HAL
open science

Impact des microARNs sur la lactation et la régulation nutritionnelle de leur expression dans la glande mammaire

Lenha Mobuchon

To cite this version:

Lenha Mobuchon. Impact des microARNs sur la lactation et la régulation nutritionnelle de leur expression dans la glande mammaire. Sciences agricoles. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2015. Français. NNT : 2015CLF22658 . tel-01343374

HAL Id: tel-01343374

https://theses.hal.science/tel-01343374

Submitted on 8 Jul 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.

Université Blaise Pascal
N° D.U. 2658

Université d'Auvergne
Année : 2015

Ecole doctorale des Sciences de la Vie, Santé, Agronomie, Environnement
N° d'ordre : 680

THESE

Pour obtenir le diplôme de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

Spécialité : Physiologie et Biologie moléculaires

Soutenue publiquement par

Lenha MOBUCHON

Le 16 Décembre 2015

Impact des microARNs sur la lactation et la régulation nutritionnelle de leur expression dans la glande mammaire

---

Sous la direction de Mmes Fabienne LE PROVOST et Christine LEROUX

Devant le jury :

Mme Christine GASPIN, Directeur de Recherche, Inra Toulouse	Rapporteur
Mme Sophie ROME, Directeur de Recherche, Inra/Inserm/Université de Lyon	Rapporteur
Mme Carole CHARLIER, Professeur de l'Université de Liège	Examinateur
Mme Paola SACCHI, Professeur de l'Université de Turin	Examinateur
Mr Claude BEAUDOIN, Professeur de l'Université Blaise Pascal	Examinateur
Mme Fabienne LE PROVOST, Directeur de recherche, Inra Jouy-en-Josas	Examinateur
Mme Christine LEROUX, Directeur de Recherche, Inra Clermont-Ferrand-Theix	Examinateur

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail. Je remercie les Drs Christine Gaspin et Sophie Rome d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse ainsi que les Drs Carole Charlier, Paola Sacchi et Claude Beaudoin d'avoir accepté d'en être examinateurs.

Je remercie également l'Inra et ApisGène qui ont financé ce projet. Ma thèse s'est déroulée dans deux unités de l'Inra, je remercie donc les unités Herbivores de Theix et Gabi (Génétique Animale et Biologie Intégrative) de Jouy-en-Josas de m'avoir accueillie au sein de leur structure.

Je tiens à exprimer ma gratitude et toute ma reconnaissance à mes deux directrices de thèse, Dr Christine Leroux et Dr Fabienne Le Provost. Je ne sais comment vous remercier, tant vous m'avez apporté. Merci de m'avoir confié ce projet et pour votre confiance tout au long de sa réalisation. Un très grand merci pour votre bienveillance, votre disponibilité et votre écoute. Vous avez été bien plus que des encadrantes pendant ces trois années de thèse. Je vous dois énormément.

A Sandrine Le Guillou, un grand merci pour tous tes conseils utiles et ton aide précieuse qui ont été essentiels à la réalisation de cette thèse !

A Sylvain Marthey, je ne sais comment toutes les analyses de bioinformatiques auraient été réalisées sans ton aide et tes conseils ! Merci beaucoup pour ta patience infaillible et pour tout ce que tu m'as enseigné ! Je me rappellerai longtemps des vendredis soirs bioinfo !

A Johann Laubier, merci pour ta bonne humeur et ton savoir technique ! Merci de m'avoir aidé à trouver mes marques dans le laboratoire ! Je tiens aussi à te remercier pour toute l'aide que tu m'as apporté que ce soit tes précieux conseils ou pour les cultures cellulaires !

Un merci particulier aux membres de mon comité de thèse les Drs Carine Capel, Madia Charlier, Christophe Antoniewski, Dragan Milenkovic et Silvère Baron pour vos conseils constructifs. Nos discussions lors des comités ont été riches et fructueuses.

Je remercie très chaleureusement les équipes AGL (Inra de Theix) et GFP-GM (Inra de Jouy-en-Josas) pour votre accueil, votre bonne humeur au quotidien et votre gentillesse !

Merci pour la convivialité qui régnait dans les laboratoires et qui a fortement contribué à mon intégration ! Merci à Pascale Béraud pour toute ton aide sur le plan administratif ! Un merci particulier à Sead Chadi et Christelle Cebo, mes colocataires de bureau à Jouy, pour votre bonne humeur et tous vos conseils ! Merci également à Edith Honvo-Hueto, Céline Boby et Sebastien Bes pour votre expertise technique et votre disponibilité ! Je remercie également Denis Laloë et Anne de la Foye pour toute l'aide qu'ils m'ont fourni au niveau des analyses statistiques !

Ce travail a également été le fruit de plusieurs collaborations ! Merci à Alyssa Imbert et Dr Christèle Robert-Granié (GenPhySE, Inra de Castanet-Tolosan) pour toute leur implication et le travail conséquent qu'elles ont réalisé pour le Crédit Incitatif MDI ! Merci à Dr Mekkhi Boussaha avec qui j'ai eu grand plaisir de collaborer pour mon premier article ! Merci aux Drs Gwenola-Tosser et Rachel Rupp (GenPhySE) de nous avoir permis d'entreprendre le travail de recherche de SNP dans les miARN caprins ! Je tiens aussi à remercier Dr Dominique Rocha pour m'avoir permis de séquencer les BME-UV1 ! J'adresse aussi mes remerciements à Dr Frédéric Dessauge de l'UMR Pegase (INRA de Saint Gilles) pour m'avoir fourni les BME-UV1 !

Je tiens aussi à remercier les Drs Marion Boutinaud, Florence Gondret et Isabelle Louveau (UMR Pegase), mes encadrantes de stages de master qui m'ont initié à la recherche et encouragé à poursuivre en thèse.

Un merci particulier aux badistes de Theix et Jouy pour votre esprit sportif ! Je n'oublierai jamais tous ces moments passés à vos côtés que ce soit nos matchs hebdomadaires ou les plus longs séjours que nous avons partagé comme les Adayades ou la coupe à Montpellier !

J'ai rencontré beaucoup de personnes pendant ces trois années de thèse ! Je n'ai pas la place de les nommer individuellement mais je pense à tous les stagiaires, doctorants ou post-doctorants qui ont croisé mon chemin ! Merci à tous d'avoir partagé un bout de cette aventure avec moi !

Cette thèse est l'aboutissement d'un long parcours universitaire qui a nécessité des efforts et de la persévérance ! Aussi, mes derniers remerciements vont à ma famille et mes proches qui m'ont toujours encouragé dans ce projet et qui ont été d'un soutien sans faille ! Enfin, merci Yann pour ta présence, ta patience et ta compréhension qui ont aidé à me construire !

Cette thèse n'aurait pu se réaliser sans votre contribution ! MERCI à tous !

TABLE DES MATIERES

Remerciements *2*

Table des matières *4*

Liste des abréviations *8*

Table des illustrations *10*

Contexte *13*

Introduction **16**

I. La glande mammaire et la synthèse du lait *17*

I.1) La glande mammaire : lieu de synthèse et de sécrétion des constituants du lait. 17

I.1.1) Description anatomique de la glande mammaire 17

I.1.2) Développement, différenciation et involution de la glande mammaire 19

I.1.2.1) Description morphologique 19

La mammogenèse 19

La lactogenèse 20

La galactopoïèse 20

L'involution 21

I.1.2.2) Régulation hormonale 22

I.2) La composition du lait **24**

I.2.1) Les matières grasses 24

I.2.1.1) Le globule gras du lait 24

I.2.1.2) La composition de la matière grasse du lait 25

I.2.1.3) Synthèse et sécrétion de la matière grasse du lait 26

Absorption des acides gras à chaine longue par la glande mammaire 26

Synthèse de novo des acides gras à chaine courte et moyenne 27

Désaturation des acides gras 28

Synthèse des triglycérides 28

Sécrétion des lipides du lait 29

I.2.2) Les protéines du lait 30

I.2.2.1) Les caséines 30

I.2.2.2) Les protéines du lactosérum 31

I.2.2.3) Synthèse et sécrétion..... 31

Synthèse 31

Sécrétion..... 32

I.2.3) Les glucides et autres constituants moindres..... 32

I.2.4) Régulation transcriptionnelle de la synthèse des constituants du lait..... 33

I.3) Facteurs modulant la synthèse et la composition du lait 35

I.3.1) Le facteur génétique 35

I.3.1.1) Impact du polymorphisme au locus de la caséine α_{s1} sur la biosynthèse des constituants du lait..... 36

I.3.1.2) Effet du polymorphisme au locus DGAT1 sur le métabolisme des lipides..... 37

I.3.2) Le facteur nutritionnel 37

II. Les miARN 42

II.1) Découverte et caractéristiques des miARN 42

II.2) La biogenèse des miARN..... 44

II.2.1) Localisation génomique et transcription 45

II.2.2) miARN editing 46

II.2.3) Maturation nucléaire du miARN primaire 46

II.2.4) Transport du pré-miARN du noyau au cytoplasme..... 48

II.2.5) Maturation du pré-miARN en miARN mature..... 48

II.2.6) Formation du complexe RISC..... 50

II.3) Mode d'action des miARN 51

II.3.1) Principe de l'interaction miARN/ARNm 51

II.3.2) Dégradation et répression de la traduction de l'ARNm cible 52

II.3.3) Activation de la traduction 53

II.3.4) Localisation cellulaire de la régulation des ARNm par les miARN 54

II.4) Régulation des miARN 55

II.4.1) Régulation transcriptionnelle de la synthèse des miARN 56

II.4.2) Régulation des miARN lors de la maturation 57

Régulation au niveau du pri-miARN 57

Régulation de l'export du pré-miARN au cytoplasme..... 57

Facteurs affectant la maturation du pré-miARN 57
II.4.3) Stabilité et dégradation des miARN 58
II.4.4) Régulation nutritionnelle des miARN 59
II.5) Fonctions des miARN 61
II.5.1) Moyen d'étude du rôle des miARN 62
II.5.2) Fonctions biologiques régulées par les miARN 65
II.5.3) Action des miARN sur le métabolisme des lipides 67
II.6) Approches pour la détection et la quantification des miARN 69
Northern Blot 69
Hybridation in situ 69
RT-qPCR 70
Les puces à oligonucléotides 70
Séquençage haut débit 71
III. MiARN et ruminants 73
Découverte des miARN chez les ruminants 73
Rôle fonctionnel et implication des miARN dans un caractère de production 74
Liens entre polymorphismes et miARN impliqués dans des caractères de production 75
IV. MiARN et glande mammaire 77
miARN et cellules souches mammaires 78
miARN et prolifération des cellules mammaires 78
miARN et différenciation mammaire 80
miARN, lactation et synthèse des constituants du lait 81
miARN et infections mammaires 82
Les miARN dans le lait 83
Travaux personnels 85
I. Etablissement des miRNomes mammaires 87
I.1) Etablissement et comparaison des miRNomes mammaires murin et bovin 87
I.2) Annotation du génome caprin à l'aide du miRNome établit chez la chèvre en lactation 88
II. Régulation nutritionnelle des miARN dans la glande mammaire de ruminants en lactation 91
II.1) Effet d'une privation alimentaire 91
II.1.1) Etude de l'impact sur le miRNome mammaire chez la chèvre en lactation 91

II.1.2) Corrélation statistique entre DEG et miARN nutrirégulés 93

II.2) Effet d'une supplémentation lipidique 97

II.2.1) Chez la vache en lactation 98

II.2.2) Chez la chèvre en lactation 100

III. Rôle fonctionnel des miARN nutrirégulés sur la lactation 102

Discussion générale et perspectives 115

L'identification des miARN dans la glande mammaire 116

Une méthodologie de choix 116

Utilisation des miRNomes mammaires 121

Autre application: Implications des miARN dans des caractères de production laitière 122

La régulation nutritionnelle des miARN 124

Fonctions des miARN nutrirégulés 127

Fonctions prédites 127

Lien entre miARN et DEG 128

L'étude fonctionnelle des miARN 130

Etude de la surexpression des miARN nutrirégulés 130

Choix du modèle cellulaire 131

Identification de la fonction des miARN nutrirégulés 133

Références 137

Annexes 172

LISTE DES ABREVIATIONS

ABC: ATP-Binding Cassette
ACBP: Acetyl-CoA Binding Protein ACC: Acétyl-CoA Carboxylase (Gène: ACACA)
ac-pré-miARN: AGO2-cleaved pre-miRNA
ACS: Acyl-CoA Synthétase
ADAR: Adenosine Deaminases Acting on RNA
ADNc: Acide DésoxyriboNucléique Complémentaire
AG: Acides Gras
AGO: Argonaute
AGPAT : AcylGlycérol-3-Phosphate AcylTransférase
AGPI: Acides Gras PolyInsaturés
ARN: Acides RiboNucléiques
ApoH: Apolipoprotein H
ARNdb: ARN double brin
ARNnc: ARN non codants
ARNsb: ARN simple brin
ARNm: ARN messagers
BCDIN3D: BCDIN3 Domain Containing
BCL2: B-Cell CLL/Lymphoma 2
BTN: BuTyrophiliNe
CAF1: CCR4-NOT transcription complex subunit 8
CD36: Cluster of Differenciation 36
CDC25A: Cell Division Cycle 25A
CEM : Cellule Epithéliale Mammaire
circARN: ARN circulaires
CLA: Conjugated Linoleic Acids
Cox-2: Cyclooxygenase-2
CPT1A: Carnitine PalmitoylTransferase 1A
CROT: CaRnitine O-octanoylTransferase
CSN1S1: gène codant pour la Caséine αs1
CSN2S2: gène codant pour la Caséine αs2
CSN2: gène codant pour la Caséine β
CSNK: CaSeiN Kinase
Dbr: enzyme Débranchante
DDX6: DEAD boX protein 6
DEG: Differentially Expressed Gene
DGAT: DiacylGlycérol AcylTransférase
DGCR8: DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8
DNMT1: DNA MethylTransferase 1
dsRBD: double strand RNA Binding Domain
eIFAE ou G: Eukaryotic translation Initiation Factor 4E ou G
EMT: Epithelium to Mesenchyme Transition
ELOVL6: ELOVL fatty acid elongase 6
EMT: Epithelial-Mesenchymal Transition
ER ou ESR: oEStrogen Receptor
EXP5 ou XPO5: EXPortin 5
FABP: Fatty Acid Binding Protein
FAS: Fatty Acid Synthetase (gène: FASN)
FMR1: Fragile X Mental Retardation 1
FXR1: Fragile X-Related protein 1
GDF8: myostatin
GH: Growth Hormone
GHR: Growth Hormone Receptor
GLUT: GLUcose Transporter
GPAT: Glycérol-3-Phosphate AcylTransférase (gène: GPAM)
HADHB : HydroxyAcyl CoA Dehydrogenase-3-ketoacyl-CoA thiolase-enoyl-CoA Hydratase
HCV: Hepatitis C Virus
HDL: High Density Lipoprotein
HMGB1: High-Mobility Group Box protein 1
HSP90: Heat Shock Protein 90
IGF1: Insulin Growth Factor 1
INSIG1: INSulin Induced Gene 1
JAK2: JAnus Kinase 2
LALBA: α-LActaLBumine
Lef1: Lymphoid enhancer binding factor 1
LDL: Low Density Lipoprotein
LGB: β-lactoglobuline
LIF: Leukemia Inhibitory Factor

lincARN: long intergenic non coding ARN
LPL: LipoProtein Lipase
LNA: Locked Nucleotide Acid
MFD: Milk Fat Depression
miARN: microARNs
MFD: Milk fat Depression
MG: Matière Grasse
MT: Matière Protéique
MTHFR:5,10-MethyleneTetraHydroFolate Reductase
mTOR: mammalian Target Of Rapamycin
MVB: MultiVesicular Bodies
qPCR: quantitative Polymerase Chain Reaction
PABPC: Poly-A Binding Protein
PACT: Protein kinase, interferon-inductible double-stranded RNA-dependent activator
PAN2 ou 3: PAN2 Poly-A Specific Ribonuclease Subunit ou 3
PAZ: PIWI/Argonaute/Zwille
P-bodies: Processing Bodies
PL: Production de Lait
Pb: paires de bases
PGR: ProGesteron Receptor
PLIN2: PeripiLIN ou adipophilin
Pol II: Polymerase II
PRLR: PRoLactin Receptor
PPARγ: Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma
PPARGC1A ou B: Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Co-activator A ou B
PTHrP: ParaThyroïd Hormone-related Peptide
qPCR: quantitative Polymerase Chain Reaction
QTL: Quantitative Traits Loci
RDE-4: RNAi deficient -4
RER: Réticulum Endoplasmique Rugueux
RISC: RNA-Induced Silencing Complex
RLC: RISC Loading Complex
RT: Reverse Transcription
SCAP: SREBP Cleavage-Activating Protein
SCD: Stéaroyl-CoA désaturase
siARN: small interfering ARN
SLGT: Sodium/GLucose co-Transporter
snoARN: small nucleolar ARN
SNP: Single Nucleotide Polymorphisme
SREBP: Sterol Response Element-Binding Protein
STAT3β ou 5: Signal Transducer and Activator of Transcription 3β ou 5
T3: 3, 3', 5-triiodothyronine
Tbx3: T box 3
TGF-β: Transforming Growth Factor-β
TNF-α: Tumour Necrosis Factor-α
TP: Taux Protéique
TRBP: Trans-activation response RNA-Binding Protein
TUT4: Terminal Uridylyl Transferase 4
XOR: Xanthine OxydoRéductase
XRN1 ou 2: eXoRiboNucléase 1 ou 2
WAP: Whey Acidic Protein
ZEB-1: Zinc finger E-Box binding homeobox 1
ZO-1: Zonula Occludens 1

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Tableau 1 Nombre et localisation des glandes mammaires chez différents mammifères. 17
Figure 1 Schéma de glandes mammaires. 17
Figure 2 Représentation schématique de l'épithélium et du stroma au cours du développement de la glande mammaire. 18
Figure 3 Hiérarchie des cellules souches et progénitrices chez la souris. 18
Figure 4 Les différentes étapes du développement de la glande mammaire. 19
Figure 5 Schéma d'une cellule épithéliale mammaire différenciée. 20
Figure 6 Schéma de la cinétique de production de lait chez la vache. 20
Figure 7 Apoptose et autophagie dans la glande mammaire bovine. 21
Figure 8 Schéma du développement de la glande mammaire au cours d'un cycle de lactation et son contrôle hormonal. 22
Tableau 2 Composition moyenne du lait chez différentes espèces. 24
Figure 9 Structure d'un globule gras du lait. 25
Tableau 3 Composition de la matière grasse laitière dans différentes espèces (%). 26
Figure 10 Structure d'un triglycéride. 26
Figure 11 Formule de l'acide linoléique et de l'acide linoléique conjugué. 26
Figure 12 Voies de synthèses des lipides du lait. 27
Figure 13 Synthèse des triglycérides dans la cellule épithéliale mammaire. 28
Figure 14 Formation et sécrétion des gouttelettes lipidiques. 29
Figure 15 Modèles de sécrétion des globules gras du lait. 29
Figure 16 Modèles de structure de la micelle de caséine. 30
Tableau 4 Principaux transporteurs d'acides aminés dans la glande mammaire. 32
Figure 17 Schéma de l'activation de STAT5 par la prolactine dans les cellules épithéliales mammaires. 34
Figure 18 Effet d'un l'allèle défectif de la caséine α_{s1} sur la morphologie des cellules épithéliales mammaires. 36
Figure 19 Effet d'une privation alimentaire de 48h chez la chèvre en lactation sur la composition du lait ainsi que sur l'expression des gènes de la lipogenèse. 38
Tableau 5 Effets d'une supplémentation en huile de tournesol sur la composition en acides gras (mmol/j) du lait de chèvre. 40
Tableau 6 Principales classes d'ARN non codants et leurs fonctions chez les mammifères. 42
Figure 20 Voie canonique de synthèse des petits ARN impliqués dans le phénomène d'ARN interférence chez les vertébrés. 43
Figure 21 Structure d'un précurseur de miARN chez l'homme. 44
Figure 22 Exemple d'une famille de miARN, la famille miR-30 chez l'homme. 44
Figure 23 Représentation des différents types d'isomiR. 44
Figure 24 Biogenèse canonique des miARN. 45
Figure 25 Localisation génomique des miARN. 45
Figure 26 Structure d'un miARN primaire. 46
Figure 27 L' « editing » des miARN. 46
Figure 28 Structure des protéines Drosha et DCGR8 chez l'homme. 47
Figure 29 Action de Drosha et DCGR8 sur le pri-miARN. 47
Figure 30 Les différentes voies de synthèse des miARN. 48
Figure 31 Structure de Dicer chez l'homme (A) et représentation de sa forme et du positionnement de ses domaines lors de la liaison avec un miARN (B). 49
Figure 32 Formation des ac-pré-miARN. 49

Figure 33 Modèles du chargement du miARN dans les protéines Argonautes chez l'homme. 50
Figure 34 Principe de l'interaction miARN/ARNm. 51
Figure 35 Les différentes actions des miARN sur leur cible. 52
Figure 36 Biogenèse canonique et action des miARN. 54
Figure 37 Différents cas du phénomène « éponges » à miARN. 55
Figure 38 Modifications de l'extrémité 3' des miARN régulant leur stabilité. 58
Figure 39 Effet de l'interaction miARN/ARNm sur la stabilité des miARN. 59
Tableau 7 Exemples de miARN dont les expressions sont affectées par des régimes enrichis en lipides. 60
Tableau 8 Caractéristiques des principaux sites de prédiction de cibles des miARN. 62
Figure 40 Différents types d'approche, utilisant des oligonucléotides synthétiques pour étudier la fonction des miARN. 64
Figure 41 Structure chimique d'un nucléotide d'ARN et de LNA. 64
Tableau 9 Exemples de miARN impliqués dans le métabolisme des lipides. 67
Figure 42 Modèle du rôle de SREBPs et de *mir-33*. 68
Figure 43 Exemples de miARN impliqués dans l'homéostasie du cholestérol. 69
Figure 44 Exemple de régulation de l'ARNm d'*ABCA1* par plusieurs miARN. 69
Figure 45 Etude de l'expression de quatre miARN par Northern blot à différents stades de développement chez la drosophile. 70
Figure 46 Exemples de localisations de miARN dans des embryons de souris. 70
Figure 47 Méthodes de quantification des miARN par RT-qPCR. 71
Figure 48 Préparation des banques et principe du séquençage des miARN. 72
Figure 49 Nombre d'articles sur les miARN dans PubMed (A) et nombre de miARN dans les bases de sonnées miRBase (B) en fonction des espèces. 73
Tableau 10 Exemples de polymorphismes présents dans le site de liaison des miARN et de leurs cibles. 75
Tableau 11 Quelques exemples de miARN connus pour être impliqués dans la biologie de la glande mammaire. 77
Figure 50 Implications des miARN dans la biologie de la glande mammaire. 79
Figure 51 Privation alimentaire de 48h chez la chèvre en lactation. 91
Figure 52 Matrice de corrélation entre les expressions des miARN nutrirégulés (30) et les gènes différentiellement exprimés (958) dans la glande mammaire des chèvres privées d'alimentation pendant 48h. 94
Tableau 12 Gènes différentiellement exprimés dans la glande mammaire des chèvres privées d'alimentation pendant 48h et dont les expressions peuvent être expliquées par les variations d'expression des miARN par la méthode SPARSE-PLS. 95
Figure 53 Relation entre les gènes différentiellement exprimés (DEG) dans la glande mammaire des chèvres privées d'alimentation. 96
Figure 54 Liens entre les ARNm et les miARN différentiellement exprimés par la privation alimentaire de 48h dans la glande mammaire de chèvre en lactation et sélectionnés par la méthode de Sparse-PLS. 96
Figure 55 Gènes différentiellement exprimés (DEG) dans la glande mammaire des chèvres privées d'alimentation, ciblés et anti-corrélés avec *miR-409-3p*. 97
Figure 56 Effet du niveau du ratio fourrage/concentré et de l'addition de graines de colza entières ou d'huile de tournesol sur les paramètres zootechniques et l'expression des gènes dans la glande mammaire de vache en lactation. 98
Figure 57 Effet du niveau du ratio fourrage/concentré et de l'addition de graines de colza entières ou d'huile de tournesol sur les paramètres zootechniques et l'expression des gènes dans la glande mammaire de chèvre en lactation. 100
Figure 58 Effet de la supplémentation en huile de tournesol sur l'expression des miARN mammaires chez des chèvres en lactation. 101

Figure 59 Experimental design of transfection assays. **107**
Figure 60 Transfection experiments and controls. **109**
Figure 61 Effect of *miR-140-3p* overexpression on the proliferation of BME-UV1. **110**
Figure 62 Effect of *miR-99a-5p* overexpression on the proliferation of BME-UV1. **111**
Figure 63 Immunostaining of controls and transfected cells with Bodipy 493/503. **112**
Figure 64 Relative levels of genes involved in lipid metabolism in controls and transfected cells with *miR-99a-5p* mimics. **113**
Figure 65 Relative levels of genes involved in lipid metabolism in controls and transfected cells with *miR-222-3p* mimics. **114**

CONTEXTE

La filière laitière est un atout important pour l'économie française représentant 67 400 exploitations laitières et 250 000 emplois sur tout le territoire français (CNIEL 2014 d'après ESANE, RICA, Enquête annuelle laitière). Cette filière est la seconde puissance laitière d'Europe, après l'Allemagne (http://www.produits-laitiers.com/l-economie-laitiere-en-europe/). Elle représente 1/5 du chiffre d'affaire (27,7 milliards d'euros en 2012, ESANE) et se situe au 2ème rang du secteur agro-alimentaire, derrière la filière viande. En 2014, la France produisait 24,6 milliards de litres de lait, soit une hausse de 5,7% par rapport à 2013 (Rapport CNIEL 2015). En revanche, bien que la consommation de fromages soit stable par rapport à celle de 2013, et celles du beurre et de la crème en légère hausse, une baisse de 12% de la consommation du lait a été enregistrée. La consommation française des produits laitiers est plutôt stable voir déclinante sur ces dernières années (Chatellier *et al*., 2013). Outre ces enjeux socio-économiques, le rôle nutritionnel du lait est indéniable. En effet, le lait est un aliment essentiel, le premier donné au jeune et doit donc fournir tous les nutriments essentiels à sa croissance. Notamment le premier lait sécrété après la parturition, le colostrum, apporte une protection immunitaire fondamentale au nouveau-né, grâce à sa richesse en protéines et en anticorps. Le lait contient des protéines, des matières grasses, du lactose et du calcium. Cette composition conditionne fortement les qualités nutritionnelles, sensorielles et technologiques du lait. Dans la plupart des pays européens, le lait et les produits laitiers tiennent une place importante dans l'alimentation. Ils apportent 40% du total des acides gras saturés consommés (Givens, 2010). En effet, la matière grasse laitière est composée d'environ 60% d'acides gras saturés dont la consommation excessive a été associée à une augmentation du taux plasmatique de cholestérol transporté par des lipoprotéines de faible densité, un marqueur prédictif du risque de maladies cardio-vasculaires humaines (Mensink *et al*., 2003). Un risque accru de maladies coronariennes a aussi été associé à la consommation excessive d'acides gras *trans* (Shingfield *et al*., 2008, Givens, 2010) bien que les acides gras *trans* majeurs du lait (*trans 11*) soient moins néfastes que les acides gras *trans 10* (Faulconnier *et al*., 2006). A l'inverse, certains acides gras plus minoritaires dans le lait comme les acides linoléiques conjugués ont des propriétés anti-cancérigènes et anti-athérogènes (Wahle *et al*., 2004, Shingfield *et al*., 2008). L'impact du lait et des produits laitiers sur la santé est de plus en plus prise en compte et mène à une remise en cause de leurs bienfaits par le consommateur,

conduisant à un mouvement anti-lait croissant (Fournier, 2013). Cependant, ces dernières années la filière laitière a entrepris des campagnes promotionnelles misant sur la valeur du lait et des produits laitiers.

Dans ce contexte, il est urgent de déterminer les mécanismes permettant de réguler la synthèse de la composition du lait, afin *in fine* d'en maitriser les particularités. De nombreux leviers existent pour modifier la productivité et la composition du lait. Parmi ces facteurs se trouvent les facteurs environnementaux comme l'alimentation, les techniques d'élevages telles que la fréquence de traite ou des facteurs intrinsèques à l'animal comme sa génétique. En particulier, l'alimentation constitue un levier rapide et réversible permettant de moduler la quantité et la composition du lait. Les effets des supplémentations de l'alimentation des ruminants dépendent de la nature de la supplémentation (tournesol, colza, lin…) et de la forme de cette supplémentation (huile, graines…) ainsi que de son interaction avec le régime de base. La glande mammaire est le lieu de synthèse et de sécrétion des constituants du lait, impliquant de nombreux gènes. Or l'expression de certains d'entre eux, impliqués dans la synthèse et la sécrétion des constituants du lait, est modifiée par des changements de la ration (Ollier *et al*., 2007, Bernard *et al*., 2008). Néanmoins, les mécanismes moléculaires responsables de la régulation de l'expression de ces gènes en réponse à la nutrition ne sont que partiellement connus.

Dans les années 90, les microARNs (miARN) ont été découverts chez le nématode *C. Elegans* (Lee *et al*., 1993). Ensuite leur conservation a été démontrée chez la plupart des espèces de vertébrés. Ces petits ARN simples brins d'une vingtaine de nucléotides ont la capacité de réguler l'expression de leurs gènes cibles en s'y fixant par complémentarité de bases (Bartel, 2004). Les miARN sont impliqués dans la plupart des fonctions biologiques (Dong *et al*., 2013). Leur expression est modulée par plusieurs facteurs dont l'alimentation chez différentes espèces et tissus (Ross et Davis, 2011). Les miARN offrent donc des pistes de compréhension de la régulation de l'expression des gènes par la nutrition dans la glande mammaire de ruminants.

C'est dans ce contexte que s'est inscrit mon sujet de thèse dont l'objectif était de déterminer la régulation nutritionnelle de l'expression des miARN dans la glande mammaire et leur rôle sur la physiologie de cet organe chez les ruminants. En premier lieu, ce travail a consisté à acquérir une meilleure connaissance des miARN exprimés dans la glande mammaire en lactation. Ainsi une approche globale a permis de dresser les miRNomes, listes des miARN exprimés, dans la glande mammaire chez la souris, la vache et la chèvre en lactation. Ces miRNomes de référence ont ensuite servi à étudier l'effet de la nutrition sur

l'expression des miARN mammaires. La régulation nutritionnelle de l'expression des miARN mammaires a été caractérisée à l'aide de deux modèles ; l'un en condition extrême (une privation alimentaire chez la chèvre en lactation) et l'autre en condition d'élevage (une supplémentation lipidique chez la vache en lactation). Ces modèles ont permis de mettre en évidence une trentaine de miARN dont l'expression était modulée par les différents régimes alimentaires. Afin de caractériser le rôle de ces miARN sur la physiologie de la glande mammaire, trois d'entre eux ont été sélectionnés sur la base des données de la littérature existante et leur fonction a été étudiée *in vitro* dans des cellules épithéliales mammaires bovines.

Ce manuscrit s'articulera en trois sections comprenant en première partie une synthèse bibliographique décrivant : (1) La glande mammaire et la synthèse du lait, (2) les miARN, (3) les miARN chez les ruminants et (4) les miARN dans la glande mammaire. Cette partie introductive dressera un bilan des connaissances actuelles permettant une meilleure compréhension du travail décrit dans ce mémoire. La seconde partie sera consacrée à la description des résultats obtenus lors de cette thèse et s'appuiera largement sur les publications issues de ces travaux. Enfin, la dernière partie permettra de discuter de l'ensemble de mes travaux et d'en tirer les principales conclusions ainsi que les perspectives qui en découlent.

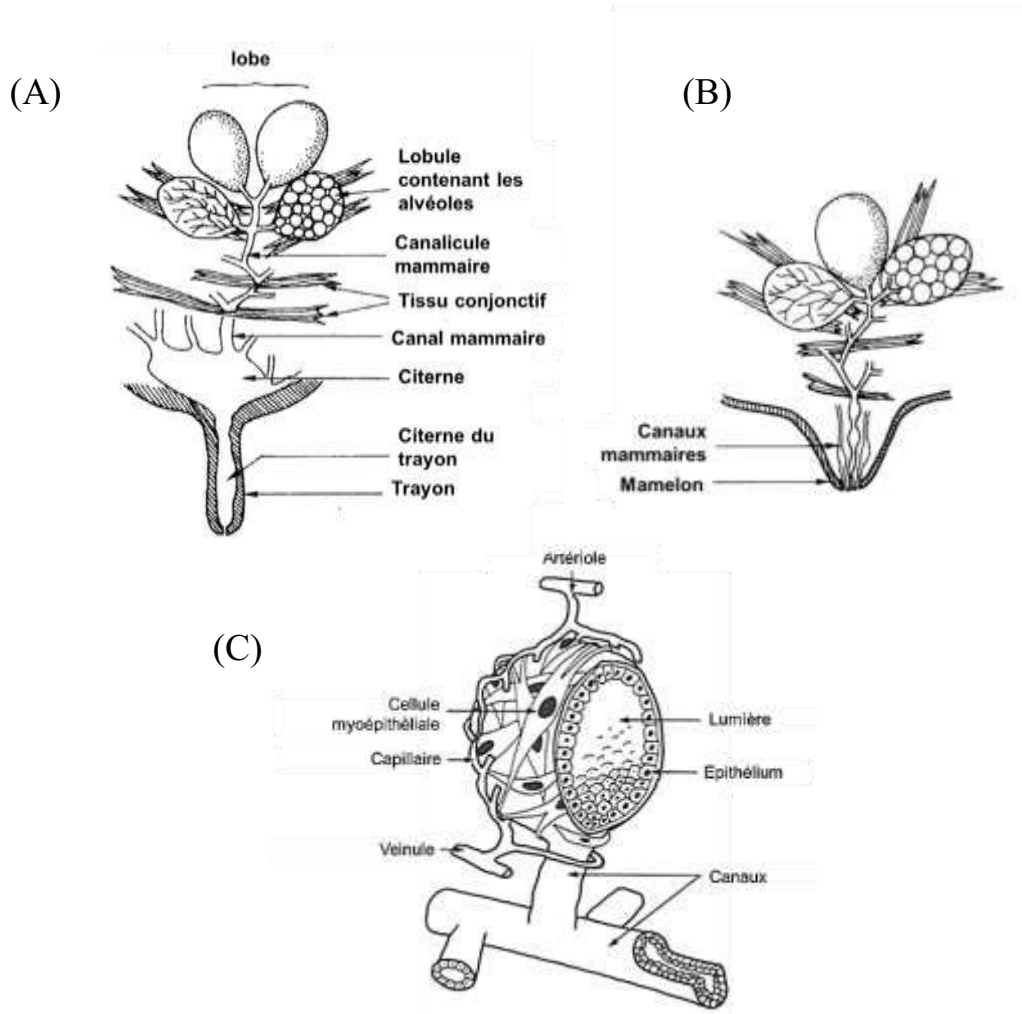
Introduction

Tableau 1 Nombre et localisation des glandes mammaires chez différents mammifères. *D'après Bouichou, 2009.*

Espèces	Nombre de glandes mammaires	Localisations	Nombre d'ouvertures par trayon
Bovins	4	4 I	1
Chèvre, mouton	2	2 I	1
Chatte	8	4 T + 2 A + 2 I	4-8
Chienne	10	4 T + 4 A + 2 I	8-22
Cochon d'Inde	2	2 I	1
Femme	2	2 T	10-20
Jument	2	2 I	2
Lapine	10	2 T + 6 A + 2 I	4-5
Rat	12	6 T + 2 A + 4 I	1
Souris	10	6 T + 4 I	1
Truie	12-14	6 T + 6 A + 4 I	2

T = Thoraciques = entre les membres antérieurs
A = Abdominales
I = Inguinales = entre les membres postérieurs

Figure 1 Schéma de glandes mammaires. (A) Chez les ruminants. (B) Chez la femme et les rongeurs.(C) Structure d'une alvéole mammaire. *D'après Delouis et al., 2001 et Husvèth, 2011.*



I. LA GLANDE MAMMAIRE ET LA SYNTHESE DU LAIT

I.1) LA GLANDE MAMMAIRE : LIEU DE SYNTHESE ET DE SECRETION DES CONSTITUANTS DU LAIT

La glande mammaire est un organe sécrétoire, caractéristique des mammifères, qui produit du lait pour nourrir et offrir une protection immunitaire au jeune. La fonction de lactation, ou la production de lait, est l'aboutissement d'un long processus de développement et de différenciation des tissus mammaires. La glande mammaire se développe de façon progressive, débutant pendant la vie fœtale et juvénile et se poursuivant avec des phases de prolifération et différenciation cellulaires, au rythme des cycles oestriens, de gestation et de lactation de la femelle.

I.1.1) DESCRIPTION ANATOMIQUE DE LA GLANDE MAMMAIRE

L'anatomie de la glande mammaire diffère quelque peu suivant les espèces, le plus souvent en fonction du nombre de petit(s) pouvant être conçu(s) par la femelle (Tableau 1). Chez le bovin, par exemple, la glande mammaire comprend quatre quartiers localisés entre les membres postérieurs. Le trayon qui permet l'éjection du lait est un orifice unique (Figure 1). Les quatre quartiers sont indépendants les uns des autres tant au point de vue anatomique que physiologique. La particularité de la glande mammaire des ruminants est qu'elle possède une citerne permettant de stocker le lait entre les tétées ou les traites. D'autres espèces comme les rongeurs possèdent jusqu'à dix à douze glandes mammaires dépourvues de citernes et composées de plusieurs lobes simples, ayant chacun son individualité sécrétrice et étant relié au mamelon par son propre canal excréteur (Figure 1).

La glande mammaire est constituée de deux tissus ; l'épithélium qui est composé de canaux et d'alvéoles produisant le lait, ainsi que le stroma ou le tissu conjonctif, aussi appelé coussinet adipeux mammaire (Figure 2). En général, les cellules épithéliales forment des canaux et des alvéoles avec une lumière centrale.

De plus, l'épithélium composant la glande mammaire est divisé en lobes, subdivisés en lobules, eux-mêmes formés d'acini ou alvéoles (Figure 1). Dans chaque alvéole, la fonction sécrétrice est assurée par une monocouche de cellules épithéliales luminales, cellules

Figure 2 Représentation schématique de l'épithélium et du stroma au cours du développement de la glande mammaire. Le stroma est constitué de plusieurs types cellulaires et joue un rôle important dans la mise en place des ramifications, ainsi que dans la régulation des cellules souches regroupées en niches. L'épithélium, quant à lui, permet la synthèse et la sécrétion du lait dans la lumière de l'alvéole. *D'après Lu et Werb, 2008.*

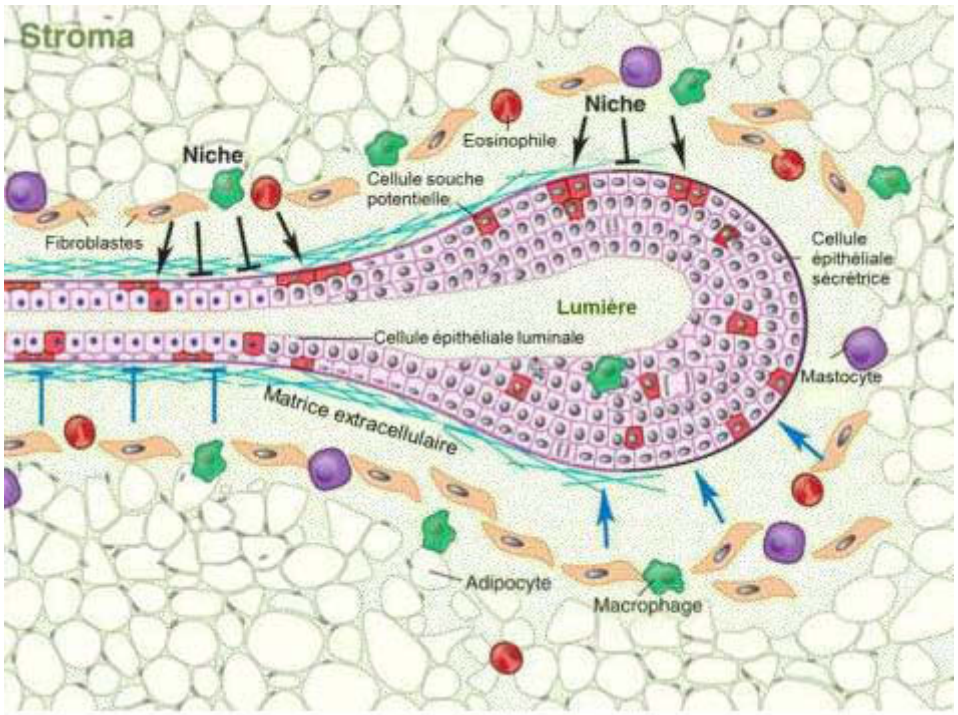
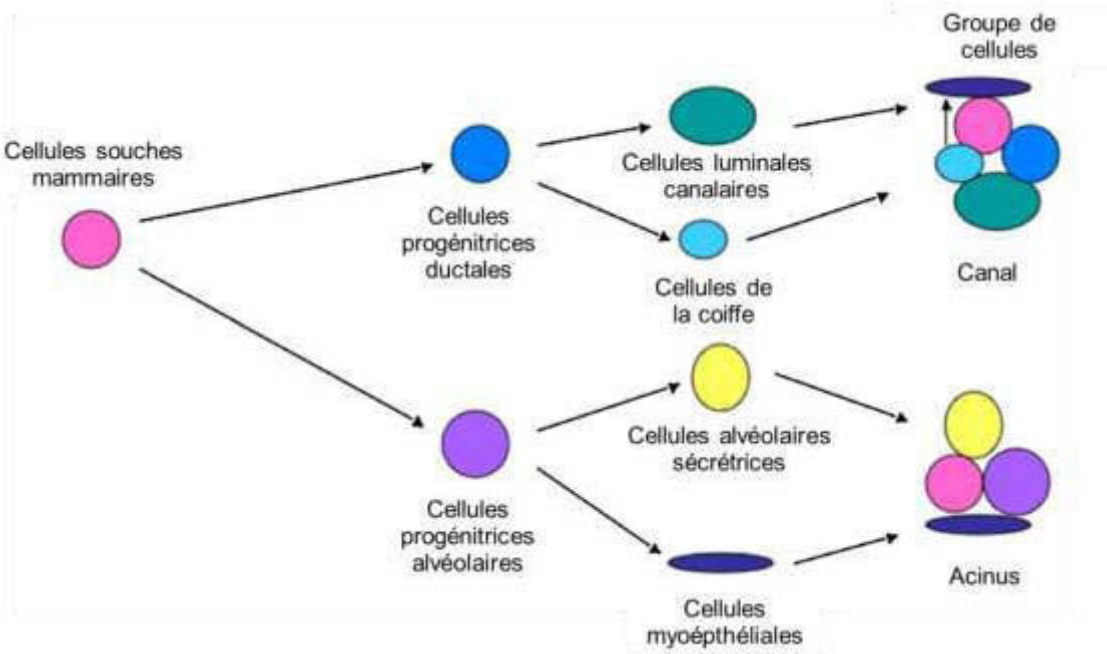


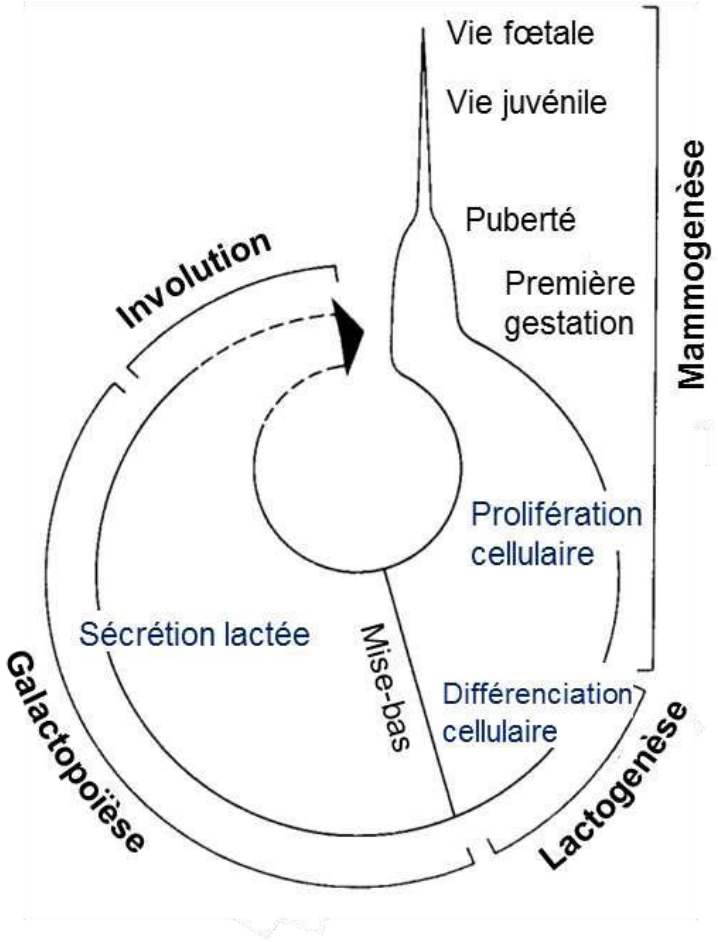
Figure 3 Hiérarchie des cellules souches et progénitrices chez la souris. *D'après Bruno et Smith, 2012*.



sécrétrices polarisées. Selon leur localisation, les cellules épithéliales luminales se différencient de deux façons : le long des canaux, elles deviennent des cellules luminales canalaires et au niveau des alvéoles, elles se différencient en cellules productrices et sécrétrices de lait. Pendant la lactation, les cellules sécrétrices sont polarisées. Au niveau basal, les échanges avec la matrice cellulaire permettent de recevoir les informations responsables de la synthèse de lait alors que du côté apical les produit du lait sont sécrétés. Le réticulum endoplasmique et les mitochondries des cellules sécrétrices sont nombreuses traduisant une activité de synthèse intense afin d'assurer la fonction sécrétoire. Par ailleurs, les acini mammaires sont entourés par des cellules myoépithéliales ou basales contractiles et d'une membrane basale, à travers laquelle se font les échanges avec les milieux lymphatiques et sanguins. Du fait de leur contractilité, les cellules myoépithéliales réparties autour des alvéoles, contribuent à l'éjection du lait de l'alvéole vers les canaux lobulaires. L'épithélium renferme également des cellules souches possédant une capacité d'auto-renouvèlement. Ces cellules sont détectées à différents stades du développement de la glande mammaire et contribuent à la génération des cellules luminales et myoépithéliales (Figure 3) (Visvader et Smith, 2011). En particulier, elles donnent naissance à deux types de cellules progénitrices unipotentes spécifiques de chaque lignage et responsables du maintien de l'homéostasie et l'expansion des cellules luminales et myoépithéliales (Van-Amerongen *et al*., 2012, Van-Keymeulen *et al*., 2011). Le comportement et le maintien des cellules souches sont régulés par des signaux locaux et systémiques générés par leur microenvironnement, appelé « niche » de cellules souches (Figure 2) (Stingl, 2009, Visvander et Smith, 2011, Xie et Li, 2007). D'autres signaux sont délivrés par les cellules épithéliales et par les composants du stroma (Joshi *et al*., 2012, Van-Nguyen et Pollard, 2002).

