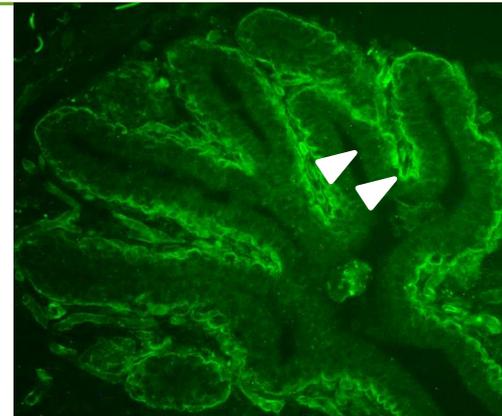
- CD10 Métillo-endopeptidase membranaire

Protéine exprimée par les cellules basales/myoépithéliales



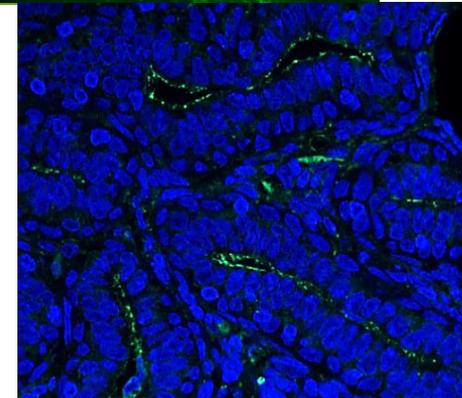
- CD49_f Intégrine α6

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



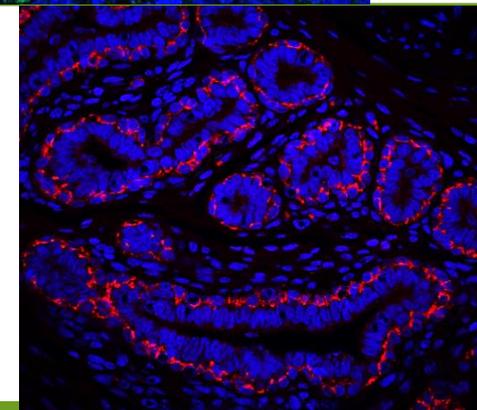
- CD24 Heat Stable Antigen

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

ANIMAUX
Prim'Holstein

Stade 1 : Puberté (n=4)

Stade 2 : Lactation (n=4)

Stade 3 : Tarissement (n=3)