Puis, les canaux lobulaires se rejoignent au niveau de la citerne du pis. Le système lobulo-alvéolaire est totalement enchâssé dans un tissu de soutien, le stroma correspondant aux tissus conjonctifs séparant lobes et lobules, les tissus adipeux et nerveux ainsi que les vaisseaux sanguins et lymphatiques (Figure 2). Ces différents constituants sont capables de fournir au tissu épithélial des signaux régulant la croissance et la morphogenèse de la glande mammaire.

Figure 4 Les différentes étapes du développement de la glande mammaire. *D'après Jammes et Djiane, 1988*.



I.1.2) DEVELOPPEMENT, DIFFERENCIATION ET INVOLUTION DE LA GLANDE MAMMAIRE

I.1.2.1) Description morphologique

Le développement de la glande mammaire démarre au cours de la vie fœtale. A partir du 32ème jour de gestation (durée de la gestation : 280 jours) chez le bovin et des stades embryonnaires (E) E11-E12 (durée de la gestation : 20 jours) chez la souris (Propper *et al*., 2013), des rudiments de mamelles sont visibles sur la face ventrale de l'embryon. Puis chez le bovin, entre le 32ème et le 50ème jour de gestation des modifications morphologiques se déroulent. La prolifération des cellules donne naissance à un cordon cellulaire, le canal primaire, qui s'arborise rapidement en canaux secondaires que seront les futurs canaux lobulaires. La partie distale du canal primaire se creuse en lumière formant l'ébauche de la citerne. Ces différentes phases du développement concernent les cellules épithéliales qui dérivent de l'ectoderme. En même temps, le mésoderme génère les vaisseaux sanguins, les tissus adipeux et conjonctifs (Turner, 1952). Dans un souci de compréhension, les étapes du développement (Figure 4) décrites dans les paragraphes suivants concernent les bovins. Des comparaisons seront faites avec les rongeurs pour les étapes de la galactopoïèse et de l'involution.

La mammogenèse

La mammogenèse comprend le développement des canaux mammaires, leur arborisation et l'apparition du tissu lobulo-alvéolaire. Ce processus se déroule lentement à partir de la naissance et jusqu'à la première gestation, puis ce processus accélère au cours du dernier tiers de gestation (Jammes et Djiane, 1988). Ainsi à la naissance, la glande mammaire est rudimentaire. Quelques canaux sont présents et ramifiés mais ils ne communiquent pas encore avec la citerne et aucune structure alvéolaire n'est observable. Le tissu adipeux et le système circulatoire sont, en revanche, mis en place et une forme extérieure de mamelle peut être distinguée. A partir du 3ème mois, la glande mammaire débute une croissance allométrique positive, c'est-à-dire plus rapide que celle des autres parties du corps (Sinha et Tucker, 1969). La prolifération du tissu adipeux s'accompagne d'une croissance rapide des canaux lobulaires. Cette phase de croissance rapide s'effectue jusqu'à la puberté (entre le 5ème et le 8ème mois chez le bovin). Après la puberté, la glande mammaire poursuit une croissance isométrique, c'est-à-dire proportionnelle à la croissance de l'individu. Cependant, pendant la phase folliculaire du cycle oestrien, les œstrogènes en forte concentration favorisent la

Figure 5 Schéma d'une cellule épithéliale mammaire différenciée. *D'après Houdebine, 2007*.

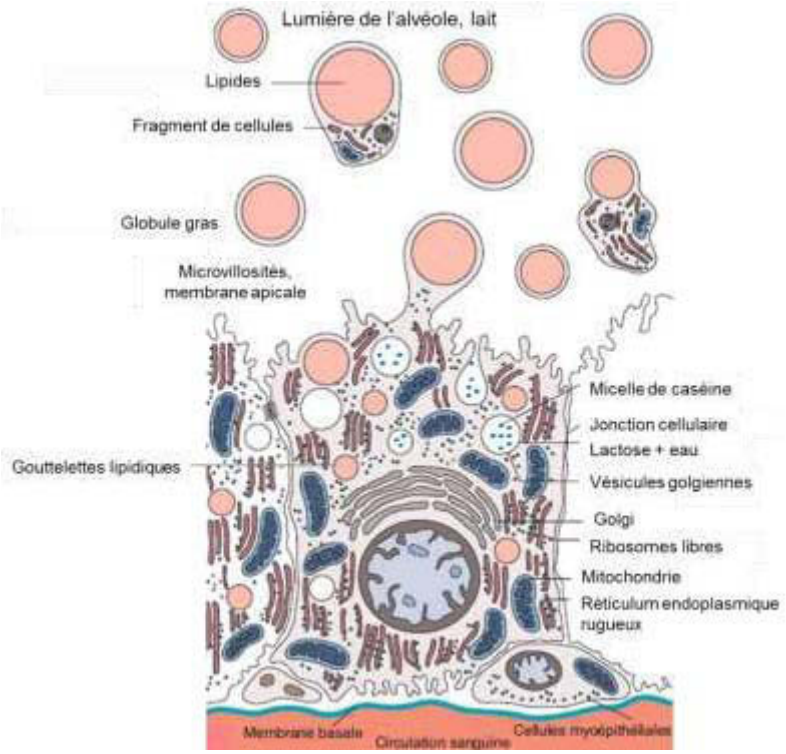
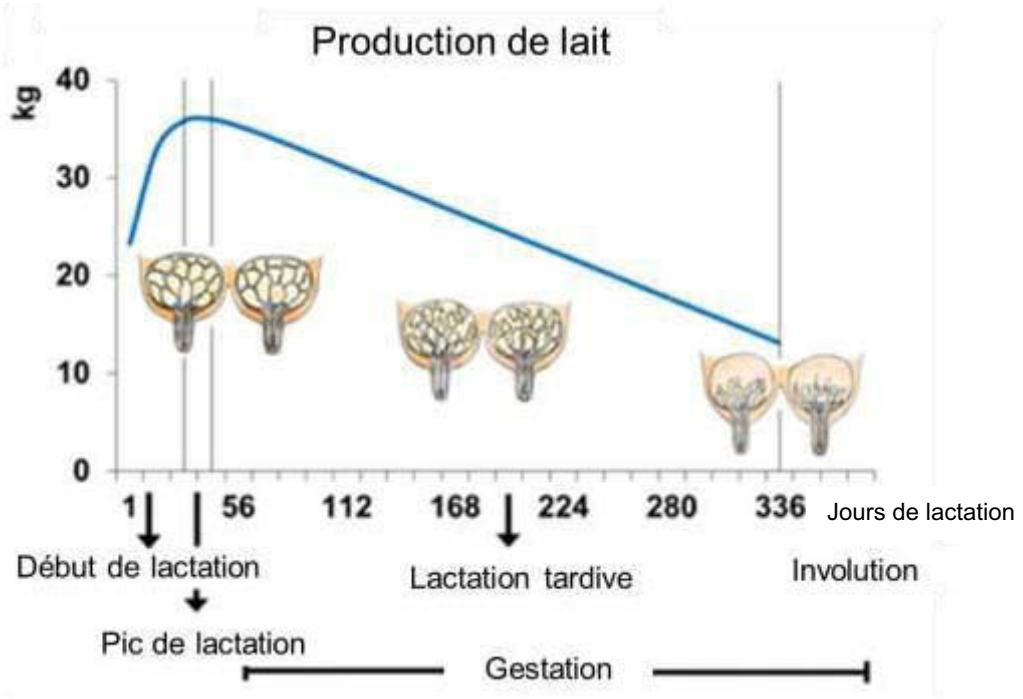


Figure 6 Schéma de la cinétique de production de lait chez la vache. La courbe représente la production de lait par jour de lactation, qui atteint son pic à 40-50 jours de lactation. Avant la lactation et jusqu'au pic, le système alvéolaire est hautement développé. En lactation tardive, le système alvéolaire régresse jusqu'à la fin de la lactation. *D'après Strucken et al., 2015.*



prolifération des canaux mammaires. Chez les ruminants, qui sont des espèces dont les cycles oestriens sont longs, la phase lutéale est caractérisée par une forte production de progestérone par le corps jaune. En tout début de gestation, la croissance de la glande mammaire redevient allométrique due à l'augmentation exponentielle du nombre de canaux (Swanson et Poffenbarger, 1979). A la suite de la ramification intense des canaux à partir du 150ème jour de gestation chez le bovin, le système lobulo-alvéolaire se met en place se substituant progressivement au tissu adipeux en pleine régression. L'épithélium monocouche se développe progressivement, formant de petites alvéoles, qui augmentent en nombre et en taille.

La lactogenèse

Cette étape est une phase de différenciation cellulaire et d'acquisition des activités de synthèse et de sécrétion, responsables de la production de lait. Cette période est courte chez la vache (environ une dizaine de jours) et se situe juste avant la parturition. Dans les 10 derniers jours de la gestation chez le bovin, les cellules épithéliales mammaires (CEM) s'hypertrophient et acquièrent les structures spécifiques à la synthèse accrue et d'une sécrétion intense, c'est-à-dire un noyau en position basale, un réticulum endoplasmique rugueux (RER) extrêmement développé, un appareil de Golgi associé à de nombreuses vésicules contenant du matériel destiné à la sécrétion ainsi qu'un nombre croissant de mitochondries (Figure 5).

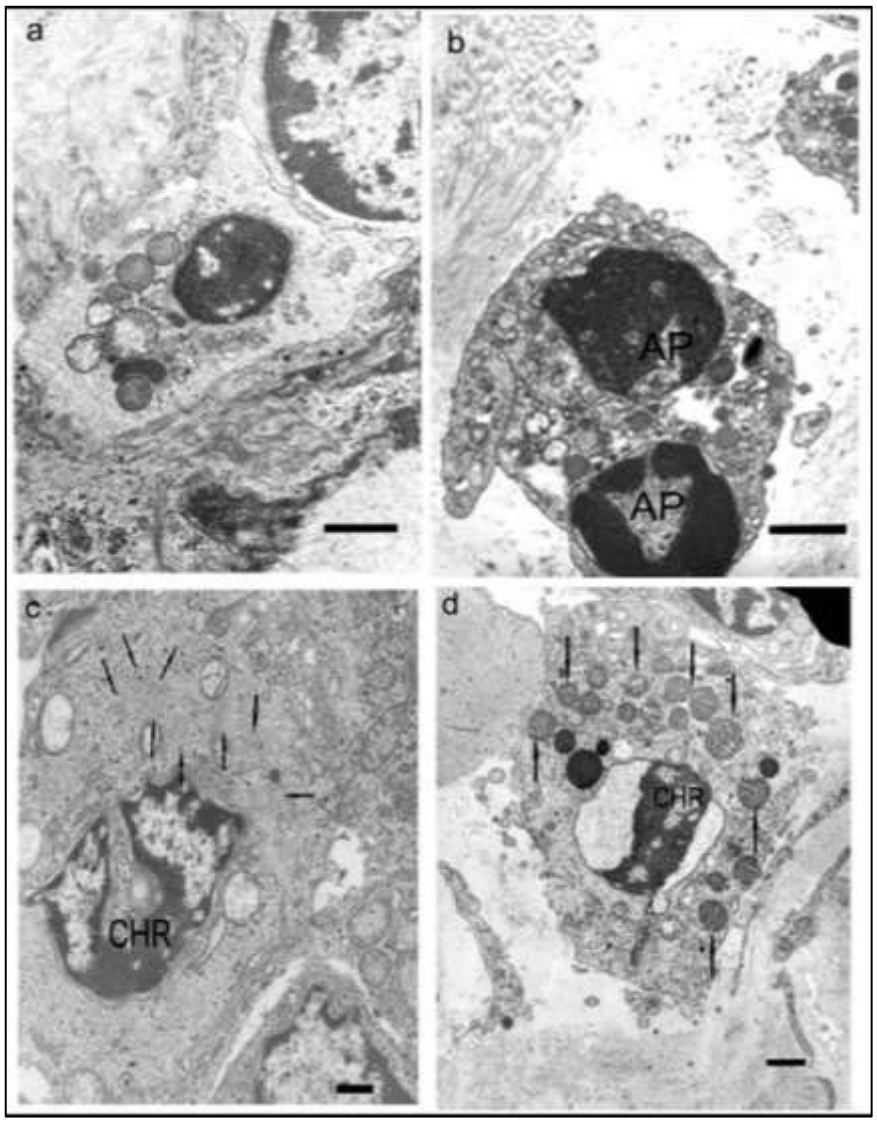
Le développement des capacités de synthèse et de sécrétion des cellules mammaires peut s'effectuer encore quelques jours après la parturition. Dans ce cas, la différenciation cellulaire se fait en parallèle de la sécrétion lactée.

La galactopoïèse

La galactopoïèse correspond à la phase de sécrétion lactée. Le processus de production de lait est auto-entretenu à partir du moment où le lait est évacué (tétées ou traites) mais il décline au cours du temps (Figure 6). En pleine activité, l'épithélium mammaire peut synthétiser et sécréter 15% de son propre poids par jour, sous forme de protéines (Feldman, 1961).

La production de lait augmente rapidement à la parturition et continue d'augmenter jusqu'au pic de lactation. Chez la souris, le pic de lactation se situe aux alentours du 12ème jours post-partum (avec une durée de la lactation de trois semaines), alors que chez la vache il se situe environ à 8 semaines post-partum (durée de la lactation de 40 semaines) (Bauman *et*

Figure 7 Apoptose et autophagie dans la glande mammaire bovine. (a) Au stade tardif de l'apoptose, la cellule rétrécie et les organites s'agrègent au niveau périnucléaire (barre : 1µm). (b) Les cellules mourantes forment des corps apoptotiques (AP) (barre : 1 µm). (c) Le stade précoce de l'autophagie se caractérise par une désorganisation du cytosquelette. Les filaments forment des structures multilamellaires (flèches). La chromatine se condense dans le noyau (CHR). L'enveloppe nucléaire et plasmatique restent intactes (barre : 500 nm). (d) Au stade tardif de l'autophagie, la chromatine est condensée au centre du noyau (CHR) et des vacuoles de dégradation apparaissent dans le cytoplasme (flèches) (barre : 1 µm). *D'après Motyl et al., 2006.*



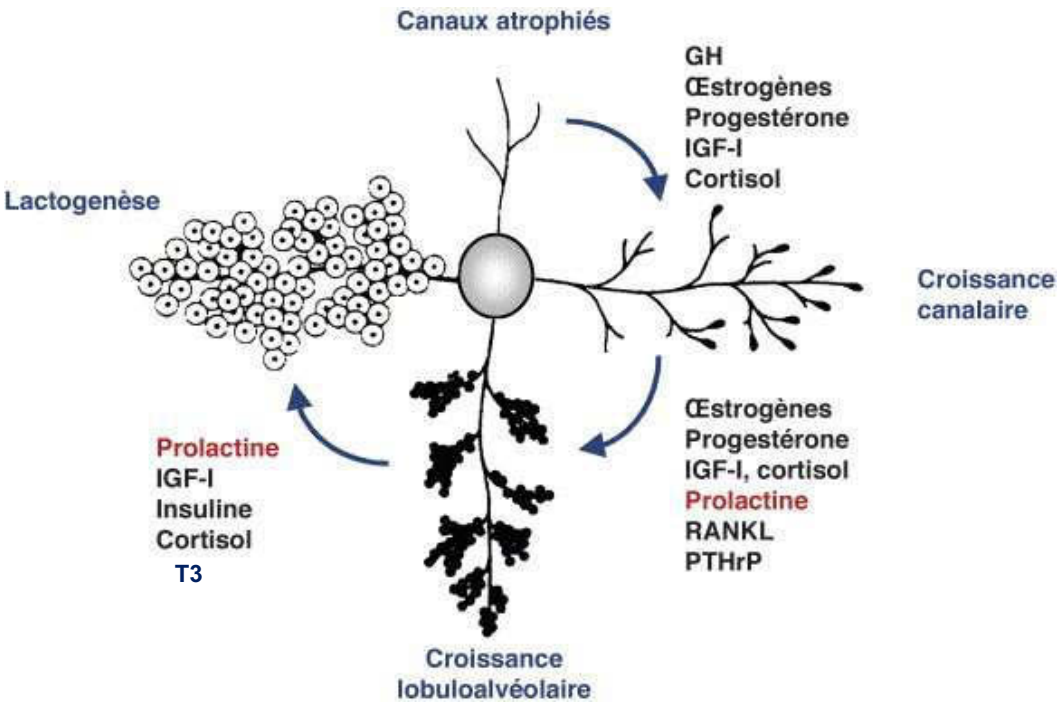
al., 1980) (Figure 6). La sécrétion de lait est dépendante du nombre et de l'activité des CEM (Anderson, 1975, Knight et Peaker, 1984, Capuco *et al*., 2001). Après le pic de lactation, la perte des CEM contribue fortement à la chute de la production de lait (Knight et Peaker, 1984). La perte des CEM est due à l'entrée des cellules sécrétrices en apoptose mais aussi à leur exfoliation dans la lumière des acini au moment de l'éjection du lait (Boutinaud *et al*., 2004). En revanche chez le rat, la chute de production est due principalement à une diminution de l'activité des cellules sécrétrices (Knight *et al*., 1984). Chez le bovin, les deux phénomènes affectant le nombre et l'activité des cellules sécrétrices sont modifiés par les fréquences de traites (Bernier-Dodier *et al*., 2009). Une augmentation de la fréquence des traites est ainsi utilisée comme stratégie pour la persistance de la lactation chez la vache laitière.

L'involution

Dès l'arrêt de la traite (tarissement volontaire) ou au moment du sevrage, la mamelle subit un remodelage tissulaire rapide impliquant une diminution du tissu lobulo-alvéolaire. Après la sécrétion lactée, la proportion de cellules en division devient négligeable. Chez les bovins laitiers, l'arrêt de la traite est brusque, ce qui se traduit par une involution plus marquée qu'un sevrage naturel où le petit arrête progressivement la tétée; rétention du lait, obstruction des canaux lobulaires, accélérant le phénomène de résorption. Dès le deuxième jour de cessation de la traite, de grandes vacuoles apparaissent dans les cellules épithéliales alvéolaires (Holst *et al*., 1987) (Figure 7). Elles contiennent essentiellement des lipides, et persistent deux à trois semaines. La structure lobulo-alvéolaire est maintenue pendant plusieurs semaines et la lactation peut être re-initiée après quatre semaines (Capuco et Akers, 1999). A la fin de l'involution, une importante partie du réseau de canaux mammaires reste en place et sera le siège d'un nouveau développement lobulo-alvéolaire au cours de la gestation suivante. Du fait des superpositions des lactations et des gestations dans l'élevage bovin, l'involution du tissu mammaire n'est jamais complète. Elle conserve toujours une partie de son potentiel sécrétoire (Jammes et Djiane, 1988).

Chez les rongeurs, l'involution est très rapide et s'accompagne d'une prolifération des lysosomes contribuant à la destruction des cellules par apoptose et au décollement des cellules épithéliales de la lame basale, supprimant le contact avec le système sanguin. L'involution chez les rongeurs comprend deux phases. La première phase dure environ 48 heures et est réversible, alors qu'un processus de remodelage est initié lors de la seconde phase, qui ramène la glande mammaire à un stade très similaire au stade vierge (Lund *et al*., 1996). Cependant, des phénomènes d'autophagie se déroulent également pendant l'involution. L'autophagie est

Figure 8 Schéma du développement de la glande mammaire au cours d'un cycle de lactation et son contrôle hormonal. IGF1: Insulin Growth Factor 1, GH: Growth Hormone, PTHrP: ParaThyroïd Hormone-related Peptide, T3: 3, 3', 5-triiodothyronine. *D'après Cherifi, 2014.*



un mécanisme de survie cellulaire, de dégradation et de recyclage des constituants cellulaires. Elle se caractérise par l'accumulation de vacuoles autophagiques dans le cytoplasme (Figure 7). Ce processus permet la réversibilité de la première phase d'involution (Watson et Kreuzaler, 2011). L'apoptose et l'autophagie peuvent être simultanées, puisque des cellules peuvent présenter des caractéristiques de ces deux phénomènes de mort cellulaire (Zarynska *et al*., 2007). L'autophagie pourrait contribuer à reporter la mise en place de l'apoptose, qui est irréversible pour le devenir des cellules sécrétrices (Zarynska et Motyl, 2008).

I.1.2.2) Régulation hormonale

Le développement et le fonctionnement de la glande mammaire sont coordonnés par trois catégories d'hormones : les hormones de la reproduction (œstrogène, progestérone, hormone placentaire lactogène, prolactine (PRL) et ocytocine), les hormones métaboliques (hormone de croissance (GH), corticostéroïdes, hormone thyroïdienne (T3) et insuline), et enfin les hormones synthétisées dans la glande mammaires (GH, PRL, ParaThyroïd Hormone-related Peptide (PTHrP) et leptine) (Neville *et al*., 2002) (Figure 8). La cinétique d'action de ces différentes hormones est très importante pour le contrôle du développement et de la différenciation du tissu mammaire.

Les hormones importantes pour la mammogenèse sont les hormones métaboliques, les facteurs de croissance et la prolactine mais surtout les hormones stéroïdiennes. Pendant la gestation, la prolifération des CEM est dépendante de l'œstrogène et de la progestérone (Houdebine, 1986, Neville *et al*., 2002, Lamote *et al*., 2004). Ces hormones sont d'origine ovarienne et placentaire au cours de la gestation. Les récepteurs spécifiques de ces hormones sont ER (Estrogen Receptor) et PGR (ProGesteron Receptor) (Schams *et al*., 2003). L'estrogène via ERα a, essentiellement, un rôle dans le développement des canaux alors que la progestérone est plutôt responsable du développement lobulo-alvéolaire. Les deux hormones interagissent et renforcent mutuellement leur action. L'œstrogène stimule aussi la sécrétion d'IGF1 (Insulin-like Growth Factor 1) par les cellules du stroma et induit la prolifération des CEM (Tucker, 2000). La mammogenèse ne se déroule pas sans la présence de GH et de prolactine, qui agissent en synergie avec les hormones stéroïdiennes (Jammes et Djiane, 1988).

La production de lait est contrôlée principalement par la prolactine et la GH au cours de la lactogenèse et de la galactopoïèse. La prolactine et la GH sont essentielles pour la transition d'un état proliératif à un état sécréteur. Ces hormones sont notamment sécrétées par l'antéhypohyse et leur action sur la glande mammaire est médiée par les récepteurs PRLR

(PRoLactin Receptor) et GHR (Growth Hormone Receptor). Dans la glande mammaire des ruminants et des rongeurs, il existe plusieurs formes de récepteur de la prolactine provenant de l'épissage alternatif de son transcrit mais il semble que seule la forme longue puisse entrainer une réponse cellulaire (Bole-Feyssot, 1998). Chez les ruminants, l'action de la GH domine celle de la prolactine, ce qui est l'inverse chez la femme et les rongeurs (Flint et Knight, 1997). La prolactine agit à la fois directement sur l'épithélium mammaire et sur l'expression de nombreux facteurs de transcription, dont STAT5 (Signal Transducer and Activator of Transcription 5), un élément clé pour la synthèse des constituants du lait (Lamote *et al*., 2004). La GH agit, quant à elle, directement sur la glande mammaire ou de façon indirecte localement via IGF1. Une autre hormone qui a un rôle majeur au cours de la lactation, est l'ocytocine. Cette hormone est sécrétée par la neurohypophyse en réponse à une stimulation de la mamelle (McNeillie *et al*., 1983). L'ocytocine gagne alors la circulation sanguine jusqu'à la glande mammaire où elle interagit avec des récepteurs spécifiques présents au niveau des cellules myoépithéliales, initiant leur contraction et permettant l'éjection du lait des alvéoles aux canaux mammaires (Young *et al*., 1996). Cette hormone a donc une fonction prépondérante pour l'expulsion du lait. D'autres hormones ont un rôle plus mineur ou moins connu pendant la lactation. Ainsi, le taux des corticostéroïdes est augmenté pendant la lactation et ils pourraient entretenir le flux de nutriments vers la glande mammaire mais également maintenir le taux de glucose sanguin (Feng *et al*., 1995). De même, le rôle principal de l'insuline, lors de la lactation, est de réguler le flux de nutriments vers la glande mammaire. Cette hormone régule aussi la synthèse des lipides et du lactose dans les cellules sécrétrices (Neville et Picciano, 1997). De plus, l'hormone thyroïdienne T3 (3, 3', 5-triiodothyronine) semble nécessaire pour que la glande mammaire puisse répondre à la GH et à la prolactine, et est donc essentielle pour la production de lait. Le taux de leptine plasmatique est augmenté chez le rat et l'homme au cours de la gestation (Amico *et al*., 1998). Cette hormone pourrait contribuer à la régulation de l'hyperphagie de la glande mammaire au cours de la lactation (Woodside *et al*., 2000). Enfin, le PTHrP est exprimé dans l'épithélium mammaire au cours de la lactation et serait secrété dans le sang. Il joue un rôle actif dans la mobilisation du calcium osseux chez la femme pour la production de lait (Kalkwarf, 1999).

L'enchainement des événements est très important lors de la lactation mais aussi pendant l'involution puisqu'il conditionne la lactation suivante. La perte des cellules sécrétrices par apoptose est reliée avec une diminution des taux de GH et d'IGF1. Chez les rongeurs, la diminution des taux de prolactine est considérée comme le signal principal contrôlant la mort

Tableau 2 Composition moyenne du lait chez différentes espèces. *D'après Jenness, 1986.*

Espèces	**Eau (%)**	**Matière grasse (%)**	**Matière protéique (%)** (Caséines + Protéines du lactosérum)	**Lactose (%)**	**Minéraux (%)**	**Energie (kcal/100g)**
Vache	87,3	3,9	3,2 (2,6+0,6)	4,6	0,7	66
Chèvre	86,7	4,5	3,2 (2,6+0,6)	4,3	0,8	70
Brebis	82	7,2	4,6 (3,9+0,7)	4,8	0,9	102
Bufflonne	82,8	7,4	3,8 (3,2+0,6)	4,8	0,8	101
Chamelle	86,5	4	3,6 (2,7+0,9)	5	0,8	70
Anesse	88,3	1,4	2 (1+1)	7,4	0,5	44
Jument	88,8	1,9	2,5 (1,3+1,2)	6,2	0,5	52
Femme	87,1	4,5	0,9 (0,4+0,5)	7,1	0,2	72
Phoque	34,6	53,3	8,9 (4,6+4,3)	0,1	0,5	516
Rate	72,6	9,3	8,2 (7,2+1)	3,7	1,4	131
Renne	66,7	18	10,1 (8,6+1,5)	2,8	1,5	214

cellulaire lors de l'involution (Accorsi *et al*., 2002). Un autre facteur, LIF (Leukemia Inhibitory Factor), serait aussi impliqué dans la chute de la production de lait pendant l'involution (Neville *et al*., 2002).

I.2) LA COMPOSITION DU LAIT

Le lait est un fluide biologique extrêmement complexe et constitue le premier aliment du jeune fournissant tous les nutriments nécessaires pour sa croissance ainsi que des éléments de l'immunité pour apporter une première protection au petit.

Le lait est un mélange complexe constitué d'environ 90% d'eau. Il comprend une solution vraie (sucre, protéines solubles, minéraux et vitamines hydrosolubles), une solution colloïdale (protéines, en particulier les caséines) et une émulsion (matières grasses). Les laits des différentes espèces de mammifères partagent la même composition mais les proportions des divers constituants varient largement en fonction de l'espèce (Tableau 2).

Ce chapitre traitera des matières grasses, des protéines puis les glucides ainsi que quelques constituants moins abondants seront évoqués.

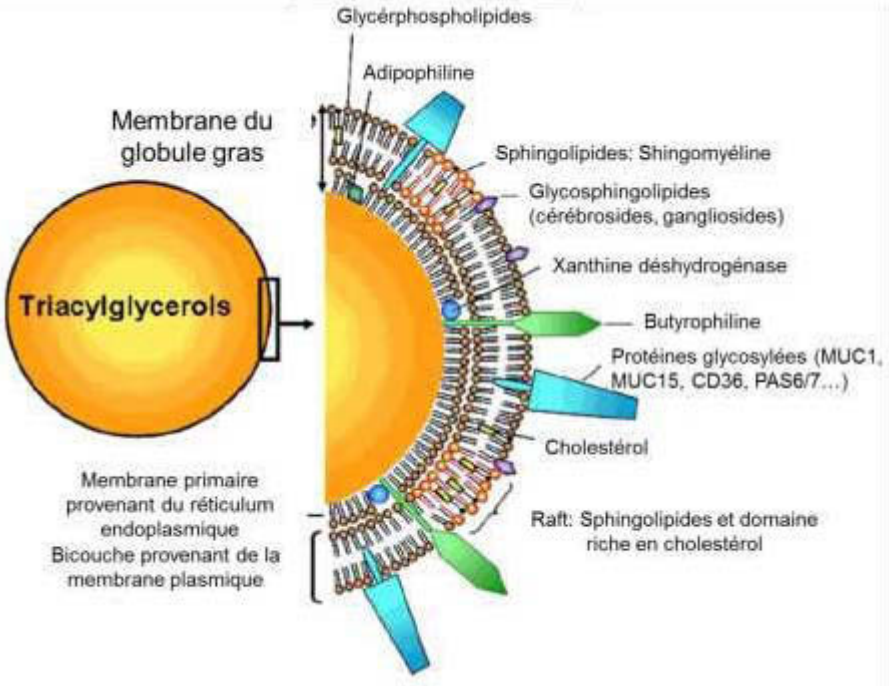
I.2.1) LES MATIERES GRASSES

Chez la vache laitière, la matière grasse du lait représente environ 4% de la masse totale du lait sécrété (Couvreur et Hurtaud, 2007). Cette proportion varie fortement en fonction des espèces, allant d'environ 1% de la masse totale de lait secrété chez l'ânesse à plus de 50% chez des espèces marines comme le phoque. Elle est particulièrement complexe en termes de composition et de structure. Dans le lait, la matière grasse se présente à l'état natif sous forme de globules gras.

I.2.1.1) Le globule gras du lait

Le globule gras est formé à partir des gouttelettes de triglycérides entourées et stabilisées dans la phase aqueuse du lait par une membrane plasmique et d'une partie du contenu de la cellule épithéliale mammaire. Dans le lait de vache, le nombre moyen de globules gras est de 15×10^9 et leur diamètre varie de 0,2 à environ 15 µm (Couvreur et Hurtaud, 2007). La taille des globules gras est décisive puisqu'elle affecte les fonctionnalités technologiques et sensorielles des produits laitiers (Couvreur et Hurtaud, 2007). Le lait de chèvre contient une proportion plus importante de petits globules (1-3 µm) que le lait de vache (4-8 µm) (Jenness,

Figure 9 Structure d'un globule gras du lait. MUC1: Mucine 1, cell surface associated, MUC15: Mucine 15, cell surface associated, CD36: Cluster of Differentiation 36, PAS6/7: lactadherin. *Extrait de http://www.intellectualventureslab.com/investigate/spinning-fat-from-milk*.



1974). Par ailleurs, le globule gras est entouré d'une membrane complexe (Figure 9) qui représente entre 2 et 6% de la masse totale du globule gras (Keenan et Dylewski, 1995). Cette membrane est essentiellement composée de diglycérides tandis que la totalité des triglycérides serait présente dans le centre du globule gras. Elle est aussi enrichie en acides gras (AG) longs, insaturés et impairs comparativement avec le centre du globule gras mais dépourvue d'AG courts (Walstra *et al*., 1999). Elle est également constituée de protéines dont une partie est impliquée dans le transit et la sécrétion des globules gras. La butyrophiline et la xanthine oxydase sont les deux protéines majoritaires dans la membrane (1/3 à 2/3 des protéines présentes) (Ye *et al*., 2002). D'autres protéines dont le rôle dans le transit et la sécrétion des globules gras n'est pas défini sont également présentes. Pour la plupart, ces protéines proviennent de la membrane apicale de la CEM. Une étude protéomique de la membrane du globule gras chez la femme a mis en évidence 191 protéines différentes (Fortunato *et al*., 2003). Des études protéomiques de la membrane du globule gras chez le bovin ont mis en exergue environ 120 protéines différentes dont le rôle est principalement d'être impliqué dans l'endocytose ou dans le fonctionnement du cytosquelette (Reinhart et Lippolis, 2006). Ce nombre de protéines identifiées est très dépendant de la technique de protéomique utilisée (Cebo *et al.,* 2012).

I.2.1.2) La composition de la matière grasse du lait

La composition en AG du lait est complexe. Les AG se répartissent en 3 familles selon le nombre de doubles liaisons éthyléniques dans leur chaine carbonée. Ainsi, les AG saturés ne contiennent aucune double liaison alors que les AG monoinsaturés ou polyinsaturés en contiennent une ou plusieurs, respectivement. En outre, la double liaison peut être en configuration *cis* ou *trans* selon que les deux parties de la chaine carbonée entourant la double liaison sont soit du même côté, soit de part et d'autre du plan de la double liaison.

Les lipides du lait sont constitués à 98% de triglycérides, 1% de phospholipides et 1% de stérols (cholestérol), tocophérol et vitamines liposolubles. Le lait contient des AG saturés et insaturés dont les proportions varient notamment en fonction des espèces (Tableau 3). Certaines espèces comme les ruminants possèdent des laits riches en AG saturés alors que d'autres espèces comme le phoque possèdent un lait riche en AG insaturés et à chaine longue. La teneur en AG monoinsaturés est faible dans le lait de ruminants (environ 30% des AG) et généralement intermédiaire dans le lait des monogastriques (supérieure à 40%) par rapport aux AG totaux. Du fait de la richesse du lait en AG courts (C4:0-C16:0), les matières grasses du lait sont très digestes. D'une manière générale, les AG saturés (en particulier les acides

Tableau 3 Composition de la matière grasse laitière dans différentes espèces (%). AG: Acides Gras. *D'après Jenness et al., 1974*.

	Vache	Chèvre	Brebis	Truie	Rate	Lapine	Femme	Phoque
AG saturés								
C4:0 (butyrique)	3,3	2,6	4,0					
C6:0 (caproïque)	1,6	2,9	2,8					
C8:0 (caprylique)	1,3	2,7	2,7		2,5	22,4		
C10:0 (caprique)	3,0	8,4	9,0	0,7	8,7	20,1	1,3	
C12:0 (laurique)	3,1	3,3	5,4	0,5	9,5	2,9	3,1	
C14:0 (myristique)	9,5	10,3	11,8	4,0	11,9	1,7	5,1	5,8
C16:0 (palmitique)	26,3	24,6	25,4	32,9	30,1	14,2	20,2	22,0
C18:0 (stéarique)	14,6	12,5	9,0	3,5	3,0	3,8	5,9	1,7
AG monoinsaturés								
C16:1 *cis-9* (palmitoléique)	2,3	2,2	3,4	11,3	2,2	2,0	5,7	10,1
C18:1 *cis-9* (oléique)	29,3	28,5	29,8	35,2	18,9	13,6	46,4	33,6
AG polyinsaturés								
C18:2 *cis-9, cis-12* (linoléique)	2,4	2,2	2,4	11,9	11,4	14,0	13,0	2,4
C18:3 *cis-9, cis-12, cis-15* (linolénique)	0,8	1,0	0,8	0,7	1,3	4,4	1,4	8,3
AG à chaine longue								11,7

Figure 10 Structure d'un triglycéride. Les AG sont estérifiés en position sn-1, sn-2 ou sn-3 sur le squelette de glycérol. *Extrait de http://www.1life63.com/en/omega-in-your-body-digestion-of-lipids/digestion-of-lipids*.

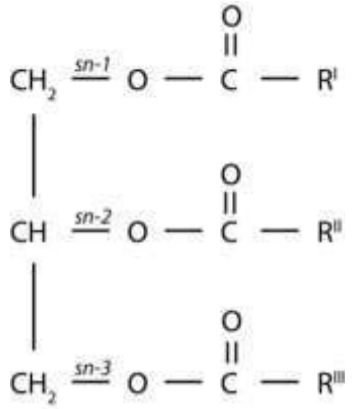
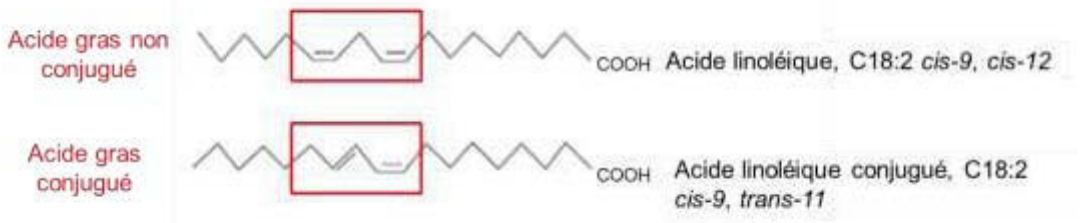


Figure 11 Formule de l'acide linoléique et de l'acide linoléique conjugué. Dans le cas des acides gras non conjugués, les doubles liaisons sont séparées par au moins deux simples liaisons. Pour les acides gras conjugués, les doubles liaisons sont séparées par une simple liaison. *Inspirée de www.savoirlaitier.ca*.



laurique, myristique et palmitique) sont réputés comme athérogènes, c'est-à-dire que leur consommation en excès favorisent la formation des plaques d'athérome dans les vaisseaux sanguins (Williams, 2000, Mensink *et al*., 2003, Givens, 2010). En revanche certains AG comme les acides oléique, linoléique ou ruménique (C18:2 *cis-9 trans-11*) auraient un effet bénéfique sur la santé humaine (Massaro *et al*., 1999, Pariza *et al*., 2001).

Les AG du lait sont presque entièrement sous forme de triglycérides, composé d'une molécule de glycérol estérifiée par 3 AG (Figure 10). Les lipides contiennent environ 15 AG majeurs (Tableau 3, ainsi que l'acide pentadécanoïque C15:0, l'acide margarique C17:0 et l'acide vaccénique C18:1 *trans-11*), mais 400 AG différents ont été répertoriés dans le lait chez le bovin. Parmi les AG monoinsaturés, l'acide oléique est quantitativement le plus représenté dans les différentes espèces, particulièrement chez l'homme (Tableau 3). Le lait des ruminants est pauvre en AG polyinsaturés, ne représentant que 3% des AG totaux. Cette faible teneur s'explique par la forte biohydrogénation des AG polyinsaturés par la microflore du rumen. Parmi les AG polyinsaturés, les acides linoléiques conjugués (CLA) (Figure 11) ont fait l'objet d'un intérêt considérable d'un point de vue nutritionnel. Les différents isomères des CLA peuvent exercer des fonctions bio-protectrices. Par exemple, l'isomère majoritaire dans le lait de vache C18:2 *cis-9*, *trans-11* aurait un effet anti-carcinogène (Ip *et al*., 1999).

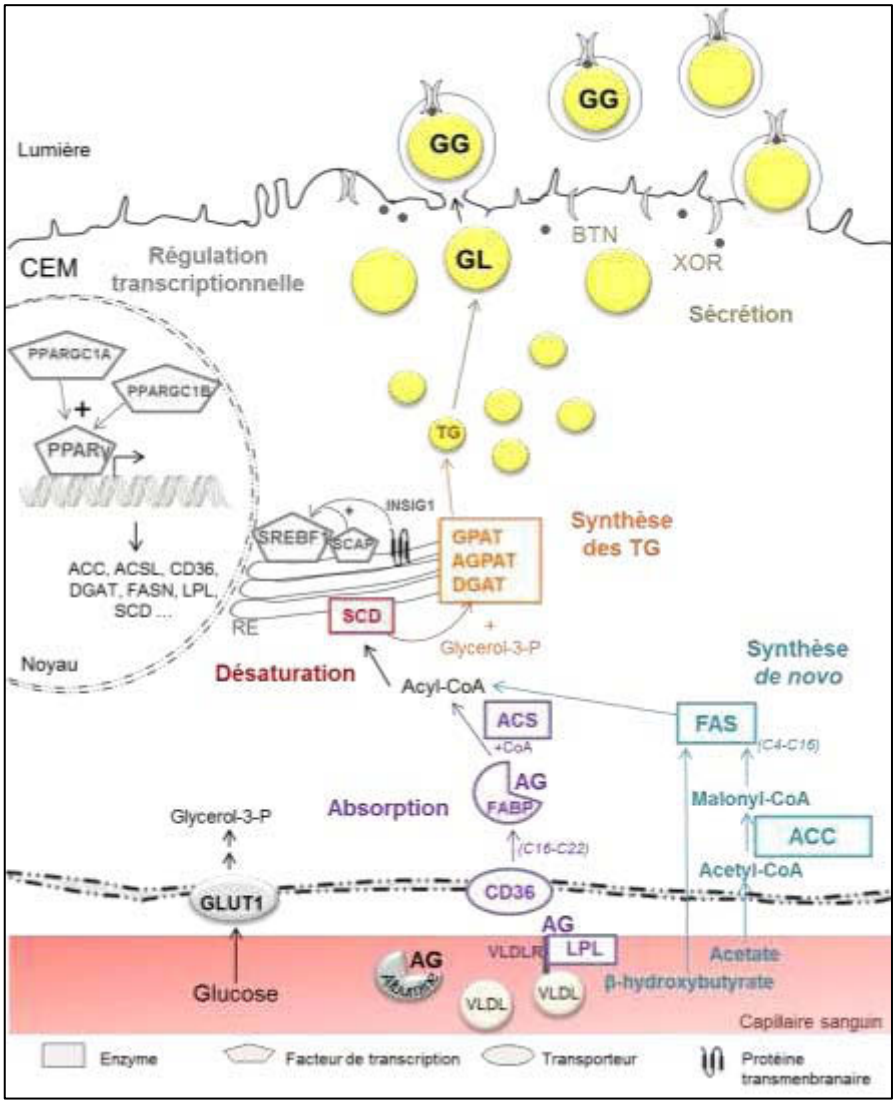
I.2.1.3) Synthèse et sécrétion de la matière grasse du lait

Selon la longueur des AG les constituant, les lipides du lait ont deux origines ; 1) les AG à chaine longue sont importés du plasma, 2) les AG à chaine courte sont synthétisés *de novo* dans la CEM (Figure 12).

Absorption des acides gras à chaine longue par la glande mammaire

Les AG à chaine longue (≥ C18) et environ la moitié des AG C16 peuvent provenir des AG non estérifiés (AGNE) qui circulent liés à l'albumine. Cette dernière proportion dépend de la composition de l'alimentation. Ces AG à chaine longue proviennent principalement des lipides d'origine alimentaire, absorbés par le tractus digestif (hydrogénation totale ou partielle dans le rumen) et de la mobilisation des réserves corporelles (spécialement en début de lactation). Ainsi les triglycérides contenus dans les chylomicrons circulants sont libérés par la lipoprotéine lipase (LPL) présente au niveau de la membrane plasmique (Barber *et al*., 1997) (Figure 12). L'activité de la LPL est régulée par des facteurs hormonaux et nutritionnels selon des mécanismes transcriptionnels, post-transcriptionnels ou post-traductionnels. Le

Figure 12 Voies de synthèse des lipides du lait. AG: Acides Gras, GG: Globules Gras, GL: Gouttelettes Lipidiques, RE: Réticulum Endoplasmique, TG: Triglycérides. Symbole: ACACA: Acetyl-CoA Carboxylase Alpha, ACSL: Acyl-CoA Synthethase Long-chain, AGPAT: Acylglycerol-3-Phosphate AcylTransferase, BTN: BuTyrophiliN, CD36: Cluster of Differentiation 36, DGAT: DiacylGlycerol AcylTransferase, FAS: Fatty Acid Synthetase, GLUT1: GLUcose Transporter 1, GPAT: Glycerol-3-Phosphate AcylTransferase, INSIG1: INSulin Induced Gene 1, LPL: LipoProrein Lipase, PPARγ:Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ, PPARGC1A: Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Coactivator 1 alpha, PPARGC1A: Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Coactivator 1 beta, SCD: Steroyl-CoA Desaturase, SCAP: Srebf ChAPerone, SREBF1:Sterol Responsive Element Binding Factor 1, VLDLR:Very Low Density Lipoprotein Receptor, XOR: Xanthine OxydoReductase

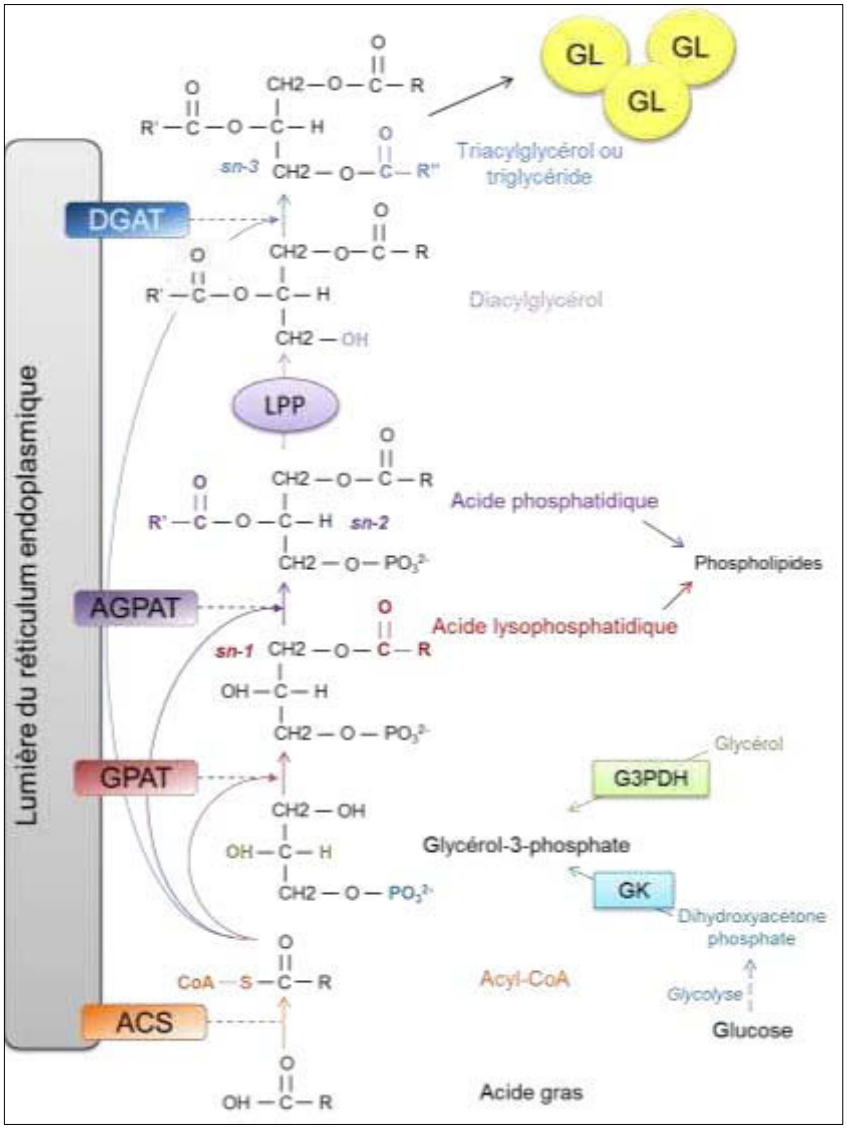


mécanisme par lequel les AG traversent l'endothélium des capillaires et l'espace interstitiel des CEM n'a pas encore été totalement identifié. Après leur arrivée dans les CEM, les AG pourraient franchir la membrane plasmique par diffusion ou grâce à un système de transport saturable. Chez les mammifères, l'Acétyl-CoA Binding Protein (ACBP) (Knudsen *et al*., 2000) lie les acyl-CoA à chaine longue et a un rôle important dans la régulation du transport des AG et de leur concentration dans le cytosol. Chez les rongeurs et les ruminants, une autre protéine se liant aux AG, CD36 (Cluster of Differentiation 36), est exprimée dans les CEM et est retrouvée dans la membrane des globules gras du lait. Elle pourrait fonctionner comme transporteur des AG à chaine longue (Abumrad *et al*., 2000). De plus, la famille des FABP (Fatty Acid Binding Protein) est impliquée dans le prélèvement et la circulation des AG dans beaucoup de tissus (Lehner et Kuksis, 1994). Dans la glande mammaire bovine, FABP et CD36 sont co-exprimées et leur expression augmente pendant la lactation puis diminue lors de l'involution (Spitsberg *et al*., 1995), suggérant que cette dernière est en relation avec le transport et le métabolisme des lipides dans les cellules. Il existe deux formes de FABP dans la glande mammaire de bovin, la A-FABP et la H-FABP (A pour Adipose Tissue et H pour Heart, selon le tissu dans lequel les isoformes ont été détectés la première fois) et elles seraient exprimées dans les cellules myoépithéliales et les CEM, respectivement (Specht *et al*., 1996). Enfin, une dernière famille de protéines impliquées dans le transport des AG, est la famille des transporteurs ATP-Binding cassette (ABC). Ces protéines sont capables de transporter différents types de composés tels que des peptides, des ions, des sucres ou des lipides, selon leur gradient de concentrations et en consommant de l'ATP (Klein *et al*., 1999). En particulier, ABCG5 et ABCG8, jouent un rôle important dans l'homéostasie du cholestérol dans la glande mammaire (Mutch *et al*., 2004, Viturro *et al*., 2006).

Synthèse de novo des acides gras à chaine courte et moyenne

Le lait des ruminants et de la plupart des espèces non-ruminants contient une forte proportion d'AG à chaine courte et moyenne. Ces AG (C4:0 à C16:0) sont synthétisés *de novo* par la CEM et la proportion de ces AG dans le lait reflète la contribution de la glande mammaire dans ce processus. La synthèse *de novo* des AG se fait à partir de deux précurseurs, l'acétate et dans une moindre mesure le β-hydroxybutyrate, qui proviennent de la fermentation ruminale des glucides alimentaires (Figure 12). La première étape de la synthèse *de novo* est l'absorption des deux précurseurs par la CEM. L'activité de carboxylation assurée par l'enzyme acétyl-CoA carboxylase (ACC), codée par le gène *ACACA*, permet de fournir du malonyl-CoA pour la synthèse des AG. Une autre enzyme joue un rôle crucial dans la synthèse *de novo* des AG, il s'agit de la fatty acid synthase (FAS), codée par le gène *FASN*.

Figure 13 Synthèse des triglycérides dans la cellule épithéliale mammaire. ACS: Acyl-CoA Synthétase, AGPAT: Acylglycérol-3-phosphate acyltransférase, DGAT: DiacylGlycérol AcylTransférase, G3PDH: Glycérol-3-Phosphate DésHydrogénase, GK: Glycérol Kinase, GPAT: Glycérol-3-Phosphate AcylTransférase, LPP: acide phosphatidique phosphatase. *D'après Bell et al., 1981, Ollier, 2007.*



Cette enzyme catalyse séquentiellement la condensation d'une molécule de malonyl-CoA avec une molécule d'acétyl-CoA (ou butyryl-CoA), chaque réaction permettant l'addition d'une unité de 2 atomes de carbone (dérivés du malonyl-CoA) sur l'AG en cours de synthèse. Chez les ruminants, la FAS permet la synthèse des AG à chaine courte et moyenne (C4:0-C16:0) alors que chez les espèces non-ruminants, les principaux produits de la FAS sont des AG C16:0 (Christie, 1979).

Désaturation des acides gras

Seulement une fraction des AG prélevés dans le sang par la glande mammaire est insaturée, ceci est dû aux biohydrogénations des AG dans le rumen. L'enzyme impliquée dans la synthèse des AG insaturés est la stéroyl-CoA désaturase (SCD), qui introduit une double liaison en position Δ^9 du myristoyl-CoA, palmitoyl-CoA et stéroyl-CoA. Cette enzyme permet notamment la synthèse de l'acide oléique (C18:1), un des composants majeurs des lipides du lait dans beaucoup d'espèces de mammifères tels que les ruminants, la femme et les rongeurs (Barber *et al*., 1997). Après la parturition, l'expression et l'activité de la SCD augmente dans la glande mammaire des ruminants (Kinsella, 1970, Ward *et al*., 1998). De plus, dans la glande mammaire bovine, la SCD est aussi responsable de la synthèse des isomères majeurs du CLA le *cis9, trans 11* (Corl *et al*., 2001, Griinari *et al*., 2000) et *trans-7, cis 9* (Corl *et al*., 2002), qui selon plusieurs études auraient un rôle bénéfique sur la santé du consommateur (Shingfield *et al*., 2008).

Synthèse des triglycérides

Chez les mammifères, les acides gras ne sont pas distribués de façon aléatoires en position sn-1, sn-2 et sn-3 (Figure 10) sur le squelette de glycérol, précurseur des triglycérides. Cette distribution détermine les caractéristiques fonctionnelles et nutritionnelles des triglycérides du lait (German *et al*., 1997). Chez le bovin par exemple, il existe une position stéréotypée des AG sur le glycérol. Ainsi une forte proportion (56-62%) des AG estérifiés en position sn-1 et sn-2 sont des AG saturés à chaine moyenne et longue (C10:0 à C18:0), avec les C16:0 distribués de façon égale entre sn-1 et sn-2. Les C8:0, C10:0 et C14:0 sont préférentiellement localisés en sn-2, alors que les C18:0 sont préférentiellement en sn-1. De plus, 24% des AG estérifiés en sn-1 sont les C18:1, et une forte proportion d'AG estérifiés en position sn-3 sont à chaine courte (C4:0, C6:0 ou C8:0 pour 44%) et l'acide oléique (C18:1, pour 27%) (Jensen, 2002). La première étape de la synthèse des triglycérides est l'estérification du glycérol-3-phosphate en position sn-1, qui est catalysée par la glycérol-3-Phosphate acyltransférase (GPAT) (Figure 13). La seconde étape est assurée par

Figure 14 Formation et sécrétion des gouttelettes lipidiques. TIP47: Peripilin 3. *D'après Pauloin et al., 2004.*

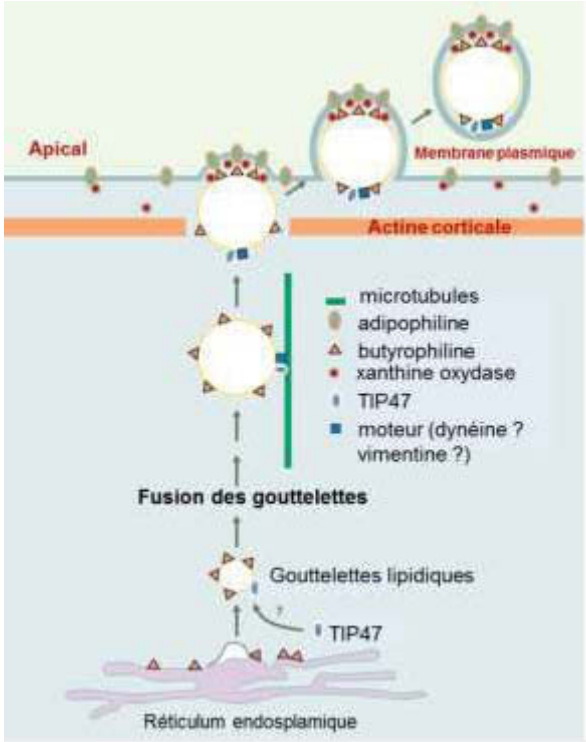
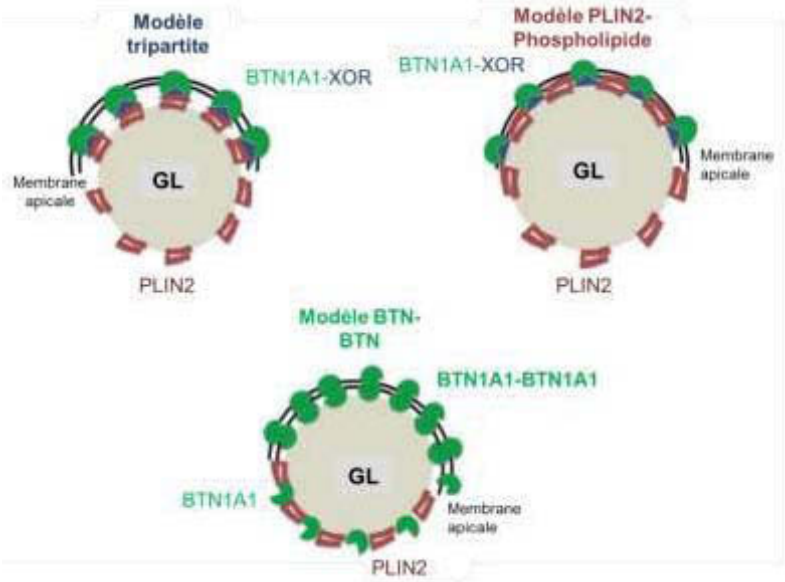


Figure 15 Modèles de sécrétion des globules gras du lait. BTN1A1: Butyrophiline, GL: Gouttelette Lipidique, PLIN2: PeripiLIN 2 ou Adipophiline, XOR: Xanthine OxydoReductase. Dans le modèle tripartite, une interaction entre PLIN2 et BTN1A1-XOR permettrait une interaction entre les gouttelettes lipidiques et la membrane apicale. Dans le modèle PLIN2-Phospholipides, c'est l'interaction entre la couche interne des phospholipides et PLIN2 entrainant une incurvation de la membrane, qui serait responsable de la sécrétion des gouttelettes. Enfin, le modèle BTN-BTN propose que la sécrétion soit médiée par l'interaction entre BTN des gouttelettes lipidiques et de la membrane plasmique. *D'après McManaman, 2012.*

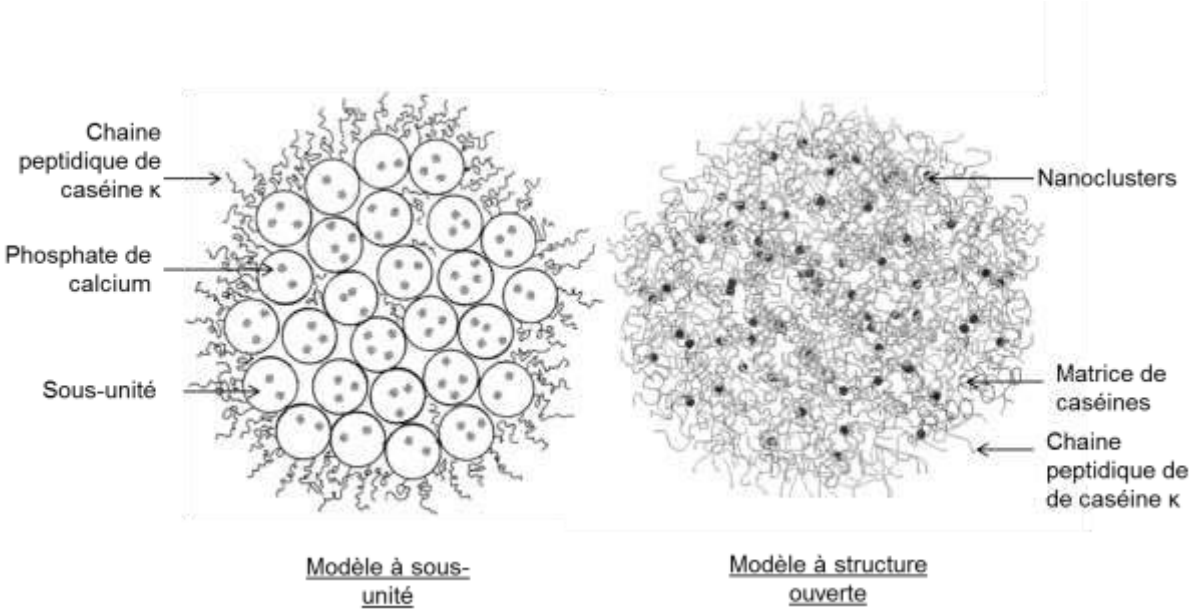


l'acylglycérol-3-phosphate acyltranférase (AGPAT) ou la lysophophatidic acid acyltransférase (LPAAT), qui a une forte affinité pour les acyl-CoA saturés (Mistry et Medrano, 2002) dans l'ordre C16:0, C14:0, C12:0, C10:0 et C8:0 (Marshall et Knudsen, 1977), ce qui est en accord avec la forte proportion d'AG à chaine moyenne et longue à la position sn-2 dans le lait. L'AG estérifié à cette position est aussi influencé par la disponibilité en substrat pour la glande mammaire chez les ruminants (Mistry et Medrano, 2002). La troisième enzyme à intervenir est la dicylglycérol acyltransférase (DGAT), permettant l'estérification d'un AG en position sn-3. Cette enzyme est la seule à être spécifique de la synthèse des triglycérides et peut donc avoir un rôle de régulateur important (Mayorek *et al*., 1989).

Sécrétion des lipides du lait

La première étape pour la sécrétion des lipides du lait est la formation des gouttelettes lipidiques, qui sont produites à partir de la membrane du réticulum endoplasmique par incorporation des triglycérides nouvellement formés. Les gouttelettes fusionnent pour former des globules lipidiques cytoplasmiques (Pauloin *et al*., 2004, Keenan et Mather, 2006). Elles sont ensuite transportées jusqu'au pôle apical de la cellule par le réseau de microtubules afin d'être sécrétées (Figure 14). Les globules sont alors enveloppés par la membrane plasmique apicale produisant des structures entourées d'une membrane en bicouche pour former les globules gras (Wooding, 1971). Les lipides du lait sont, par ce moyen, retenus dans le compartiment cytoplasmique et restent en contact avec des éléments du cytoplasme, même après sécrétion (McManaman, 2012). Deux modèles ont été proposés pour expliquer le procédé par lequel les gouttelettes lipidiques sont enveloppées et sécrétées. Le premier modèle propose que les gouttelettes seraient progressivement entourées par la membrane plasmique apicale par un processus analogue au bourgeonnement des particules virales (Wooding, 1972). Le second modèle propose que l'enveloppement des gouttelettes lipidiques soit couplé à la fusion de vésicules entourées de membrane cytoplasmique apicale (Wooding, 1971). De plus, des petites quantités de cytoplasme peuvent être incorporées dans les globules. La composition de la membrane des globules gras des ruminants commence à être caractérisée grâce aux approches de protéomiques et trois protéines y sont fortement présentes ; la butyrophiline (la famille BTN, dont BTN1A1), la xanthine oxydoréductase (XOR) et la péripiline 2 ou adipophiline (PLIN2). En outre trois modèles ont été proposés afin d'expliquer l'interaction de ces protéines avec les gouttelettes lipidiques au niveau apicale (Figure 15). Le 1er, le modèle tripartite suggère que les gouttelettes lipidiques seraient associées à la membrane apicale à travers une interaction entre PLIN2 et le complexe

Figure 16 Modèles de structure de la micelle de caséine. Dans le modèle à sous-unité, la micelle est assimilée à une sphère composée de sous unités protéiques, elles-mêmes sphériques. Dans le modèle à structure ouverte, la micelle s'apparie à un réseau construit à partir d'un point de nucléation qui s'est développé grâce aux interactions entre le calcium et les différentes caséines. *D'après Walstra, 1999 et De Kruif et Holt, 2003.*



BTN1A1-XOR (Figure 15, A). Le second modèle BTN-BTN suggère qu'une interaction homotypique entre BTN1A1 localisée à la surface des gouttelettes lipidiques et la membrane plasmique mènerait à la formation d'oligomère de butyrophiline et à l'enveloppement des gouttelettes (Figure 15, B). Enfin, le 3ème, le modèle PLIN2-Phospholipides propose que des interactions entre la PLIN2 et la couche interne de phospholipides de la membrane plasmique entraineraient une altération de la bicouche lipidique et induirait une incurvation de cette dernière (Figure 15, C) (McManaman, 2012).

I.2.2) Les proteines du lait

Le taux de matières azotées totales du lait est appelé taux protéiques (TP). Les protéines du lait représentent 95% des matières azotées totales du lait. Les 5% restants sont constitués d'acides aminés libres et de petits peptides, d'azote non protéique, essentiellement de l'urée (0,3 à 0,4 g/L), de la créatinine, de l'acide urique… Les protéines sont classées en deux groupes selon leur solubilité à pH 4,6 et à 20°C (conditions de précipitation des caséines): les protéines coagulables ou caséines et les protéines solubles ou protéines du lactosérum.

I.2.2.1) Les caséines

Chez les ruminants, les protéines du lait sont très majoritairement composées par les caséines. Elles sont au nombre de 4 (caséines α_{s1}, α_{s2}, β et κ) et sont peu conservées entre espèces. Plusieurs dizaines de variants génétiques ont été caractérisés dans le lait de vache, de brebis et de chèvre. Les caséines sont des phosphoprotéines synthétisées par les CEM sous un contrôle hormonal complexe. La teneur des laits en caséines est très variable entre espèces allant de près de 80% des protéines chez le ruminants à 50% des protéines dans le lait humain (Tableau 2). Les caséines se trouvent sous forme de micelles dans le lait et lui donnent sa couleur blanche car elles sont capables de diffuser la lumière. On compte environ 1,14 x 10^{17} micelles de caséines par litre de lait de ruminant. La gamme de taille des micelles s'étend de 50 à 500 nm, dans un même lait, pour un diamètre hydrodynamique moyen qui se situe autour de 150 à 200 nm (Holt, 1985, Dalgleish et Corredig, 2012) (Figure 16). Cette micelle est composée de 90% de caséines et de 8% de minéraux. Les quatre caséines qui la composent, α_{s1}, α_{s2}, β et κ, sont chez le bovin dans un rapport molaire respectif d'environ 4 ; 1 ; 3,5 et 1,5. La fraction minérale est constituée de 90% de phosphate de calcium et de 10% d'ions magnésium et citrate. La structure de cette micelle de caséine reste un sujet de discussion et fait encore débat, en dépit des nombreux travaux qui y sont consacrés (Holt 1992, Horne 2006, McMahon et Oommen 2008, Dalgeish 2011, de Kruif *et al.*, 2012). Il existe deux

variantes de structure : le modèle à sous unités et le modèle à « nanoclusters » (Figure 16). Dans les deux modèles, la caséine κ permet de maintenir la stabilité de l'édifice micellaire et la structure micellaire est poreuse. Dans le modèle à sous-unité, la micelle représente une sphère composée de sous-unités protéiques sphériques avec un cœur hydrophobe et une couche externe constituée des régions polaires des caséines. Dans le modèle à structure ouverte, un réseau construit à partir d'un point de nucléation s'est développé grâce aux interactions entre le calcium et les différentes caséines (Léonil *et al*., 2013).

I.2.2.2) Les protéines du lactosérum

Cette fraction du lait est légèrement colorée mais translucide. Elle est obtenue après avoir éliminé les caséines et les lipides par centrifugation et précipitation sélective à pH 4,6. Le lactosérum contient essentiellement de l'α-lactalbumine (chez la plupart des espèces), de la β-lactoglobuline (chez les ruminants et le porc), de la WAP (Whey Acidic Protein ; chez les rongeurs et le chameau), ainsi que de l'albumine, de la transferrine, de la lactoferrine, et divers anticorps en quantité variable selon les espèces. La β-lactoglobuline est un constituant majeur de la fraction protéique soluble dont le rôle biologique reste mal connu. Il serait impliqué dans le transport moléculaire et peut se lier aux AG (Kontopidis *et al*., 2002, 2004). L'α-lactalbumine intervient dans le complexe permettant la synthèse du lactose, la lactose synthase et joue donc un rôle majeur dans la synthèse du lait puisque le lactose régule la quantité d'eau dans le lait. Le lait contient en plus une multitude d'enzymes cellulaires dont la fonction est toujours très incertaine et dont la présence résulterait de la lente lyse des cellules mammaires au cours de la lactation (Houdebine, 2007).

Enfin, les peptides présents dans le lait et issus de la digestion des caséines et de certaines protéines du lactosérum, telles que l'α-lactalbumine et la β-lactoglobuline, sont de plus en plus considérés comme bioactifs et pourraient avoir un réel bénéfice sur la santé du petit ou du consommateur, grâce à des propriétés antimicrobiennes et antivirales (Nagpal *et al*., 2011).

I.2.2.3) Synthèse et sécrétion

Synthèse

Les protéines du lait proviennent soit d'une synthèse dans les CEM à partir de l'expression des gènes spécifiques dont les gènes des protéines majeures du lait (les quatre caséines, l'α-Lactalbumine et la β-Lactoglobuline), soit du plasma (les immunoglobulines et la sérum-albumine, par exemple) (Boisgard *et al*., 2001). Les protéines sont synthétisées dans

Tableau 4 Principaux transporteurs d'acides aminés dans la glande mammaire.

Gène	Protéine	Espèce*	Système de transport associé	Description	*Références*
SLC1A1	EAAC1;EAAT3	vache, rate, truie	X^-_{AG}	Système Na+ dépendant; acides aminés anioniques	*Kansal et al., 2000, Baik et al., 2009*
SLC1A2	GLT-1;EAAT2				
SLC1A3	GLAST;EAAT1	vache, rate			
SLC1A4	ASCT1-SATT	femme, vache, truie, souris	ASC	Système Na+ dépendant; acides aminés dipolaires et linéaires (L-alanine, L-serine, L-cysteine)	*Shennan et Boyd, 2014*
SLC1A5	ASCT2;AAAT	vache, rate		Acides aminés neutres	*Bionaz et Loor, 2011*
SLC6A1	GAT1	vache	GABA		*Baik et al., 2009*
SLC6A6	TauT	vache, truie, rate, souris	System Gly	Système Na+-Cl- dépendant; acides bêta-aminés	*Shennan et McNeillie, 1994, Baik et al., 2009*
SLC6A9	GlyT1	vache	β		*Finucane et al., 2008*
SLC6A14	ATB^{0+}	femme, truie, rate, wallaby	B^{0+}		*Shu et al., 2012*
SLC7A1	CAT-1	femme, vache, truie, rate	y+	Acide aminés cationiques	*Baumrecker et al., 1984*
SLC7A5	LAT1	femme, vache, rate, souris	L	Système Na+-dépendant; acides aminés neutres	*Bionaz et Loor, 2011*
SLC7A7	y+LAT1	vache, truie	y+L		*Baik et al., 2009*
SLC7A8	LAT2	vache, rate	L		
SLC15A1	PEPT1	femme, rate	H+-peptide cotransporter 1	Transporteur de protons-peptides électrogèniques	*Zhou et al., 2011*
SLC15A2	PEPT2	femme, vache, truie, rate, lapine	H+-peptide cotransporter 2		
SLC36A1	PAT1	truie		Protons/acides aminés symport	*Bionaz and Loor, 2011*
SLC38A2	SNAT2	vache, rate	System A	Système Na+-dépendant; acides aminés neutres	*Baik et al., 2009*
SLC38A3	SNAT3	vache			

**Espèce chez qui l'ARNm a été détecté.*

les CEM au niveau du réticulum endoplasmique. Un des facteurs limitant la synthèse des protéines du lait est la disponibilité des acides aminés dans la glande mammaire. Ces derniers sont prélevés dans la circulation sanguine et transportés dans la CEM via différents systèmes de transports (Tableau 4). Ces transporteurs sont regroupés par famille selon la nature des acides aminés transportés. Les acides aminés prélevés par la CEM représentent aussi une source d'azote α-aminé et de squelette carbone pouvant à la fois servir pour la synthèse d'autres acides aminés ou de métabolites (par exemple l'acétyl-CoA) ou encore être oxydés comme source d'énergie intra-mammaire (Raggio *et al*., 2006).

Sécrétion

Une fois synthétisées, les protéines transitent à travers le compartiment intermédiaire entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, les saccules golgiennes et le réseau trans-golgien. C'est au niveau de l'appareil de Golgi et du réseau trans-golgien que les protéines vont subir des modifications post-traductionnelles, telles que des glycosylations, des phosphorylations ou des sulfations. En particulier, la phosphorylation des caséines est assurée par des caséines kinases (CSNK). Bien que cette modification soit cruciale pour la formation des micelles de caséines, elle reste mal connue. Les protéines sont ensuite transportées par des vésicules de sécrétion et sont sécrétées par fusion des vésicules avec la membrane plasmatique apicale (Franke *et al*., 1976, Vilotte *et al*., 2003).

Concernant les protéines qui proviennent du plasma (par exemple les immunoglobulines ou la transferrine), elles sont internalisées par endocytose dans la CEM au niveau du pôle baso-latérale et transportées jusqu'au pôle apical par transcytose (Burgoyne et Duncan, 1998).

I.2.3) Les glucides et autres constituants moindres

Le lactose, principal glucide du lait, détermine en partie le volume de lait produit grâce à son pouvoir osmotique, comme mentionné auparavant. Le lactose est synthétisé par les CEM à partir du glucose prélevé dans le sang et de galactose dans la lumière de l'appareil de Golgi, par un complexe enzymatique la lactose synthase. Ce complexe est constitué de deux sous unité l'α-Lactalbumine (LALBA) et la galactosyltransférase, dont le principal substrat est le glucose importé de la circulation par les transporteurs GLUT (GLUcose Transporter, GLUT1, étant l'isoforme majeur dans la glande mammaire) et SGLT (Sodium/GLucose co-Transporter). Le galactose nécessaire pour la synthèse de lactose, est principalement dérivé du glucose (Faulkner et Peaker, 1987). Les vésicules de Golgi contenant le lactose sont sécrétées

quant à elles par exocytose. Le lactose intervient à 50% de la pression osmotique du lait et détermine, donc, en partie le volume de lait produit.

Le lait comprend également des constituants présents en moindre quantité comme les minéraux et les vitamines. Parmi les minéraux du lait, on trouve principalement du calcium (environ 1,3 g/kg de lait), du potassium (environ 1,6 g/kg de lait) et du phosphore (environ 1 g/kg de lait). Ces teneurs sont indépendantes de l'alimentation. De plus, le lait contient du magnésium de l'ordre de 120 mg/L pour le lait de vache et du fer, dont la teneur est particulièrement faible chez la vache (0,6 mg/kg).

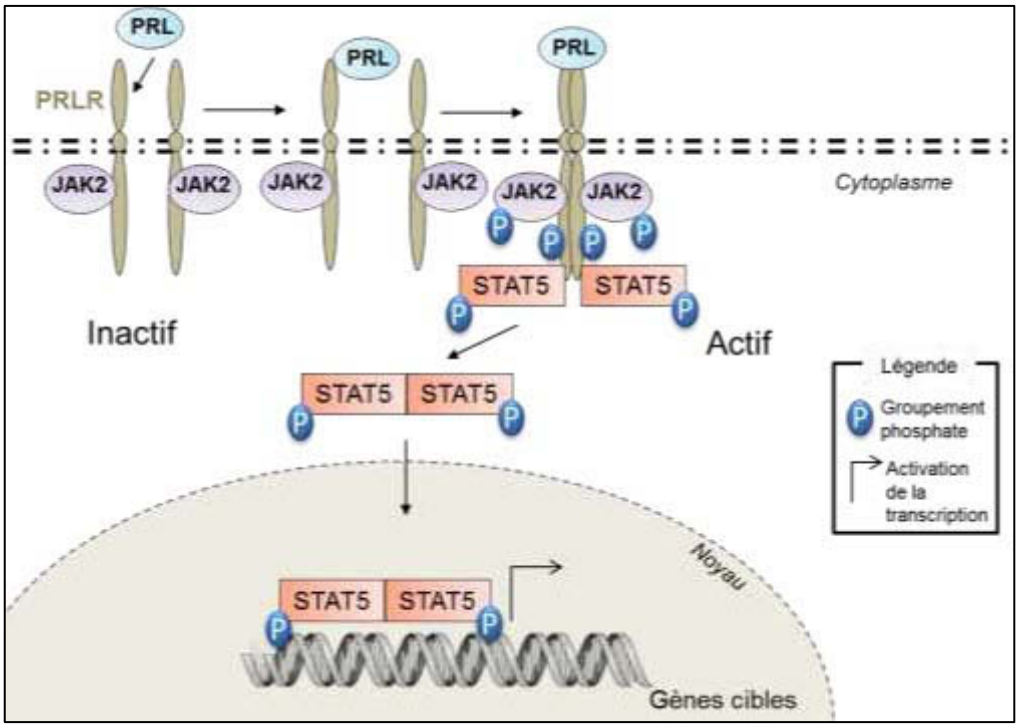
Le lait contient également des vitamines parmi lesquelles, les vitamines liposolubles A, D3, et E, dont la teneur dépend de l'alimentation quel que soit les espèces. Il contient aussi des vitamines hydrosolubles. Les taux de vitamine du groupe B sont plus constants, chez les ruminants, car ces vitamines sont synthétisées par les bactéries du rumen. Chez les monogastriques, leur taux est très lié à l'alimentation.

I.2.4) REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE DE LA SYNTHESE DES CONSTITUANTS DU LAIT

Chaque étape de la synthèse et la sécrétion des constituants du lait est réalisée grâce aux gènes spécifiques, que ce soit des enzymes ou des transporteurs permettant l'approvisionnement de la CEM en substrat. Il existe donc plusieurs voies de régulation des gènes impliqués dans la synthèse des constituants du lait.

En particulier, SREBP1 (Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1) est un élément essentiel de la régulation du métabolisme des lipides chez le bovin et la souris (Anderson *et al*., 2007, Harvatine et Bauman, 2006). Il existe plusieurs isoformes de SREBP: SREBP1a et 1c associés, respectivement, à la régulation de la transcription des gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol et de la synthèse des triglycérides et SREBP2, impliqué principalement dans la biosynthèse du cholestérol. Les protéines SREBP1 et SREBP2 sont situées dans la membrane du réticulum endoplasmique où elles y résident sous forme de précurseurs inactifs. Les précurseurs SREBP forment un complexe avec la protéine SCAP (SREBP Cleavage-Activating Protein), ancrée dans la membrane du réticulum endoplasmique grâce à son association avec une troisième protéine, INSIG1 (INSulin Induced Gene 1). Après la dissociation d'INSIG1 du complexe SREBP/SCAP, le complexe peut être transporté vers l'appareil de Golgi (Espenshades et Hughes, 2007). Ils sont ensuite clivés et activés puis transportés vers le noyau pour activer la transcription des gènes contenant des éléments de réponse aux stérols (SRE) dans leurs promoteurs (*ACACA* ou *FASN*, par exemple).

Figure 17 Schéma de l'activation de STAT5 par la prolactine dans les cellules épithéliales mammaires. JAK2: Janus Kinase 2, PRL: PRoLactine, PRLR: PRoLactine Receptor, STAT5: Signal Transducer and Activator of Transcription 5. *Inspirée de Clevenger et al., 2009*.



D'autre part, la synthèse des lipides du lait est sous le contrôle de PPARγ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma) (Desvergne *et al*., 2006). En effet, ce récepteur nucléaire, est impliqué dans la régulation de l'import des AG (*CD36*), la synthèse *de novo* (*ACACA, FASN*) et de la synthèse des triglycérides (*LPIN1, SCD*) (Bionaz et Loor, 2008). De plus, l'expression d'*INSIG1* est aussi régulée par PPARγ, suggérant que ce dernier serait aussi impliqué dans le contrôle de l'activité de SREBP1. PPARγ est régulé par deux co-activateurs PPARGC1A et PPARGC1B (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Co-activator A et B) (Kadegowda *et al*., 2009, Shi *et al*., 2013).

Pour ce qui concerne la régulation des gènes codant pour les protéines du lait, des sites de fixation pour de nombreux facteurs de transcription tels que OCT-1, NF-1, C/EBP, GR, Ets-1, YY-1, SP1 et STAT5 ont été identifiés dans leurs promoteurs (Rosen *et al*., 1996, Vilotte *et al*., 2003). En particulier, STAT5 (Signal Transducer and Activator of Transcription 5) a été considéré comme « un facteur mammaire » pouvant être induit par la prolactine pendant la lactation. L'interaction de la prolactine avec son récepteur PRLR induit la dimérisation de ce récepteur, entrainant l'activation de la kinase JAK2 (Janus Kinase 2) (Figure 17). JAK2 provoque la phosphorylation de PRLR permettant le recrutement de STAT5 qui va également être phosphorylé par JAK2 induisant la dimérisation de ce dernier, son détachement de PRLR et sa translocation dans le compartiment nucléaire (Hennighausen et Robinson, 2001). Ces mécanismes ont été bien étudiés chez les rongeurs. Aussi, dans la glande mammaire, deux protéines STAT5 sont présentes, STAT5A et STAT5B. Après phosphorylation de STAT5 par JAK2, des homodimères (STAT5A/STAT5A ou STAT5B/STATB) ou des hétérodimères (STAT5A/STAT5B) peuvent se former et migrer dans le noyau. Environ 400 gènes sont sous le contrôle de STAT5 dans la glande mammaire comprenant les gènes codant pour les protéines majeures du lait et des protéines régulant le métabolisme cellulaire (Yamaji *et al*., 2013). STAT5 intervient aussi dans le métabolisme des lipides puisqu'il se lie sur le promoteur du gène *ACACA* et contribue à l'activation de ce gène via la prolactine (Mao *et al*., 2002).

Enfin, la protéine mTOR contrôle la traduction des protéines dans tous les tissus d'un organisme. Des travaux chez les rongeurs et les ruminants ont souligné le rôle de mTOR dans la régulation de la synthèse des protéines du lait (Prizant et Barash, 2008, Moshel *et al*., 2006). De plus, mTOR fonctionne comme une sous-unité catalytique s'associant à d'autres protéines entrainant la formation de deux complexes ; mTORC1, qui régule la synthèse protéique et mTORC2, qui est principalement impliqué dans la régulation de la croissance cellulaire, du métabolisme et du cytosquelette (Kim *et al*., 2002). Une des cibles majeures de

mTORC1 est *EIFAE* (Eukaryotic translation Initiation Factor 4E), un facteur d'initiation de la traduction (Kimball et Jefferson, 2006, Bionaz et Loor, 2011).

I.3) FACTEURS MODULANT LA SYNTHESE ET LA COMPOSITION DU LAIT

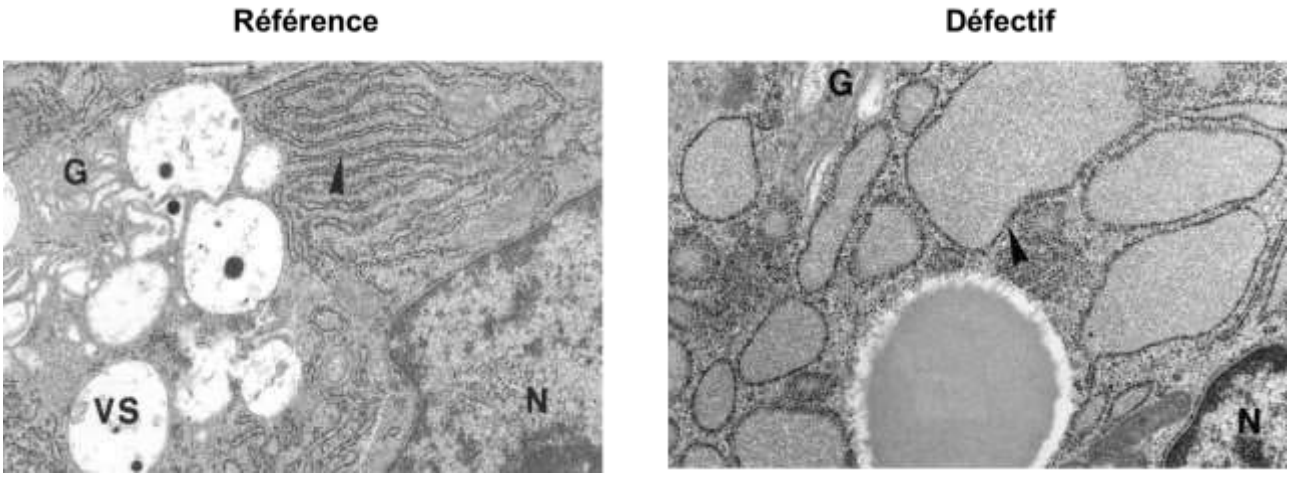
De nombreuses recherches en Agronomie ont eu pour objectifs de préciser les leviers permettant de moduler la composition du lait afin de répondre à la demande des filières et des consommateurs. Ces recherches ont aussi eu pour but d'identifier les mécanismes d'action de ces leviers afin d'en maitriser les régulations. Les principaux facteurs de variation de la composition du lait sont soit liés à l'animal (génétique, stade physiologique, état sanitaire), soit à son environnement (alimentation, saison, nombre de traite) (Hoden et Coulon, 1991). Parmi ces leviers, les effets de la génétique et de la nutrition sur la composition du lait et les gènes responsables de sa synthèse et sa sécrétion sont plus particulièrement traités dans ce paragraphe.

I.3.1) LE FACTEUR GENETIQUE

A un même locus (localisation d'un gène), il peut exister des allèles différents d'un même gène au sein d'une même espèce, qualifiés de polymorphisme génétique. Ainsi depuis quelques années et grâce à une meilleure connaissance des génomes, de nombreux travaux ont été entrepris chez les ruminants pour identifier les régions chromosomiques où les variations alléliques qui peuvent être associées à la variabilité d'un caractère quantitatif. Ces régions ont été associées avec des variations de la production et de la composition du lait chez les ruminants, et sont appelées des QTL (Quantitative Traits Loci). L'identification des gènes contenus dans les QTL et donc potentiellement responsables de ces variations, ainsi que la détection de la mutation causale a constitué un enjeu majeur pour le développement d'outil de sélection génomique.

Au vu des très nombreux QTL associés aux caractères laitiers chez les ruminants (plus de 2 300 QTL laitiers chez le bovin, http://www.animalgenome.org), deux exemples bien décrits dans la littérature et chez deux espèces ont été choisis pour illustrer ce paragraphe ; l'effet du polymorphisme au locus caséine α_{s1} sur la biosynthèse des constituants du lait chez la chèvre et l'effet du polymorphisme au locus de DGAT1 sur le métabolisme des lipides chez les bovins.

Figure 18 Effet d'un l'allèle défectif de la caséine α_{s1} sur la morphologie des cellules épithéliales mammaires. Chez les animaux porteurs d'un allèle défectif, les micelles de caséines sont retenues dans le réticulum entrainant un engorgement de celui-ci (flèches). G: Golgi, N: Noyau, VS: Vésicule de Sécrétion. *D'après Chanat et al., 1999*.



I.3.1.1) Impact du polymorphisme au locus de la caséine α_{s1} sur la biosynthèse des constituants du lait.

Chez la chèvre, le locus *CSN1S1* codant pour la caséine α_{s1}, une des protéines majeures du lait, est particulièrement polymorphe (Grosclaude *et al*., 1994) et présente une variabilité d'expression conduisant à une synthèse d'environ 7 g/L (chez un individu portant deux allèles dits forts) à 0 g/L (chez les porteurs de deux allèles dits nuls), avec des situations intermédiaires pour les individus porteurs des allèles dits faibles (F) ou intermédiaires (E), allant respectivement de 0,6 à 1,5 g/L. De plus, une corrélation positive entre le taux protéique et le taux butyreux a été montrée (Grosclaude *et al*., 1994) de sorte qu'une sélection en faveur des allèles forts entraine quasi systématiquement une augmentation du taux butyreux du lait. Par ailleurs, dû à une accumulation de protéines dans les CEM, un engorgement du réticulum endoplasmique est visible chez les individus homozygotes pour un allèle *CSN1S1* dit défectif (synthèse réduite de caséine α_{s1}) (Chanat *et al*., 1999) (Figure 18). De plus, une sous-expression des gènes clés de la lipogenèse comme *FASN* a pu être associée à une diminution des taux en AG à chaine moyenne et du taux de matières grasses chez les individus défectifs (Ollier *et al*., 2008). De même, une diminution de l'expression de *SCD* dans la glande mammaire a été observée chez ces individus et une corrélation avec une modification de la fluidité membranaire due à la composition en AG des phospholipides membranaires a été suggérée. Enfin, les mécanismes de sécrétion sont également affectés par ce polymorphisme chez les individus portant un allèle nul pour *CSN1S1* (Beauvallet *et al*., 2008) avec des changements des propriétés physico-chimiques des membranes des globules gras (Cebo *et al*., 2012).

Cet exemple montre comment la variabilité génétique à un locus, codant pour une protéine majeure du lait, peut entrainer une modification importante dans la synthèse et la sécrétion des protéines mais aussi des autres constituants du lait entrainant une modification des propriétés des laits caprins.

Hormis cet exemple bien décrit, les données de variabilité génétique chez la chèvre sont plus fragmentaires que chez le bovin mais de nouveaux outils de séquençage vont permettre d'identifier plus de polymorphisme chez cette espèce. Ainsi quelques études chez des chèvres de race Alpine ont pu identifier, en particulier, des polymorphismes dans le gène *ACACA*, *SCD* et *LPL*, qui ont été associés à des différences de production laitière (Crepaldi *et al*., 2013).