Phénotypage des cellules
Marquage des protéines de surface

TISSU MAMMAIRE

CYTOMETRIE EN FLUX



Explants cryo-
conservés



Digestion enzymatique pour
obtention de cellules dissociées

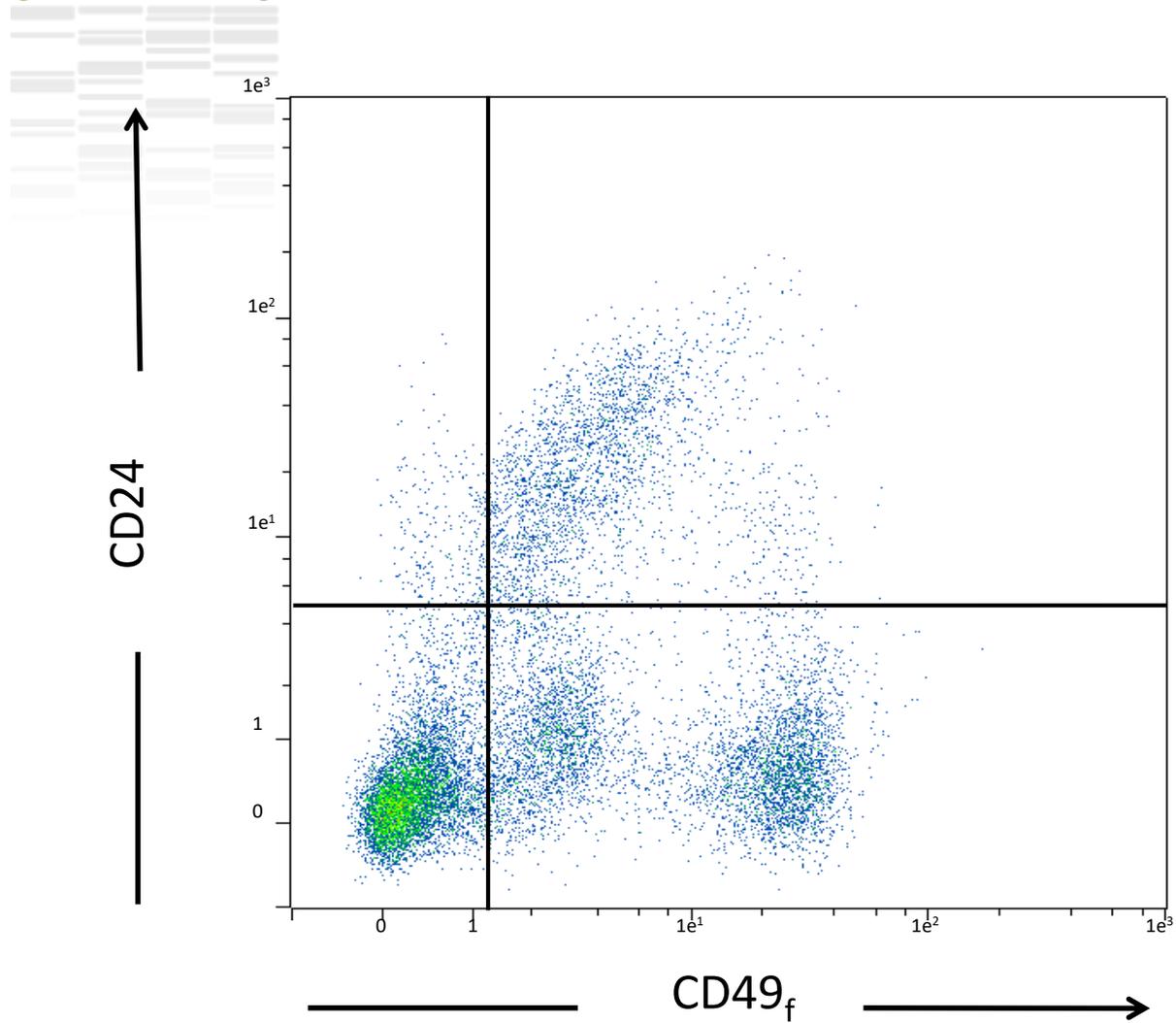
Marqueurs de surface : validation

✓ CD49f

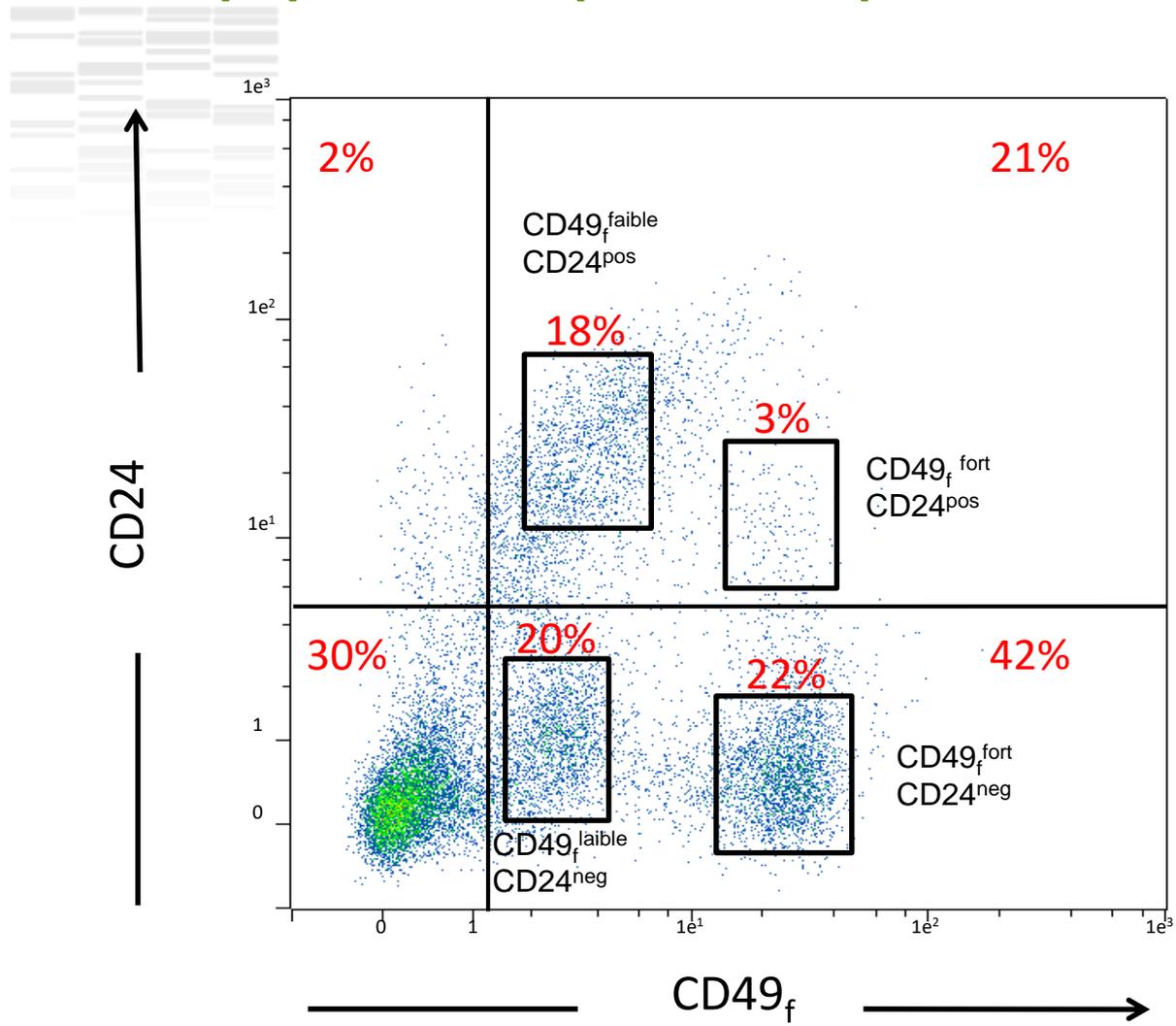
✓ CD24

✓ CD10

Profil cytométrique des cellules mammaires totales à la puberté



Quatre sous-populations épithéliales présentes à la puberté



Phénotypage des cellules dissociées du tissu

ANIMAUX
Prim'Holstein

Stade 1 : Puberté (n=4)

Stade 2 : Lactation (n=4)

Stade 3 : Tarissement (n=3)

TISSU MAMMAIRE



Explants cryo-
conservés

Digestion enzymatique pour
obtention de cellules dissociées

Phénotypage des cellules
Marquage des protéines de
surface

CYTOMETRIE EN FLUX



TRI CELLULAIRE



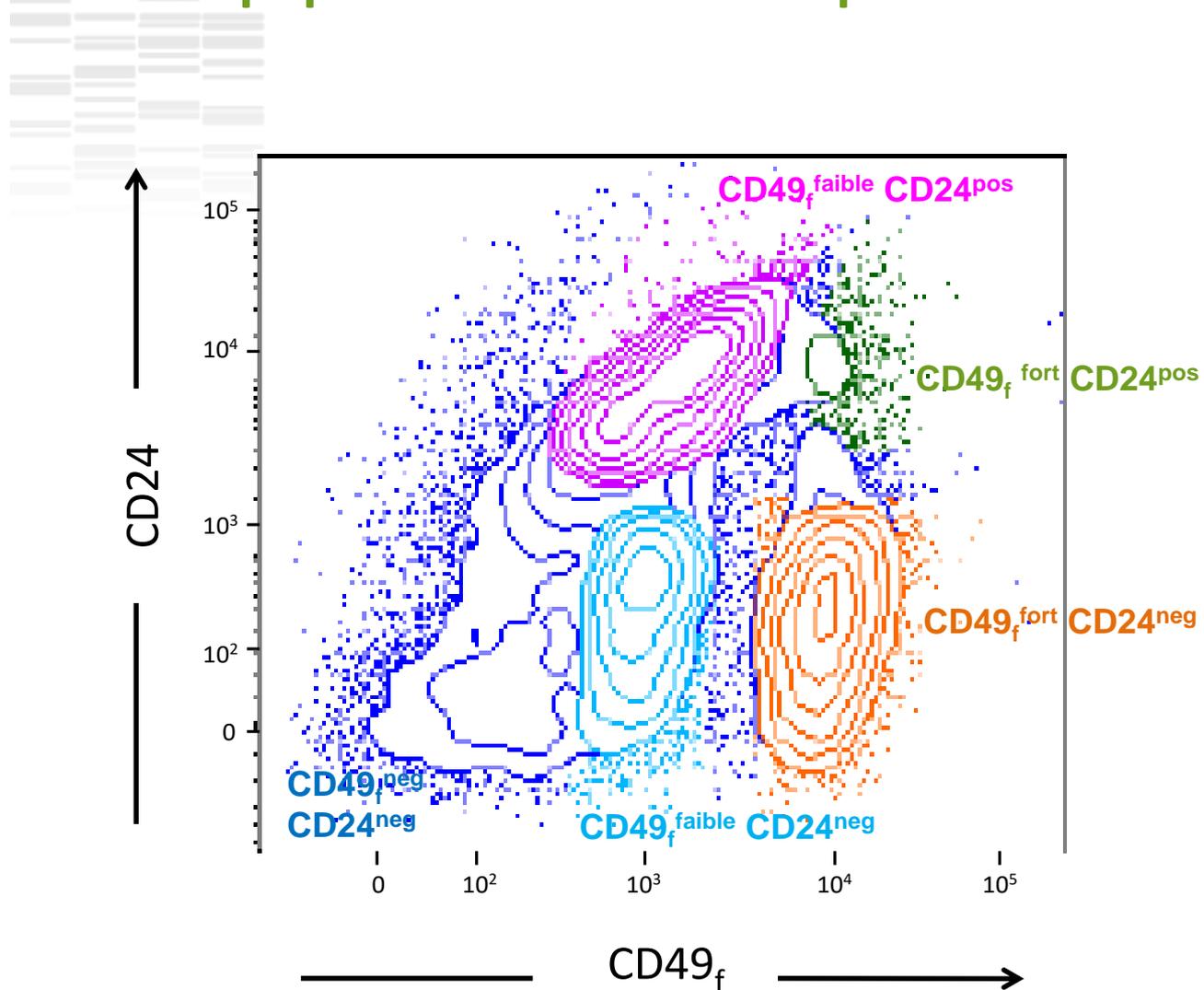
Trieur (FACSARIA II)