I.3.1.2) Effet du polymorphisme au locus DGAT1 sur le métabolisme des lipides

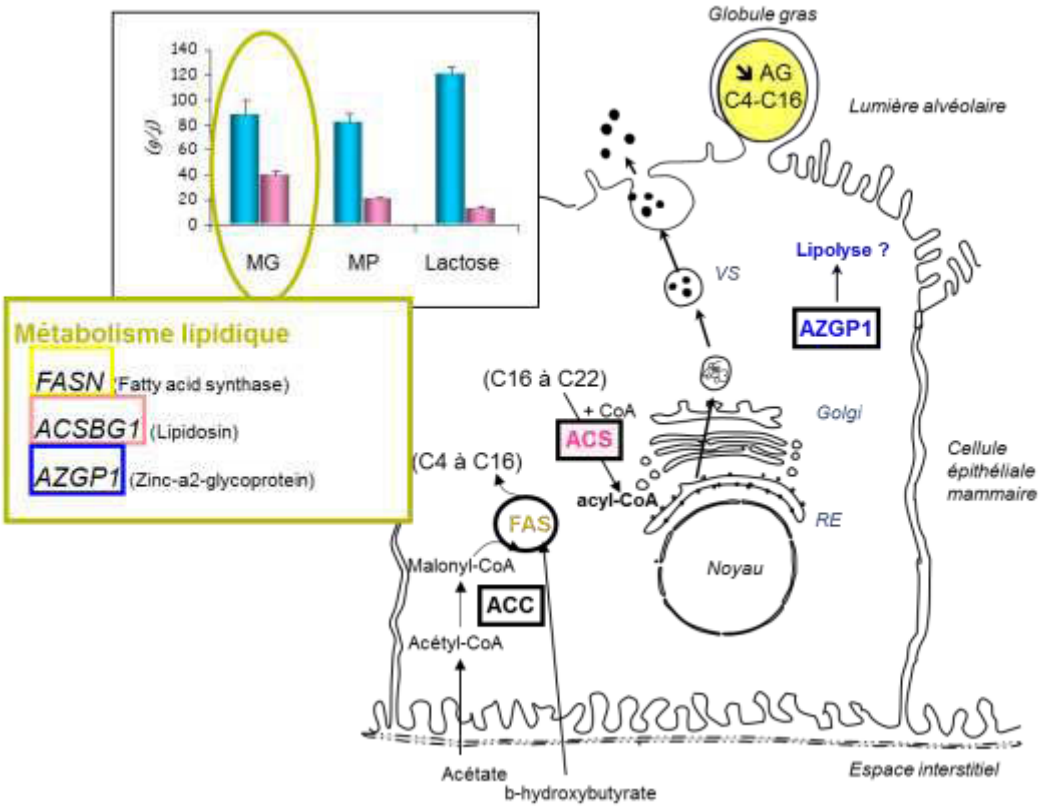
Chez les bovins (races Holstein, Normande et Montbéliarde), une double mutation (GC/AA) dans la séquence du gène codant pour DGAT1 a été identifiée. Cette mutation entraine la substitution d'un résidu Alanine par un résidu Lysine en position 232 de la chaine peptidique de cette enzyme et a été tenue responsable de la forte réduction du taux butyreux et en moindre mesure du taux protéique chez les individus porteurs de cette mutation (Grisart *et al*., 2002, Winter *et al*., 2002, Boichard *et al*., 2003). La forte réduction du taux butyreux serait la conséquence d'une perte d'efficacité catalytique de cette enzyme, qui est responsable de l'addition du troisième et dernier AG sur le diacylglycérol précurseur des triglycérides (Grisart *et al*., 2004). Cette mutation conduit aussi à une modification de la composition en AG du lait (diminution des AG à chaine moyenne et insaturée, augmentation des AG à chaine moyenne et saturée et à chaine longue et insaturée) ainsi qu'à une diminution de la taille des globules gras qui pourrait refléter une modification de la spécificité de l'enzyme (Schennink *et al*., 2007). Les animaux porteurs de cette mutation présentent une expression plus forte des gènes impliqués dans la voie de synthèse du lactose, des lactoprotéines, de la captation des AG (*CD36, LPL*), la synthèse des AG (*ACACA, FASN*), le transport des AG (*FABP3-4*) et leur sécrétion (*BTN1A1*). Ces résultats suggèrent que des voies alternatives à la synthèse des diacylglycérols seraient mises en jeu via notamment DGAT2 (Faucon *et al*., 2008).

D'autres polymorphismes ont pu être mis en évidence chez le bovin. Par exemple, il existe cinq SNP (Single Nucleotide Polymorphisme) dans le gène *FABP4,* qui impactent la production de lait et le pourcentage de protéines du lait (Zhou *et al*., 2015). De même, des polymorphismes sont connus dans les introns 3 et 4 et l'exon 5 du gène *SCD* entrainant des changements dans la production du lait et le taux protéique (Alim *et al*., 2012). Des polymorphismes ont aussi été détectés dans les gènes codant pour FAS, STAT5A ou la leptine, certains d'entre eux pouvant moduler la composition en AG du lait (Marchitelli *et al*., 2013).

I.3.2) Le facteur nutritionnel

L'alimentation est un levier de maitrise de la production et de la composition du lait qui présente l'avantage d'avoir des effets rapides et réversibles. Bien que ce levier puisse également moduler la composition protéique du lait, l'impact prépondérant de l'alimentation concerne la composition en AG du lait. En particulier, plusieurs études ont montré que les lipides sous forme de supplémentations dans l'alimentation des rats entrainaient un

Figure 19 Effet d'une privation alimentaire de 48h chez la chèvre en lactation sur la composition du lait ainsi que sur l'expression des gènes de la lipogenèse. La privation a entrainé une diminution des matières grasse et protéique du lait ainsi que du taux de lactose. Elle a également mené à une diminution de l'expression des gènes *FASN*, *ACBG1* et *AZGP1*, connus pour être impliqués dans le métabolisme des lipides. Associée à cette diminution d'expression, la privation a aussi eu pour conséquence une diminution des acides gras à chaines courtes (C4-C16). ACBG: Acyl-CoA Synthetase Bubble-Gum family member 1, AG: Acides Gras, AZGP: Alpha-2-Glycoprotein 1, Zinc-Binding, FASN: Fatty Acids SyNthase, MG: Matière Grasse, MP: Matière Protéique. *D'après Ollier et al., 2007.*



changement de la composition en AG du lait (Souza et Williamson, 1993, Brandsch *et al*., 2004, Ringseis *et al*., 2004, Rodriguez-Cruz *et al*., 2009). Chez les ruminants, les études ont eu pour but principal de fournir aux consommateurs un lait dont la composition est la plus favorable possible pour la santé. Ainsi, la régulation nutritionnelle de la composition du lait a fait l'objet d'un grand intérêt. Au vu de l'importante littérature et des modèles d'études de cette thèse, ce paragraphe sera plus principalement consacré aux effets d'une restriction alimentaire, du ratio fourrage-concentré et/ou des supplémentations en huile de tournesol sur la composition du lait et l'expression des gènes du métabolisme des lipides.

La fonction de lactation est dépendante de l'approvisionnement de la glande mammaire en nutriments, requis pour la synthèse du lait. Une sous-alimentation sévère ou trop longue s'accompagne d'une diminution rapide du niveau de production laitière (Chilliard *et al*., 1998). De plus, une restriction alimentaire chez la vache laitière pendant 11 semaines conduit à une diminution de la production laitière, une diminution du poids de la glande mammaire, de la quantité d'ADN dans la mamelle, de la taille des alvéoles mammaires, une augmentation de la mort des cellules épithéliales mammaires et d'un remodelage du tissu mammaire comparativement aux vaches contrôles (Dessauge *et al*., 2011). Ces restrictions n'ont pas affecté le taux butyreux du lait. En revanche, une privation alimentaire de 48h chez la chèvre en lactation conduit à une diminution de la sécrétion des matières grasses dans le lait et une modification de sa composition en AG (Massart-Leen et Peeters, 1985). Associée à ce phénotype, l'expression de 161 gènes a été impactée par la privation alimentaire dont 88 étaient sous exprimés, parmi lesquels cinq des six gènes codant pour les protéines majeures du lait (*CSN1S1, CSN1S2, CSN3, LALBA* et *LGB*) reliés à une moindre quantité de protéines et de lactose sécrétés dans le lait (Ollier *et al*., 2007). La diminution de la biosynthèse des matières grasses du lait et en particulier des AG à chaines courtes et moyennes chez les individus privés peut être associée à la sous-expression du gène *FASN* (Ollier *et al*., 2007) (Figure 19). De plus, de nombreux gènes impliqués dans la différenciation ou la prolifération cellulaire étaient sous-exprimés dans la glande mammaire des chèvres privées. Une modification des gènes impliqués dans la mort cellulaire, à la fois par apoptose et autophagie, a aussi été observée suggérant que la glande mammaire des individus privés étaient dans une phase précoce d'involution (Ollier *et al*., 2007).

Pour moduler la composition en AG, les recherches se sont principalement basées sur deux critères, la nature du fourrage et les lipides de la ration. En effet, les fourrages constituent la base de l'alimentation des ruminants et sont source de fibres. Du concentré est également distribué aux animaux dans le cadre de l'élevage classique et est le plus souvent

composé de céréales (riches en amidon, principale source d'énergie) et de tourteau (principale source de protéines). Les supplémentations lipidiques ajoutées à ces rations ont principalement deux origines. Les premières concernent les lipides d'origines végétales apportées sous forme d'huile (l'huile de tournesol, par exemple) ou de graines oléagineuses (les graines de colza, par exemple) qui sont riches en AG à chaine longue. Les secondes concernent les huiles d'origine marines (comme les huiles de poissons) qui sont caractérisées par la présence d'AG à chaine polyinsaturé de la série Oméga 3. Cette dernière supplémentation est principalement utilisée comme modèle expérimental, bien que les algues commencent à être distribuées dans les rations destinées aux animaux d'élevages.

Chez les bovins, les conséquences des supplémentations lipidiques sur la production et la composition du lait ont été bien décrites, avec une augmentation de la production (pour la plupart des supplémentations en lipides) et une réduction faible mais systématique du taux protéique et des caséines. Néanmoins, ces supplémentations lipidiques n'ont pas toutes le même effet dû à leur nature mais aussi à l'interaction importante entre les fourrages, les concentrés et leurs composants (fibres, amidon, lipides). Les supplémentations apportées modulent également ces effets sur la composition en AG du lait. Ainsi chez la vache, les régimes riches en concentrés (amidon), les régimes riches en concentrés et supplémentés en huiles végétales ainsi que les régimes enrichis en huile de poisson entrainent une diminution du taux butyreux, phénomène appelé « Milk fat Depression » (MFD) (Davis et Brown, 1970, Piperova *et al*., 2000, Ahnadi *et al*., 2002, Peterson *et al*., 2003, Harvatine et Bauman, 2006). En revanche, les lipides encapsulés conduisent à une large augmentation du taux butyreux (Palmquist *et al*., 1993, Chilliard et Ferlay, 2004). La MFD est causée par la biohydrogénation des AG dans le rumen (Baumgard *et al*., 2000). A l'inverse, chez la chèvre, presque tous les types de supplémentations lipidiques induisent une augmentation remarquable du taux butyreux dans le lait sans changement systématique de la production de lait ou du taux protéique (Chilliard *et al*., 2003a). Ces modifications de la matière grasse du lait sont accompagnées d'un changement de la composition en AG qui sont bien décrites chez la vache (Chilliard *et al*., 2000, 2001, Palmiquist *et al*., 1993) et chez la chèvre (Chilliard *et al*., 2003a, 2006a). Les travaux portant sur les effets de supplémentations proches réalisées chez la vache et la chèvre ont révélé des réponses différentes entre ces deux espèces probablement dues à une moindre sensibilité du tissu mammaire aux effets anti-lipogéniques de certains AG (Bernard *et al.,* 2008, Toral *et al.,* 2015).

Par ailleurs, la caractérisation des enzymes responsables de la synthèse et de la sécrétion des lipides du lait a permis le développement d'approches de gènes candidats impliqués dans

Tableau 5 Effets d'une supplémentation en huile de tournesol sur la composition en acides gras (mmol/j) du lait de chèvre. *D'après Ollier et al., 2009.*

	Traitements[1]			
	LF	LF-SO	SEM	P-value (n=16)
C4:0 + C6:0 + C8:0	81.9	101.3	2.3	<0.01
C10:0 + C12:0 + C14:0	193.1	180.5	5.4	<0.01
C16:0	135.1	118.8	3.4	<0.01
C18:0	31.7	50.0	1.5	<0.01
C18:1 *cis-9*	63.6	80.6	2.1	<0.01
C18:1 *trans-10*	1.2	3.8	0.1	<0.01
C18:1 *trans-11*	6.1	42.0	1.5	<0.01
C18:2n-6	10.3	15.6	0.4	<0.01

[1]Traitements: LF: régime riche en concentré, LF-SO: régime riche en concentré supplémenté avec de l'huile de tournesol.
SEM: Standart Error of the Mean

le prélèvement des AG (*LPL*), la synthèse *de novo* (*ACACA* et *FASN*) et la désaturation des AG (*SCD*). Ces études montrent que la réponse de ces gènes candidats aux facteurs nutritionnels n'est pas toujours reliée aux changements dans la composition des AG.

Par exemple, un régime à base de foin de luzerne et de concentré dans un ratio 60:40 supplémenté ou non avec 25 g/kg de matières sèches d'huile de tournesol pendant 7 semaines et distribué à des brebis en lactation, n'a pas de conséquence sur les performances des animaux. En revanche, la supplémentation en huile de tournesol entraine un changement de la composition en AG. En particulier, le taux d'AG C12:0, C14:0, C16:0 est diminué alors que celui des AG à chaine longue tels que C18:0, C18:1 *cis 9* et l'isomère *cis-9*, *trans-11* du CLA est augmenté. Ces changements n'ont pas été accompagnés par une différence d'expression des gènes clés de la lipogenèse dans la glande mammaire, ni de celle des facteurs de transcription les régulant. Cette étude suggère que d'autres mécanismes de régulation pourraient être responsables de la modification de la composition en AG du lait en réponse à l'huile de tournesol (Castro-Carrera *et al*., 2015). L'expression des gènes n'a pas non plus été affectée dans la glande mammaire de chèvres supplémentées pendant 3 semaines avec de l'huile de tournesol (Ollier *et al.,* 2009). En revanche, la supplémentation lipidique a entrainé une augmentation du taux de tous les acides gras quantifiés dans le lait des chèvres (Tableau 5).

De plus, un régime à base de foin contenant aucune ou 55 g/kg de matières sèches d'huile de Tournesol distribué à des chèvres en lactation n'a pas d'effet sur la production du lait (Bernard *et al*., 2009). L'huile de tournesol a entrainé une diminution de la sécrétion des AG de C10-C16 et une augmentation des AG à chaine longue tels que C18:0. De plus les ratios *cis-9* C14:1/C14:0, *cis-9* C18:1/C18:0 et *cis-9 trans-11* C18:2/C18:1 sont diminués dans le lait des animaux ayant reçu la supplémentation lipidique associés à une diminution de l'activité de la SCD dans la glande mammaire des chèvres supplémentées, sans différence au niveau de l'abondance de son ARNm, ni de celle des ARNm des autres gènes de la lipogenèse. Il pourrait donc exister d'autres voies de régulations de réponse à une supplémentation lipidique dans la glande mammaire. Ces deux exemples montrent qu'il existerait des mécanismes de régulations plus complexes que ceux envisagés dans le cadre des approches dites ciblées sur quelques gènes clés.

Le développement des outils de transcriptomique a permis de caractériser l'effet des supplémentations lipidiques sur un large panel de gènes, mettant en évidence de nouveaux candidats à étudier. Par exemple, un régime à base de foin riche en concentré (ratio fourrage-concentré 46:54) supplémenté ou non avec 40 g/kg de matières sèches d'huile de tournesol

distribué à des vaches au pic de lactation, conduit à une augmentation de la production de lait, des matières protéiques et du taux de lactose, ainsi qu'à une diminution du taux butyreux (Leroux *et al*, soumis). L'ajout d'huile de tournesol a également entrainé une diminution des AG à chaines courtes et moyennes C4:0-C16:0 dans le lait, et à une augmentation des AG C18:0, des AG *trans* en particulier l'isomère C18:2 *cis-9 trans 11*. La supplémentation n'a pas eu d'effet sur l'activité des enzymes FAS, G6PDH et G3PDH, ni sur l'expression des gènes candidats de la lipogenèse. En revanche, une analyse globale de l'expression des gènes de la glande mammaire, par approche transcriptomique, a montré une sur-expression de 39 gènes et une sous-expression de 10 gènes. Les voies majoritaires impactées étaient la réplication, la transcription et la traduction. Un peu plus de 30% des gènes étaient impliqués dans le métabolisme glucidique, protéique ou lipidique. En particulier, l'expression d'*ApoH* (une lipoprotéine), *ELOVL6* (une élongase d'AG), *BTN2A1* (une protéine majeure du globule gras) et *LPL* a été modifiée par la supplémentation lipidique (Leroux *et al*, soumis). Bien que ces gènes ne puissent pas être directement reliés aux changements de la composition de la matière grasse laitière, ils constituent de nouvelles pistes d'investigations, dont la régulation de l'expression par la nutrition reste à élucider.

Tableau 6 Principales classes d'ARN non codants et leurs fonctions chez les mammifères. *Inspiré d'Esteller, 2011* et *Kowalczyk et al., 2012*.

Abréviation	***Nom***	**Taille (nucléotides)**	**Fonctions**
Petits ARN			
miARN	*microARN*	19-24	Régulation de l'expression génique
piARN	*piwi interacting ARN*	25-33	Répression de la rétro-transposition des éléments répétés
siARN	*small interfering ARN*	20-22	ARN interférence
tiARN		17-18	Régulation de la transcription
ARN intermédiaires			
ARNr	*ARN ribosomal*		Formation des complexes ribosomaux
ARNt	*ARN de transfert*	73-93	Elongation de la traduction et synthèse de protéines
PASR	*Promoter-associated small ARN*	22-200	Inconnue
PROMPT	*Promoter upstream transcript*	< 200	
snoARN	*small nucleolar ARN*	60-300	Activation de la transcription ?
snARN	*small nuclear ARN*	150	Epissage d'autres ARN
TSSa-ARN	*TSS-associated ARN*	20-90	Maintenance de la transcription ?
Longs ARN			
ARNnc antisense		> 200	ARN interférence
ARNnc pseudogène			Régulation de la fonction des miARN
ARNnc 3'UTR			Inconnue
lincARN	*long intergenic non coding ARN*		Régulation de la structure ADN-chromatine
T-UCR	*Transcribed ultraconserved region*	>350	Régulation des taux de miARN et ARNm ?

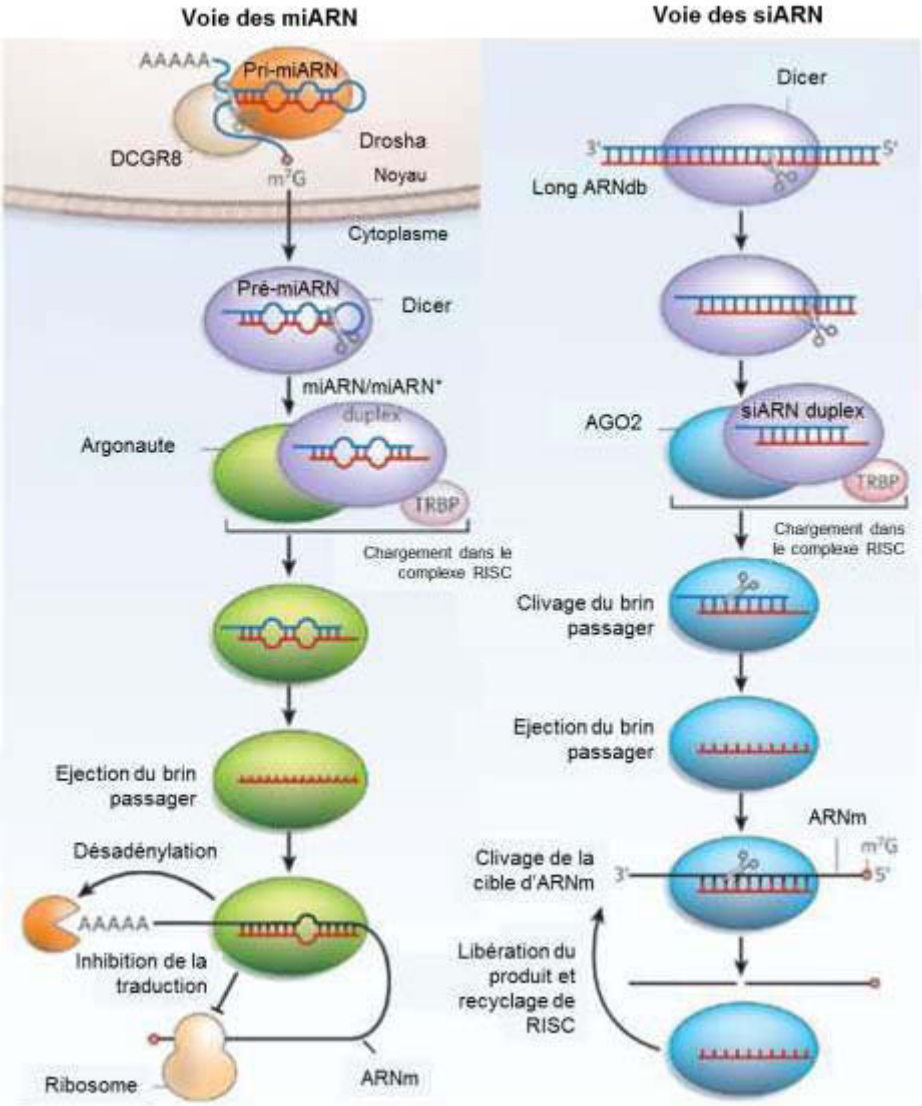
II. LES MIARN

La découverte des ARN non-codants a complètement bouleversé le dogme, qui historiquement se basait sur le principe qu'un gène devait coder pour une protéine possédant une fonction cellulaire. Des recherches récentes ont permis la découverte de nombreuses espèces d'ARN non codants (Tableau 6) et ont fourni des preuves d'un rôle de régulation important de ces molécules à la fois sur la physiologie ainsi que sur de nombreuses pathologies (Ambros, 2004, Bushati et Cohen, 2007, Gangaraju et Lin, 2009, Berezikov, 2011, Lujambio et Lowe, 2012). De plus, le nombre d'ARN non codants selon les espèces est corrélé à la complexité du génome suggérant que les mécanismes de régulation par les ARN sont essentiels pour l'évolution (Taft *et al*., 2007). Les ARN non codants sont divisés en sous classes selon leur taille, leur fonction ou leur localisation génomique. Ainsi, les petits ARN non codants comprennent les ARN dont la taille est inférieure à 200 nucléotides tels que les microARN (miARN), les ARN de taille intermédiaires tels que les snoARN et les ARN longs non codant comprennent les ARN dont la taille peut aller de 200 à des milliers de nucléotides tels que les ARN longs intergèniques non codants (lincARN).

II.1) DECOUVERTE ET CARACTERISTIQUES DES MIARN

Dans les années 90, les miARN étaient une classe de petits ARN peu connue qui étaient décrits comme étant uniquement impliqués dans certaines fonctions telles que le développement chez les espèces non mammifères. La découverte par Ambros *et al.* du rôle des gènes *lin-4* et *lin-14* dans le contrôle temporel du développement du nématode *C. Elegans* (*Caenorhabditis Elegans*) a entrainé un rapide changement de la vision des miARN. Ainsi, ils ont montré que le gène *lin-4* ne codait pas pour une protéine, mais pour un précurseur d'environ 61 nucléotides qui était maturé en un ARN de 22 nucléotides (Lee *et al*., 1993, Ambros *et al*., 2001). De plus, au même moment, un autre laboratoire démontrait que la synthèse protéique de LIN-14 était régulée au niveau post-transcriptionnelle et que le niveau de LIN-14 était inversement proportionnel à celui du de l'ARN *lin-4* (Wightman *et al*., 1993). Des analyses de séquence ont révélé que l'ARN *lin-4* possédait des complémentarités de séquence dans la région 3'UTR du gène *lin-14*, menant à l'hypothèse que *lin-4* régulait la

Figure 20 Voie canonique de synthèse des petits ARN impliqués dans le phénomène d'ARN interférence chez les vertébrés. ARNdb: ARN double brin, DCGR8: DiGeorge syndrome Critical Region Gene 8, TRBP: HIV-1 TAR RNA Binding Protein. *D'après Jinek et Doudna, 2009.*



synthèse de LIN-14 par liaison de base de type Watson-Crick. Cette étude mettait en évidence la première interaction miARN/ARNm. Pendant plusieurs années, *lin-4* fut considéré comme une anomalie. C'est la découverte des miARN de la famille *let-7* et de sa conservation du nématode à l'homme qui souligneront l'importance fonctionnelle de la régulation des gènes par les miARN (Reinhart *et al*., 2000, Pasquinelli *et al*., 2000, Lagos-Quintana *et al*., 2001). De plus, les miARN ont pris beaucoup d'importance avec la découverte du phénomène d'ARN interférence (ARNi), qui est impliqué dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes et qui est conservé au cours de l'évolution (Novina et Sharp, 2004). Avec les miARN, les « small interfering ARN » (siARN), une autre classe de petits ARN non codants, interviennent dans ce processus (Figure 20). Ces deux types d'ARN partagent des similitudes telles que leur courte taille d'une vingtaine de nucléotides, leur maturation par la ribonucléase Dicer et leur incorporation dans les complexes RISC (RNA-Induced Silencing Complex) pour réprimer l'expression de gènes. En revanche, alors que les miARN sont endogènes, les siARN ont plusieurs origines comme des éléments transposables, des ARN doubles brins parfaitement appariés ou peuvent être exogènes et provenir de virus (Watanabe, 2008). De plus, les siARN régulent principalement les gènes desquels ils dérivent dans l'objectif de défendre la cellule hôte d'ARN parasites. Les siARN s'hybrident toujours parfaitement à leur cible alors que dans la majorité des cas, chez les mammifères, la complémentarité est partielle entre le miARN et sa cible.

Au cours des dernières années, le nombre de miARN découverts n'a cessé d'augmenter. Actuellement, 28 645 précurseurs de miARN codants pour 35 828 miARN chez 223 espèces sont répertoriés dans miRBase (version 21, 2015), base de référence des miARN. L'homme est l'espèce possédant le plus grand nombre de miARN répertoriés dans miRBase, comptabilisant 1 881 précurseurs et 2 588 miARN. Chez les animaux, 1 à 5% des gènes coderaient pour des miARN (Kusenda *et al*., 2006). Les miARN sont très conservés entre espèces. Ainsi, la structure secondaire des précurseurs des miARN et la séquence de leur forme mature sont particulièrement conservées entre les espèces, supposant l'existence d'une pression de sélection.

Une nomenclature des miARN a été mise en place selon plusieurs critères, basée sur leur biogenèse (Griffths-Jones *et al*., 2006). Ainsi par convention les miARN sont notés « miR », contrairement à leurs précurseurs ou aux gènes codants pour les miARN qui eux sont annotés « mir ». L'organisme d'origine est indiqué par 3 lettres en préfixe, par exemple hsa pour *homo-sapiens* ou bta pour *bos taurus*. Un précurseur de miARN (pré-miARN) donne naissance à deux miARN dont le positionnement sur le précurseur est précisé par l'ajout de -

Figure 21 Structure d'un précurseur de miARN chez l'homme. *Issue de http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/Images/MIR146BFig1.png.*

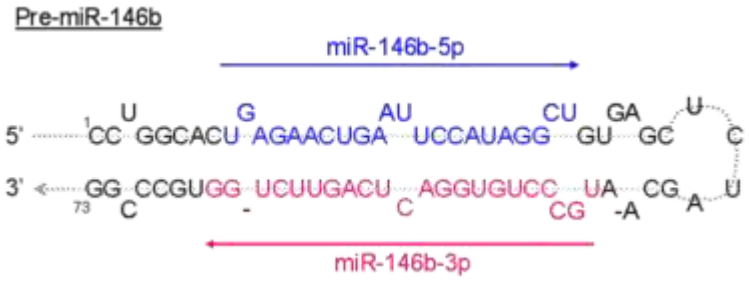
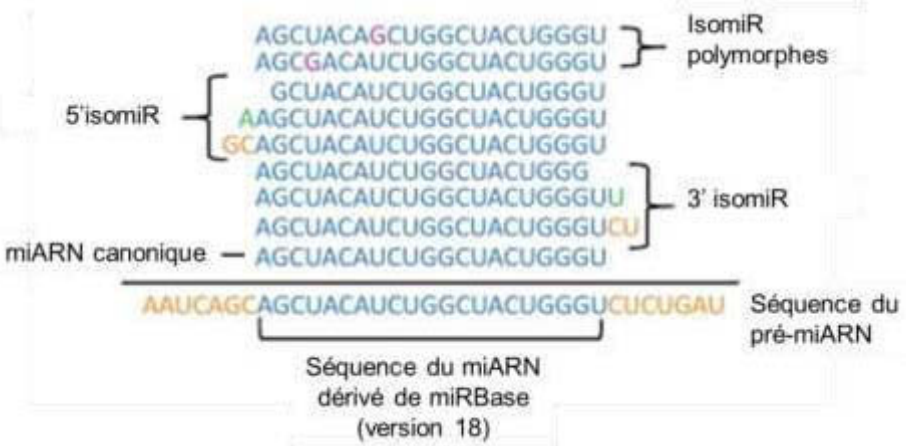


Figure 22 Exemple d'une famille de miARN, la famille *mir*-30 chez l'homme. *Extraite de www.exiqon.com.*

Figure 23 Représentation des différents types d'isomiR. Les isoformes pour le miARN humain *miR-222* montrent un exemple de l'hétérogénéité des isomiR. La séquence de l'isoforme prédominante est indiquée en bleu. Les 5' et 3'isomiR sont des variants du miARN qui diffèrent à leur extrémité 5' et 3', respectivement. Les modifications correspondant au précurseur en orange et celles qui en diffèrent sont en vert. Les isomiR polymorphes hébergent des nucléotides distincts (violet) au sein de leur séquence. *D'après Neilsen et al., 2012.*



5p ou -3p après le suffixe chiffré, de la façon suivante miR-X-5p ou miR-X-3p (Figure 21). La majorité des miARN appartiennent à des familles de miARN au sein desquelles chaque membre partage une même région «seed», qui correspond au site de reconnaissance des séquences des messagers cibles. Elle se situe, classiquement, entre les nucléotides 2 à 8 du miARN (Witkos *et al*., 2011) (Figure 22). Par ailleurs, certains miARN se différencient seulement par quelques bases. Cette différence est, alors, indiquée par une lettre en suffixe, par exemple *miR-181a* et *miR-181b*. De plus, lorsqu'un miARN est le résultat de la maturation de régions chromosomiques différentes, une distinction est faite par l'ajout d'un second suffixe chiffré, par exemple *miR-181a-1* et *miR-181a-2* indiquant que *miR-181a* provient de deux loci différents (le chromosome 1 pour *miR-181a-1* et le chromosome 9 pour *miR-181a-2*, chez l'homme). Enfin, certains miARN ne répondent pas à cette nomenclature, c'est notamment le cas des familles *let-7* et *lin-4* chez les animaux ainsi que les miARN des plantes et des virus.

Chaque miARN est annoté selon une seule séquence définie mais pour un grand nombre il existe des variants de longueur et/ou de séquence appelés isomiR (Landgraf *et al*., 2007, Neilsen *et al*., 2012). Initialement considérés comme des artefacts expérimentaux, les expériences de séquençage haut débit et les algorithmes bioinformatiques ont permis de mieux caractériser un vaste éventail d'isomiR dans différentes espèces (Neilsen *et al*., 2012). Ils seraient issus de clivage imprécis de Drosha/Dicer, les enzymes responsables de la biogenèse des miARN (Lee *et al*., 2010). Leur fonction est semblable à celle de l'isoforme prédominante (miARN canonique) et ils pourraient interagir avec les miARN canoniques, agissant de façon coordonnée dans des voies de signalisation communes (Cloonan *et al*., 2011). Du fait de la modification de la région «seed», les 5'isomiR peuvent cibler un large panel d'ARNm (Tan *et al*., 2014). Selon les variations de séquence, les isomiR sont classés en trois catégories (Figure 23) : les 5'et 3' isomiR dont l'extrémité 5' et 3', respectivement, est rallongée ou raccourcie, ainsi que les isomiR polymorphes qui contiennent à l'intérieur de leur séquence des nucléotides différents de l'isoforme prédominante.

II.2) La biogenese des miARN

La biosynthèse des miARN se compose d'une cascade de réactions enzymatiques divisées en cinq grandes étapes aboutissant à la formation d'un miARN fonctionnel et à l'assemblage du complexe RISC (Figure 24):

Figure 24 Biogenèse canonique des miARN. AGO 1-4: ArGOnautes 1-4, DCGR8: DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8, GW182, miRISC : miRNA-Induced Silencing complex , Pol II : Polymérase II, RIIIa ou RIIIb : RNase IIIa ou IIIb, TRBP : Trans-activation response RNA-Binding Protein, XPO5 : eXPOrtin. *Inspirée de Lin et Gregory, 2015.*

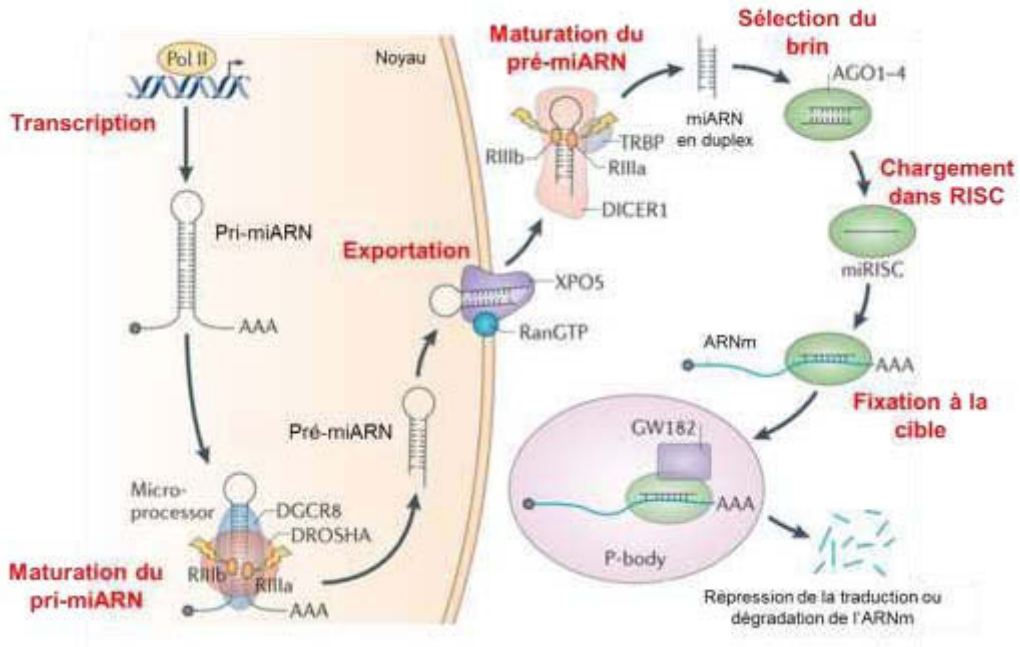
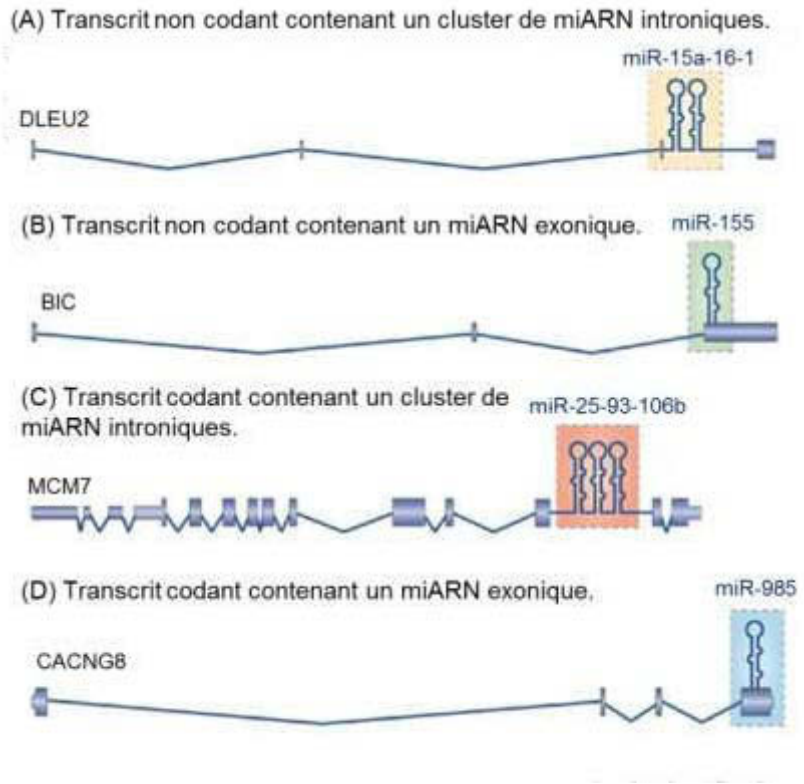


Figure 25 Localisation génomique des miARN. Selon leur localisation génomique, les miARN peuvent être classés en 4 catégories. Les miARN peuvent être en position intronique ou exonique de transcrits non-codants (A et B) ou de transcrits codants (C et D). *D'après Kim et al., 2009.*



- La transcription du gène codant pour le miARN sous forme de miARN primaire (pri-miARN)
- La maturation du pri-miARN en précurseur (pré-miARN) au niveau nucléaire
- L'export du pré-miARN du noyau vers le cytoplasme
- La maturation du pré-miARN en miARN mature
- La formation du complexe RISC

Seules les voies de biogénèse chez les animaux seront décrites dans les paragraphes suivants.

II.2.1) LOCALISATION GENOMIQUE ET TRANSCRIPTION

Les gènes codants pour les miARN peuvent être classés en différentes catégories selon leur localisation génomique. Environ 50% des loci de miARN connus sont proches d'autres miARN. Ces miARN en cluster sont exprimés sous forme de transcrits primaires polycistroniques (Lee *et al*., 2002). Dans certains cas exceptionnels, des miARN individuels dérivent de promoteurs séparés (Cai *et al*., 2004, Lee *et al*., 2003). L'expression des gènes de miARN en cluster est hautement corrélée et une coordination interne a été suggérée, ce qui indiquerait que les miARN issus d'un même cluster réguleraient des voies biologiques communes (Yuan *et al*., 2009). La plupart des gènes de miARN sont en cluster dicistronique (Yuan *et al*., 2009) mais de larges clusters polycistroniques existent, notamment sur le chromosome 19 chez le bovin où un cluster d'environ 40 gènes de miARN est conservé entre espèces de mammifères (Dong *et al*., 2013) (Figure 25).

Environ la moitié des miARN chez les animaux est localisée dans des régions intergéniques appelés miARN intergéniques (Rodriguez *et al*., 2004, Kim *et al*., 2009) (Figure 25). Certains miARN sont générés à partir de transcrits non codants alors que d'autres sont synthétisés par des gènes codants. Ainsi, environ 80% des loci de miARN intragéniques sont localisés dans des régions introniques de gènes codants (40%) ou non (40%), alors que 20% sont dans des régions exoniques (Kim *et al*., 2009). Les miARN intragéniques tendent à être exprimés avec leur gène hôte et les deux auraient des effets synergiques (Lutter *et al*., 2010, Rearick *et al*., 2011).

La transcription de la majorité des gènes des miARN est effectuée par l'ARN polymérase II (Pol II) (Lee *et al*., 2004, Cai *et al*., 2004). Néanmoins, une minorité de miARN, associés avec des répétitions de type Alu, peuvent être transcrits par l'ARN polymérase Pol III (Borchert *et al*., 2006). Les facteurs de transcription associés à l'ARN polymérase Pol II contrôlent la transcription des gènes de miARN et leur permettent d'être

Figure 26 Structure d'un miARN primaire. Le pri-miARN mesure environ 1 000 nucléotides et est constitué du brin -5p (bleu), une boucle terminale et du brin -3p (rouge). *Issue de http://theses.ulaval.ca/archimede/fichiers/25600/ch01.html et Chan et Slack, 2007.*

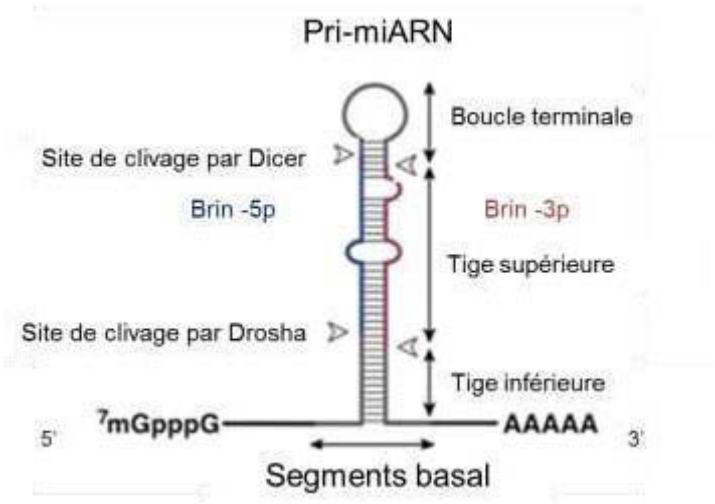
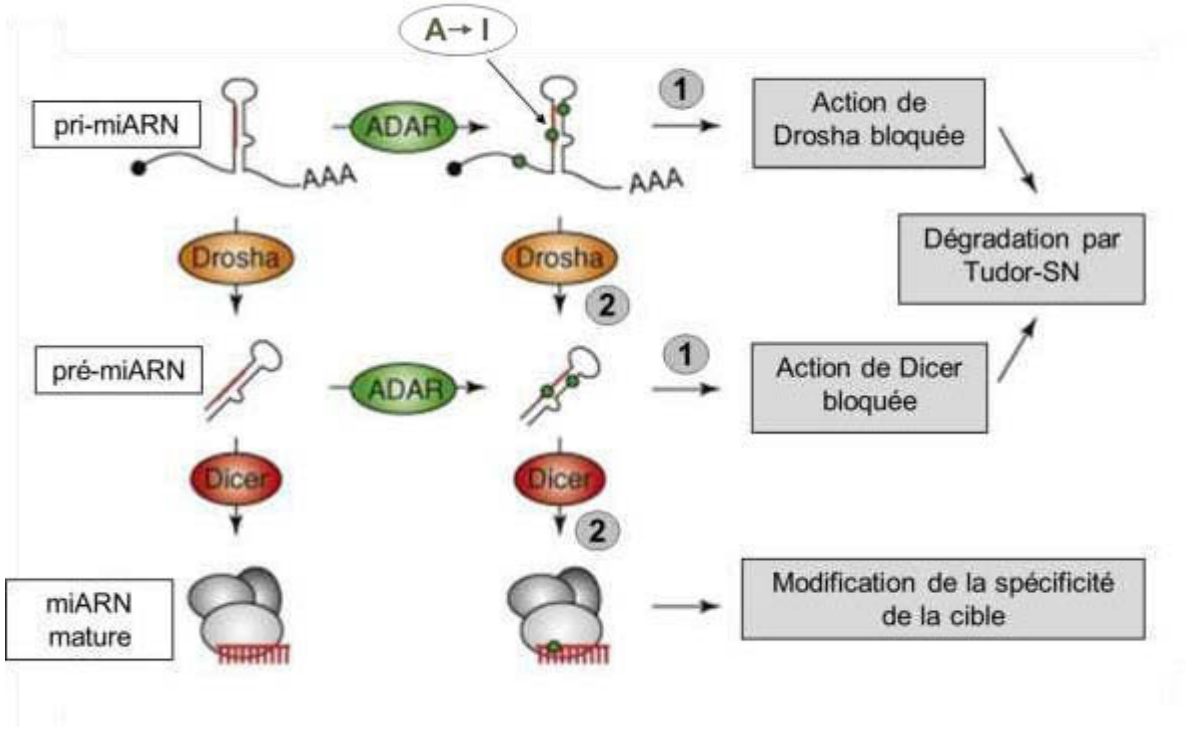


Figure 27 L' « editing » des miARN. L'enzyme ADAR convertit une adénosine (A) en inosine (I) (points verts) au niveau du pri-miARN ou du pré-miARN. Cette modification peut altérer l'action de Drosha ou Dicer (①) et entrainer la dégradation de la molécule par la ribonucléase TUDOR-SN. Les pri-miARN ou pré-miARN édités peuvent aussi entrainer une accumulation de miARN (②) qui reconnaissent des cibles différentes du miARN non édité. ADAR: Adenosine DeAminase RNA-specific, TUDOR-SN: TUDOR Staphylococcal Nuclease homolog. *D'après Ding et al., 2009.*



régulés selon les types cellulaires, les différentes conditions physiologiques, ou selon la méthylation de leur promoteur (Saito *et al*., 2006, Brueckner *et al*., 2007, Lujambio *et al*., 2008). Les transcrits issus des ARN polymérases Pol II ou Pol III sont des ARN de 100 à 1000 nt, les pri-miARN (ou miARN primaires) qui sont classiquement composés d'une tige de 33 paires de bases, une boucle terminale et de deux régions flanquantes d'ARN simple brin en amont et en aval de la tige-boucle (Figure 26). Les pri-miARN disposent d'une coiffe et d'une queue poly-A, qui représentent les marques d'une transcription par l'ARN polymérase Pol II (Winter *et al*., 2009).

II.2.2) MIARN EDITING

L' « editing » d'un transcrit primaire par ADAR (Adenosine Deaminase Acting on RNA) correspond à la modification d'une adénosine (A) en inosine (I). L'appariement du nucléotide « inosine » étant similaire à celui du « guanosine » (G), l' « editing » de A en I des pri-miARN peut changer leur séquence et leur propriété structurale. Cette étape peut influencer les processus de maturation et de reconnaissance de leur cible (Winter *et al*., 2009). Les premiers exemples d' « editing » ont été décrits notamment pour quelques miARN tels que *mir-22*, puis *mir-151* et *mir-223* (Blow *et al*., 2006). En particulier, l' « editing » de A en I du *pri-mir-142* inhibe son clivage par l'endonucléase Drosha, entrainant sa dégradation par la ribonucléase Tudor-SN, qui coupe préférentiellement les ARN doubles brins contenant une paire inosine-uracile (Yang *et al*., 2006, Scadden et O'Connel, 2005) (Figure 27). L' « editing » de certains autres pri-miARN peut, à l'inverse, améliorer leur maturation par Drosha, comme *mir-203* (Kawahara *et al*., 2008). L' « editing » de A en I est le plus fréquent pour les ARN des animaux. Néanmoins, la fréquence de ce phénomène pour les miARN n'est pas encore claire mais, chez l'homme, des travaux ont montré que plus de 16 % des pri-miARN étaient édités (Athanasiadis *et al*., 2004, Kawahara *et al*., 2008, Tomaselli *et al*., 2013).

II.2.3) MATURATION NUCLEAIRE DU MIARN PRIMAIRE

La première étape de la maturation, dans le noyau, du pri-miARN est le clivage à la base de sa structure tige-boucle, qui entraine la libération d'une seconde tige-boucle d'environ 60 à 70 nucléotides et qui définit le précurseur du miARN ou pré-miARN (Lee *et al*., 2002). Cette étape est réalisée par la RNase III-type Drosha, qui nécessite le cofacteur DiGeorge syndrome Critical Region gene 8 (DGCR8) (ou Pasha chez les invertébrés) pour cliver le pri-miARN (Han *et al*., 2004, Denli *et al*., 2004, Gregory *et al*., 2004, Landthaler *et al*., 2004).

Figure 28 Structure des protéines Drosha et DCGR8 chez l'homme. DCGR8: DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8, dsRBD: double strand RNA Binding Domain. *D'après Tsunetsugu-Yokota et Yamamoto, 2010.*

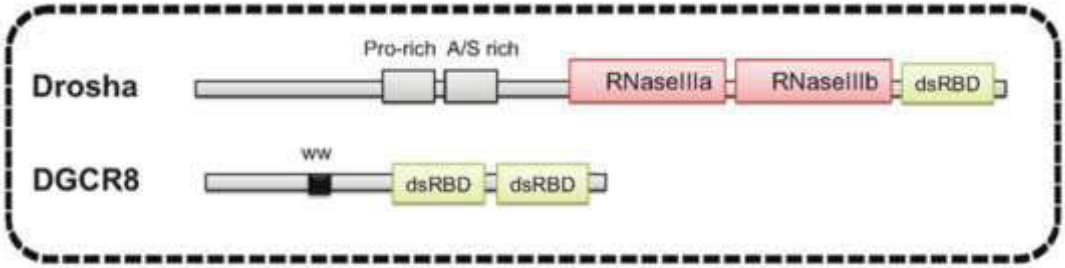
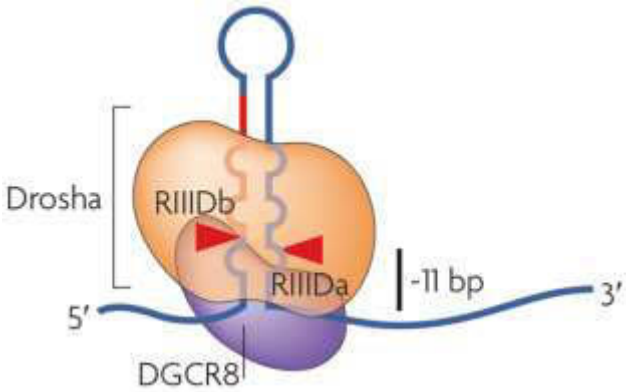


Figure 29 Action de Drosha et DCGR8 sur le pri-miARN. Drosha interagit avec son co-facteur DCGR8 pour former le complexe (microprocesseur) sur le pri-miARN. Les deux domaines RNase III (RIIIDa et RIIIDb) de Drosha interagissent entre eux pour former un dimère contenant deux sites catalytiques proches l'un de l'autre. Le premier domaine coupe le brin 3' du pri-miARN alors que le second coupe le brin 5' générant une extrémité avec deux nucléotides excédents en 3'. DCGR8: DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8, RIIIDa ou RIIIDb: RNase IIIa ou b. *D'après Kim et al., 2009.*

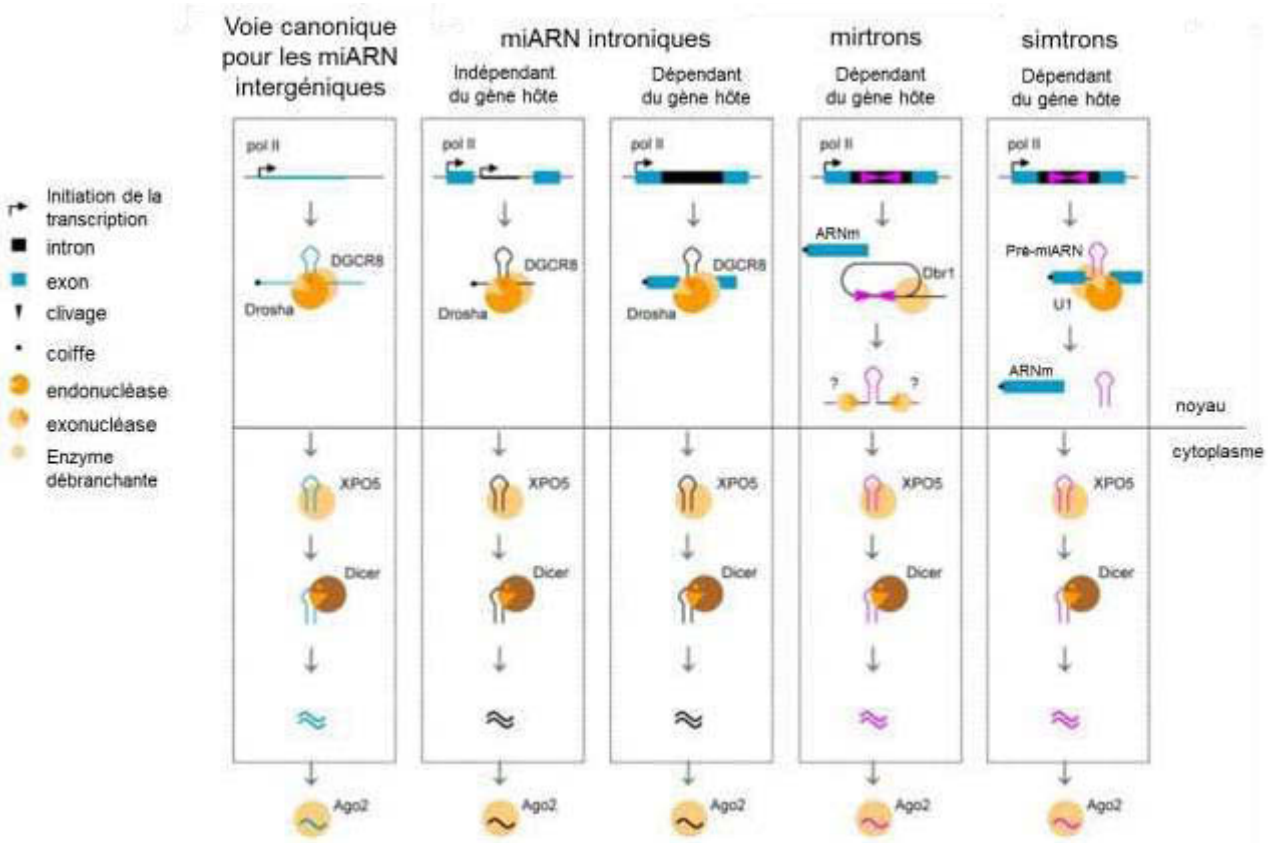


Drosha et son cofacteur forment un large complexe, appelé microprocesseur, d'environ 650 kDa chez l'Homme, et sont très conservés entre espèces (Filippov *et al*., 2000, Wu *et al*., 2000, Fortin *et al*., 2002). L'enzyme Drosha est composée de deux sites catalytiques RNAse III avec un site de fixation aux ARN doubles brins (dsRBD) (Figure 28) en partie C terminale et un domaine riche en proline et arginine/sérine en N terminale (Tsunetsugu-Yokota et Yamamoto, 2010). Le cofacteur DCGR8 est, quant à lui, composé de deux sites dsRBD et un domaine WW riche en résidus tryptophane, qui serait impliqué dans la fixation de DCGR8 à Drosha (Yeom *et al*., 2006).

La tige ainsi que les régions flanquantes du pri-miARN joue un rôle important pour cette étape de maturation, puisque DCGR8 interagit avec le pri-miRNA par ces régions (Figure 29). Un seul polymorphisme dans la séquence de la tige du pri-miARN peut bloquer l'action de Drosha (Duan *et al*., 2007). Les deux domaines RNAse III de Drosha clivent les bras 5' et 3' du pri-miARN, alors que DCGR8 interagit directement avec le pri-miARN et fonctionne comme un guide permettant de déterminer le site exact de clivage. Drosha coupe, alors, à 11 pb de la jonction ARNdb/ARNsb, à la base de la tige-boucle (Han *et al*., 2006, Zeng *et al*., 2005). Le clivage du pri-miARN médié par Drosha se déroule au niveau co-transcriptionnel et précède l'épissage de l'ARN codant ou non-codant contenant le miARN. L'épissage n'est pas inhibé par Drosha, car un intron continu n'est pas nécessaire pour la bonne réalisation de l'épissage (Kim et Kim, 2007, Morlando *et al*., 2008). Lorsque la structure tige-boucle du miARN est située dans un exon, le clivage par Drosha peut déstabiliser le transcrit et réduire la synthèse de protéine. Après maturation par Drosha et DGCR8, le pré-miARN obtenu possède un groupe phosphate en extrémité 5' et 2 nucléotides non appariés à son extrémité 3'.

La voie de biosynthèse présentée ci-dessus est la voie canonique incluant Drosha et DCGR8 mais il existe d'autres voies de synthèse de miARN fonctionnels (Figure 30). En particulier, des miARN peuvent dériver des introns de leur gène hôte après l'épissage. Si l'intron résultant de l'épissage et le lasso de l'enzyme débranchante (Dbr) a une taille appropriée pour former une tige boucle ressemblant à un pré-miARN, il contourne le clivage par Drosha et sera maturé par Dicer dans le cytoplasme (Okamura *et al*., 2007, Ruby *et al*., 2007). Ces miARN, appelés mirtrons, ont été découverts chez plusieurs espèces, incluant *D.melanogaster* et *C.elegans* (Berezikov *et al*., 2007) et récemment, l'Homme et la souris (Ladewig *et al*., 2012). Ils sont différents mais très conservés entre les invertébrés et les mammifères et pourraient être des précurseurs de l'évolution des voies existantes de la biogenèse des miARN. Plus récemment, une autre voie alternative produisant des miARN a

Figure 30 Les différentes voies de synthèse des miARN. Les trois premiers schémas correspondent à la voie canonique de synthèse des miARN inter- et intragéniques. Les deux derniers schémas représentent des voies de synthèse des miARN alternatives, indépendante du microprocesseur Drosha/DCGR8 (mirtrons) ou indépendante de DCGR8 mais dépendante de U1 snRNP (simtrons). Ago 2: Argonaute 2, DCGR8: DiGeorge syndome critical region gene 8, pol II: polymérase II, XPO5: eXPOrtin 5. *D'après Falaleeva et Stamm, 2013, Hubé et Francastel, 2015.*



été identifiée, il s'agit des simtrons (splicing-independant mirtron-like miRNA). Cette voie repose également sur des facteurs d'épissage tels que U1 snRNP et sur le microprosseur Drosha mais pas sur DCGR8, ni sur l'enzyme débranchante (Janas *et al*., 2011, Havens *et al*., 2012). La synthèse des simtrons ne nécessite pas Dicer et se déroule lorsque l'épissage de l'ARNm est actif, mettant ces deux processus en compétition. Ces miARN produits par des voies alternatives sont intégrés dans le complexe RISC et exerceraient les mêmes fonctions que les miARN issus de la voie canonique (Havens *et al*., 2012, Deng *et al*., 2015).

II.2.4) TRANSPORT DU PRE-MIARN DU NOYAU AU CYTOPLASME

Le pré-miARN est, ensuite, transporté dans le noyau pour poursuivre sa maturation. L'export du pré-miARN est assurée par la protéine Exportine 5 Ran-GTP dépendante (EXP5 ou XPO5), qui est un membre de la famille des récepteurs de transport nucléaire (Bohnsack *et al*., 2004, Lund *et al*., 2004, Yi *et al*., 2005). Bien qu'EXP5 ait été à l'origine connue comme transporteur des ARNt (Bohnsack *et al*., 2002, Calado *et al*., 2002), le chargement principal d'EXP5 s'est avéré être celui des pré-miARN. L'inactivation du gène *Exp5* chez la souris a conduit à une diminution de l'abondance des miARN matures mais pas à une accumulation des pré-miARN, indiquant qu'EXP5 protège aussi les pré-miARN contre une digestion nucléaire (Yi *et al*., 2003, Bohnsack *et al*., 2004, Lund *et al*., 2004). Le transport du pré-miARN se fait à travers les pores nucléaires, qui sont de larges canaux protéiques enchâssés dans la membrane nucléaire (Nakielny et Dreyfuss, 1999). L'EXP5 reconnait le pré-miARN indépendamment de sa séquence ou de sa tige-boucle. Une longueur définie de la tige double-brin ainsi que la région flanquante en 3' sont importantes pour la bonne fixation d'EXP5 et pour assurer un transport correct. Le pré-miARN lié à EXP5 est exporté du noyau et l'hydrolyse du GTP entraine la libération du pré-miARN dans le cytoplasme (Lund *et al*., 2004, Gwizdek *et al*., 2003, Basyuk *et al*., 2003, Zeng et Cullen, 2004).

II.2.5) MATURATION DU PRE-MIARN EN MIARN MATURE

Une fois dans le cytoplasme, le pré-miARN est clivé une seconde fois, près de la boucle terminale, libérant un petit duplex d'ARN d'environ 22 nucléotides (Winter *et al*., 2009). Drosha détermine, ainsi la séquence du miARN mature en générant une des extrémités du miARN, alors que l'autre extrémité est créée par le clivage de Dicer, qui mesure 22 nucléotides à partir de l'extrémité préexistante du pré-miARN. Dicer est une enzyme hautement spécifique et très conservée, qui est trouvée chez tous les organismes eucaryotes, incluant les levures (*S.Pombe*), les plantes et les animaux. Dicer est une RNAse III

Figure 31 Structure de Dicer chez l'homme (A) et représentation de sa forme et du positionnement de ses domaines lors de la liaison avec un miARN (B). Il existe deux modèles d'architecture de Dicer dans la forme en L (ancien et nouveau) dans lesquels les positions des domaines PAZ et RNAse III ainsi que la proximité des domaines hélicases avec la boucle du pré-miARN sont inversées. dsRBD: double strand RNA Binding Domain, RIII: RNase III. *D'après Sawh et Duchaine, 2012.*

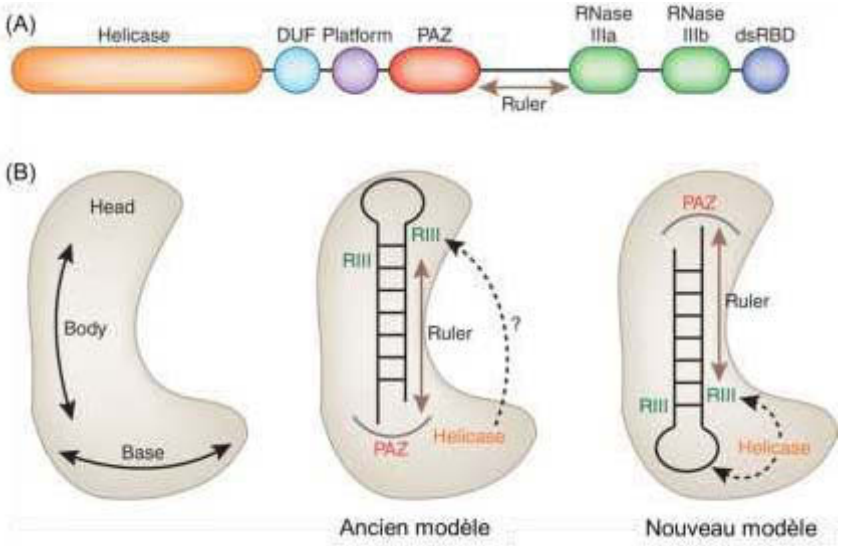
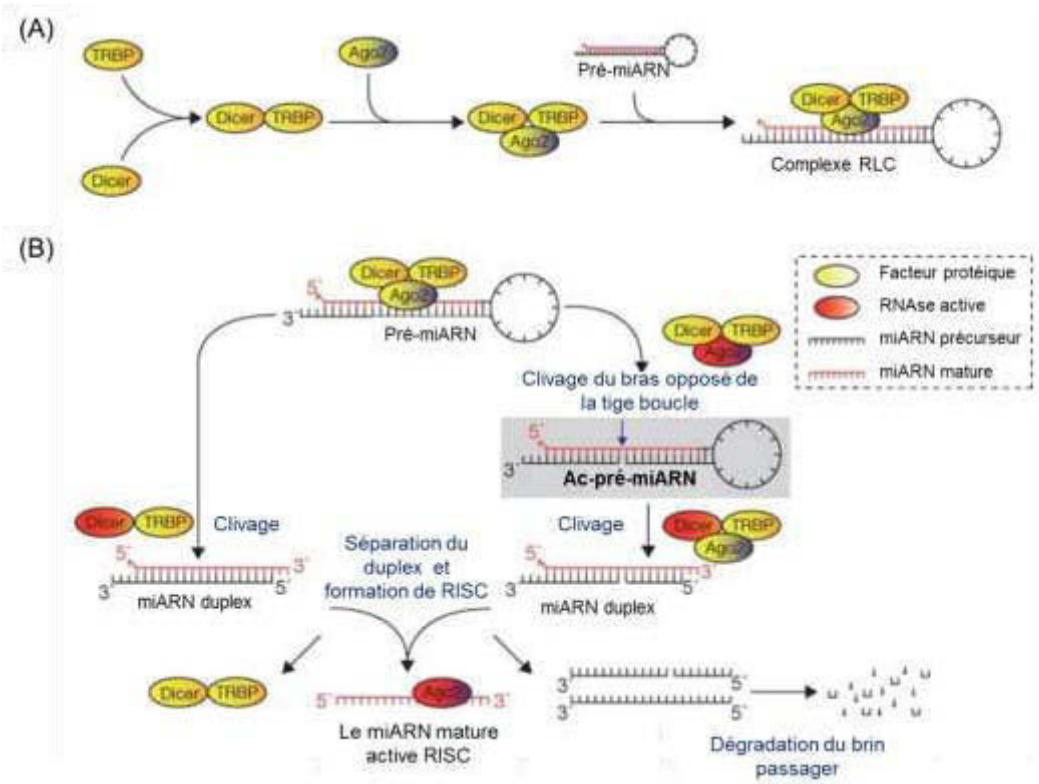


Figure 32 Formation des ac-pré-miARN. (A) Dicer et TRBP interagissent et forme le complexe RLC (RISC Loading Complex) avec AGO2. (B) Après la fixation du RLC sur le pré-miARN, Dicer libère le duplex de miARN. Mais AGO2 peut aussi cliver le brin passager générant une tige boucle entaillée, appelé ac-pré-miARN ou AGO2-cleaved pre-miRNA. Ago2: ArGOnaute 2, RLC: RISC Loading Complex, TRBP: Trans-activation response RNA-Binding Protein. *D'après Diederichs et Haber, 2007 et Winter et al., 2009.*



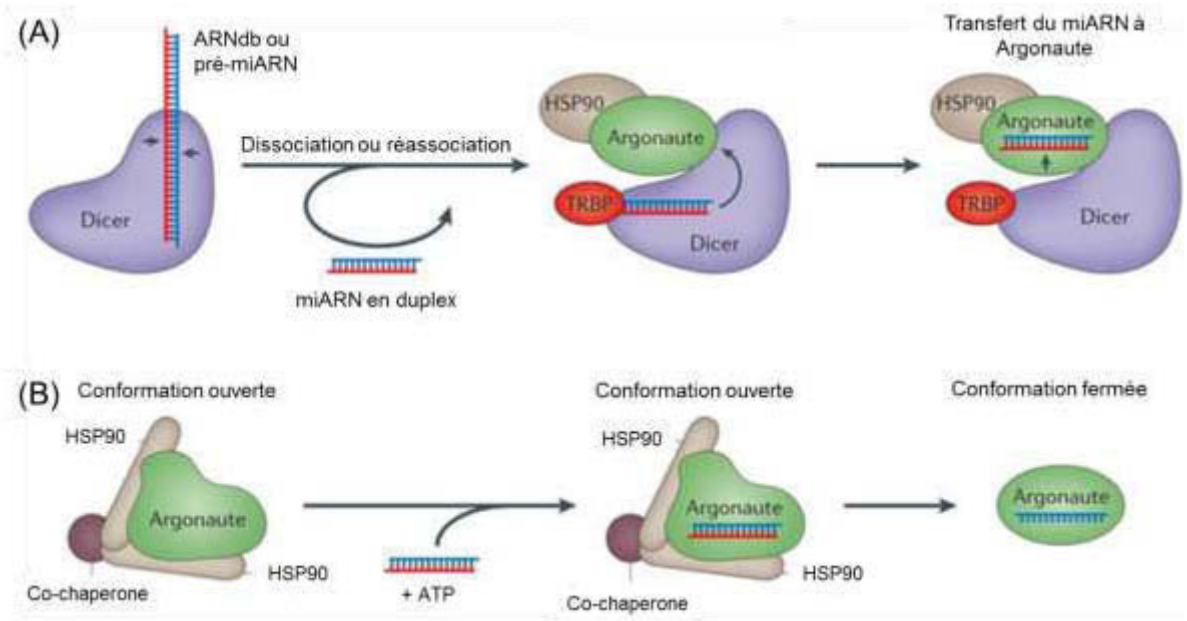
cytoplasmique constituée du domaine hélicase en N terminale, suivi des domaines DUF283 (dont la fonction est inconnue) et PAZ (PIWI/Argonaute/Zwille) en plus de deux domaines RNAse III et un domaine dsRBD (Bernstein *et al*., 2001, Jinek et Doudna, 2009) (Figure 31). Certains organismes possèdent plusieurs homologues de Dicer, et chacun de ces isotypes a une fonction distincte (Lee *et al*., 2004). Par exemple, chez la Drosophile (*D.melanogaster*) Dicer 1 est nécessaire pour la biogenèse des miARN, alors que Dicer 2 permet la production des siRNA (Lee *et al*., 2004).

Pour fonctionner, Dicer s'associe avec d'autres protéines pouvant se fixer aux ARN doubles brins. Ainsi, Dicer 1 chez *D.melanogaster* nécessite Loquacious (LOQS ou R3D1), qui contient trois domaines dsRBDs pour maturer les pré-miARN. Dicer peut également s'associer à la RNAi deficient -4 (RDE-4) chez *C.Elegans* et fragile X mental retardation 1 (FMR1) chez *D.melanogaster*, ainsi qu'avec des protéines de la famille Argonaute (AGO) chez de nombreux organismes (Tabara *et al*., 2002, Liu *et al*., 2003, Hammond *et al*., 2001). Chez l'Homme, Dicer interagit avec les protéines TRBP (Trans-activation response RNA-Binding Protein), qui possèdent des domaines de fixation aux ARN doubles brins, ainsi qu'avec la protéine PACT (protein kinase, interferon-inductible double-stranded RNA-dependent activator, ou PRKRA). Les protéines associées à Dicer ne semblent pas nécessaires pour la maturation, mais elles contribueraient plutôt à la formation du complexe RISC (voir plus bas). TRBP stabilise Dicer (Chendrimada *et al*., 2005, Haase *et al*., 2005, Lee *et al*., 2006). La déplétion de TRBP et de PACT diminue la régulation post-transcriptionnelle des gènes.

Par ailleurs, dans le cas particulier où les miARN présentent un fort degré de complémentarité le long de leur tige-boucle, une étape de clivage additionnelle se déroule avant le clivage médié par Dicer (Figure 32). En effet, AGO2 clive le brin 3' (le futur brin passager) de la tige boucle au milieu de sa séquence pour générer une tige boucle entaillée et produisant un ac-pré-miARN (AGO2-cleaved pre-miRNA) (Diederichs et Haber, 2007). Dicer peut ensuite cliver l'ac-pré-miARN avec une efficacité identique au pré-miARN. Cette étape faciliterait très probablement la dissociation des deux brins du précurseur et l'action de RISC (Matranga *et al*., 2005).

Grâce à son activité RNase III, Dicer clive la boucle du pré-miARN ou l'ac-pré-miARN, et génère un miARN duplex d'approximativement 22 nucléotides avec 2 nucléotides flanquant à chaque extrémité 3'.

Figure 33 Modèles du chargement du miARN dans les protéines Argonautes chez l'homme. (A) Dicer lie et clive le pré-miARN (flèches), produisant un miARN en duplex. Ce petit ARN se dissocie et se réassocie à Dicer à une position différente. Puis TRBP positionne le duplex permettant une sélection du brin et un chargement correct de ce dernier. (B) Le chargement dans les protéines Argonautes est médié par un dimère de protéines HSP90 et de co-chaperonnes qui hydrolysent de l'ATP pour maintenir les Argonautes en conformation ouverte. Après le chargement du duplex, le brin passager est dissocié et les protéines Argonautes sont chargées avec un petit ARN simple brin dans une conformation fermée. ARNdb: ARN double brin, HSP90: Heat Shock Protein 90, TRBP: Trans-activation response RNA-Binding Protein. *D'après Meister, 2013.*



II.2.6) FORMATION DU COMPLEXE RISC

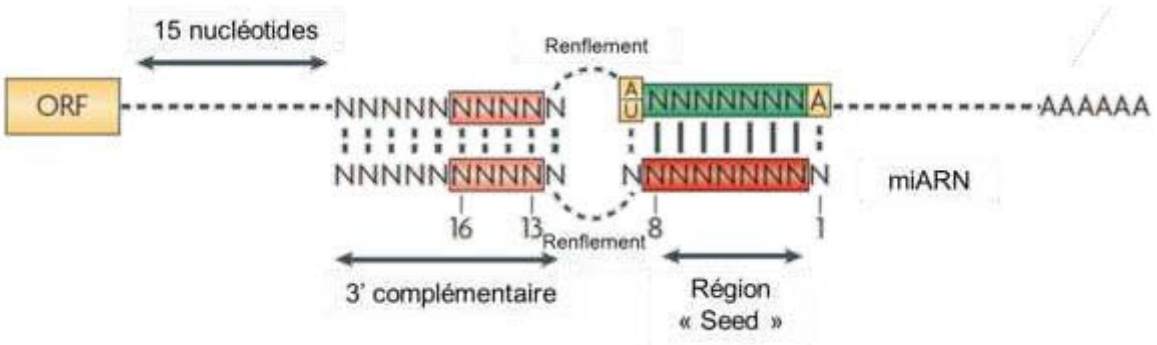
Dicer, TRBP et les protéines AGO contribuent à la formation du complexe RISC en formant, dans un premier temps, le complexe RLC (RISC loading complex) (Figure 33). Bien que la façon dont le complexe RLC se fixe à l'ARN et facilite le chargement d'AGO ne soit pas connue, des études suggèrent que le duplex de miARN serait libéré après le clivage de Dicer et que l'extrémité stable du duplex pourrait se lié à la protéine TRBP dans le complexe RLC alors que l'autre extrémité interagirait avec les protéines AGO (Tomari *et al*., 2004). Chez *D. melanogaster*, ces mécanismes sont en partie connus et c'est la protéine R2D2 contenant deux sites de liaison à l'ARN, dsRBD, qui forme un hétérodimère complexe avec Dicer 2 pouvant se lier à l'extrémité la plus stable du duplex et orienter AGO sur le duplex d'ARN. Chez les mammifères, c'est TRBP qui serait responsable de cette étape (Winter *et al*., 2009).

Ainsi une fois clivé le pré-miARN se trouve sous forme de duplex miR-X-5p/miR-X-3p. Ce duplex est pris en charge par une protéine AGO pour générer le complexe effecteur RISC (Kim *et al*., 2009). Un seul des deux brins est incorporé dans RLC donc une sélection se déroule à cette étape. Pour la sélection du miARN mature, il s'agit généralement du brin 5p. Le brin 3p présente une stabilité interne moins forte par rapport au reste de la séquence du précurseur et cette propriété thermodynamique joue un rôle essentiel pour la dissociation du duplex et la sélection du brin par RISC (Khvorova *et al*., 2003). Dans le cas des mirtrons, la sélection du brin guide est préférentiellement le brin 3p et donc devient le brin mature majoritaire. A l'issue de cette sélection, le miARN mature se compose d'une partie 5' comprenant la région «seed» (bases 2 à 7 ou 8), qui s'apparie à la cible et une partie 3' dont le rôle est également important pour la reconnaissance de la cible. Le brin passager est le plus souvent dégradé bien que dans certains cas il puisse être incorporé dans RISC et être fonctionnel car cette étape n'est pas stringente (Bouasker et Simard, 2012).

Le duplex est donc pris en charge par AGO à l'intérieur du complexe RLC et le transfert du duplex à AGO est médié par Hsc70-Hsp90 chez *D. melanogaster* et HSP90 (Heat Shock Protein 90) chez l'homme. Ce complexe hydrolyse de l'ATP afin de garder AGO dans un état ouvert pour que cette dernière puisse charger le duplex.

Il existe 4 protéines AGO différentes chez l'homme AGO1, 2, 3 et 4 qui peuvent toutes lier les miARN et être chargées dans le complexe RLC, suggérant des fonctions peu distinctes entre protéines AGO. En revanche, seul AGO2 possède une activité endonucléase. Les protéines Argonautes sont constituées de 2 lobes ; le premier contenant le domaine N-terminal

Figure 34 Principe de l'interaction miARN/ARNm. ORF: Open Reading Frame. *D'après Filipowicz et al., 2008.*



et le domaine PAZ, l'autre contenant les domaines Mid et Piwi (Yuan *et al*., 2005). Bien que les fonctions de tous ces domaines ne soient pas toutes définies, il semblerait que les domaines PAZ, Mid et PIWI aient une fonction importante dans les phénomènes d'ARN interférence puisque leur interaction avec le miARN est fondamentale à la fonction de ce dernier (Parker *et al*., 2005). Le domaine PAZ identique à celui de Dicer se lie au duplex possédant deux nucléotides non appariés à l'extrémité 3' mais également aux ARN simples brins et reconnait l'extrémité 3' des miARN matures (Song *et al*., 2003, Ma *et al*., 2004, Lingel *et al*., 2004). Le domaine Mid, quant à lui, permettrait la reconnaissance de l'extrémité 5' phosphate du miARN mature ainsi que la coiffe de l'ARNm (Boland *et al*., 2010). Enfin le domaine PIWI possède une structure tertiaire appartenant à la famille des RNAses H et permet au complexe RISC d'exercer une activité endonucléolytique sur l'ARNm (Song *et al*., 2004).

Chez l'homme et *D. melanogaster*, le brin passager entaillé par AGO2 est retiré de RLC par l'endonucléase C3PO, qui interagit avec AGO2. Le brin non sélectionné est retiré du complexe RLC et, par conséquent, devient le complexe RISC qui peut à présent cliver les ARN complémentaires au miARN mature (Ye *et al*., 2011).

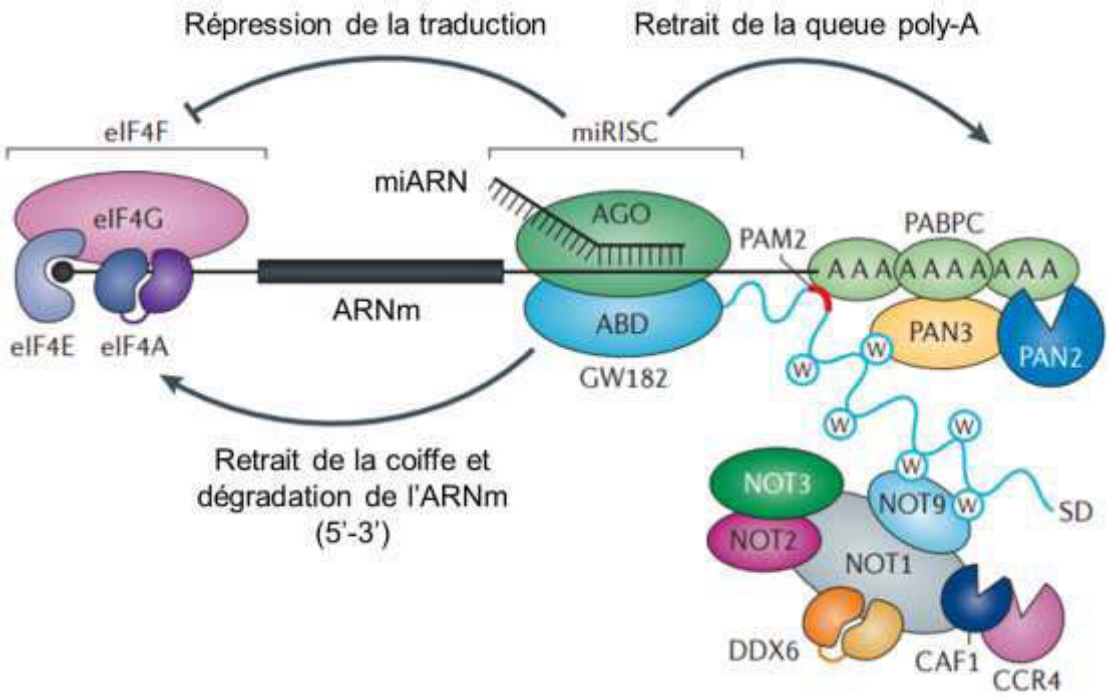
II.3) MODE D'ACTION DES MIARN

Plus de 60% des gènes codants pour des protéines contiennent au moins un site de fixation pour les miARN (Friedman *et al*., 2009). Un miARN peut cibler une centaine d'ARNm différents et un ARNm peut être ciblé par plusieurs dizaines de miARN différents.

II.3.1) PRINCIPE DE L'INTERACTION MIARN/ARNM

Chez les plantes, le miARN est généralement parfaitement complémentaire à sa cible et entraine son clivage par activité endonucléase selon un mécanisme d'ARN interférence (Jones-Rhoades *et al*., 2006). Dans la plupart des cas, les miARN chez les métazoaires sont partiellement complémentaires à leur cible. L'exigence la plus stricte est un appariement de base continu et parfait de la région «seed» du miARN (nucléotide 2-8 du miARN, Figure 34) qui renforce l'interaction miARN/ARNm. Une paire GU ou un mésappariement et renflement dans la région «seed» affectent fortement la répression induite par le miARN. Cependant, un résidu A en position 1 du miARN et un A ou un U en position 9 (représentés en jaune, Figure 34) augmente l'efficacité de liaison et ne nécessitent pas de se lier aux autres nucléotides du

Figure 35 Les différentes actions des miARN sur leur cible. Le miARN via le complexe RISC se fixe dans la région 3'UTR de l'ARNm. Les protéines AGO (Argonautes) interagissent avec la protéine GW182, qui à son tour interfère avec les protéines PABPC (Poly-A Binding Protein) au niveau de la queue poly-A et avec les enzymes cytoplasmique PAN2 et PAN3. Le complexe PAN2-PAN3 et CCR4-NOT catalysent le retrait de la queue poly-A et une dégradation rapide du miARN. Le miARN peut également inhiber la traduction de l'ARNm en interférant avec la fixation et/ou l'activité du complexe d'initiation eIF4F. AGO: Argonautes, CAF1: CCR4-NOT transcription complex subunit 8, CCR4-NOT: CCR4-NOT transcription complex subunit (incluant NOT1 et 2, DDX6: DEAD boX protein 6, eIF4A/E/G/F: Eukaryotic Translation Initiation Factor 4A/E/F/G, PABPC: Poly-A Binding Protein, PAM2: PABP-interacting motif 2, PAN2/3: PAN2/3 Poly-A Specific Ribonuclease Subunit. *D'après Jonas et Izaurralde, 2015*.



miARN. Un autre principe de l'appariement est que les renflements ou les mésappariements doivent être présents dans la région centrale du duplex miARN/ARNm, excluant le clivage médié par AGO. Enfin, le dernier principe est qu'il doit y avoir une complémentarité raisonnable à la moitié 3' du miARN pour stabiliser l'interaction. Des mésappariements ou des renflements sont généralement tolérés dans cette région bien qu'une complémentarité de base correcte, particulièrement pour les résidus 13-16 du miARN (représentés en orange, Figure 34) deviennent important lorsque l'appariement dans la région «seed» est optimal (Grimson *et al*., 2007).

Dans la majorité des cas, chez les métazoaires le miARN se fixe en 3'UTR de sa cible, mais ils peuvent aussi effectuer leur rôle de répression de la traduction lorsqu'ils se fixent en 5'UTR ou dans la région codante de l'ARNm (Kloosterman *et al*., 2004, Easow *et al*., 2007).

II.3.2) Degradation et repression de la traduction de l'ARNm cible

Chez les animaux, la fixation du miARN sur son ARNm cible entraine majoritairement la dégradation de ce dernier. En effet, ce phénomène représente 66 à 90% de l'action des miARN sur leur cible dans des cultures de cellules mammifères (Selbach *et al*., 2008, Baek *et al*., 2008, Eichhorn *et al*., 2014).

La dégradation de l'ARNm passe en premier lieu par le retrait de sa queue poly-A (Figure 35). La queue poly-A et les protéines PABPC (Poly-A Binding Protein) de l'ARNm sont connues pour augmenter la traduction dépendante de la coiffe en interagissant avec le facteur d'élongation eIF4G (Tarun *et al*., 1997). Plusieurs études ont indiqué que la coiffe et la queue poly-A sont requises pour une action inhibitrice efficace du miARN sur sa cible (Humphreys *et al*., 2005). En particulier, PABPC interagit avec le complexe RISC via la protéine GW182 (Fabian *et al*., 2010, Zekri *et al*., 2009). Cette protéine joue un rôle prépondérant pour la dégradation de l'ARNm puisqu'elle recrute via son domaine riche en tryptophane le complexe désadénylase constitué de PAN2 (PAN2 Poly-A Specific Ribonuclease Subunit) et son adaptateur PAN3. Ce complexe est recruté pour déstabiliser la queue notamment via son interaction avec les protéines PABPC et initie la dégradation de la queue poly-A (Wahle et Winkler, 2013). Lorsque la queue poly-A est écourtée un second complexe d'enzyme désadénylase intervient, le complexe CCR4-NOT qui est composé de nombreuses sous-unités dont les protéines NOT, DDX6 (DEAD boX protein 6) et CAF1 (CCR4-NOT transcription complex subunit 8) et dont certaines ont la capacité d'interagir avec la protéine GW182 (Yamashita *et al*., 2005). C'est ce complexe qui dégrade la fin de la queue poly-A et donc entraine une déstabilisation de l'ARN.

A la suite de la désadénylation, la coiffe de l'ARNm cible est retirée par le complexe enzymatique DCP1/DCP2 (Rehwinkel *et al*., 2005) et l'ARNm est dégradé par l'exonucléase XRN1 des extrémités 5' à 3' (Jonas et Izaurralde, 2015). Les ARNm qui ne possèdent pas de coiffe en extrémité 5' ou dont la traduction est indépendante de cette structure ne sont pas régulés par les miARN (Pillai *et al*., 2005, Humphreys *et al*., 2005).

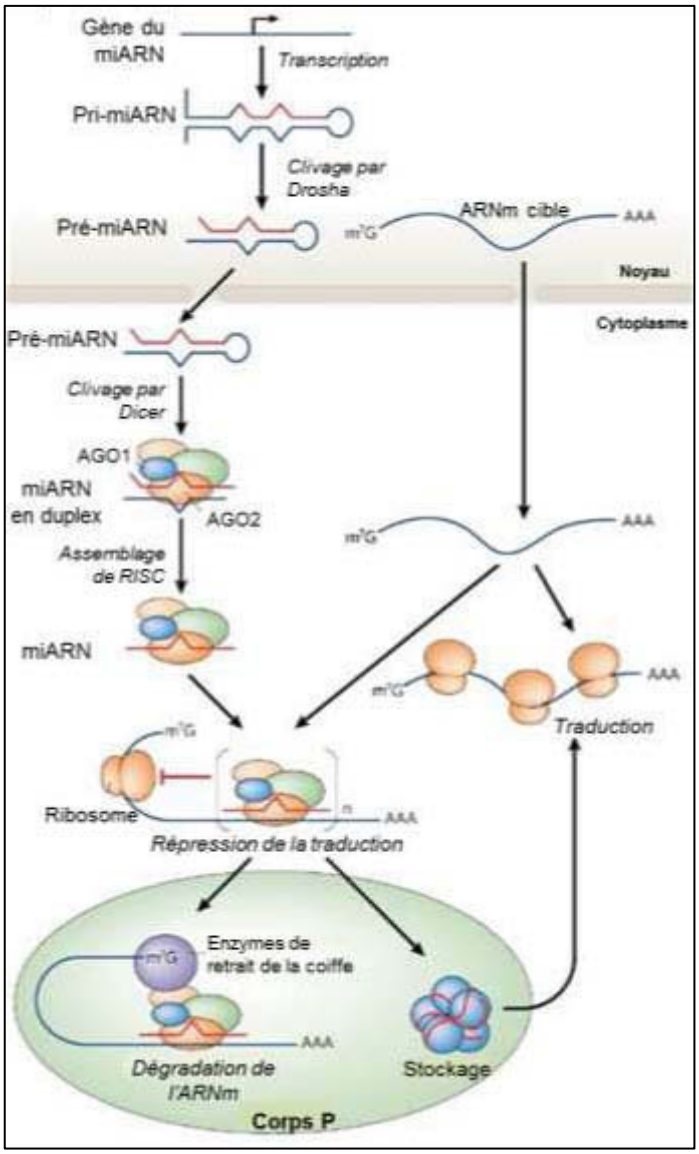
En plus d'entrainer la dégradation de l'ARNm cible, les miARN peuvent réprimer la traduction de leur cible. Les mécanismes moléculaires permettant d'expliquer ce phénomène sont encore sujets de controverses mais le complexe RISC pourrait interférer avec la fonction du facteur d'initiation de la traduction eIF4E (eukaryotic translation Initiation Factor 4), par exemple. De plus, la répression pourrait aussi être médiée par une inhibition de la formation du complexe ribosomal. Ainsi, il a été montré notamment que *miR-2* peut inhiber à la fois le recrutement de la sous unité ribosomale 40S et l'initiation de la formation du complexe 80S dans des embryons de drosophile (Thermann et Hentze, 2007). D'autres études ont aussi suggéré que la répression de la traduction par les miARN passe par l'inhibition de l'adhésion de la sous unité ribosomale 60S et 40S (Chendrimada *et al*., 2007).

Enfin, plusieurs miARN ainsi que les protéines Argonautes peuvent s'associer à des fractions de ribosomes, qui sont responsables de la synthèse des chaines polypeptidiques chez les mammifères (Kim *et al*., 2004) et les plantes (Lanet *et al*., 2009), suggérant que les miARN pourraient agir sur l'élongation de la traduction de leur ARNm cible (Maroney *et al*., 2006). Plusieurs mécanismes ont été proposés parmi lesquels la dégradation de la chaine polypeptidique naissante par des protéases (Nottrott *et al*., 2006). Le miARN pourrait également induire la dissociation prématurée des ribosomes de l'ARNm cible (Petersen *et al*., 2006). Cependant d'autres études doivent encore confirmer ces mécanismes.