Caractérisation des sous-
populations d'intérêt :

- ✓ Expression de gènes
- ✓ Activité ALDH1
- ✓ Culture *in vitro* 3D
- ✓ Immunofluorescence

Identification des sous-
populations d'intérêt

Tri des sous-populations cellulaires épithéliales d'intérêt



Les caractéristiques des sous-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

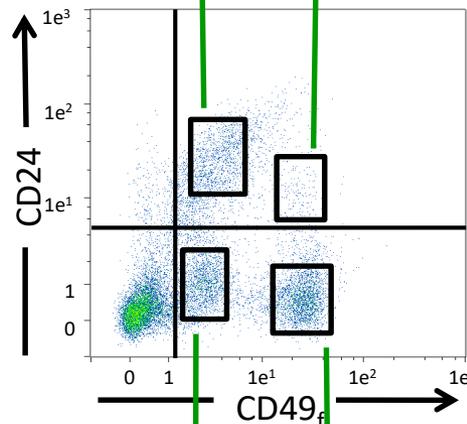
Cellules CD49_f^{fort} CD24^{pos}

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

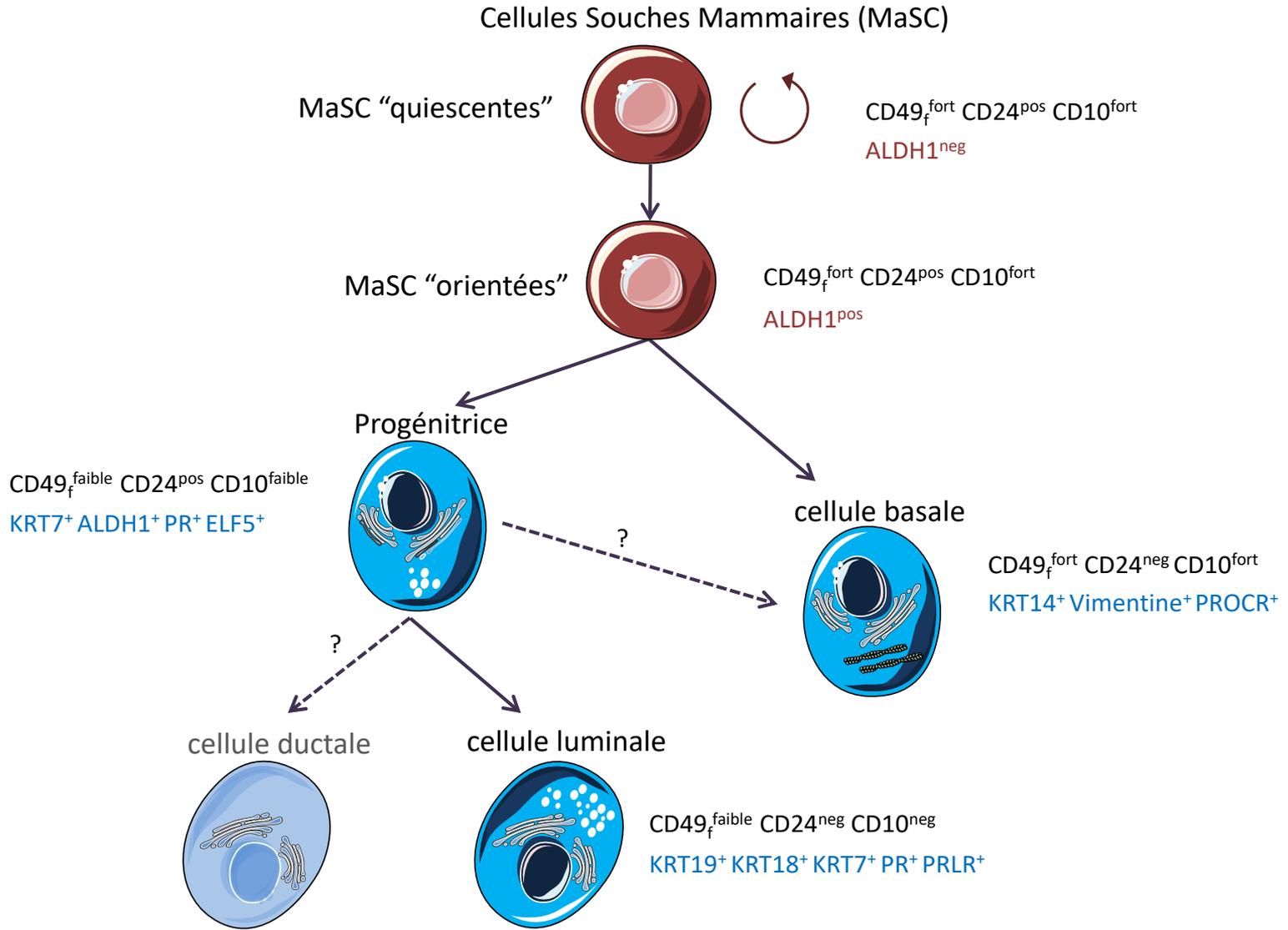
Pas d'activité ALDH1

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

Cellules luminales

Cellules basales

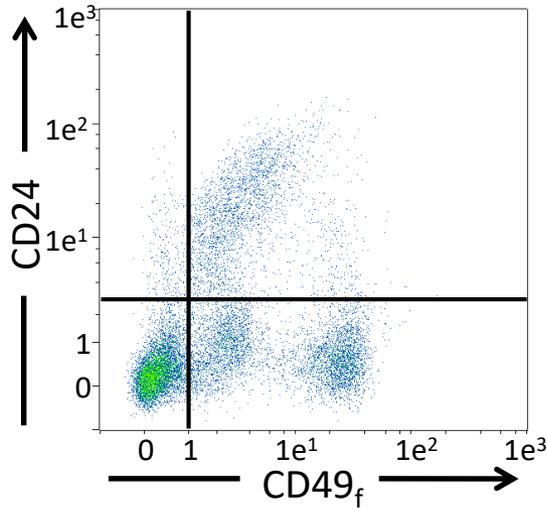
Le lignage épithélial mammaire à la puberté chez le bovin