II.3.3) ACTIVATION DE LA TRADUCTION

Les miARN ne sont pas seulement connus pour inhiber la traduction, puisque dans certains cas plus rares, ils peuvent aussi l'activer (Vasudevan *et al*., 2007). Ainsi, sous des conditions de privation de sérum, en culture cellulaire, le complexe AGO2-*miR-369-3* se lie à la région 3'UTR de l'ARNm de *TNF-α* (Tumour Necrosis Factor-α), recrute FXR1 (Fragile X-related protein 1) et stimule la traduction de l'ARNm (Vasudevan *et al*., 2007). D'autres exemples de l'effet activateur des miARN inclut l'interaction de *miR-10a* avec la région 5'UTR de nombreux ARNm codants pour des protéines ribosomales, une interaction qui résulte en l'augmentation de la traduction de ces ARNm en réponse à un stress ou en cas d'un manque de nutriment (Ørom *et al*., 2008). De plus, *miR-122*, un miARN très abondant dans le

Figure 36 Biogenèse canonique et action des miARN. Après avoir été transcrit et maturé par les enzymes Drosha et Dicer, le miARN mature dans le complexe RISC fixe son ARNm cible. L'ARNm réprimé est alors stocké dans les corps P ou entre dans une voie de dégradation. Selon les conditions et les stimuli reçus par la cellule, l'ARNm peut être de nouveau traduit ou dégradé. AGO2: ArGOnaute 2, RISC: RNA Induced Silencing Complex. *D'après Rana et al., 2007.*



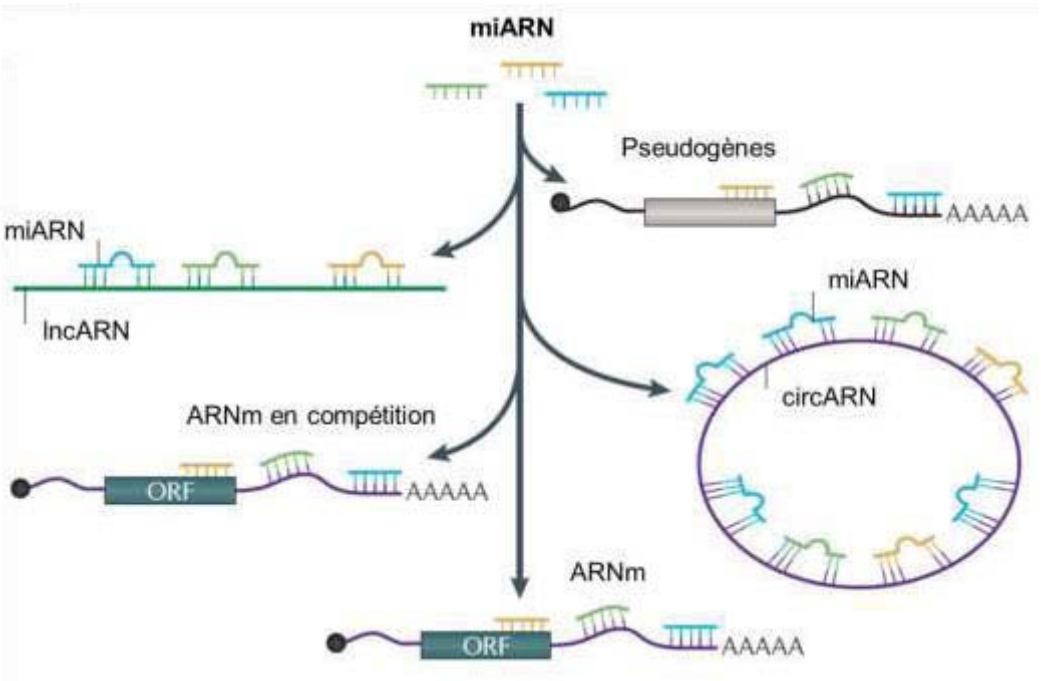
foie, peut stimuler la traduction de l'ARNm HCV (Hepatitis C Virus) en favorisant probablement son chargement dans les ribosomes (Henke *et al*., 2008). Le miARN *miR-122* pourrait agir comme un chaperon en modifiant la structure de l'ARN et en facilitant l'accès pour les ribosomes. Des études complémentaires doivent être entreprises afin de préciser le mode d'action par lequel *miR-122* peut augmenter la traduction de HCV en liant sa région 5'UTR et inhiber la traduction des ARN cellulaires en se liant à leurs régions 3'UTR (Jopling *et al*., 2008).

II.3.4) Localisation cellulaire de la regulation des ARNm par les miARN

Plusieurs composants impliqués dans les mécanismes d'action des miARN ne sont pas localisés dans le cytoplasme mais font intervenir des organites et des structures cellulaires, telles que les corps P ou P-bodies (Processing Bodies), les granules de stress ou les MVB (MultiVesicular Bodies).

Les ARNm dont l'expression a été inactivée peuvent s'accumuler dans les corps P. Les corps P semblent agir à une étape finale de la dégradation des ARNm (Eulalio *et al*., 2007) (Figure 36), bien que certains auteurs aient montré que le retrait de la coiffe et la dégradation par une exonucléase 5'-3' des ARNm chez la levure se déroulent au niveau des polysomes lorsque l'ARNm est traduit (Hu *et al*., 2009). Les corps P sont enrichis en protéines impliquées dans la désadénylation, le retrait de la coiffe et la dégradation. Par exemple, ils contiennent le complexe désadénylase CCR4-NOT1, le complexe de retrait de la coiffe DCP1-DCP2 et l'exonucléase 5'-3' (XRN1) (Parker et Sheth, 2007, Eulalio *et al*., 2007). Les corps P ne possèdent pas de ribosomes, ni la majorité des facteurs d'initiation de la traduction. Chez les métazoaires, ils sont aussi enrichis en protéines tels que AGO et GW182, mais également des miARN, ce qui est cohérent avec leur rôle dans la répression de la traduction des ARNm. Plusieurs études montrent d'ailleurs une corrélation entre le mécanisme d'action des miARN et l'accumulation d'ARNm cibles dans les corps P et une corrélation négative entre la localisation des corps P et l'association des polysomes sur les ARNm (Bhattacharyya *et al*., 2006, Pillai *et al*., 2005, Liu *et al*., 2005). En revanche, les corps P ne sont pas essentiels pour la fonction des miARN et la présence d'agrégats cellulaires de corps P est plutôt une conséquence que la cause de l'inactivation induite par les miARN (Eulalio *et al*., 2007). Les protéines des corps P qui ont une fonction inhibitrice sur la traduction peuvent assister le complexe RISC en initiant l'inactivation. Il existe donc un pool d'ARN non traduits dans les corps P, qui en fonction des stimuli cellulaires, peuvent réintégrer le cytoplasme et être traduit (Rana *et al.,* 2007).

Figure 37 Différents cas du phénomène « éponges » à miARN. Les pseudogènes, les ARN longs non-codants (lncARN), les ARN circulaires (circARN) et des ARNm interagissent et séquestrent le miARN pour l'empêcher d'agir sur sa cible d'ARN. circARN: ARN circulaire, lncARN: ARN longs non codants, ORF: Open Reading Frame. *D'après Hausser et Zavolan, 2014.*



D'autre part, les granules de stress partagent des protéines avec les corps P. Ces deux organites sont fréquemment situées à proximité et peuvent échanger du matériel cellulaire (Kedersha *et al*., 2005, Wilczynska *et al*., 2005). Les granules de stress se forment en cas de stress cellulaire et notamment lorsqu'il y a inhibition de l'initiation de la traduction, par conséquent ces organites pourraient jouer un rôle dans le mécanisme d'action des miARN (Leung *et al*., 2006, Leung *et al*., 2006).

Enfin, une large portion des protéines Argonautes est associée avec des membranes de structures cellulaires telles que l'appareil de Golgi ou le réticulum endoplasmique (Cikaluk *et al*., 1999, Tahbaz *et al*., 2004). Ainsi les MVB ont été identifiés comme des organites cellulaires pouvant contribuer à la fonction des miARN ou au renouvellement de RISC grâce à des études chez la drosophile et dans des cellules mammifères (Gibbings *et al*., 2009, Lee *et al*., 2009). Ces organites sont spécialisés dans le compartiment endosomal tardif et possèdent une morphologie multivésiculaire. Les MVB dirigent les protéines issues d'endocytose vers les lysosomes pour être dégradées ou vers les exosomes pour être sécrétées. Le chargement des protéines Argonautes avec un miARN est favorisé lorsque le renouvellement des MVB est altéré (Lee *et al*., 2009). L'implication de ces structures cellulaires dans l'élimination des composants de RISC ou dans le mécanisme d'action des miARN reste à être caractériser.

Enfin, les conséquences de l'interaction miARN/ARNm ont été discutées par rapport à l'ARNm dans ce paragraphe. Cependant, les miARN eux-mêmes peuvent être séquestrés et neutralisés par les cibles avec lesquelles ils interagissent (Figure 37). Ainsi, la capacité des miARN à réguler leur cible diminue avec le nombre et l'abondance de leur cible. De plus, l'activité des miARN pourrait être régulée par d'autres classes d'ARN, agissant comme des « éponges » en empêchant les miARN de fixer leur cible (Ebert *et al*., 2007, Ebert et Sharp, 2010, Hausser et Zavolan, 2014). Parmi ces ARN « éponges », les ARN longs non codants (lncARN), les ARN circulaires (circARN), des pseudogènes et d'autres ARNm constituent des régulateurs de l'activité des miARN, qui ne seront pas traités dans ce mémoire.

II.4) REGULATION DES MIARN

Les études de profils d'expression des miARN indiquent que la majorité d'entre eux est sous le contrôle de signaux développementaux et/ou tissus spécifiques. Pour citer quelques exemples de miARN dont l'expression est majoritaire dans un tissu comparativement aux autres, miR-1 représente 45% des miARN exprimés dans le cœur de souris et miR-122

représente 72% des miARN du foie (Lagos-Quintana *et al*., 2002). Le contrôle précis du niveau d'expression des miARN est crucial pour maintenir les fonctions physiologiques de la cellule, et les dérégulations de l'expression des miARN sont souvent associées à des pathologies chez l'Homme, telles que le cancer (Landgraf *et al*., 2007).

II.4.1) Regulation transcriptionnelle de la synthese des miARN

Environ 50% des miARN sont situés dans les introns de gènes codants ou non, mais certains, dans une moindre mesure, sont aussi exoniques. Les miARN en cluster, considérés comme des miARN codés par des gènes à une distance de moins de 10 kilobases (Griffiths-Jones *et al*., 2008), partagent un promoteur commun et sont transcrits en large polycistron (Lee *et al*., 2002). La localisation précise des promoteurs de gènes des miARN est encore inconnue pour la majorité des miARN mais ils peuvent être caractérisés par l'étude des îlots de méthylation, du séquençage de l'ARN et de l'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP-seq) (Ozsolak *et al*., 2008). Certains gènes de miARN situés dans l'intron des gènes codants pour des protéines partagent le même promoteur que leur gène hôte. Cependant, il a été montré que certains gènes de miARN ont plusieurs sites d'initiation de la transcription et que les promoteurs des gènes de miARN introniques sont parfois distincts de ceux de leur gène hôte (Monteys *et al*., 2010). La transcription des miARN est également sous le contrôle de régulations épigénétiques (Cai *et al*., 2004, Lee *et al*., 2004). En effet, la modification de la méthylation des promoteurs des gènes de miARN a été associée à une expression altérée de ces derniers et impliquée dans le développement de cancer chez l'homme (Choudhry et Catto, 2011). Parmi les facteurs de transcription associés à la polymérase II, enzyme responsable de la transcription des gènes de miARN, p53, MYC, ZEB1, ZEB2 ou des protéines de différenciation des myoblastes comme MYOD1 ont été décrits comme impliqués dans la régulation positive ou négative de l'expression des miARN (Kim *et al*., 2009, Krol *et al*., 2010). Récemment, Jeon *et al*. (2013) ont montré que SREBP, un facteur de transcription impliqué dans le métabolisme des lipides, activait directement l'expression d'un miARN polycistronique. Parmi les miARN contenu dans ce polycistron, *miR-182* et *miR-96* régulent négativement l'expression de *FBWW7* et *INSIG2*, respectivement, tous deux connus pour affecter l'accumulation de SREBP dans le noyau.

Enfin, des polymorphismes nucléotidiques (SNP, Single Nucleotide Polymorphism) peuvent être trouvés dans le promoteur des gènes de miARN et en modifier la transcription. Par exemple, un SNP dans le promoteur de *let-7* a été associé à un risque accru de cancer du poumon chez l'homme (Shen *et al*., 2015).

II.4.2) REGULATION DES MIARN LORS DE LA MATURATION

En plus d'un contrôle transcriptionnel, les différents acteurs intervenant dans la maturation du miARN sont également régulés affectent directement la biogenèse des miARN.

Régulation au niveau du pri-miARN

Des altérations dans la séquence du miARN et/ou dans sa structure affectent la maturation et la stabilité des miARN. Ainsi la présence de SNP dans les gènes des miARN peut affecter leur biogenèse et leur spécificité de cible. Par exemple, le changement d'un C par T dans la séquence du gène du cluster de *pri-mir-15a/16-1* réduit l'efficacité de Drosha et conduit une diminution de la production de *miR-16* (Auyeung *et al*., 2013).

L'efficacité de Drosha, responsable de la maturation du pri-miARN, est cruciale pour l'abondance des miARN. Plusieurs mécanismes existent pour réguler le niveau d'expression, l'activité ou la spécificité de Drosha. Un exemple notable est l'autorégulation qui existe entre Drosha et son cofacteur DCGR8 (Han *et al*., 2009). DCGR8 stabilise l'expression de Drosha via des interactions protéines-protéines, alors que Drosha déstabilise l'ARNm de DCGR8 par clivage d'une tige boucle dans un de ses exons. Ce fragment donne d'ailleurs naissance à un miARN fonctionnel, *miR-1306* (Kadener *et al*., 2009). Des modifications post-transcriptionnelles telles que des phosphorylations ou des acétylations peuvent aussi réguler la stabilité, la localisation nucléaire et l'activité du microprocesseur (Ha et Kim, 2014). Enfin, l'activité médiée par Drosha est souvent contrôlée par des protéines liant l'ARN telles que p68 ou p72, qui interagissent sélectivement avec Drosha et/ou certains pri-miARN (Davis et Hata, 2009, Davis *et al*, 2010, Suzuki *et al*., 2009).

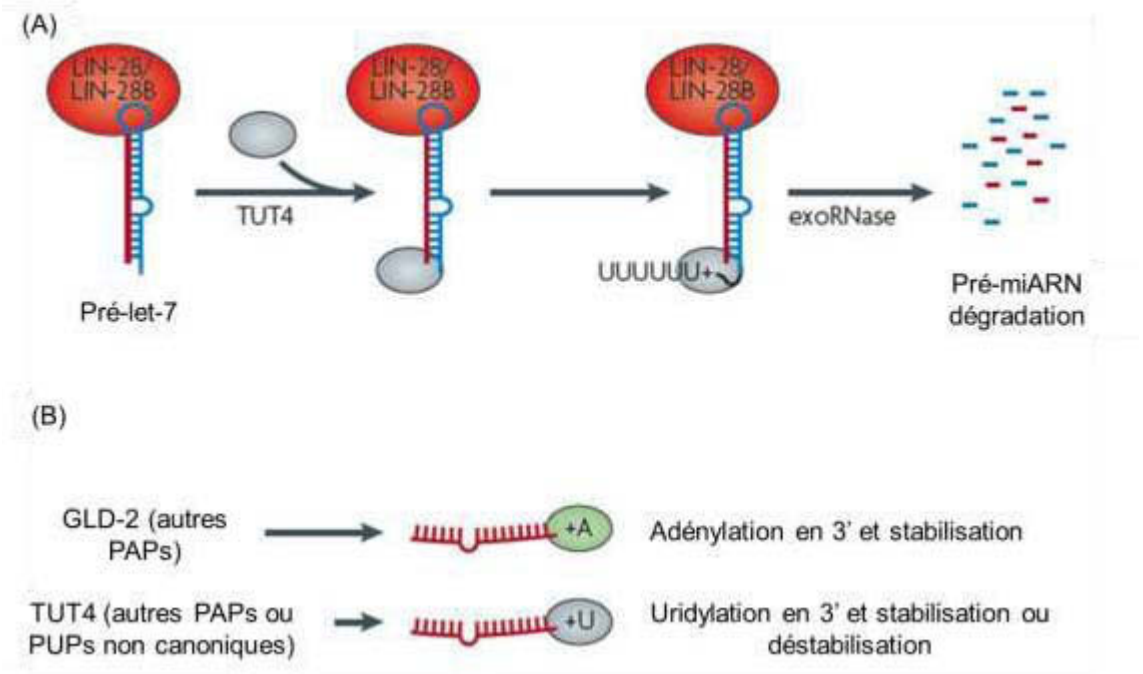
Régulation de l'export du pré-miARN au cytoplasme

L'export du pré-miARN dans le cytoplasme est médiée par EXP5. Cette protéine est exprimée de façon ubiquitaire mais au cours du cycle cellulaire elle peut être induite au niveau post-transcriptionnel par la voie PI3K (Iwasaki *et al*., 2013). Un étude récente a montré que EXP1 (aussi connue sous le nom de CRM1) pouvait transporter certains pré-miARN issus de voies de synthèses non canoniques (par exemple *pré-mir-320*) (Xie *et al*., 2013).

Facteurs affectant la maturation du pré-miARN

L'ajout de nucléotide(s) en extrémité 3' du pré-miARN modifie le précurseur et le miARN (Figure 38). Une de ces modifications correspond, principalement, à l'ajout d'une

Figure 38 Modifications de l'extrémité 3' des miARN régulant leur stabilité. (A) La protéine de liaison à l'ARN *LIN-28* favorise l'uridylation du pré-miARN let-7 chez *C. Elegans* et dans les cellules de mammifères en recrutant la poly-U polymérase (PUP) TUT4, qui ajoute des uracils en extrémité 3'. Cette modification empêche la maturation du pré-miARN par Dicer et induit sa dégradation par une nucléase non connue. (B) La stabilité de l'ARN est influencée par des modifications (adénylation par une poly-A polymérase (PAP), par uridylation (PUP) ou par méthylation) qui entrainent soit la dégradation du miARN, soit le protègent contre des exonucléases selon le miARN et le tissu dans lequel il s'exprime. *D'après Krol et al., 2010.*



queue poly-U par l'enzyme TUT4 (Terminal Uridylyl Transferase 4). Cet ajout entraine un blocage de l'action de Dicer et facilite la dégradation du miARN (Ameres et Zamore, 2013, Heo *et al*., 2008). Une autre modification est l'adénylation des pré-miARN qui se déroule essentiellement après la maturation par Dicer. Le miARN hépathique, *miR-122* est fréquemment adénylé, ce qui le stabilise. Dans d'autres contextes, l'adénylation peut favoriser la dégradation du miARN mais les causes d'une telle différence ne sont pas encore connues (Katoh *et al*., 2009, Backes *et al*., 2012).

Enfin, l'enzyme BCDIN3D, chez l'homme, a la capacité d'O-méthylé le monophosphate situé à l'extrémité 5'du *pré-mir-145* ou *pré-mir-23b*, par exemple. Dicer interagissant avec cette même extrémité, cette modification interfère ce processus de maturation (Xhelmace *et al*., 2012, Ha et Kim, 2014).

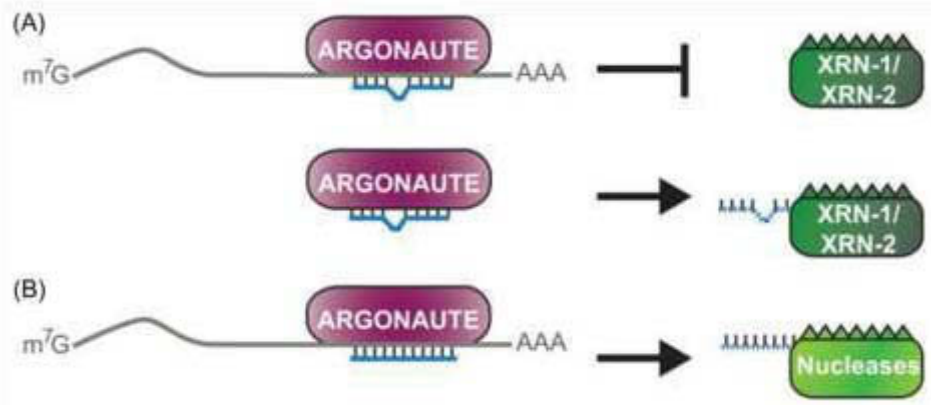
La maturation du pré-miARN en miARN, médiée par Dicer, est aussi régulée par les miARN eux-mêmes. En effet, il existe des sites de liaison de *let-7* dans la séquence de Dicer chez l'homme, et il en résulte une boucle de rétrocontrôle entre Dicer et son produit *let-7* (Tokumaru *et al*., 2008, Forman *et al*., 2008). Aussi, à cette étape de la genèse des miARN, les protéines Argonautes sont essentielles à la dissociation du duplex d'ARN et à la fonction du miARN mature. Ces protéines peuvent être modulées par plusieurs facteurs. En particulier, des modifications post-transcriptionnelles comme une prolyl-4 hydroxylation ou des phosphorylations sur certains résidus sérine ou tyrosine d'AGO2 jouent sur sa stabilité. Enfin les protéines Argonautes sont stables lorsqu'elles sont chargées avec un miARN alors que vides, elles sont instables (Martinez et Gregory, 2013).

Comme vu à travers ces exemples, chaque étape de la biogenèse des miARN est l'objet de contrôle et de modifications complexes dont tous les mécanismes ne sont pas encore élucidés (Ha et Kim, 2014).

II.4.3) STABILITE ET DEGRADATION DES MIARN

Il est de plus en plus évident que les miARN ont des demi-vies distinctes qui pourraient être déterminées par leur séquence. Les miARN sont généralement assez stables et auraient une demi-vie allant de 28h à plusieurs jours, ce qui est environ 2 à 20 fois plus long que la demi-vie moyenne d'un ARNm standard (environ 10h) (Bail *et al*., 2010). De plus, les miARN sont présents dans tous les fluides corporels, y compris le lait, dans lequel ils se trouvent notamment dans les vésicules lipidiques, empaquetés dans des protéines de liaisons à l'ARN ou encore dans des exosomes, ce qui les protègent potentiellement d'une dégradation (Weber *et al*., 2010, Gibbings *et al*., 2009).

Figure 39 Effet de l'interaction miARN/ARNm sur la stabilité des miARN. (A) Chez *C. elegans* l'interaction du miARN avec sa cible stabilise l'association du miARN avec Argonaute ce qui protège le miARN des dégradations exonucléotidiques réalisées par XRN-1/2. Lorsque les cibles ne sont pas disponibles le miARN se déloge d'Argonaute et est dégradé. (B) Chez la drosophile et les mammifères, une complémentarité quasiment parfaite entre le miARN et sa cible déclenche la dégradation du miARN par des nucléases. XRN-1/2: 5'-3' eXoRiboNuclease 1/2. *D'après Finnegan et Pasquinelli, 2013.*



Les miARN sont protégés des ribonucléases par le complexe RISC. En effet, un élément essentiel de RISC sont les protéines Argonautes, qui agissent en priorité en augmentant l'abondance des miARN avant d'agir sur la régulation des gènes cibles (Gantier *et al*., 2011). Des données structurales ont montré que les protéines Argonautes se lient étroitement aux miARN et que les extrémités 5' et 3' de ce dernier sont ancrées dans les protéines Argonautes (Elkayam *et al.,* 2012). Cette interaction laisse peu de séquence accessible pour l'action des ribonucléases. Enfin, les miARN sont souvent présents en grande quantité dans une cellule, leur conférant la capacité de cibler de nombreuses cibles. Des analyses biochimiques indiquent que le renouvellement des miARN est moins efficace que celui d'autres petits ARN comme les siARN, et que leur dégradation est lente accroissant encore leur abondance dans la cellule (Haley et Zamore, 2004, Ameres *et al*., 2007).

Le renouvellement des miARN a été étudié dans de nombreux systèmes et plusieurs nucléases ont été identifiées pour être impliquées dans le clivage et la dégradation des miARN mais leur spécificité d'action et leur conservation sont encore inconnues. Chez *C. elegans*, les 5'-3' exoribonucléases XRN-1 et XRN-2 (Figure 39) sont responsables de la dégradation des miARN (Chatterjee *et al*., 2011, Chatterjee *et al*., 2009). Le miARN mature est ainsi libéré du complexe RISC avant la dégradation, XRN2 facilitant cette dissociation, puis il est clivé dans le sens 5' → 3'.

Enfin, l'ARNm cible peut moduler la stabilité des miARN. Les cibles qui sont hautement complémentaires induisent la dégradation des miARN par ajout d'une queue de nucléotides (Ameres *et al*., 2010, Baccarini *et al*., 2011, Xie *et al*., 2012).

II.4.4) Regulation nutritionnelle des miARN

L'expression des miARN dans différents tissus peut être modifiée par l'environnement. Parmi ces facteurs environnementaux influençant l'expression des miARN, la nutrition a fait l'objet, ces dernières années, de nombreuses études chez l'Homme ou les modèles rongeurs. De plus, certains nutriments auraient un rôle protecteur contre le cancer ou l'athérosclérose. Ces études se sont ensuite étendues à d'autres espèces comme les animaux d'intérêt agronomique tels que le bœuf ou le porc.

De surcroît, l'expression de certains miARN peut aussi être impactée par le niveau alimentaire. Ainsi chez le rat, l'expression de *miR-140* est significativement augmentée par une restriction calorique de 6 mois dans la plaque de croissance épiphysaire du tibia (Pando *et al*., 2012). De même chez le singe, l'expression de 15 miARN est significativement affectée dans le muscle des individus maintenus en restriction calorique pendant la majeure partie de

Tableau 7 Exemples de miARN dont les expressions sont affectées par des régimes enrichis en lipides.

miARN	Régimes	Durée	Tissus	Espèces	Méthode de détection	*Références*
miR-143	Riche en matières grasses	8 jours	Tissu adipeux	Souris	qPCR	*Takanabe et al., 2008*
miR-103, *miR-107*, ***miR-143***, *miR-221, miR-222*	Supplémentation en acides linoléiques conjugués	30 jours	Tissu adipeux	Souris	qPCR	*Parra et al., 2010*
miR-125b, ***miR-16***, *miR-190, miR-191, miR-194*, ***miR-19***, *miR-200b, miR-26a-1, miR-27, miR-29a, miR-29b, miR-30d, miR-301b, miR-3154, miR-326, miR-34b, miR-369, miR-377, miR-380, miR-425, miR-486, miR-487a, miR-513, miR-551b, miR-654, miR-660, miR-874, miR-887*	Riche en matières grasses et en cholestérol	50 jours	Foie	Singe	Séquençage haut débit	*Karere et al., 2012*
miR-142b, *miR-145, miR-15a*, ***miR-16a***, *miR-18a, miR193a*, ***miR-19***, *miR-203, miR-30c, miR-30e, miR-31, miR-34a*	Riche en matières graisses	60 jours	Foie	Poisson	Séquençage haut débit	*Zhang et al., 2014*
miR-16b, ***miR-19***, ***miR-92a***, *miR-92b*, ***miR-101***, ***miR-103***, ***miR-106***, ***miR-142***, *miR-196a*, ***miR-296***, ***miR-2368*** et ***miR-2454***	Riche en matières grasses	90 jours	Tissu adipeux	Bœuf	Puces à ADN	*Romao et al., 2012*
miR-101, *miR-106, miR-136, miR-166*, ***miR-142-5p***, ***miR-2368***, ***miR-2454***, ***miR-296***, *miR-376d*, ***miR-378***, ***miR-92a***	Supplémentation en algues	140 jours	Tissu adipeux	Mouton	qPCR	*Meale et al., 2014*

MiARN retrouvés dans deux modèles ou plus.

leur vie (Mercken *et al*., 2013). Enfin, dans le tissu mammaire de souris, Ørom *et al.* (2012) ont montré que l'expression de *miR-203* était fortement induite par une restriction calorique de 6 mois.

Parmi les facteurs modulant l'expression des miARN, les taux de glucose cellulaire entrainent une modification de l'expression de certains miARN. Par exemple, *in vitro*, l'ajout de glucose engendre une augmentation de l'expression de *miR-29* dans des adipocytes en culture (3T3-L1) (He *et al*., 2007). Une autre étude a montré une augmentation de l'expression de *miR-27a* et *miR-222* en réponse à différentes concentrations de glucose extracellulaires (Herrera *et al*., 2010).

Plusieurs auteurs se sont attelés à dresser des listes composées des différents nutriments pouvant régulés l'expression des miARN, parmi lesquels les vitamines, les polyphénols, les acides aminés, les AG polyinsaturés, les phospholipides pour n'en citer que quelques-uns (Ross-Davis, 2011, Izzotti *et al*., 2012, Shah *et al*., 2012, Milenkovic *et al*., 2013).

Ainsi, des données concernant l'effet des lipides sur l'expression des miARN commencent à être disponibles (Tableau 7). Par exemple, *miR-143*, identifié par de nombreuses études comme jouant un rôle crucial sur la différenciation adipocytaire mésentérique, est régulé positivement par des régimes riches en matières grasses chez des souris nourries avec ce régime pendant 8 jours (Takanabe *et al*., 2008). Le taux de *miR-143* a d'ailleurs été étroitement corrélé avec le taux des marqueurs de la différenciation adipocytaire tels que *PPARγ*, *FABP4* ou encore avec les taux plasmatiques de leptine. Cette modification de l'expression de *miR-143* par les acides gras a aussi été identifiée chez la souris (Parra *et al*., 2010). En effet, une supplémentation en acide linoléique conjugué apportée à des souris (pendant 30 jours) a affecté l'expression de *miR-103, miR-107, miR-143, miR-221* et *miR-222*. L'expression de ces miARN était aussi corrélée avec celle des gènes du métabolisme des lipides dans le tissu adipeux rétro-péritonéale (Parra *et al*., 2010). De plus, l'expression de 29 miARN a également été affectée par un régime riche en graisses dans le foie de babouins (Karere *et al*., 2012). Parmi ces miARN, *miR-221* et *miR-222* étaient retrouvés, également caractérisés dans le tissu adipeux de souris supplémentées avec de l'acide linoléique conjugué (Parra *et al*., 2010). L'expression de certaines familles de miARN est régulée par la nutrition. En particulier, les familles *mir-16* et *mir-19* sont fréquemment retrouvés parmi les miARN affectés par des régimes riches en graisse. En effet, leur expression au niveau hépatique ainsi que celle de neuf autres miARN a varié en réponse à un régime constitué de 15% de gras

comparativement à un régime en comportant 5%, chez le poisson (Brème) (Zhang *et al*., 2014).

Chez les ruminants, les exemples de régulation nutritionnelle des miARN sont plus partiels, puisque seulement deux études ont été menées à ce jour. Par exemple, il a été récemment montré que l'expression de 12 miARN était influencée par un régime riche en graisse dans le tissu adipeux de bouvillons (Romao *et al*., 2012). De façon surprenante, cette étude chez les ruminants met en exergue *miR-103* déjà identifié dans les études chez les rongeurs citées précédemment. Cela suggère que l'expression de ce miARN est hautement sensible aux régimes riches en lipides chez des espèces différentes.

Egalement chez les ruminants, dans le tissu adipeux d'agneaux, l'expression de 11 miARN a été affectée par le remplacement d'huile de lin et de graines d'orge par des algues riches en AG polyinsaturés de la famille oméga 3 (Meale *et al*., 2014). Leur expression était, en outre, négativement corrélée avec celle de leurs cibles impliquées dans le métabolisme des lipides telles que *ACSL1*. Parmi les miARN modifiés, *miR-142-5p*, dont l'expression était aussi affectée dans le tissu adipeux de bovin et le foie de poisson par des régimes riches en lipides, est retrouvé. De même que *miR-103*, l'expression de *miR-142-5p* semble fortement modulée par différents régimes alimentaires et ce miARN pourrait constituer un bon modèle de la régulation nutritionnelle des miARN.

Enfin, plusieurs études montrent que les miARN circulants dans les lipoprotéines, les microparticules ou les exosomes pourraient être utilisés comme indicateur du statut nutritionnel (Rome *et al*., 2015).

Si les quelques exemples cités dans ce paragraphe montrent bien l'existence d'une régulation nutritionnelle de l'expression des miARN dans différents tissus, il n'existait pas au début de ma thèse de données sur une telle régulation dans la glande mammaire.

II.5) FONCTIONS DES MIARN

Les miARN ont des rôles clés dans la régulation de voies biologiques chez les mammifères (Ambros *et al*., 2004, Bartel *et al*., 2004, Bushati *et al*., 2007, Ameres *et al*., 2013). Ils participent à la régulation de l'expression des transcrits et représentent une nouvelle classe de cibles thérapeutiques. Les miARN possèdent des fonctions conservées dans l'évolution et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques (développement, immunité, métabolisme…).

Tableau 8 Caractéristiques des principaux sites de prédiction de cibles des miARN. *D'après Peterson et al., 2014.*

Outil	**Séquence de l'interaction miARN/ARNm**	**Conservation**	**Energie de liaison**	**Accessibilté du site**	**Nombre de site de fixation**	**Apprentissage**	**Sites internet**	***Références***
miRanda	X	X	X				http://www.microrna.org/	*John et al., 2004*
TargetScan	X	X					http://www.targetscan.org	*Lewis et al., 2005;*
DIANA-microT-CDS	X	X	X	X	X	X	http://www.microrna.gr/microT-CDS	*Paraskevopoulou et al., 2013*
RNA22-GUI	X		X				https://cm.jefferson.edu/rna22v1.0/	*Loher and Rigoutsos, 2012*
PITA	X	X	X	X	X		http://genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/	*Kertesz et al., 2007*
RNAhybrid	X		X		X		http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/	*Kruger and Rehmsmeier, 2006*

II.5.1) MOYEN D'ETUDE DU ROLE DES MIARN

La prédiction des cibles des miARN par des algorithmes bio-informatiques est une étape importante pour caractériser le rôle de ces derniers. De nombreux algorithmes de prédiction ont été développés se basant sur trois caractéristiques communes ; l'interaction miARN/ARNm via la région « seed », l'énergie de liaison et l'accessibilité au site. Plusieurs types d'interaction au niveau de la région « seed » peuvent être considérés en fonction de l'algorithme de prédiction (Lewis *et al*., 2003, 2005, Brennecke *et al*., 2005, Krek *et al*., 2005) :

- 6mer : Interaction parfaite entre la région « seed » du miARN et l'ARNm sur 6 nucléotides
- 7mer-m8 : Interaction parfaite entre le miARN et l'ARNm du nucléotide 2 à 8 de la région « seed »
- 7mer-A1 : Interaction parfaite entre le miARN et l'ARNm du nucléotide 2 à 7 de la région « seed » avec un A en face du nucléotide 1 du miARN
- 8mer : Interaction parfaite entre le miARN et l'ARNm du nucléotide 2 à 8 de la région « seed » avec un A en face du nucléotide 1 du miARN

Cette dernière interaction a été montrée comme étant l'interaction la plus effective (Agarwal *et al*., 2015). La seconde caractéristique, l'énergie de liaison, peut être utilisée pour mesurer la stabilité de l'interaction miARN/ARNm. Enfin la dernière caractéristique, qui est l'accessibilité, correspond à la facilité par laquelle le miARN peut s'hybrider à son site de fixation sur la cible.

Les logiciels de prédiction peuvent ensuite être classés en deux catégories établies sur l'utilisation ou non de la notion de conservation entre espèce, une caractéristique qui influence fortement la liste de cibles fournies (Grimson *et al*., 2007). Par exemple, les algorithmes basés sur le critère de conservation sont DIANA-microT (Paraskevopoulou *et al*., 2013), miRanda (John *et al*., 2004), PicTar (Krek *et al*., 2005), TargetScan (Lewis *et al*., 2005) alors que PITA (Kertesz *et al*., 2007) et RNA22 (Loher et Rigoutsos, 2012) appartiennent aux algorithmes se basant sur d'autres critères tels que la structure de la région 3'UTR. Chaque outil fournit des caractéristiques communes (séquence de l'interaction, énergie de liaison, conservation) mais certains comme DIANA-microT possèdent des algorithmes d'apprentissage permettant d'intégrer les données de validations expérimentales (Tableau 8). Certaines caractéristiques de ces outils ont leur limite. Par exemple, une forte énergie de liaison entre un miARN et sa cible prédite par un algorithme ne garantit pas cette

interaction au niveau biologique (Peterson *et al*., 2014). Pour pallier ces limites, certains auteurs suggèrent d'utiliser plusieurs de ces outils pour une même recherche (Witkos *et al*., 2011). Par conséquent, l'outil miRWalk a été développé et a la capacité de combiner les prédictions de plusieurs algorithmes (Dweep *et al*., 2011). Ces algorithmes sont en général exhaustifs mais les cibles identifiées par cette approche restent putatives. Ainsi, l'outil de prédiction miRTarbase est un outil qui se base uniquement sur des interactions validées expérimentalement et fournit une liste de cibles beaucoup plus restreinte mais plus fiable (Papadopoulos *et al*., 2009).

Outre ces outils bioinformatiques, des approches de validation *in vitro* et *in vivo* ont été développées. Une des premières approches pour étudier le rôle des miARN a été l'établissement de lignées d'animaux surexprimant ou déficients pour un miARN. Comme pour les modèles transgéniques, un promoteur spécifique peut être utilisé pour surexprimer le miARN dans un type cellulaire spécifique. Bien que cette approche ait prouvé son utilité pour définir la fonction de nombreux miARN, la surexpression forcée d'un miARN peut également conduire à la régulation de cibles sans pertinence biologique notamment lorsque l'expression du transgène atteint un niveau non physiologique (Van Rooij, 2011). La manipulation génétique peut aussi aboutir à la délétion des miARN. Plusieurs exemples de modèles d'animaux inactivés pour un miARN ont été publiés et ont révélé des fonctions très spécifiques pour ces miARN délétés (Zhao *et al*., 2007, Van Rooij *et al*., 2007, Wang *et al*., 2008, Callis *et al*., 2009, Boettger *et al*., 2014, Ng *et al*., 2014). Par exemple, la délétion ciblée de *miR-126*, un miARN abondamment exprimé dans les cellules endothéliales, entraine une létalité embryonnaire chez 50% des souris délétées, associée avec des hémorragies dû à un défaut de perméabilité des vaisseaux sanguins (Kuhnert *et al*., 2008, Wang *et al*., 2008). Cependant, il est possible que la délétion d'un miARN individuel ne génère aucun phénotype à cause de la redondance de la fonction des miARN de la même famille. Par exemple, la délétion de *miR-133a-1* ou *miR-133a-2* n'entraine aucun phénotype notable, alors que la délétion simultanée des deux miARN mène à une létalité accrue au niveau embryonnaire et néonatale chez les souris mutées (Liu *et al*., 2008).

Pour remédier à la lourdeur de mise en œuvre d'animaux transgéniques, des modèles *in vitro* sont maintenant également utilisés. Ils s'appuient sur la capacité des miARN à moduler des voies biologiques importantes et offrent des opportunités de manipuler la fonction des miARN en utilisant des oligonucléotides synthétiques *in vitro* (Small et Olson, 2011) (Figure 40). Par exemple, certains oligonucléotides appelés « mimics » et transfectés sous forme d'un duplex de miARN, permettent d'amplifier la fonction d'un miARN

Figure 40 Différents types d'approche, utilisant des oligonucléotides synthétiques, pour étudier la fonction des miARN. Le miARN endogène (rouge) se lie à sa cible par complémentarité de bases dans la région 3'UTR de sa cible et régule son expression. Un miARN mimics (vert) est un duplex d'oligonucléotide de miARN, comprenant la même séquence que le miARN endogène et ciblant les mêmes ARNm. Un antimiR (gris) est un oligonucléotide qui est complémentaire au miARN endogène, qui peut se lier à ce dernier et inhiber sa fonction. D'autres oligonucléotides peuvent se lier au site de fixation de l'ARNm cible (bleu) sans entrainer de régulation du gène cible. Les miARN « éponges » ou compétiteurs consistent en un ARN codant lié à une région 3'UTR contenant des sites de fixation pour le miARN et créant une compétition entre ses sites et ceux de l'ARNm cible. ORF: Open Reading Frame. *D'après Small et Olsen, 2011.*

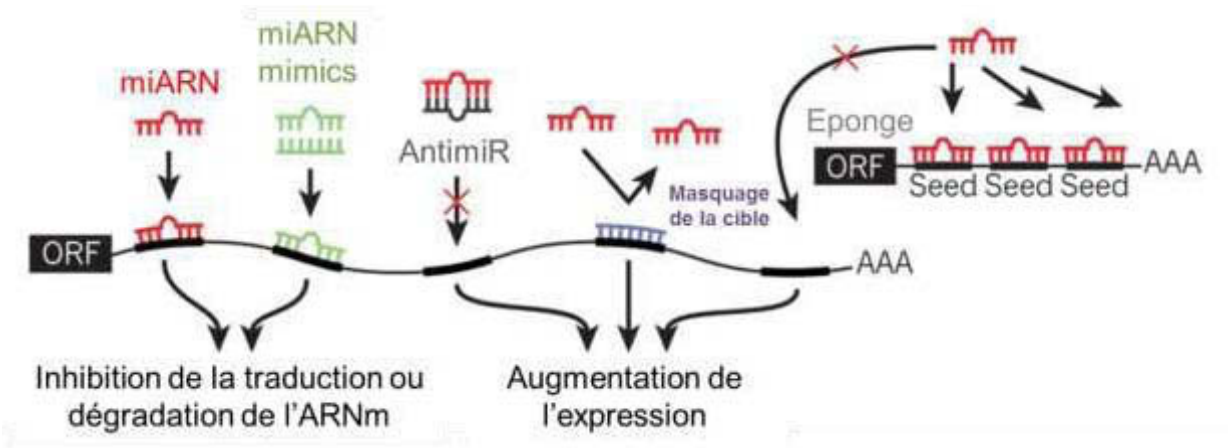
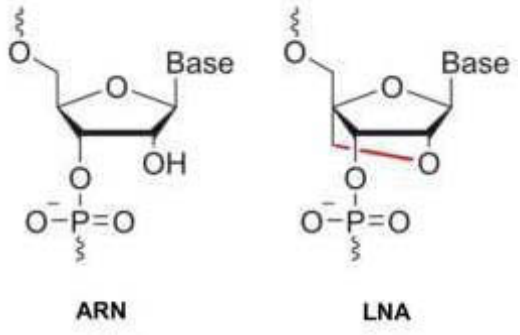


Figure 41 Structure chimique d'un nucléotide d'ARN et de LNA (Locked Nucleic Acid). Le ribose des nucléotides LNA diffère de ceux des nucléotides de l'ARN car il est « bloqué » par un pont méthylène (rouge) reliant l'atome 2'-O à l'atome 4'-C. *D'après Astakhova, 2014*.



endogène. L'un des deux brins du duplex est chimiquement modifié pour ne pas être incorporé dans le complexe RISC. L'autre brin peut être chargé dans les protéines Argonautes et interagir avec sa cible. Cette technique est transitoire mais des transfections stables existent également pour la surexpression des miARN, grâce notamment à l'utilisation des vecteurs d'expression. En effet, la séquence du précurseur du miARN peut être insérée dans un vecteur d'expression (virale ou non), être amplifié dans des bactéries, purifié puis être transfecté dans des cellules d'intérêt (Furukawa *et al*., 2011, Osório *et al*., 2013). Ces vecteurs d'expression sont de plus en plus développés et sont adaptés pour être transfectés dans divers types de cellules dont les cellules mammifères. En revanche, cette approche nécessite de choisir les bons promoteurs ainsi que la région chromosomique de transcription.

A l'inverse, d'autres oligonucléotides appelés « antimiR » se lient par complémentarité aux miARN endogènes et bloquent leurs fonctions. D'autres oligonucléotides permettent également de masquer le site de fixation du miARN sur sa cible empêchant l'inactivation de cet ARNm. Enfin, les miARN « éponges » contiennent plusieurs sites de fixation du miARN et agissent en compétition avec la fixation du miARN sur sa cible. Bien que les résultats obtenus par ces techniques soient parfois différents de ceux obtenus dans des modèles transgéniques *in vivo*, leur développement a fortement accéléré la vitesse à laquelle des questions biologiques peuvent être résolues dans un cadre expérimental. *In vivo*, les mimics et les antimiR peuvent également être utilisés après une modification chimique de leurs séquences afin d'augmenter leur stabilité dans les cellules (Van Rooij, 2011). Cependant leur expression est limitée en termes de localisation (transfection dans un tissu) et de durée (transfection transitoire).

Enfin, les LNA (Locked Nucleotide Acid) ont été utilisés *in vivo* pour effectuer une inactivation des miARN (You *et al*., 2006). Les LNA sont une classe d'acides nucléiques analogues dans lesquels le ribose est « bloqué » par un pont méthylène reliant l'atome 2'-O à l'atome 4'-C (Figure 41) (Ørom *et al*., 2006, Astakhova, 2014). Les LNA contiennent les bases azotées thymidine, cytosine, guanosine, adénosine, uridine et méthyl-cytosine, qui apparaissent également dans l'ARN et sont capables de former des paires de bases par complémentarité Watson-Crick (You *et al*., 2006). Une fois incorporé dans un oligonucléotide, les LNA sont utilisés pour inactiver les miARN car ces oligonucléotides ont une forte affinité pour leur cible et une excellente capacité de discrimination des mésappariements.

II.5.2) FONCTIONS BIOLOGIQUES REGULEES PAR LES MIARN

Parmi les nombreux processus régulés par les miARN se trouvent des fonctions essentielles dont la prolifération, la différenciation ou la mort cellulaire qui ont un effet sur toutes les voies biologiques (Ambros *et al*., 2004). Ainsi, les miARN ont été étudiés dans des contextes aussi nombreux que divers. Par exemple, leur implication a été montrée dans la réponse immunitaire (O'Connel *et al*., 2010, Baltimore *et al*., 2008), la sécrétion de l'insuline (Poy *et al*., 2004), la synthèse de neurotransmetteurs (Greco et Rameshwar, 2007), le rythme circadien (Cheng *et al*., 2007) ou encore la réplication virale (Jopling *et al*., 2005).

La première fonction identifiée pour les miARN a été leur implication dans le développement larvaire chez *C. Elegans* (Lee *et al*., 1993). En effet, les auteurs ont montré que l'ARN *lin-4* pouvait se fixer et réprimer l'expression du gène *lin-14* qui est impliqué dans la transition du premier au second stade larvaire chez *C. Elegans* (Lee *et al*., 1993, Wightman *et al*., 1993). Chez les mammifères, l'importance des miARN dans le développement a été initialement démontrée avec la création de lignées de souris déficientes en Dicer ou DCGR8. Cette déficience conduisait à la létalité des embryons (Bernstein *et al*., 2003, Wang *et al*., 2007). Ces travaux ont souligné l'importance fonctionnelle des miARN. De plus, les animaux qui sont incapables de produire des miARN (animaux déficients pour Drosha ou Dicer, par exemple) ne survivent pas ou ne peuvent pas se reproduire (Förstemann *et al*., 2005).