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

Vaches pubères

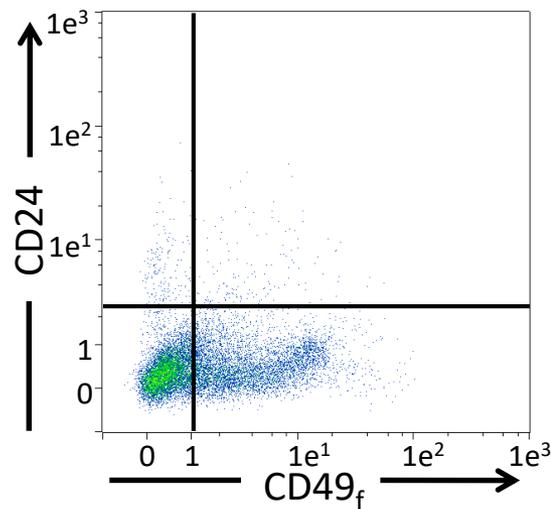
17 mois
(n = 4)



Cellules progénitrices

Vaches en lactation

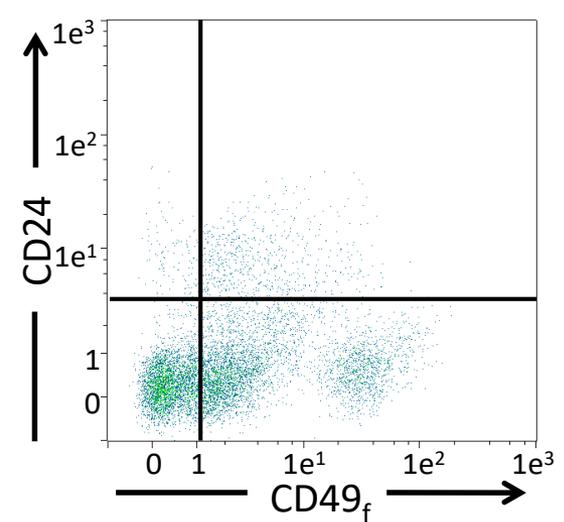
4^{ème} lactation (35kg lait/jour)
(n = 4)



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...

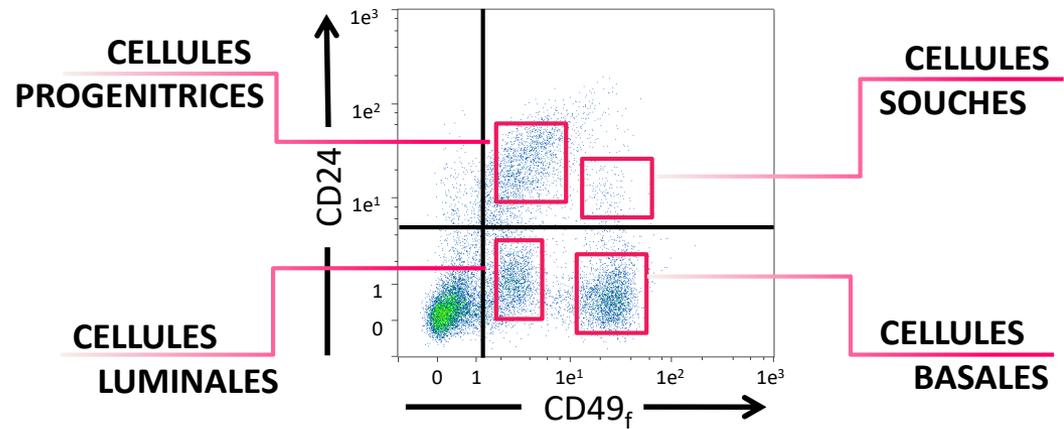
- *cytométrie en flux*



- *Tri cellulaire*



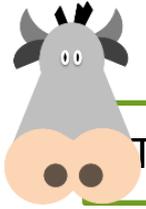
Identifier / caractériser les populations épithéliales



OUTIL de PHENOTYPAGE des cellules épithéliales

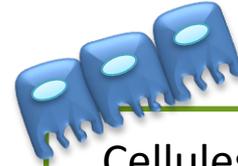
Identifier le type de cellules épithéliales

Approches complémentaires pour étudier les cellules mammaires en agronomie



In vivo / Ex vivo

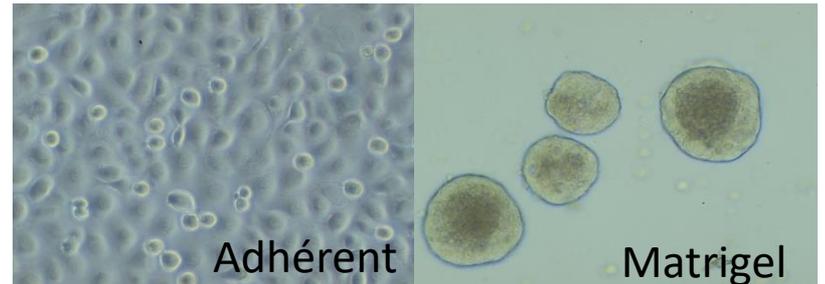
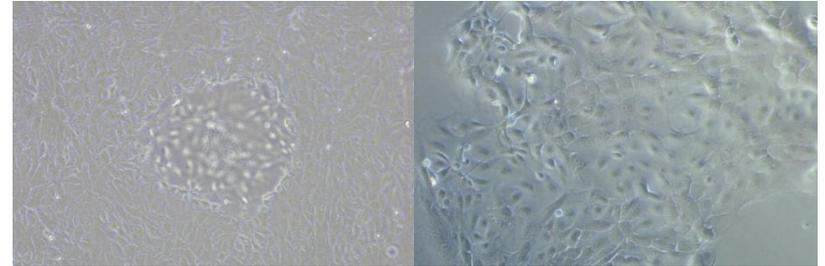
Tissu / biopsie de glande mammaire



In vitro

Cellules dissociées (culture primaire)

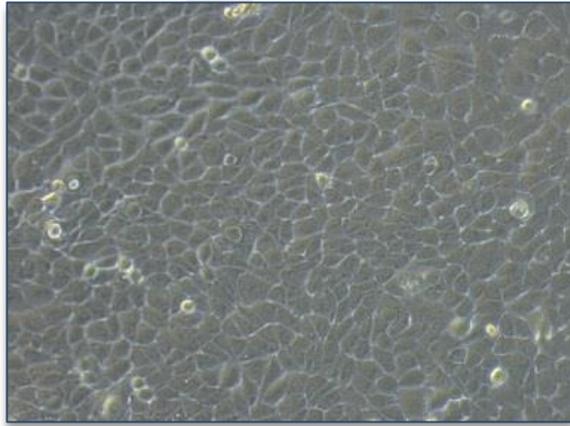
Lignées cellules épithéliales mammaires



Adhérent

Matrigel

Les deux lignées cellulaires épithéliales mammaires bovines



(MAC-T)