Dans ce contexte de développement, certains miARN sont impliqués dans la croissance cellulaire. Ainsi, *in vitro*, la surexpression de *miR-124* empêche le développement des neurones alors que son inactivation augmente ce processus (Gao, 2010). Le rôle des miARN dans le développement du cœur et des vaisseaux sanguins a été particulièrement bien étudié (Papoutsidakis *et al*., 2013). Par exemple, *miR-1* est le miARN le plus abondamment exprimé dans les cardiomyocytes et a aussi été le premier à être décrit comme impliqué dans le développement du cœur (Zhao *et al*., 2007). Ce rôle dans le programme de développement semble une des fonctions majoritaires des miARN (Stark *et al.,* 2005).

En plus du développement, les miARN ont été impliqués dans la différenciation des tissus (Van Rooij *et al*., 2007, Van Rooij *et al*., 2009). Par exemple, une surexpression de *miR-181* dans des cellules hématopoïétiques souches ou progénitrices conduit à une augmentation de leur différenciation en lymphocytes B (Chen *et al*., 2004). Les miARN participent au maintien l'homéostasie tissulaire. Dans le cœur par exemple, les animaux déficients en *miR-208* montrent un défaut de réponse au stress et ont une hypertrophie cardiaque. Les miARN sont aussi importants pour maintenir un état tissulaire différencié (Van Rooij *et al.,* 2007).

Par ailleurs, certains miARN ont été impliqués dans la mort cellulaire, c'est par exemple le cas du cluster *miR-15/16* ou des familles *mir-29* et *let-7* (Lima *et al*., 2011). En fonction du contexte cellulaire, *miR-24* peut être soit pro-apoptotique (dans des cellules de carcinomes cervicaux) ou anti-apoptotique (dans des cellules de carcinomes de poumons). La même étude a montré que *miR-21* avait des fonctions différentes en fonction des tissus (Cheng *et al*., 2005).

Dans un contexte pathologique, la fonction des miARN a suscité un grand intérêt puisqu'ils offrent de nouvelles perspectives de compréhension de la régulation des gènes impliqués dans ces maladies. L'altération de l'expression des miARN est impliquée dans de nombreux cancers (Sassen *et al*., 2008, Jansson et Lund, 2012). Pour ne citer que quelques exemples, l'expression du cluster *miR-17-92* est élevée dans plusieurs types de cancer, notamment des lymphomes et des leucémies (Ota *et al*., 2004). Plusieurs études ont montré que ce cluster peut promouvoir le cancer lorsqu'il est exprimé de façon ectopique souvent en coopérant avec l'oncogène c-Myc (He *et al*., 2005, Dews *et al*., 2006, Lu *et al*., 2007, Bonauer *et al*., 2009). De plus, *mir-34* est une autre famille de miARN qui a été fréquemment associée au cancer. Cette famille est composée de trois miARN qui sont directement activés par p53 et fonctionnent en parallèle avec p21 et BCL2 (B-Cell CLL/Lymphoma 2) pour promouvoir l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. D'autres miARN ont été impliqués dans le cancer et les signatures des miARN pourraient être utilisées pour des diagnostiques cliniques (He *et al*., 2007).

La fonction des miARN a également été liée à différentes voies métaboliques incluant le métabolisme et le transport du cholestérol et des AG (développé dans le paragraphe suivant) ainsi que dans la fonction des îlots pancréatiques ou le métabolisme du glucose (Fernandez-Hernando *et al*., 2013). Par exemple, plusieurs familles ont été reliées au métabolisme du glucose. Ainsi, *miR-375* est fortement exprimé dans les cellules des îlots pancréatiques et régule un grand nombre de gènes impliqués dans la prolifération de ces cellules et de leur fonction (Poy *et al*., 2004, Poy *et al*., 2009). Une surexpression de *let-7* dans le pancréas entraine une diminution de la tolérance au glucose alors qu'une surexpression de *lin-28*, un inhibiteur de *let-7*, augmente le prélèvement de glucose par le pancréas (Frost et Olson, 2011, Zhu *et al*., 2011). Enfin, des études sur des cohortes de patients sains ou atteints de diabète de type 2 a aussi permis de suggérer le rôle de certains miARN circulants, comme *miR-140-5p*, dans la sensibilité à l'insuline (Ortega *et al.,* 2014).

Pour conclure, ces quelques exemples de fonctions montrent bien la pléiotropie d'action qui peut être associée aux miARN. Ces derniers peuvent agir de façon coordonnée avec les

Tableau 9 Exemples de miARN impliqués dans le métabolisme des lipides.

miARN	Régulation biologique	Cibles observées	*Références*
miR-33	Efflux du cholestérol, initiation de la formation des HDL	ABCA1	*Najafi-Shoushatari et al., 2010*
	Transport des LDL et hydrolyse du cholestérol	NPC1	*Rayner et al., 2010*
	Oxydation mitochondriale des acides gras	HADHB, CROT, CPT1A	*Gerin et al., 2010, Rayner et al., 2011, Rayner et al., 2011*
	Régulent la transcription du récepteur aux LDL, des acides gras et des voies de synthèse du cholestérol	SREBP	
miR-27a/b	Régulent l'expression d'enzymes et de facteurs de transcription du métabolisme des acides gras et du cholestérol	ABCA1, FASN, SREBP, PPARγ, CEBP/α	*Lin et al., 2009, Kida et al., 2011, Shirasaki et al., 2013*
miR-122	Régule la transcription du récepteur aux LDL, des acides gras et des voies de synthèse du cholestérol	SREBP1-c	*Iliopoulos et al., 2010*
	Catalyse la synthèse des triglycérides	DGAT2	
	Synthèse des acides gras	ACACA, FASN	
	Production d'acide biliaire et absorption du cholestérol	CYP7A1	*Song et al., 2010*
miR-370	Oxydation mitochondriale des acides gras	CPT1A	*Iliopoulos et al., 2010*
	Régule la transcription du récepteur aux LDL, des acides gras et des voies de synthèse du cholestérol	SREBP1-c	
	Catalyse la synthèse des triglycérides	DGAT2	
	Synthèse des acides gras	FASN	
miR-378/378*	Synthèse des acides gras et des triglycérides	CRAT, Med13	*Carrer et al., 2012*
miR-302a	Efflux du cholestérol, initiation de la formation des HDL	ABCA1	*Hoekstra et al., 2012*
	Catalyse la synthèse des acides gras saturés et monoinsaturés	ELOVL6	
miR-613	Synthèse des acides gras	LXRα	*Ou et al., 2011*
miR-168a	Métabolisme des LDL	LDLRAP1	*Zhang et al., 2012*
miR-758	Efflux du cholestérol, initiation de la formation des HDL	ABCA1	*Ramirez et al., 2011*
mi-10b	Stéatose hépatique	PPARα	*Zheng et al., 2010*
miR-224	Métabolisme des acides gras	ACSL4	*Peng et al., 2013*

ABCA1: ATP-Binding Cassette transporter, sub-family A, member 1, ACACA: Acetyl-CoA Carboxylase Alpha, ACSL4: Acyl-CoA Synthetase Long-chain family member 4, CEBP/α: CCAAT/Enhancer Binding Protein (C/EBP) alpha, CROT: CaRnitine O-octanoylTransferase, CPT1A: Carnitine PalmitoylTransferase 1A, DGAT2: DiacylGlycerol O-AcylTransferase 2, ELOVL6: ELOVL fatty acid elongase 6, HADHB: HydroxyAcyl-CoA Deydrogenase/3-ketoacyl-CoA thiolase/enoyl-CoA Hydratase (trifunctional protein) Beta subunit, LDLRAP1: Low Density Lipoprotein Receptor Adaptor Protein 1, LXRα: Liver X Receptor alpha, Med13: Mediator complex subunit 13NPC1: Niemann-Pick type C1,PPARα: Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha, PPARγ : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma, SREBP: Sterol Responsive Element Binding Protein

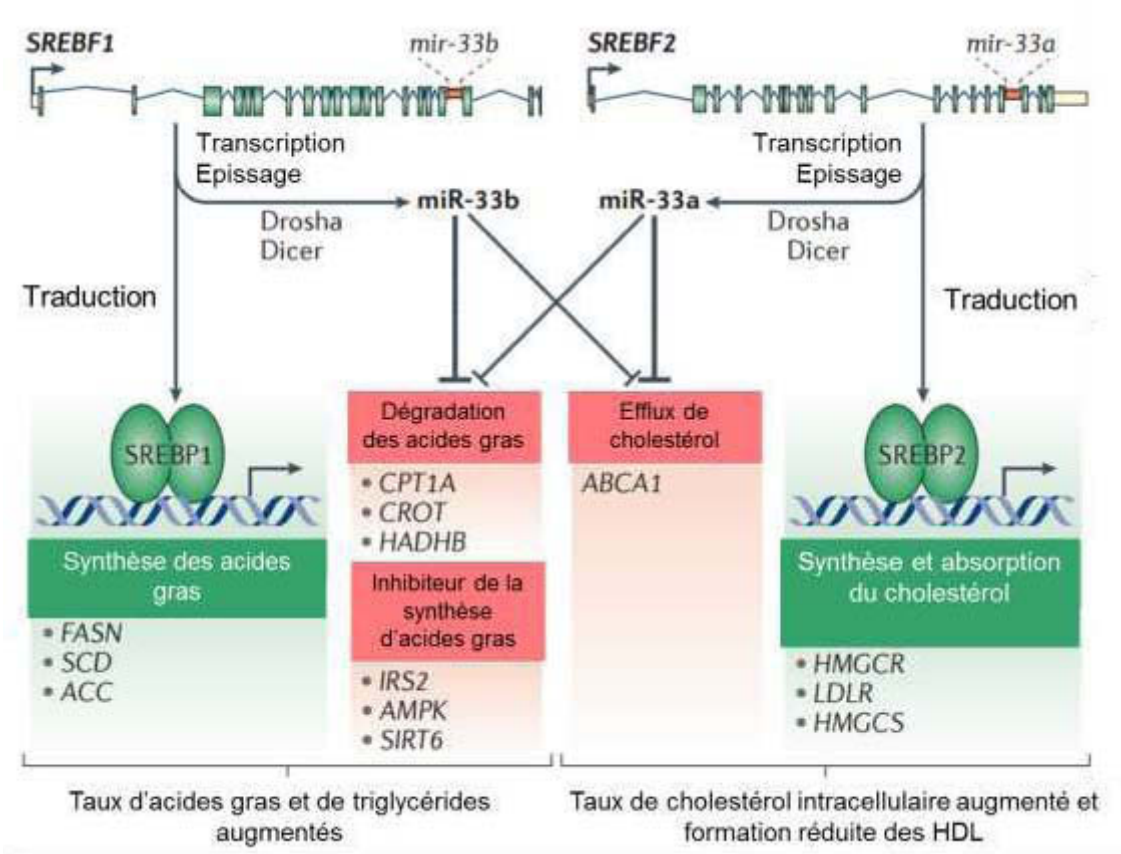
facteurs de transcription pour réguler différentes voies de signalisation notamment celles impliquées dans le développement (Cui *et al.,* 2007).

II.5.3) ACTION DES MIARN SUR LE METABOLISME DES LIPIDES

La plupart des études concernant l'implication des miARN dans le métabolisme des lipides s'est déroulée dans un contexte pathologique, que ce soit les maladies cardiovasculaires, les stéatoses hépatiques, le développement de l'athérosclérose ou dans le cadre de maladies métaboliques comme l'obésité. En effet, dans les cellules de mammifères, les miARN peuvent affecter la régulation de l'adipogenèse à plusieurs étapes en étant des facteurs pro- ou anti-adipogéniques (Peng *et al*., 2014). De plus de nombreux miARN ont été décrits comme régulant le métabolisme des lipides incluant *miR-33*, *miR-122*, *miR-370* ou *miR-378/378** (Tableau 9) dont les mécanismes d'action sont détaillés ci-après.

Un des miARN impliqués dans le métabolisme des lipides qui a suscité la plus grande curiosité est *mir-33*. En effet, le gène codant pour les deux isoformes *miR-33a* et *-b* est situé dans un intron du gène codant, respectivement, pour SREBP2 et 1 connus pour être des régulateurs de la synthèse de cholestérol (Figure 42). Ces miARN sont fortement conservés entre les espèces et l'expression de *miR-33a* est influencée par des changements dans son environnement, en particulier par les taux en cholestérol. De plus, *miR-33a* est co-transcrit avec SREBP2 et leurs expressions sont comparables dans plusieurs tissus (Fernandez-Hernando *et al*., 2011). La protéine SREBP2 et *miR-33a* sont tous deux impliqués dans la régulation des taux de cholestérol. Ainsi, on trouve parmi les cibles les plus conservées de *miR-33a*, *ABCA1*, un ARNm qui code pour un transporteur responsable de la sortie du cholestérol de la cellule et dont la région 3'UTR contient trois sites de fixation pour *miR-33a* et/ou *miR-33b*. L'inhibition de la voie d'action d'*ABCA1* entraine une augmentation, suite à la fixation de *miR-33a*, de l'efflux de cholestérol. En plus du cholestérol, *miR-33a* contrôle l'expression de plusieurs gènes tels que *CPT1A* (Carnitine PalmitoylTransferase 1A), *CROT* (CaRnitine O-octanoylTransferase) ou *HADHB* (HydroxyAcyl CoA Dehydrogenase-3-ketoacyl-CoA thiolase-enoyl-CoA Hydratase), qui ont un rôle essentiel dans l'oxydation des AG (Gerin *et al*., 2010). De son côté, SREBP2 favorise l'absorption et la synthèse de cholestérol à travers la transactivation du récepteur aux lipoprotéines à basse densité (LDL, Low Density Lipoprotein) et des gènes impliqués dans la biosynthèse du cholestérol. A travers l'inhibition d'*ABCA1* qui induit une diminution de l'efflux de cholestérol, *miR-33a* peut coopérer avec son gène hôte *SREBF2* afin d'augmenter les taux intracellulaires de cholestérol (Najafi-Shoushtari *et al*., 2010). Pour ce rôle important dans le transport du

Figure 42 Modèle du rôle de SREBPs et de *mir-33*. Les gènes *SREBFs* agissent de façon coordonnée avec leurs miARN introniques *miR-33a* et *miR-33b* pour réguler le métabolisme lipidique. La transcription des loci de *SREBF1* et 2 génère les protéines SREBP1, SREBP2 ainsi que les miARN *miR-33a* et *miR-33b*. SREBP1 active les gènes impliqués dans la synthèse des acides gras, des phospholipides et des triglycérides (*FASN* (Fatty Acid SyNthase), *SCD* (Steroyl-CoA Desaturase), *ACC* (Acetyl-CoA Carboxylase)), alors que SREBP2 active les gènes impliqués dans la synthèse et l'absorption du cholestérol (*HMGR* (3-Hydroxyl-3-MethylGlutaryl-Receptor), *LDLR* (Low-Density Lipoprotein Receptor), *HMGCS* (3-Hydroxyl-3-MethylGlutaryl-CoA-Synthase). *MiR-33a* et *miR-33b* agissent en réprimant l'expression des gènes régulant la β-oxydation des acides gras (*CROT* (CaRnitine O-octanoylTransferase), *HADHB* (HydroxyAcyl CoA Dehydrogenase-3-ketoacyl-CoA thiolase-enoyl-CoA Hydratase) Beta subunit), *CPT1A* (Carnitine PalmitoylTransferase 1A)), l'efflux de cholestérol (*ABCA1* (ATP-Binding Cassette subfamily A member 1)) ainsi que des inhibiteurs de SREBPs (*IRS2* (Insulin Receptor Substrate 2), *AMPKA1* (AMP-activated Protein Kinase Alpha 1 subunit), *SIRT6* (SIRTuin 6). HDL: High Density Lipoprotein *.D'après Rottiers et Naar, 2012.*



cholestérol et dans le métabolisme des AG, *miR-33a* est un des miARN présentant la plus grande promesse au niveau thérapeutique.

Par ailleurs, *miR-122* est un miARN très abondamment exprimé dans le foie, puisqu'il y représente 70% des miARN exprimés (Lagos-Quintana *et al*., 2002). Ce miARN a été associé avec la régulation du métabolisme hépatique. L'utilisation de sondes anti-sens complémentaires à *miR-122* a entrainé une diminution de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme des lipides et produit une augmentation de l'expression d'une centaine de gènes qui sont normalement inactivés dans les hépatocytes, suggérant que *miR-122* permet de maintenir le phénotype du foie (Elmén *et al*., 2008, Esau *et al*., 2006). De plus, l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la synthèse et l'oxydation des AG, incluant *FASN* et *ACACA* (des régulateurs du métabolisme des lipides), est altérée dans le foie de souris traitées avec un anti-miR-122. *MiR-122* est sous le contrôle de *miR-370*, qui présente des effets similaires sur le métabolisme des lipides. En particulier, il cible *CPT1A*, un ARNm qui code pour une enzyme mitochondriale impliquée dans le transport des AG à chaine longue à travers la membrane, et permet la réduction de l'oxydation des AG. La transfection de *miR-370* dans des lignées de cellules humaines de foie (HepG2) a pour conséquence une augmentation de l'expression de *miR-122* conduisant à une hausse de l'expression de gènes lipogéniques tels que *SREBF1* et *DGAT2* (Figure 43) (Iliopoulos *et al*., 2010).

Le métabolisme des lipides est par conséquent sous le contrôle de nombreux miARN et certains gènes peuvent être régulés par un panel de miARN. L'un des exemples les plus frappant est *ABCA1* (Figure 44), un transporteur de cholestérol dans plusieurs tissus, qui est ciblé par pas moins de 11 miARN (Novak *et al*., 2014).

D'autre part, les miARN peuvent être inclus dans des lipoprotéines et participer à leur métabolisme (Horie *et al*., 2014). Les lipoprotéines de haute densité (HDL, High Density Lipoprotein) et les LDL (Low Density Lipoprotein) contiennent des miARN. En particulier, le profil en miARN des HDL est différent entre des patients sains (*miR-135a**, *miR-188-5p* et *miR-877* étant les plus abondants) ou atteints d'hypercholestérolémie (*miR-223*, *miR-105* et *miR-106a* étant alors les plus abondants) (Vickers *et al*., 2011). *MiR-223* est d'ailleurs le miARN le plus fréquemment trouver dans les HDL. Les LDL ont un profil de miARN comparable à celui des exosomes et contiennent moins de miARN que les HDL (Wagner *et al*., 2013). Certaines études ont montré que les miARN contenus dans les HDL pouvaient être transférés dans des cellules réceptrices (Vickers *et al*., 2011, Wagner *et al*., 2013, Tabet *et al*., 2014) et peuvent également entrainer une baisse des miARN cellulaires causée par l'absorption de ces derniers dans les HDL (Wagner *et al*., 2013).

Figure 43 Exemples de miARN impliqués dans l'homéostasie du cholestérol. *MiR-122* et *miR-370* réduisent l'oxydation des acides gras et favorisent la synthèse des acides gras et du cholestérol. Les cibles directes (orange et bleu) ainsi que les voies biologiques régulées par ces miARN sont représentées. ACC: Acetyl-CoA Carboxylase, CPT1A: Carnitine PalmitoylTransferase 1A, DGAT2: DiacylGlycérol AcylTransférase 2, SCD: Steroyl CoA Desaturase, SREBP1C: Sterol Regulatory Element Binding Protein 1 C.

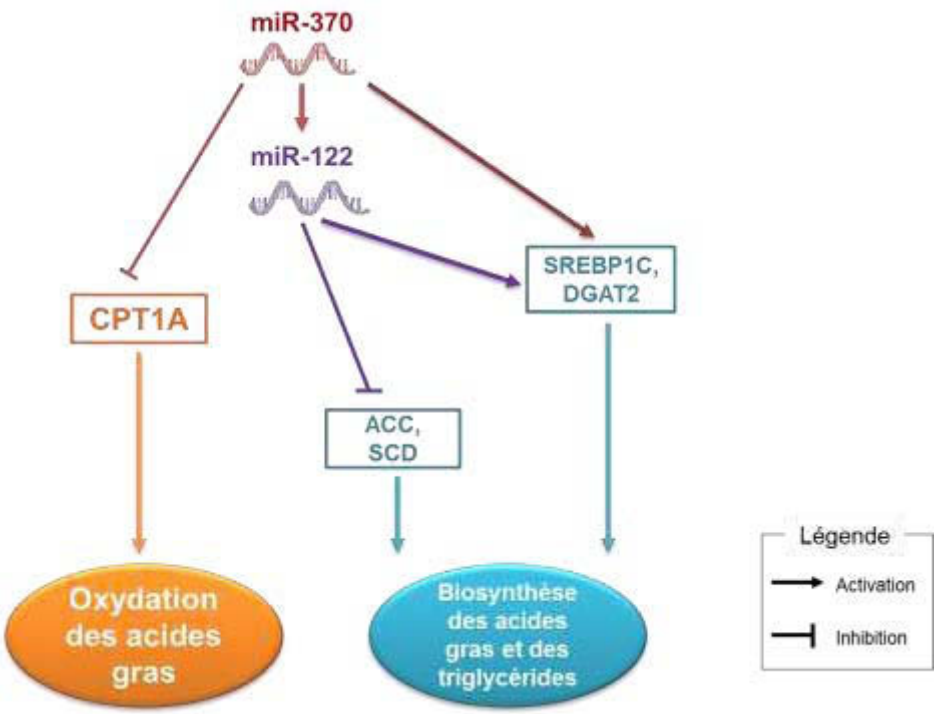
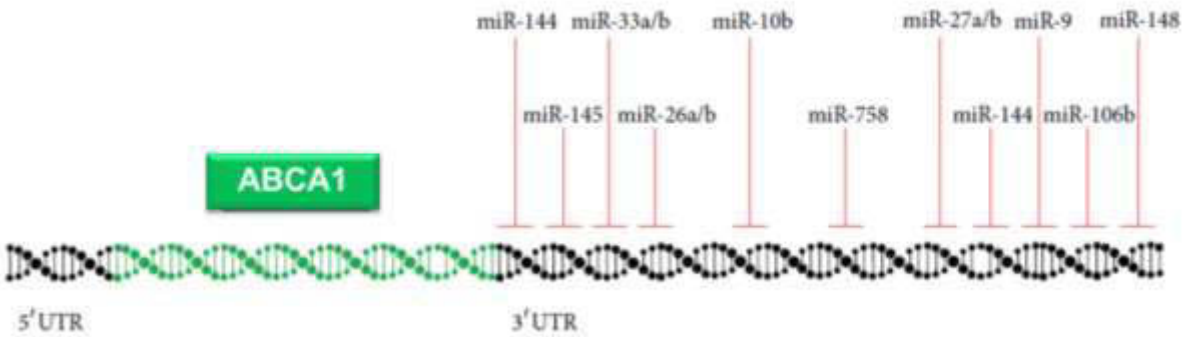


Figure 44 Exemple de régulation de l'ARNm d'*ABCA1* par plusieurs miARN. Cette figure représente tous les miARN dont la fixation à *ABCA1*, un transporteur de cholestérol, a été validée. ABCA1: ATP-Binding Cassette transporter, sub-family A, member 1. *D'après Novák et al., 2014.*



L'intérêt grandissant de l'implication des miARN dans le métabolisme lipidique laisse entrevoir que ces derniers pourraient servir de biomarqueurs dans le suivi de la progression de pathologies et/ou de réponse aux thérapies. Ils pourraient aussi constituer des cibles thérapeutiques pour des pathologies cardiovasculaires ou métaboliques.

II.6) APPROCHES POUR LA DETECTION ET LA QUANTIFICATION DES MIARN

Une des premières étapes pour la recherche et l'étude des miARN est leur détection. Aujourd'hui, plusieurs approches ont été développées pour déterminer la présence et/ou l'abondance des miARN. L'expression de centaines de miARN différents peut être mesurée en parallèle grâce à des techniques comme le séquençage haut débit ou l'hybridation de puces, alors que la RT-qPCR, le Northern blot ou l'hybridation *in situ* permettent l'étude d'un nombre plus restreint de miARN. Les grands principes de ces techniques sont expliqués dans ce paragraphe (Van Rooij *et al*., 2011, Pritchard *et al*., 2012).

Northern Blot

Le Northern blot, qui est une approche bien connue et robuste, a été une des premières techniques de détection des miARN. Cette procédure implique de séparer les ARN totaux sur un gel de polyacrylamide, de transférer les ARN sur membrane et d'hybrider une sonde spécifique du miARN d'intérêt. Par exemple, cette approche a permis de détecter la présence de certains miARN à tous les stades du développement chez la drosophile (*miR-1* ou *miR-2a*, par exemple) alors que d'autres sont uniquement exprimés au stade embryonnaire (*miR-3*, par exemple) (Aravin *et al*., 2003) (Figure 45). Un des avantages de cette technique est qu'elle permet de détecter à la fois le miARN mature et son précurseur, mais cette technique nécessite une quantité importante d'ARN de départ (10 à 15 mg) et la connaissance de la séquence des miARN d'intérêt.

Hybridation in situ

L'hybridation *in situ* est la technique la plus utilisée pour visualiser et localiser l'expression d'un gène ou miARN dans des cellules ou tissus (Figure 46). Par exemple, Kloosterman *et al.* (2006) ont identifié que la plupart des miARN est préférentiellement exprimé dans un tissu embryonnaire. La détermination de l'expression spatio-temporelle d'un miARN peut être d'un grand intérêt pour identifier son rôle biologique. Une limite de cette approche est l'utilisation de sonde courte, ce qui réduit la spécificité de celle-ci pour le

Figure 45 Etude de l'expression de quatre miARN (*miR-1, miR-2a, miR-3* et *miR-4*) par Northern blot à différents stades de développement chez la drosophile. Les phases de développement embryonnaire sont indiquées en heure après la ponte, les stades larvaires sont L1, L2 et L3. L'ARNr 2S est un contrôle positif. P: pupe, M: adulte mâle, F: adulte femelle. *D'après Aravin et al., 2003.*

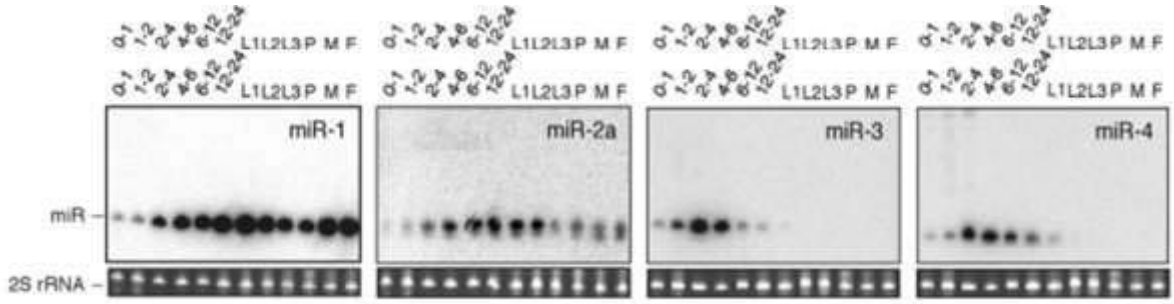
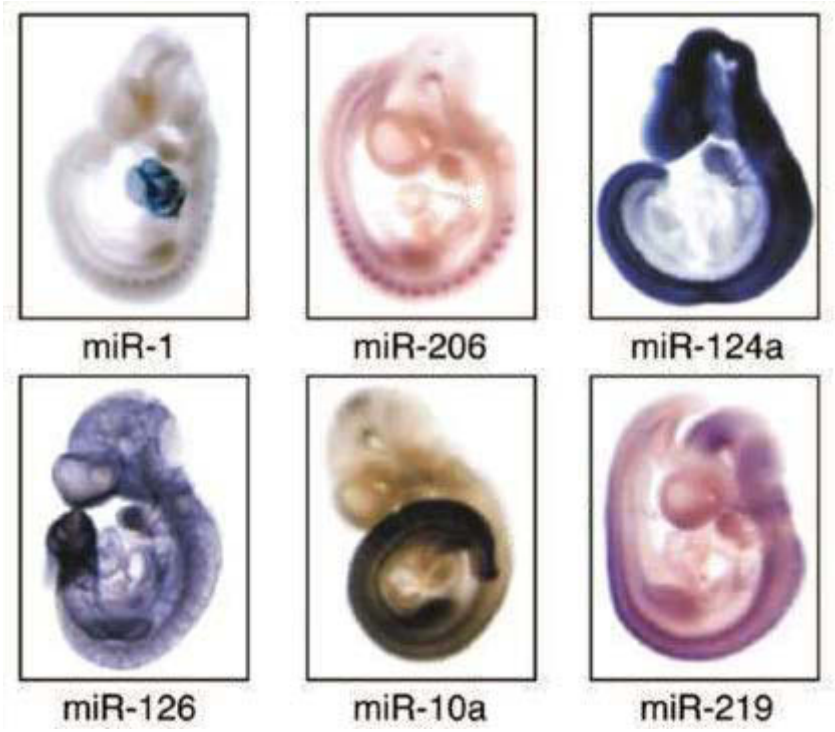


Figure 46 Exemples de localisations de miARN dans des embryons de souris. L'hybridation *in situ* de miARN dans des embryons de souris montrent une présence de *miR-1* dans le cœur et les somites, *miR-206* dans les somites, *miR-124a* dans le système nerveux central, *miR-126* dans les vaisseaux sanguins, *miR-10a* dans le tronc postérieur, *miR-219* dans le cerveau et la moelle épinière. *Adaptée de Kloosterman et al., 2006.*



miARN. Cette méthode est généralement efficace lorsque le miARN est fortement abondant, mais fournit des résultats incohérents pour les miARN faiblement exprimés (Jørgensen *et al*., 2010, Song *et al*., 2010).

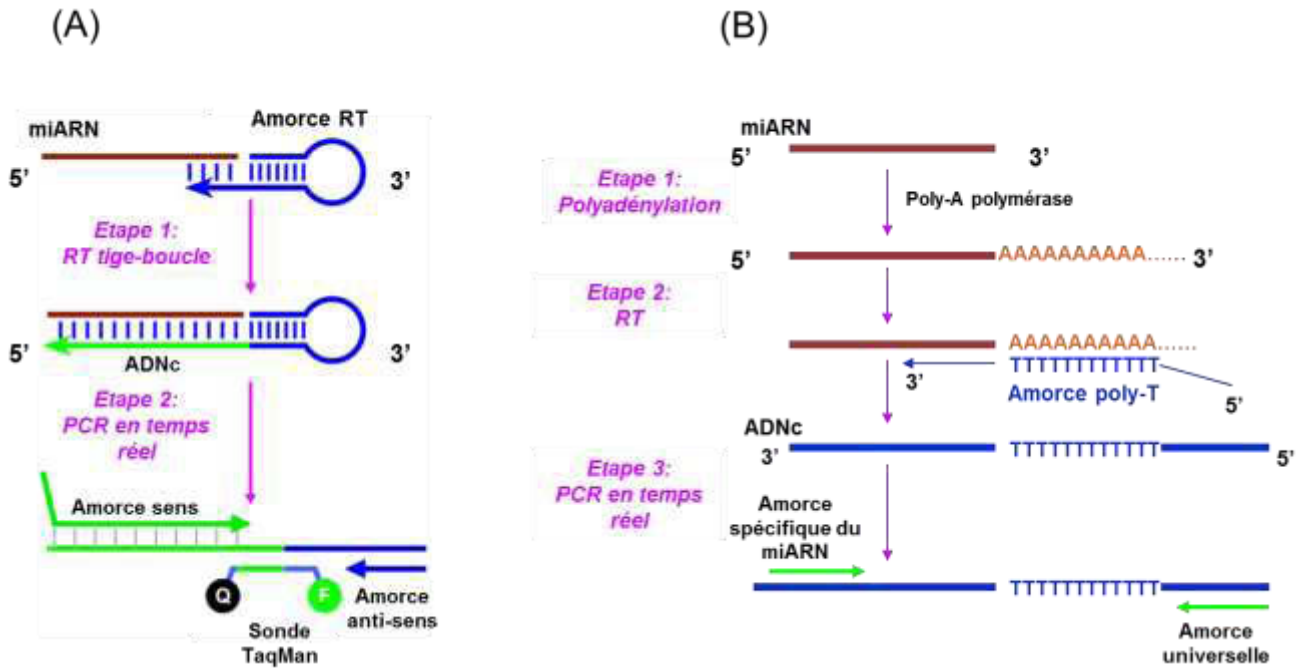
RT-qPCR

La PCR (Polymerase Chain Reaction) en temps réel est la méthode la plus communément utilisée pour étudier des miARN d'intérêt et pour valider des observations de profils d'expression. Deux méthodes ont été développées pour la détection spécifique des miARN par RT-qPCR (Figure 47). La première méthode utilise une amorce en tige-boucle spécifique du miARN qui se lie à l'extrémité 3' du miARN et subit une transcription inverse (RT) de façon individuelle. L'ADNc résultant est quantifié en utilisant une analyse par qPCR de type TaqMan, incluant des amorces spécifiques pour le miARN et une sonde hydrolysable. Chaque essai est identique en termes de longueur de produits d'amplification mais la transcription inverse est dissociée entre les miARN d'intérêts et ceux de référence, pouvant conduire à un biais d'efficacité de cette étape (Chen *et al*., 2005). La seconde méthode passe par l'ajout d'une séquence poly-A à l'extrémité 3' des miARN et ces derniers subissent une transcription inverse grâce à une amorce universelle poly-T. La qPCR est effectuée avec un marqueur de fluorescence, le SYBRgreen, en utilisant une amorce spécifique du miARN et une amorce universelle (Benes et Castoldi, 2010). Alors que la première méthode utilisant une amorce tige-boucle possède une meilleure efficacité et spécificité ainsi qu'une meilleure discrimination entre les miARN matures et leurs précurseurs, elle est aussi plus onéreuse. La seconde méthode utilisant une queue poly-A est pratique, si différents miARN doivent être analysés à partir d'une petite quantité d'ARN de départ. Bien que cette approche ait démontré son efficacité, elle ne permet pas de mesurer l'expression d'un grand nombre de miARN en parallèle.

Les puces à oligonucléotides

Une autre approche de mesure de l'expression des miARN est l'utilisation des puces qui se basent sur l'hybridation des miARN à des sondes fixées sur lame et permet de quantifier l'expression de plusieurs centaines de miARN simultanément. Les échantillons d'ARN contenant les miARN sont hybridés sur la puce, qui renferme des sondes pour chaque miARN de l'espèce étudiée (Yin *et al*., 2008). Son objectif principal est de mesurer le changement relatif de l'expression des miARN entre des états différents. Cette méthode a été couramment utilisée pour quantifier l'expression des gènes et a été optimisée pour l'étude des miARN. La différence majeure avec les puces pour ARNm est la taille de la cible. Ainsi

Figure 47 Méthodes de quantification des miARN par RT-qPCR. (A) Un miARN subit une reverse transcription en utilisant une amorce tige-boucle spécifique du miARN. L'ADNc résultant est amplifié en utilisant des amorces spécifiques et une sonde hydrolysable. La Taq polymérase déplace et hydrolyse la sonde entrainant une séparation du fluorophore et du quencher. L'accumulation du signal fluorescent est utilisée pour la quantification en temps réel. (B) Tous les miARN sont polyadénylés par une poly(A) polymérase. Les miARN possédant une queue poly-A subissent une reverse transcription grâce à une amorce poly-T. L'ADNc résultant est amplifié par une amorce spécifique et une amorce universelle. La réaction de qPCR est contrôlée en temps réel grâce à l'utilisation d'un marqueur qui fluoresce lorsqu'il se lie à de l'ADN double brin (comme le SYBRgreen). RT : Reverse Transcription. *Inspiré de Varkonyi-Gasic et Hellens, 2011 et http://www.genecopoeia.com/.*



l'avantage d'avoir de longs oligonucléotides (~70 nucléotides) pour les puces des ARNm n'existe pas pour les miARN. En principe, le miARN mature et son précurseur peuvent s'hybrider à la sonde puisqu'ils contiennent des séquences similaires. Une limite de cette approche est la connaissance *a priori* des séquences qui est utile pour déterminer la séquence des sondes. Une autre limite de cette approche est la spécificité des sondes, notamment dans les cas des isomiR qui se différencient par un seul nucléotide. De plus, les puces commerciales se basent sur les miARN répertoriés dans les bases de données. Pour l'étude des miARN chez les animaux d'élevage, il n'existe pas à ce jour de puces disponibles à un prix abordable.

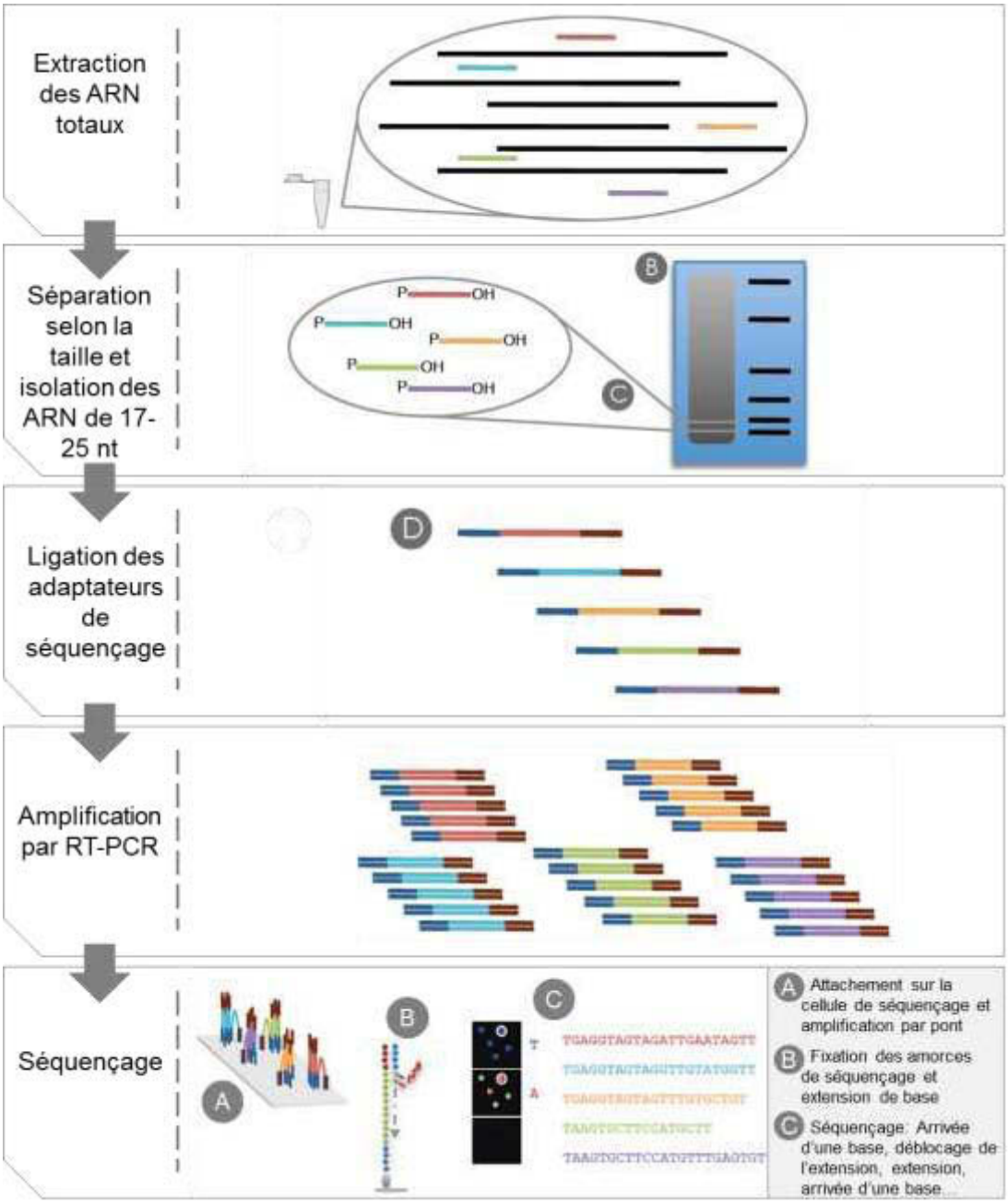
Toutes les approches citées auparavant nécessitent une connaissance de la séquence des miARN à étudier. Hors chez certaines espèces, par exemple, chez les animaux d'élevage cette connaissance *a priori* n'est pas toujours possible.

Séquençage haut débit

Le séquençage haut débit des petits ARN est la plus récente des techniques de détection et est de plus en plus utilisée pour étudier le profil des miARN exprimés dans un tissu, appelé un miRNome. Cette approche est dépendante de toute connaissance *a priori* des séquences. Elle peut fournir des informations sur toutes les sortes de petits ARN (ARNr, ARNt, ARNpiwi), permet une quantification absolue et la découverte de nouveaux petits ARN. Elle réalise en parallèle le séquençage de millions de séquences. Après extraction des ARN, les ARN sont isolés en fonction de leur taille par migration sur gel (Figure 48). Des adaptateurs de séquençage, contenant des amorces universelles, sont liés aux extrémités 5' et 3' du petit ARN. Ces petits ARN sont amplifiés après une transcription inverse suivie d'une amplification par une réaction de PCR. Puis, les séquences issues de l'étape précédente sont fixées sur une cellule de séquençage. Il se produit alors une amplification des séquences par pont. Les amorces de séquençage se fixent aux petits ARN et le séquençage est réalisé par extension de base. Ainsi, chaque nucléotide est lié à un fluorophore de couleur différente. Après incorporation du nucléotide par complémentarité, il y a lavage des autres nucléotides, capture de la fluorescence pour connaitre l'identité du nucléotide incorporé, le fluorophore est clivé, puis de nouveau un nucléotide marqué s'incorpore et ainsi de suite. La synthèse se termine lorsqu'un « terminateur », correspondant à un nucléotide chimiquement modifié bloquant l'action de l'ADN polymérase, est incorporé (Metzker, 2010).

Des biais pouvant avoir une incidence sur la qualité des résultats du séquençage haut débit ont été mis en évidence. En particulier, la ligation des adaptateurs de séquençage est une

Figure 48 Préparation des banques et principe du séquençage des miARN. *Inspirée de https://en.wikipedia.org/wiki/File:Miran-seq-library-prep.pdf.*

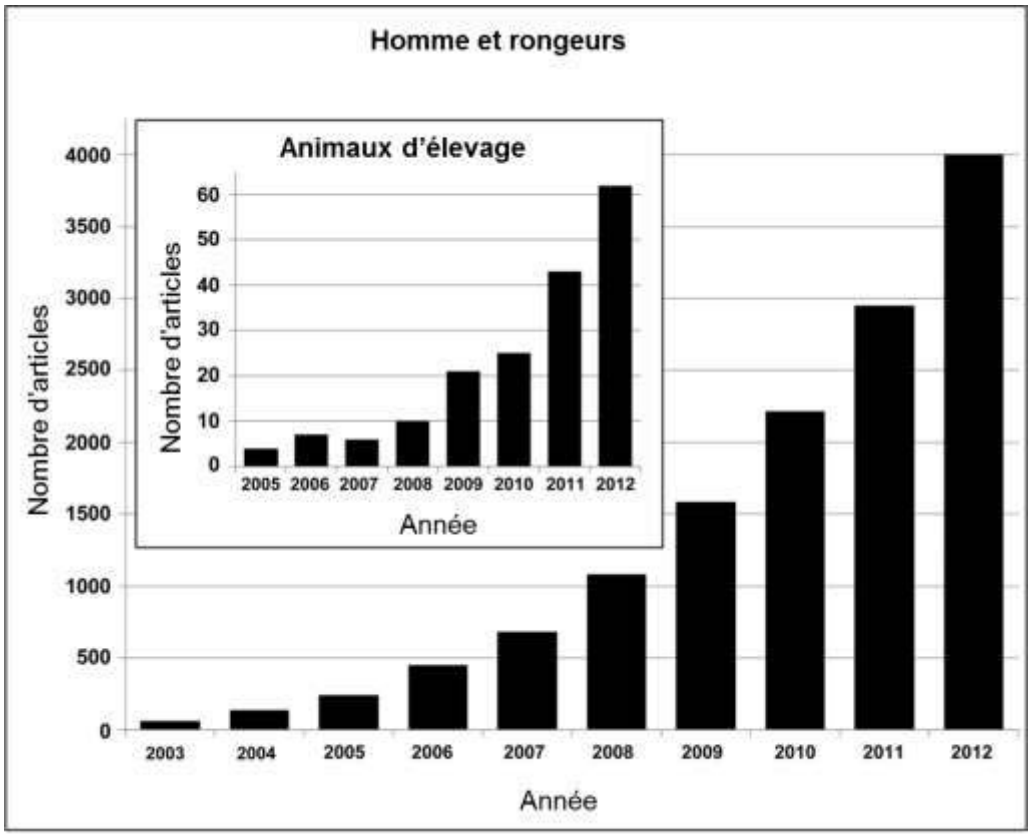


étape délicate pour cette approche puisqu'elle est dépendante de la séquence de l'adaptateur, de l'enzyme de ligation ainsi que de la structure secondaire et de la composition nucléotidique du miARN (Hafner *et al*., 2011, Zhuang *et al*., 2012, Baran-Gale *et al*., 2013, Van Dijk *et al*., 2014). Une autre limite de cette approche est la production de données nombreuses et complexes qui nécessite des traitements bioinformatiques lourds. Ainsi, avec l'augmentation de l'utilisation de cette approche de nombreux algorithmes ont été développés pour prédire, annoter et quantifier les séquences issues du séquençage. Parmi ces algorithmes miRDeep2 (Friedlander *et al*., 2008) ou miRanalyzer (Hackenberg *et al*., 2009), sont fréquemment utilisés. Les données générées par séquençage haut débit, qui représentent une approche relativement récente, peuvent être validés par d'autres techniques comme la RT-qPCR.