(Holstein en lactation-gravide)⁽¹⁾



(BME-UV1)

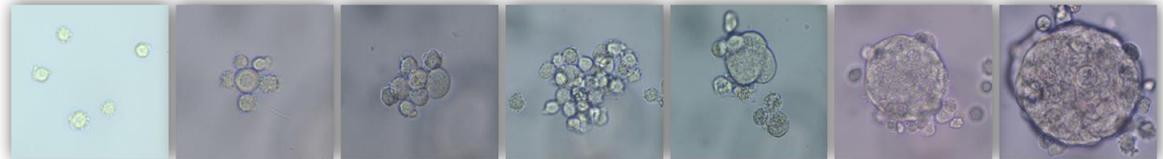
(Holstein en lactation)⁽²⁾

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

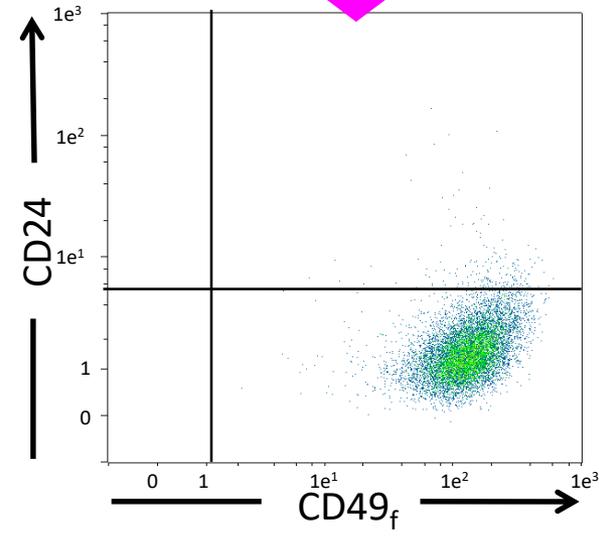
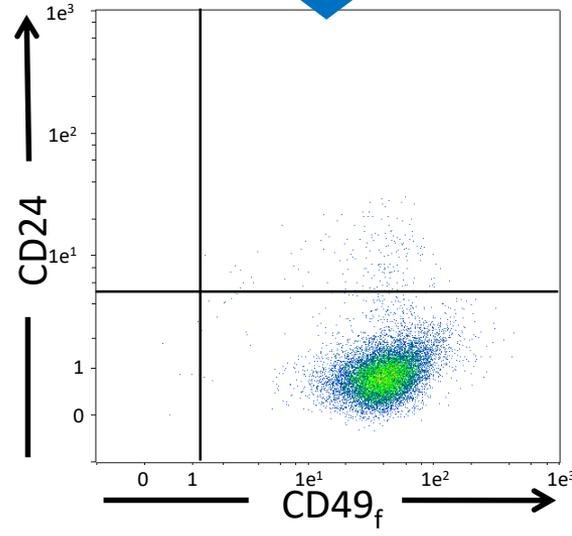
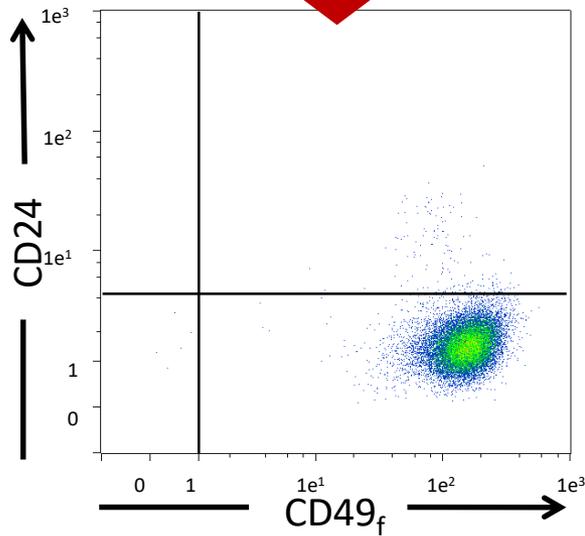
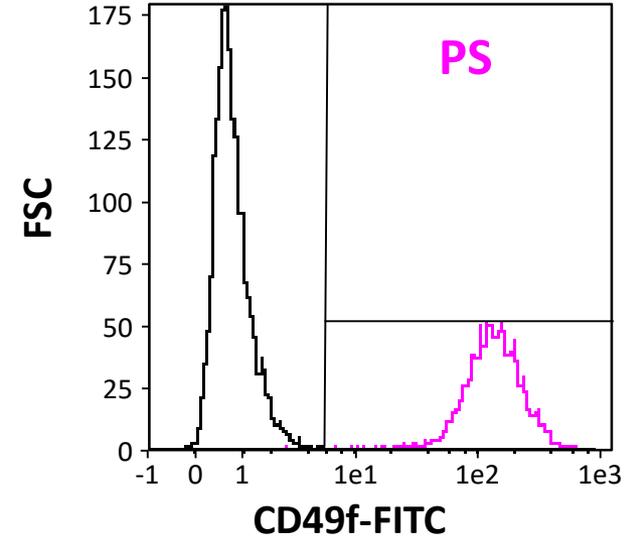
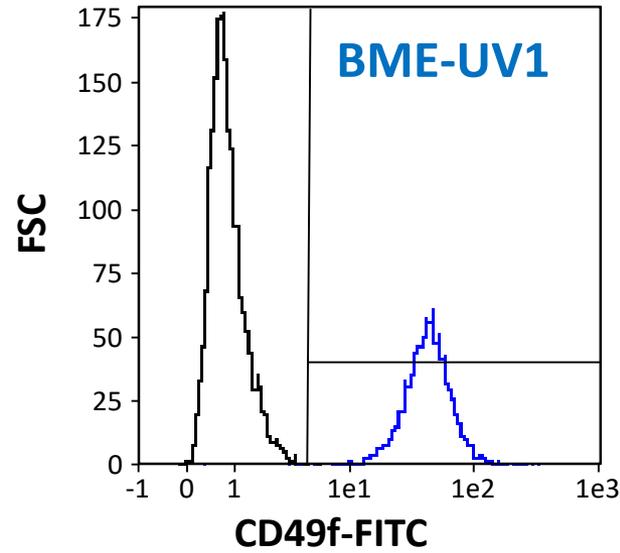
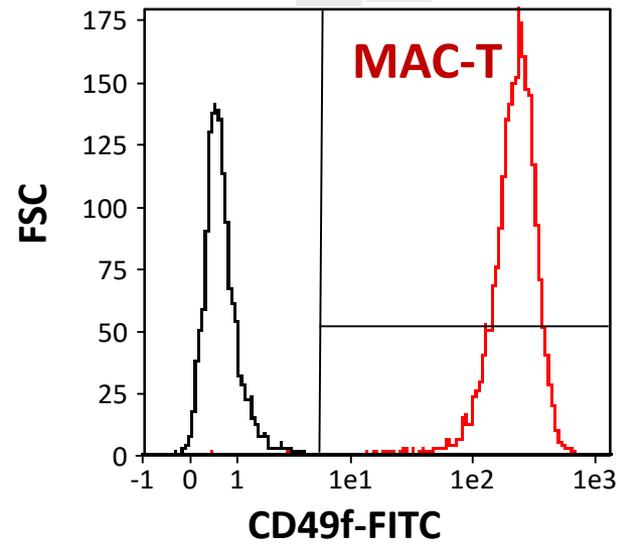
Condition **2D** (adhérent)



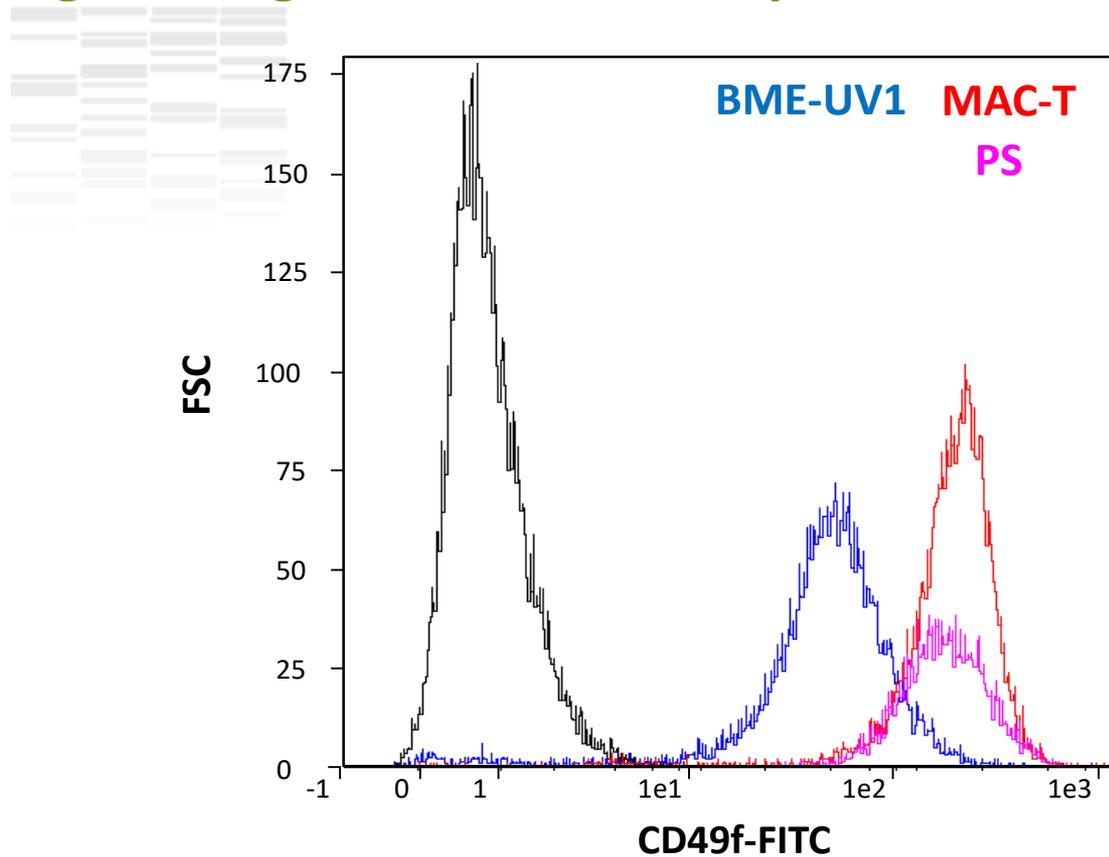
Conditions **3D** (Matrigel ou ULA)



Phénotypage des lignées de cellules épithéliales mammaires bovines



Phénotypage des lignées de cellules épithéliales mammaires bovines



BME-UV1

CD49f^{med} CD24^{neg}

**Lignées de cellules luminales
(sécrétrices)**

MAC-T

CD49f^{fort} CD24^{neg}

**Lignées de cellules
basales**

PS

CD49f^{fort} CD24^{neg}

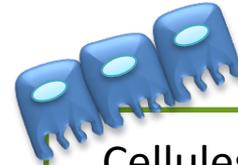
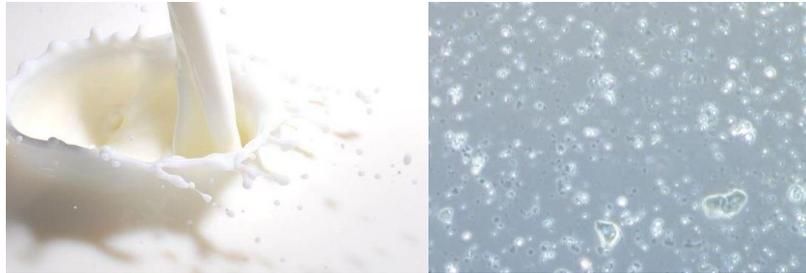
**Lignées de cellules
basales**

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



In vivo / Ex vivo

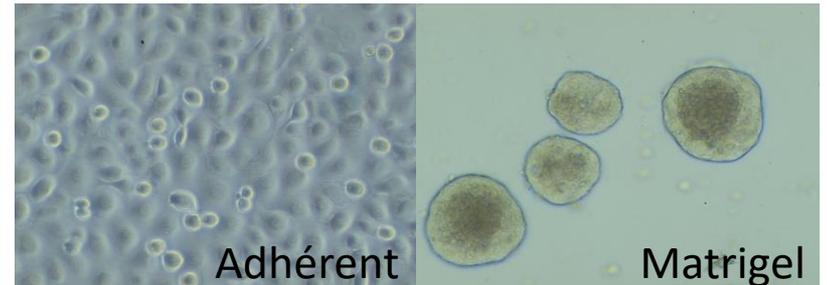
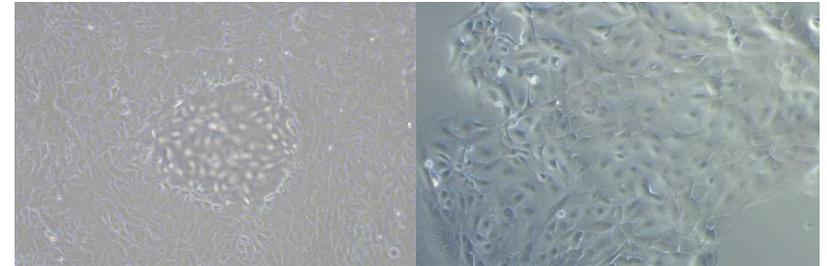
Cellules du lait



In vitro

Cellules dissociées (culture primaire)

Lignées cellules épithéliales mammaires



Des cellules épithéliales distinguables parmi les cellules totales du lait

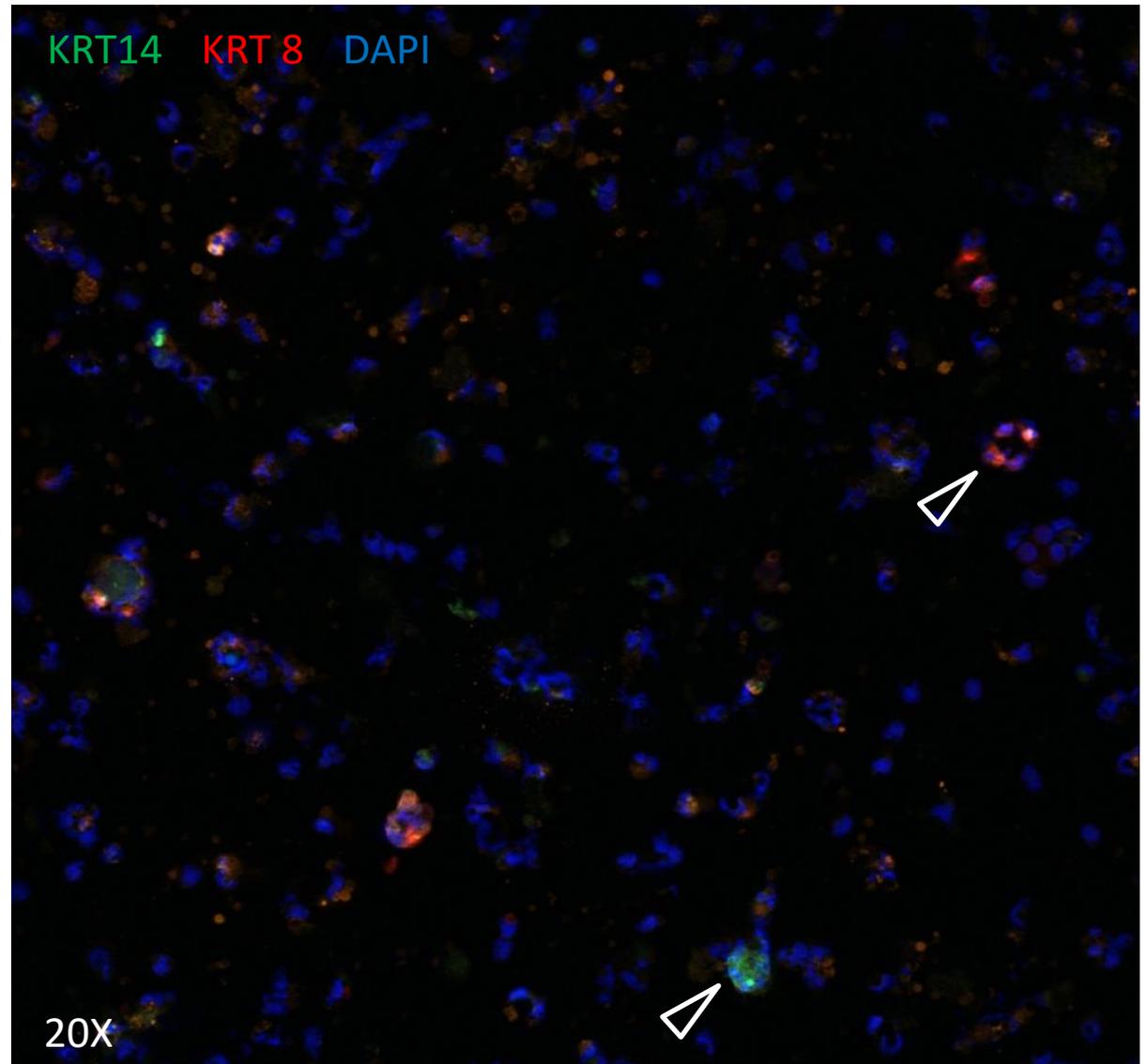


ImmunoFluorescence :

cellules basales (KRT14)
cellules luminales (KRT8)

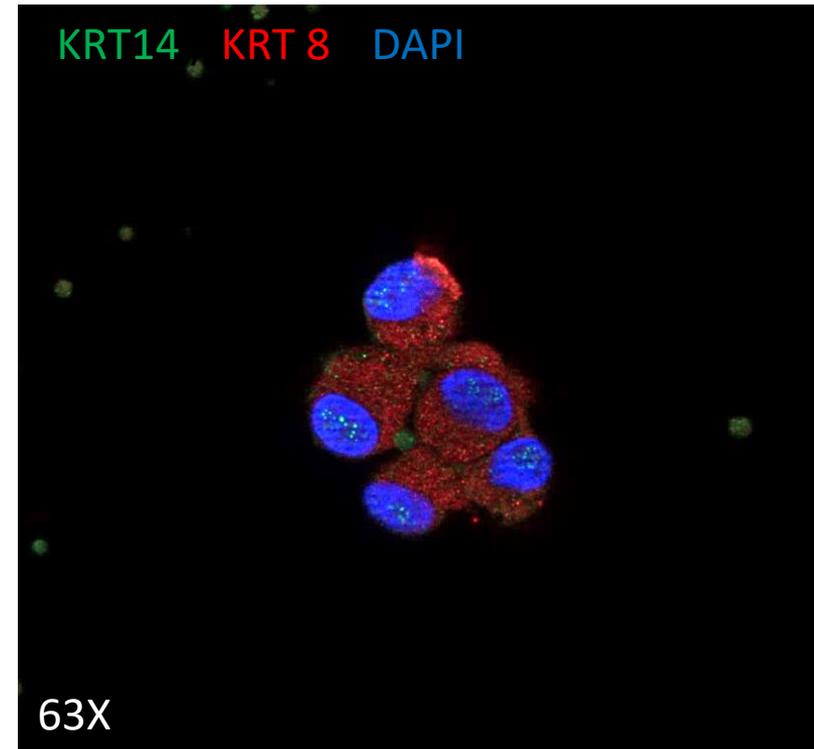
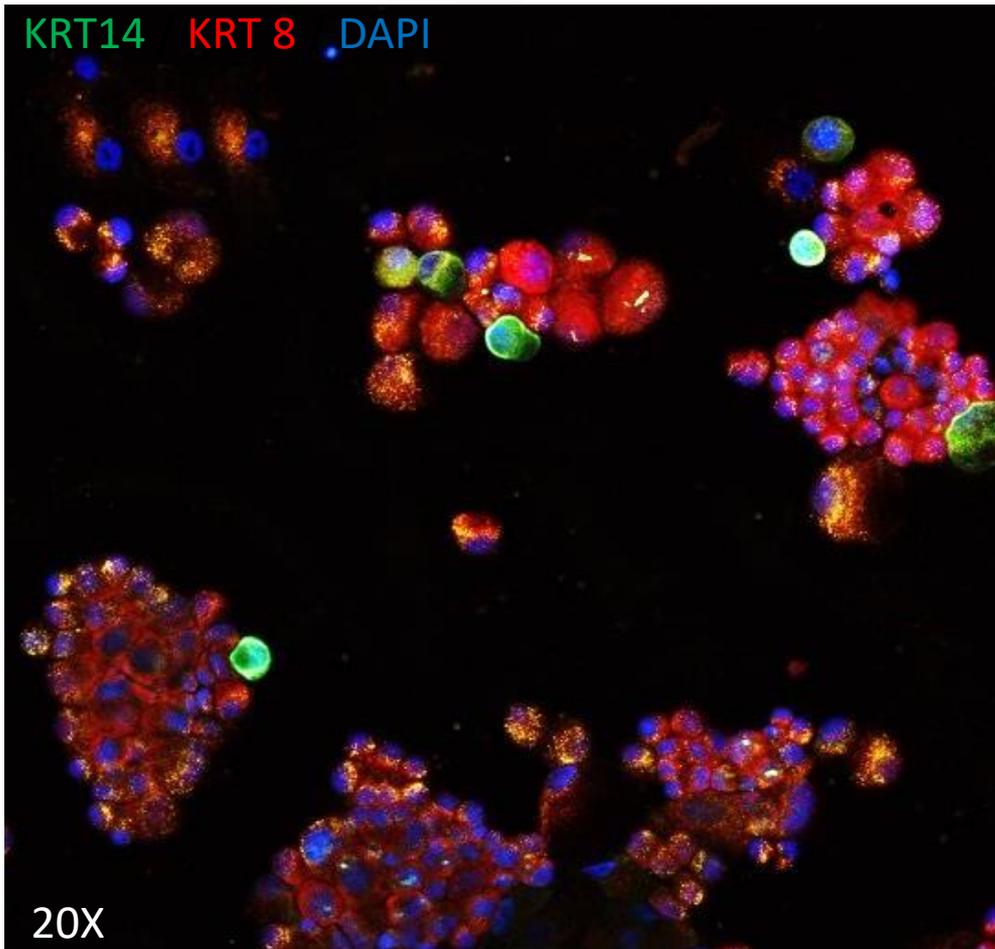
Peu de cellules épithéliales

Cellules luminales, basales?



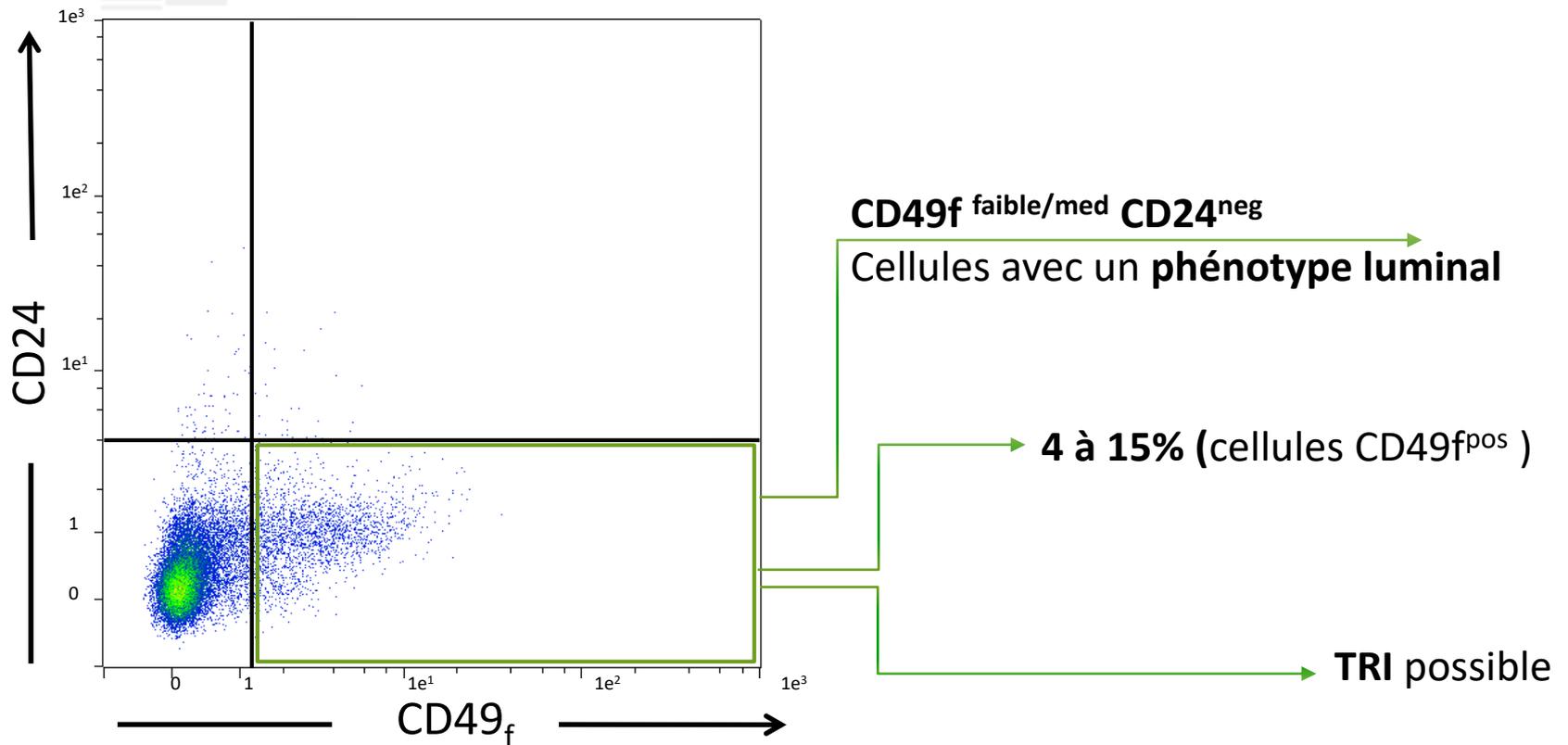
Les cellules épithéliales du lait sont majoritairement lumineales

Après culture en support adhérent des cellules totales du lait



Phénotyper les cellules du lait pour connaître son échantillonnage

Cellules du lait de vache en lactation



En conclusion

L'approche de cytométrie en flux :

- Mise en évidence des populations épithéliales : proposition d'un lignage épithélial mammaire chez la vache laitière
- Etude 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

Collègues et collaborateurs de l'UMR PEGASE (St-Gilles)

Installation Expérimentale de Méjusseaume

Pierre Germon (UMR ISP) et Sergine Even (UMR STLO)

Collègues et collaborateurs de l'UMR GABI (Jouy-en-Josas)

Plateformes BIOSIT de RENNES : CytomeTRI &
Génomique Environnementale et Humaine (GEH)

Merci