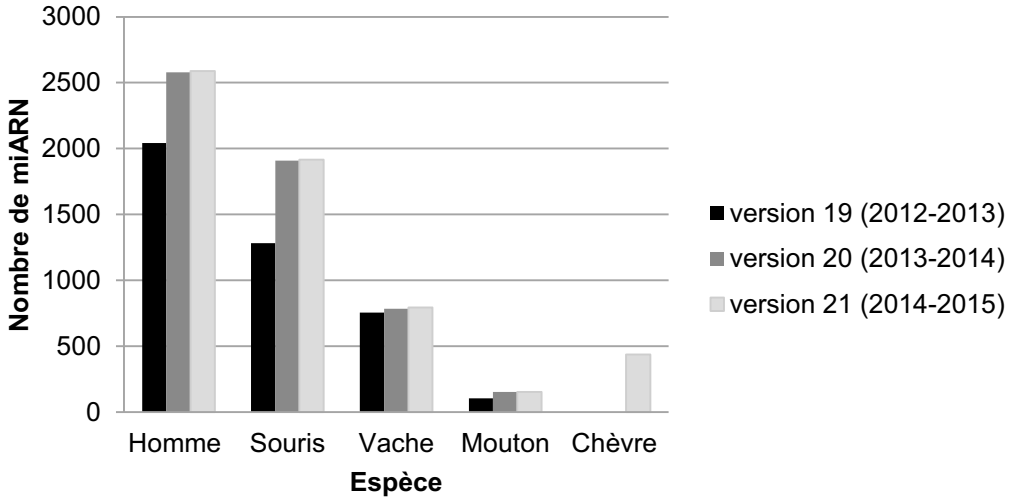
Cette approche, dénuée d'*a priori*, est d'un grand intérêt pour les espèces n'ayant pas ou peu de miARN répertoriés dans miRBase et permet également d'identifier des nouveaux miARN qui offrent des pistes de compréhension pour certaines voies de signalisation cellulaire.

Figure 49 Nombre d'articles sur les miARN dans PubMed (A) et nombre de miARN dans les bases de données miRBase (B) en fonction des espèces. *D'après Fatima et Morris, 2013.*

(A)



(B)



III. MiARN ET RUMINANTS

Au cours de la dernière décennie, les recherches consacrées à la génétique des animaux d'élevage ont franchi de nouvelles barrières de la connaissance en se rapprochant toujours plus du génome et de son fonctionnement. En effet, le génome de ces espèces a été récemment séquencé fournissant une meilleure connaissance sur les gènes et leur fonctionnement chez ces espèces (Elsik *et al*., 2009, Zimin *et al*., 2009, Archiblad *et al.,* 2010, Dong *et al*., 2013). Associée à cette meilleure compréhension, le développement des techniques de séquençage a permis d'identifier des miARN chez les ruminants. Le nombre de publications concernant ces miARN a par conséquent fortement augmenté (Figure 49). Bien que ce nombre reste très inférieur chez les animaux d'élevage par rapport à d'autres espèces comme l'homme ou les rongeurs, il croit de façon exponentielle depuis 2005.

Découverte des miARN chez les ruminants

En plus des techniques hauts débits et grâce à la conservation des miARN, les études d'homologie de séquences ont permis une implémentation des répertoires de miARN chez les ruminants. En effet, chez le bovin, les miARN ont été identifiés par homologie de séquence avec les miARN connus chez d'autres espèces et dont les séquences ont pu être retrouvées dans le génome bovin (Coutinho *et al*., 2007, Strozzi *et al*., 2009, Long et Chen, 2009). Les données de séquençage haut débit notamment issues des tissus embryonnaires, adipeux ou mammaires ont aussi permis de fournir cette liste de miARN. C'est cette même approche qui a permis l'identification des miARN chez la chèvre et le mouton, en particulier à partir de la peau, des follicules pileux, du muscle ou encore de la glande mammaire (Wenguang *et al*., 2007, Ji *et al*., 2012, Li *et al*., 2012, Wang *et al*., 2014).

Ainsi, dans les trois dernières versions de miRBase, un nombre croissant de miARN chez les ruminants peut être noté (Figure 49). Le bovin (*Bos taurus*) est l'espèce ruminant possédant le plus grand nombre de miARN connus, 793 miARN en 2015. Les miARN chez le mouton (*Ovis aries*) ont été répertoriés tôt dans miRBase mais seulement 153 miARN sont listés à ce jour dans miRBase 21. Enfin, l'apparition des miARN chez la chèvre (*Capra hircus*) a été très tardive. En effet, les miARN chez cette espèce ont été répertoriés en 2014 (miRBase 21), il n'existait donc pas de miARN chez la chèvre au début de ma thèse.

Les miARN entre espèces de ruminants sont très conservés. Par exemple, parmi les 159 miARN identifiés à partir de la peau et des follicules pileux de chèvre et de mouton, 105

miARN étaient conservés entre les deux espèces (Wenguang *et al*., 2007). De plus, certains miARN n'ont été détectés que chez les ruminants. Par exemple, *miR-6119-5p* est identifié dans plusieurs tissus chez le bovin (Huang *et al*., 2011) mais pas chez d'autres espèces dont le répertoire de miARN est important comme l'homme ou la souris. Un autre exemple est *miR-2388*, qui a uniquement été caractérisé dans des cellules rénales bovines (Glazov *et al*., 2009). De surcroit, environ 71 miARN ont été identifiés comme spécifiques des ruminants, dont la famille *mir-2284* composée de 24 membres (Bao *et al*., 2013). Le nombre abondant de régions «seed» générées par mutation dans cette famille indique que l'émergence de nouveaux miARN peut mener à la diversification adaptative fonctionnelle. Le rôle de ces miARN spécifiques des ruminants n'est pas encore connu mais ils pourraient expliquer les particularités de production chez ces espèces. De ce fait, les miARN ouvrent des pistes d'investigations quant aux productions des ruminants.

En plus des profils d'expression, les miARN ont fait l'objet d'étude fonctionnelle chez les ruminants afin de caractériser leur rôle. Ces études portent principalement sur le lien entre miARN et les traits d'intérêts économiques, comme la production de lait et de viande ainsi que les traits qui influencent la fertilité, la survie des embryons et la résistance aux maladies.

Rôle fonctionnel et implication des miARN dans un caractère de production

D'un point de vue fonctionnel, les études concernant les miARN bovins, initiées ces dernières années, se sont principalement concentrées sur leur rôle dans le tissu adipeux (Romao *et al*., 2014), le muscle squelettique (Sun *et al*., 2015, Sun *et al*., 2013), les ovocytes (Sohel *et al*., 2013) et le développement embryonnaire (Kropp et Khatib, 2015). La plupart de ces études n'ont pas encore identifié la fonction même des miARN mais plutôt leurs différences d'expression entre différents états, stades ou tissus. Par exemple, l'analyse de l'expression des miARN du stade vésicule germinale au stade blastocyste a permis de mettre en évidence une augmentation de *miR-21* et *miR-130a,* de façon linéaire, dans les embryons bovins du stade une cellule au stade huit cellules. Cette étude a donc suggéré un rôle de ces deux miARN dans le développement précoce embryonnaire (Mondou *et al*., 2012).

Outre, le rôle des miARN sur la fertilité, les études fonctionnelles se sont aussi intéressées au rôle des miARN dans le tissu adipeux. Par exemple chez le bovin, *miR-143* est un miARN dont l'expression est augmentée au cours de la différenciation des pré-adipocytes en adipocytes intramusculaires (Li *et al*., 2011). La transfection d'un oligonucléotide inhibiteur de *miR-143* altère la différenciation du tissu adipeux intramusculaire chez le bovin,

Tableau 10 Exemples de polymorphismes présents dans le site de liaison des miARN et de leurs cibles.

Espèces	Gène	Fonction	Site de fixation du miARN	*Références*
Bovin	GH21	Hormone de croissance	miR-17-3p, miR-92b, miR220a, c, d, miR-671 et miR-1306	*Mullen et al., 2010*
	GH24			
	HSF1	Protéine de choc thermique	miR-484, miR-671	*Li et al., 2011*
	BOLA-DQA2	Réponse immunitaire	miR-2318	*Hou et al., 2011*
Caprin	CSN1S1	Protéine du lait	miR-101	*Zidi et al., 2009*
Ovin	GDF8 (MSTN)	Protéine de masse musculaire	miR-1, miR-206	*Clop et al., 2006, Georges et al., 2006,*

BOLA-DQA2: major histocompatibility complex class II DQ alpha 2, CSN1S1: CaSeiN alpha S1, HSF1: Heat Shock transcription Factor 1, GDF8 (MSTN): MyoStaTiN, GH21 ou 24: Growth Hormone

suggérant un rôle important de *miR-143* sur ce processus qui est essentiel pour les qualités organoleptiques de la viande bovine.

Chez la chèvre, plusieurs études se sont concentrées sur l'implication des miARN dans la production de cachemire (Liu *et al*., 2012, Yuan *et al*., 2013, Wu *et al*., 2014). Ainsi les miARN issus des follicules pileux, structures responsables de la synthèse de cachemire, ont été séquencés relevant une différence d'expression au cours du cycle folliculaire. Ainsi l'expression de 23, 29 et 44 miARN est respectivement spécifique aux stades anagène (croissance du follicule), catagène (involution) et télogène (repos avant la chute). Il a également été montré que certains miARN affectent la différenciation et la prolifération des follicules pileux, et leurs cibles ont un rôle important dans la croissance périodique de ces structures. Cette étude suggère que des miARN régulent la production de cachemire chez la chèvre, qui représente un intérêt économique important.

Liens entre polymorphismes et miARN impliqués dans des caractères de production

La sélection génomique est un outil indispensable pour améliorer les phénotypes des animaux d'élevage. Des polymorphismes fonctionnels situés dans le site de fixation du miARN sur sa cible peuvent être informatifs pour la sélection génomique. En effet, des SNP peuvent perturber l'interaction miARN/ARNm dont plusieurs cas ont été reportés chez les ruminants (Tableau 10) (Georges *et al.,* 2007). La première étude de ce genre a été réalisée chez le mouton. En effet, chez la race Texel, la transition d'un G en un A dans la région 3'UTR du gène codant pour la myostatine (GDF8), crée un site illégitime pour la fixation les miARN myogéniques *miR-1* et *miR-206* (Clop *et al*., 2006). La reconnaissance de l'allèle A de la myostatine entraine une diminution de l'expression de ce gène et contribue à l'hypertrophie musculaire chez ces animaux.

En plus du muscle, des études de caractérisations de liens entre SNP et miARN ont été recherchés dans la glande mammaire. En particulier, un SNP (2776A>G) dans la région 3'UTR de *HMGB1* (High-Mobility Group Box protein 1) chez le bovin, altère le site de fixation de *miR-223-3p* (Li *et al*., 2012). En se fixant à sa cible, *miR-223-3p*, dont l'expression est augmentée en cas d'infection de la glande mammaire, entraine une répression de l'expression de *HMGB1* qui est connu pour jouer un rôle majeur dans la réponse immunitaire innée dans la glande mammaire. Par conséquent, les vaches possédant un génotype portant ce SNP ont une expression plus forte de *HMGB1* et sont moins susceptibles aux mammites. De plus chez la chèvre, Zidi *et al.* (2010) ont mis en évidence un SNP (175C>T) dans la région 3'UTR de *CSN1S1* (codant pour la caséine α_{s1}), qui détruit le site de

fixation de *miR-101*. Les chèvres possédant l'allèle T présentent un taux plus élevé de caséine α_{s1} dans le lait, bien que cette différence ne soit pas significative par rapport aux autres allèles. Des études supplémentaires doivent être entreprises pour identifier si cette mutation constitue une source de variation importante de l'expression de *CSN1S1* et donc a un effet sur la composition du lait caprin. Dans ce même contexte et très récemment, Hou *et al.* (2015) ont rapporté, chez la chèvre, la présence de deux SNP (2244A>G et 2264A>G) dans la région 3'UTR de *MTHFR* (5,10-MethyleneTetraHydroFolate Reductase), un gène codant pour une enzyme essentielle pour le métabolisme de l'homocystéine et du folate. La substitution 2244A>G peut augmenter la fixation de *miR-1266* sur *MTHFR*, alors que la seconde substitution 2264A>G peut diminuer la fixation de *miR-616*. Les chèvres possédant un génotype A_{2244}-G_{2264} ont un taux d'ARNm *MTHFR* plus fort que les chèvres de génotype G_{2244}-A_{2264}, associé à une augmentation de la production du lait et du taux protéique chez ces mêmes animaux (Hou *et al*., 2015). Cette étude suggère donc un rôle indirect de *miR-1266* et *miR-616* sur la synthèse du lait chez la chèvre.

Bien que les études des miARN chez les ruminants soient récentes et leurs fonctions encore peu caractérisées, les miARN font l'objet d'un grand intérêt et le nombre de travaux dans ce domaine devrait continuer à accroître au cours des prochaines années.

Tableau 11 Quelques exemples de miARN connus pour être impliqués dans la biologie de la glande mammaire.

miARN	Fonction dans la glande mammaire	Modèle d'étude	Cibles	*Référence*
Let-7	Inhibe le renouvellement et la différenciation; diminue les populations de cellules souches et progénitrices	Cellules épithéliales mammaires de souris (Comma-Dbeta)	Ras, Hmga2	*Ibarra et al., 2007*
miR-15a	Diminue la viabilité des cellules épithéliales mammaires et inhibe l'expression des caséines	Cellules épithéliales mammaires de vache	GHR	*Li et al., 2012*
miR-24	Contrôle la synthèse des triglycérides	Cellules épithéliales mammaires de chèvre (GMEC)	FASN	*Wang et al., 2015*
miR-27a/miR-103	Régulent le métabolisme des lipides	Cellules épithéliales mammaires de chèvre (GMEC)	Gènes lipogèniques	*Lin et al., 2013, Lin et al., 2013*
miR-29s	Régule la méthylation de l'ADN	Cellules épithéliales mammaires de vaches laitières (DCMECs)	DNMT3A, DNMT3B	*Bian et al., 2015*
mir-30b	Diminue la taille des lumières des alvéoles mammaires et altère le métabolisme des lipides	Souris		*Le Guillou et al., 2012*
miR-99a/b	Régulent la transition épithéliale-mésenchyme	Cellules de glandes mammaires normales de souris (NMUMG)	E-cadhérine, Tgfβ, ZO-1	*Turcatel et al., 2012*
miR-101a	Inhibe la prolifération des cellules épithéliales mammaire et réduit l'expression de la β-caséine	Souris	Cox-2	*Tanaka et al., 2009*
miR-126-3p	Inhibe la prolifération des cellules épithéliales mammaire et réduit l'expression de la β-caséine	Cellules épithéliales mammaires de souris	Pgr	*Cui et al., 2011*
miR-135a	Régulation de l'expression de PRLR	Cellules épithéliales mammaires de chèvre	PRLR	*Li et al., 2015*
miR-130b	Impliqué dans le métabolisme des lipides	Cellules épithéliales mammaires de chèvre (GMEC)	PGC1α, PPARγ	*Chen et al., 2015*
miR-138	Diminue la viabilité et la prolifération des cellules épithéliales mammaires	Biopsies de glande mammaire de souris	Prlr	*Wang et Li, 2008*
miR-146b	Intervient dans le maintien des cellules progénitrices alvéolaires et luminales	Cellules épithéliales mammaires de souris en gestation	Stat3β	*Elsarraj et al., 2013*

IV. MIARN ET GLANDE MAMMAIRE

La glande mammaire subit de profonds changements morphologiques et fonctionnels au cours des cycles de reproduction-lactation qui implique la mise en place des processus de prolifération, différenciation et apoptose des cellules (Topper et Freeman, 1980). Plusieurs études ont mis en évidence l'implication des miARN à la fois au niveau de la prolifération et la différenciation cellulaire mais aussi au niveau de la synthèse des constituants du lait (Silveri *et al*., 2006, Gigli et Maizon, 2013).

Dans la glande mammaire, les premières études concernant les miARN ont reposé sur leur identification grâce aux puces à miARN puis à travers leurs profils d'expression chez plusieurs espèces; femme (Farazi *et al*., 2011), la ratte (Zhang *et al*., 2014), la truie (Peng *et al*., 2015), la vache (Li *et al*., 2012, Li *et al*., 2015, Wicik *et al*., 2015), et la chèvre (Ji *et al*., 2012, Ji *et al*., 2012, Li *et al*., 2012). La comparaison des différents profils a permis entre autres de mettre en évidence la régulation de certains miARN au cours des stades du développement de la glande mammaire. Par exemple, l'analyse du profil d'expression de 318 miARN dans la glande mammaire de souris à seize stades (juvénile, puberté, vierge mature, gestation, lactation et involution) a montré que seulement un tiers était exprimé au cours du développement mammaire. Leurs expressions étaient globalement diminuées en lactation et au cours des premiers jours de l'involution. Cette étude a aussi permis de classer les miARN en sept clusters selon le stade de développement (Avril-Sassen *et al*., 2009).

L'utilisation de banques de petits ARN a aussi permis l'identification de nouveaux miARN. Par exemple, chez la souris grâce à cette approche 24 nouveaux miARN dont six spécifiques de la souris ont été identifiés (Sdassi *et al*., 2009). Ces travaux ont aussi permis de souligner des signatures de miARN dans la glande mammaire. Par exemple chez la femme, parmi 106 miARN étudiés, 23 montraient une expression particulièrement abondante dans la glande mammaire suggérant l'implication de ces miARN dans la physiologie de ce tissu (Liu *et al*., 2004a).

La fonction des miARN n'est que partiellement connue dans la glande mammaire, mais il semble que ces derniers puissent agir à plusieurs échelles (Tableau 11, Figure 50). Les études relatant ces travaux sont synthétisés ci-dessous.

Tableau 11 (Fin)

miARN	Fonction dans la glande mammaire	Modèle d'étude	Cibles	*Référence*
miR-152	Régule la méthylation de l'ADN	Cellules épithéliales mammaires de vaches laitières (DCMECs)	DNMT1	*Wang et al., 2014*
miR-155	Intervient dans la transition épithélium-mésenchyme	Cellules de glandes mammaires normales de souris (NMUMG)	RhoA	*Kong et al., 2008*
miR-193b (cluster)	Régule l'activité des cellules souches/progénitrices et la différenciation du tissu mammaire	Glande mammaire souris	Cav3, Elf5	*Yoo et al., 2014*
miR-200a	Participe au maintien du phénotype épithélial	Cellules épithéliales mammaires de souris	E-cadhérine, Zeb1	*Nagoaka et al., 2013*
miR-203	Régule l'activité des cellules souches et la destinée des cellules luminales	Cellules épithéliales de sein	ΔNp63α	*Decastro et al., 2013*
miR-205	Augmente la prolifération de la population des cellules progénitrices	Cellules épithéliales mammaires de souris (Comma-Dbeta)	Pten, Zeb1, Zeb2	*Greene et al., 2010*
miR-206	Intervient dans le développement de la morphogenèse du tissu mammaire	Souris et cellules humaines embryonnaires de rein (293T)	ESR1, Lef1, Tbx3	*Lee et al., 2013*
miR-214	Régule l'expression des protéines du lait	Cellules épithéliales mammaires (HC11, MCF7) et cellules embryonnaires humaines de rein (HEK293)	Lactoferrine	*Liao et al., 2010*
miR-486	Régule la synthèse des constituants du lait	Cellules épithéliales mammaires bovines (BMEC)	PTEN	*Li et al., 2015*
Cluster miR-424(322)/503	Régule la viabilité cellulaire	Cellules humaines mammaires (MCF-10a et MCF-12)	CDC25A	*Llobet-Navas et al., 2014*

Cav3: Caveolin 3, CDC25A: Cell Division Cycle 25A, Cox-2: Cyclooxygenase-2, DNMT1, 3A ou 3B: DNA MethylTransferase 1, 3A ou 3B, Elf5: E74-like factor 5 ESR1: EStrogen Receptor 1, FASN: Fatty Acid SyNthetase, GHR: Growth Hormone Receptor, Hmga 2: High mobility group AT-hook 2, Pgr: Progesterone receptor, Lef1: Lymphoid enhancer binding factor 1, Prlr: Prolactin receptor, Pten: Phophatase and tensin homolog, Ras: Resistance to audiogenic seizures, RhoA: Ras homolog gene family member a, Stat3β: Signal transducer and activator of transcription 3 β, Tbx3: T box 3, Tgfβ: Transforming growth factor β, ZEB1 ou ZEB2: Zinc finger E-Box binding homeobox 1 ou 2, ZO-: Zonula Occludens.

miARN et cellules souches mammaires

La glande mammaire renferme un réservoir de cellules souches et progénitrices qui donnent naissance aux cellules épithéliales, sécrétrices de lait. Plusieurs travaux ont mis en évidence l'implication des miARN dans le maintien de ces cellules souches ou progénitrices. Par exemple, Elsarraj *et al.* (2013) ont montré que pendant la gestation chez la souris, *miR-146b* est impliqué dans le maintien des cellules progénitrices alvéolaires et luminales, en partie grâce à la régulation du facteur apoptotique, *STAT3β* (Signal Transducer and Activator of Transcription 3 β) (Elsarraj *et al*., 2013). A l'inverse, une étude a montré que *miR-203* pouvait supprimer la capacité d'auto-renouvèlement des cellules progénitrices luminales via l'inhibition de l'expression de *ΔNP63α*, normalement activé au cours de la différenciation de ces cellules (DeCastro *et al*., 2013).

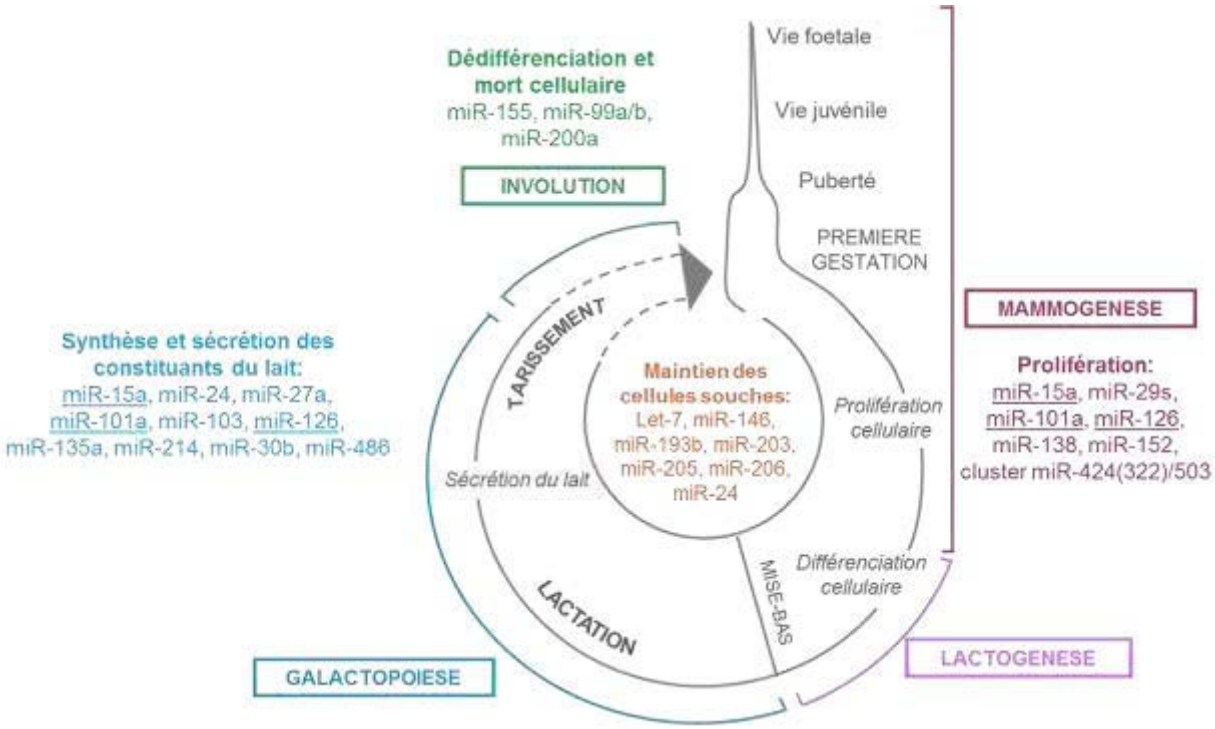
Enfin certains miARN comme *miR-205* ou *miR-22* sont fortement exprimés dans les cellules progénitrices mammaires alors que d'autres comme *miR-93* ou *let-7* le sont très faiblement. En outre, la surexpression de *let-7* dans ces cellules inhibe leur capacité d'auto-renouvèlement suggérant un rôle pour ces miARN dans l'équilibre entre les cellules progénitrices mammaires et les cellules différenciées (Ibarra *et al*., 2007).

miARN et prolifération des cellules mammaires

En plus, d'un rôle sur les cellules souches mammaires, les miARN ont aussi été impliqués dans la prolifération/viabilité des cellules mammaires. En particulier, Tanaka *et al*. (2009) ont montré que l'expression de *miR-101a* était augmentée tout au long de la différenciation et de l'involution du tissu mammaire. La surexpression de *miR-101a* dans des cellules épithéliales mammaires murines en culture, entraine une inhibition de la prolifération de ces cellules. Ce miARN cible directement la région 3'UTR de *Cox-2* (Cyclooxygenase-2), qui est un médiateur de la prolifération cellulaire. De ce fait, *miR-101a* pourrait réguler la prolifération cellulaire en ciblant *Cox-2*.

Par ailleurs, la surexpression de *miR-206* dans la glande mammaire de souris a entrainé un défaut de développement de ce tissu (Lee *et al*., 2013). *MiR-206* cible et réprime l'expression d'*ESR1* (oEStrogen Receptor 1) dans des cellules mammaires MCF-7 (Adams *et al*., 2007). De plus, la surexpression de ce miARN dans des bourgeons mammaires entraine une modification de l'expression de *Wnt* et des facteurs de transcription *Tbx3* (T box 3) et *Lef1* (Lymphoid enhancer binding factor 1), connus pour être essentiels dans le

Figure 50 Implications des miARN dans la biologie de la glande mammaire. Les miARN soulignés ont été décrits dans plusieurs voies de régulation.



développement de la glande mammaire. Ainsi, *miR-206* pourrait agir en aval d'*ESR1* pour moduler la croissance du tissu mammaire (Lee *et al*., 2013).

Le développement et le fonctionnement de la glande mammaire sont sous le contrôle de plusieurs hormones telles que l'œstrogène, la progestérone ou encore la prolactine. Aussi, certaines études se sont intéressées aux miARN pouvant être impliqués dans ces régulations hormonales. Le gène codant pour le récepteur à la progestérone (PGR) est une cible directe de *miR-126-3p*. L'inhibition de son expression et du niveau de sa protéine par *miR-126-3p* est associée à une diminution de la prolifération des cellules épithéliales mammaires chez la souris (Cui *et al*., 2011). L'expression de *miR-126-3p* est également modifiée selon les cycles de la glande mammaire chez cette même espèce, étant plus faible en lactation comparativement à la gestation et l'involution (Cui *et al*., 2011), suggérant un rôle important de ce miARN dans le développement et la fonction de la glande mammaire.

Chez les ruminants, la viabilité des cellules bovines, *in vitro,* est réduite par la surexpression de *miR-15a*. Les auteurs ont aussi montré une inhibition de l'ARNm codant pour le récepteur à la GH (*GHR*) ainsi qu'une diminution du niveau de sa protéine suite à la surexpression de *miR-15a* (Li *et al*., 2012), suggérant un rôle de ce miARN sur la prolifération des cellules épithéliales mammaires bovines.

Enfin, l'expression des gènes dans la glande mammaire est sous le contrôle transcriptionnel de plusieurs protéines dont STAT5. De façon intéressante, STAT5 régule l'expression du cluster *miR-17/92*. Bien que les membres de ce cluster puissent cibler des gènes impliqués dans le développement de la glande mammaire, la perte de ces miARN dans les cellules souches de glande mammaire de souris n'affecte pas le développement de ce tissu de la puberté à la lactation. Ces résultats ont suggéré que ce cluster n'était pas indispensable au développement de la glande mammaire (Feuermann *et al*., 2012). Le facteur STAT5 aussi régule l'expression du cluster *miR-193b* qui contient également *miR-365-1* et *miR-6365*. L'inactivation de *miR-193b* dans la glande mammaire de souris entraine une augmentation de l'activité des cellules souches/progénitrices et une augmentation de la différenciation du tissu mammaire entre la puberté et la gestation. Le facteur STAT5 pourrait contrôler la différenciation du tissu mammaire via la régulation du cluster de *miR-193b* (Yoo *et al*., 2014).

miARN et différenciation mammaire

En début d'involution, l'épithélium sécrétoire laisse place à un tissu mésenchymateux, correspondant à la transition épithélium-mésenchyme (EMT). Certains miARN ont été identifiés dans ce phénomène. En particulier, l'expression de *miR-200a* est augmentée du milieu de la gestation à la lactation et répond à une stimulation par des hormones lactogéniques dans des cellules épithéliales mammaires murines en culture. L'inactivation de ce miARN dans ces mêmes cellules entraine une diminution du taux d'ARNm de l'E-cadhérine ainsi qu'une augmentation de *ZEB-1* (Zinc finger E-Box binding homeobox 1), qui est un marqueur de la transition épithélium-mésenchyme (EMT). Ces travaux ont été complétés par une étude en culture cellulaire 3D qui a permis de montrer que l'inactivation de *miR-200a* diminue la polarité des cellules, suggérant que ce miARN est impliqué dans le maintien du phénotype de l'épithélium mammaire (Nagoaka *et al*., 2013).

De plus, TGF-β (Transforming Growth Factor-β) est une cytokine multifonctionnelle qui induit l'EMT dans de nombreux tissus. Turcatel *et al.* (2012) ont mis en évidence que l'inhibition de *miR-99a* et *miR-99b* diminue l'activité de TGF-β, entraine une diminution de la migration cellulaire mais une augmentation de la prolifération dans des cellules normales de glande mammaire murine. En revanche, une surexpression de ces deux miARN dans ces cellules entraine une augmentation de la prolifération, de la migration et de la fibronectine, alors que l'expression de l'*E-cadhérine* et de *ZO-1* (Zonula Occludens 1), tous deux impliqués dans les adhésions cellulaires, sont négativement régulées. L'ensemble de ces résultats permettent de suggérer que *miR-99a* et *miR-99b* pourraient agir, via un réseau complexe, comme modulateurs de l'EMT mammaire induit par TGF-β (Turcatel *et al*., 2012).

Le facteur TGF-β peut aussi réguler l'expression des miARN. Le cluster *miR-424(322)/503* est sous le contrôle de ce facteur dans l'épithélium mammaire murin. Chez des modèles murins déficients en cluster *miR-424(322)/503*, la régression des acini mammaires est altérée. De plus, après la lactation, l'activation de la voie TGF-β entraine la transcription de ce cluster qui peut à son tour réguler négativement l'expression de ces cibles telles que *CDC25A* (Cell Division Cycle 25A). Cette régulation négative de *CDC25A* est concomitante avec sa dégradation par le protéasome et l'induction de l'arrêt du cycle cellulaire (Llobet-navas *et al*., 2014, Llobet-navas *et al*., 2014). Ce cluster pourrait donc avoir un rôle essentiel dans le remodelage cellulaire suite à la lactation.

Enfin, Galio *et al*. (2012) ont cloné 47 nouveaux miARN de la glande mammaire de brebis (similaires avec ceux identifiés chez le bovin, l'homme et la souris). En début de gestation, des hybridations *in situ* ont souligné l'expression de *miR-21* et *miR-200* dans les cellules épithéliales luminales lorsqu'il y a une importante prolifération cellulaire, ainsi qu'une expression de *miR-205* dans les cellules de l'épithélium basal. Puis, *miR-205* et *miR-200* sont co-exprimés dans les cellules épithéliales luminales pendant la seconde moitié de gestation. Cette étude suggère que *miR-205* et *miR-200* pourrait coopérer pour préserver le potentiel sécrétoire de ces cellules en réprimant le programme d'EMT.

miARN, lactation et synthèse des constituants du lait

Le rôle des miARN dans la synthèse des constituants du lait n'est pas encore bien connu bien que quelques études aient été entreprises. Par exemple, la surexpression de *miR-30b* dans la glande mammaire de souris entraine une réduction de la taille de la lumière des alvéoles du tissu mammaire et une altération du métabolisme lipidique. En effet, les souris transgéniques présentaient des gouttelettes lipidiques de plus petites tailles avec une perte de leurs caractéristiques sphériques par rapport aux souris sauvages. De plus, les petits nourris par ces souris transgéniques montraient un défaut de croissance probablement dû à une augmentation de la viscosité du lait. Cette surexpression a aussi entrainé des régulations géniques affectant l'adhésion cellulaire, la sécrétion et le transport de molécules dans la glande mammaire (Le Guillou *et al*., 2012). Cette étude suggère un rôle important de *miR-30b* dans la physiologie de la lactation.

Par ailleurs, deux études *in vitro* ont été menées pour identifier le rôle des miARN dans le métabolisme des lipides. Aussi, l'expression de *miR-27a* est corrélée au cycle de lactation chez la chèvre et est influencée par la prolactine, hormone lactogène. La surexpression de ce miARN dans des cellules épithéliales mammaires de chèvre entraine une diminution de l'accumulation des triglycérides, du ratio AG insaturés/saturés et affecte l'expression des gènes lipogéniques tels que *PPARγ* dont le niveau protéique est également altéré (Lin *et al*., 2013). Au contraire, la surexpression de *miR-103* dans ces mêmes cellules entraine une augmentation de la formation des gouttelettes lipidiques, de l'accumulation des triglycérides, de la proportion d'AG saturés ainsi qu'une augmentation de l'expression de plusieurs gènes lipogéniques comme *ABCA1, ACACA, DGAT1* ou *SREBP* (Lin *et al*., 2013). Bien que ces études soient réalisées sur des modèles *in vitro*, elles suggèrent que ces miARN pourraient être impliqués dans la synthèse des lipides du lait.

De plus, récemment la comparaison des profils d'expression en miARN dans le tissu mammaire de vaches laitières de race Holstein (race laitière) ou Limousine (race allaitante) a révélé que le développement important de la glande mammaire menant à une forte production de lait pourrait dépendre d'un profil d'expression spécifique de miARN. Parmi les miARN les plus différentiellement exprimés entre les deux races sont *miR-10b, miR-29b, miR-101, miR-375, miR-2285t, miR-146b, let-7b, miR-107* et *miR-1434-3p* (Wicik *et al*., 2015). De façon intéressante, parmi ces miARN *miR-2285t* appartient à la famille *mir-2284,* qui est une famille de miARN spécifique des ruminants suggérant que ces miARN pourraient contribuer à expliquer les particularités de production des bovins laitiers. Il a aussi été montré que l'expression de *miR-152* est significativement augmentée pendant la lactation dans la glande mammaire de vaches produisant une grande quantité de lait comparativement avec des vaches produisant une quantité plus modeste. Inversement, l'expression d'une cible de *miR-152*, *DNMT1* (DNA MethylTransferase 1), est diminuée chez ces mêmes animaux (Wang *et al.,* 2014). La surexpression de ce miARN dans des cellules épithéliales mammaires de vaches laitières entraine une forte diminution de l'expression de *DNMT1* (au niveau de son ARNm et de sa protéine) qui s'accompagne d'une diminution globale de la méthylation de l'ADN. Enfin, *miR-152* régule aussi la viabilité et la multiplication des cellules épithéliales mammaires, suggérant un rôle important de ce miARN dans le développement et la fonction de lactation chez la vache laitière. Dans ce même contexte, *miR-29s* a été identifié comme régulant la méthylation de l'ADN dans des cellules épithéliales mammaires de vaches (Bian *et al*., 2015). L'inhibition de ce miARN entraine une hyperméthylation globale de l'ADN, dont l'augmentation de la méthylation des promoteurs des gènes liés à la biosynthèse des constituants du lait comme *CSN1S1, PPARγ, SREBP1* ou *GLUT1*.

D'un point de vue thérapeutique, le rôle de silencing des miARN a aussi suscité de l'intérêt. En particulier, les miARN ont été utilisés pour moduler la synthèse des protéines dans le lait. Ainsi, Jabed *et al.* (2012) se sont servis des miARN pour inhiber la production de LGB (β-lactoglobuline), un des allergènes majeurs du lait. Ils ont ciblé 10 miARN, individuellement ou en tandem, produisant une inactivation de 98% du gène *LGB*. Un des tandems a été utilisé pour produire un bovin transgénique produisant un lait sans LGB mais très riche en caséines (Jabed *et al*., 2012).

miARN et infections mammaires

Les miARN sont aussi impliqués dans des pathologies mammaires. En particulier, la mammite est une inflammation bactérienne du tissu mammaire représentant la maladie la plus

répandue et couteuse pour la filière laitière. Plusieurs auteurs ont examiné les profils d'expression des miARN en réponse à des infections bactériennes *in vitro* (Dilda *et al*., 2012, Lawless *et al*., 2013, Jin *et al*., 2014) ou *in vivo* (Naeem *et al*., 2012, Chen *et al*., 2014, Li *et al*., 2015) révélant des dizaines de miARN différentiellement exprimés entre un tissu mammaire sain versus un tissu infecté, dont la fonction a pu être reliée à l'immunité innée et au fonctionnement de la cellule épithéliale mammaire. Par exemple, Naeem *et al.* (2012) ont montré que *miR-181a, miR-16* et *miR-31* voient leur expression diminuée de 3 à 5 fois alors que *miR-223* est surexprimé dans un tissu mammaire infecté avec le pathogène *S. uberis* comparativement à un tissu sain (Naeem *et al*., 2012). Plusieurs auteurs ont mis en évidence *miR-223* comme biomarqueur potentiel des mammites car l'expression de ce miARN est fortement affectée par les infections bactériennes et il régule la prolifération et la différenciation des cellules immunitaires comme les neutrophiles (Chen *et al*., 2014, Li *et al*., 2015).

Les miARN dans le lait

Les miARN sont stables dans les fluides corporels. En particulier, les miARN sont présents dans le lait empaquetés dans des exosomes, des microvésicules ou encore protégés par des protéines. Notamment, Chen *et al.* (2010) ont montré que les miARN étaient un composant intrinsèque du lait de vache et présents de façon stable (Chen *et al*., 2010). Ils ont identifié sept miARN comme hautement présents dans le lait (*miR-26a, miR-26b, miR-200c, miR-21, miR-30d, miR-99a* et *miR-148a*) et pouvant représenter de potentiels biomarqueurs dans le contrôle de la qualité du lait. De même chez la femme, Kosaka *et al.* (2010) ont déterminés des miARN dans le lait pouvant jouer un rôle dans la croissance et la différenciation cellulaire ainsi que dans l'immunité du nouveau-né. C'est alors posée la question du transfert des miARN du lait au jeune. Les souriceaux nourris par des mères transgéniques présentant un taux élevé de *miR-30b* dans leur lait (> 100 fois au taux normal), montrent une présence forte de ce miARN dans leur estomac (> 30 fois au taux normal) mais pas dans les autres tissus (Laubier *et al*., 2015). Une seconde étude n'a pas pu mettre en évidence le transfert de *miR-375* ou *miR-200c/141* présents dans le lait dans l'épithélium intestinal, le sang, le foie ou la rate de souriceaux déficients pour l'un ou l'autre des miARN et nourris par des mères sauvages (Title *et al*., 2015). Les auteurs montrent aussi une forte dégradation des miARN au niveau intestinal. De plus, bien que les miARN soient stables dans le lait de vache (Izumi *et al*., 2012), les procédés de transformation du lait pour la consommation humaine, tels que la pasteurisation, entraine une perte de certains miARN dans

le lait (Howard *et al*., 2015). A l'inverse, une étude récente a montré que le consommateur buvant du lait de vache absorbe une quantité suffisante pour que les miARN du lait puissent être biologiquement actifs. Les auteurs ont aussi montré que les miARN bovins peuvent entrer dans les cellules mononucléaires périphériques et que les concentrations physiologiques des miARN dans le lait affectent l'expression des gènes *in vivo* et en cultures cellulaires (Baier *et al*., 2014). En accord avec cette étude, il a été montré très récemment que les exosomes du lait de bovin pouvaient rentrer dans des cellules intestinales bovines ou murines (*in vitro*) par endocytose (Wolf *et al*., 2015).

Le transfert des miARN du lait et leur potentiel impact sur la santé du jeune ou du consommateur sont actuellement peu connus et sujets de controverses. Ainsi, des études futures sont nécessaires pour préciser ces points.

TRAVAUX PERSONNELS

L'alimentation est un levier rapide permettant de moduler la quantité et la qualité du lait chez les ruminants. Cette modulation passe aussi par la modification de l'expression de gènes dans la glande mammaire dont certains sont directement impliqués dans la synthèse et la sécrétion du lait. En revanche, les mécanismes de régulation de l'expression de ces gènes ne sont pas encore connus. Ainsi, les miARN, qui sont impliqués dans la régulation de l'expression de leurs ARNm cibles, offrent de nouvelles pistes de compréhension de ces mécanismes. **Cette thèse vise donc à identifier la régulation nutritionnelle des miARN dans la glande mammaire et à étudier leur rôle sur la lactation.**

Aussi, en premier lieu seront présentés les travaux qui ont permis de générer les miRNomes mammaires de référence. La première étude présentera l'établissement des miRNomes chez la vache et la souris en lactation ainsi que leur comparaison. Les travaux suivants présenteront l'établissement du miRNome chez la chèvre en lactation ainsi que son utilisation pour l'enrichissement de l'annotation du génome de cette espèce.

A partir de ces miRNomes de référence, l'effet de la nutrition sur l'expression des miARN a été étudié et sera présenté à travers deux modèles. L'effet d'une privation alimentaire de 48h sur l'expression des miARN dans la glande mammaire de chèvres en lactation sera exposé en premier. Puis, l'effet d'une supplémentation en huile de tournesol sur l'expression des miARN dans la glande mammaire chez la vache et la chèvre en lactation sera développé.

Enfin, l'impact des miARN sur la lactation sera décrit à travers trois études de surexpression de miARN dans des cellules épithéliales mammaires bovines en culture.

I. ETABLISSEMENT DES MIRNOMES MAMMAIRES

La caractérisation de la fonction des miARN sur la lactation passe par une meilleure connaissance des miARN présents à ce stade physiologique dans la glande mammaire. Ainsi les miRNomes mammaires chez la souris, la vache et la chèvre en lactation ont été réalisés. Ces résultats sont exposés dans les deux sous parties de cette section à travers les publications qui ont résulté de ces travaux.

I.1) ETABLISSEMENT ET COMPARAISON DES MIRNOMES MAMMAIRES MURIN ET BOVIN

Afin d'avoir une connaissance exhaustive des miARN exprimés dans les glandes mammaires murines et bovines, les miRNomes mammaires ont été établis et comparés chez ces deux espèces. Aussi à partir des ARN issus de glande mammaire de deux vaches et de deux souris en lactation établie, l'ensemble des miARN a été séquencé selon la méthode de séquençage haut débit Solexa, Illumina. Les miRNomes résultants ont été comparés afin d'identifier les spécificités et les miARN communs entre les deux espèces. De plus, pour obtenir plus d'informations sur les miARN chargés dans le complexe RISC et donc actifs, les miARN associés avec AGO2 ont été isolés par co-immunoprécipitation puis séquencés par la même méthode, à partir de la glande mammaire de deux souris en lactation établie. Ces travaux ont fait l'objet de l'**Article 1**.

Article 1: Characterization and comparison of lactating mouse and bovine mammary gland miRNomes. *Le Guillou S, Marthey S, Laloë D, Laubier J, Mobuchon L, Leroux C, Le Provost F.* PLoS One. 2014 Mar 21;9(3):e91938. doi: 10.1371/journal.pone.0091938. eCollection 2014.

OPEN ACCESS Freely available online

PLOS | ONE

Characterisation and Comparison of Lactating Mouse and Bovine Mammary Gland miRNomes

Sandrine Le Guillou[1], Sylvain Marthey[1], Denis Laloë[1], Johann Laubier[1], Lenha Mobuchon[1,2,3], Christine Leroux[2,3], Fabienne Le Provost[1]*

1 INRA, UMR1313 Génétique Animale et Biologie Intégrative, Jouy-en-Josas, France, **2** INRA, UMR1213 Herbivores, Saint-Genès Champanelle, France, **3** Clermont Université, VetAgro Sup, UMR1213 Herbivores, Clermont-Ferrand, France

Abstract

Background: The mammary gland is a dynamic organ that undergoes important physiological changes during reproductive cycles. Until now, data regarding the characterisation of miRNA in the mammary gland have been scarce and mainly focused on their abnormal expression in breast cancer. Our goal was to characterise the microRNA (miRNA) involved in mechanisms regulating the mammary function, with particular focus on the lactation stage.

Methodology/principal findings: Using high-throughput sequencing technology, the exhaustive repertoires of miRNA expressed (miRNome) in mouse and bovine mammary glands during established lactation were identified, characterized and compared. Furthermore, in order to obtain more information on miRNA loading in the RNA-induced silencing complex (RISC), the miRNome was compared with that obtained from RNA associated with the AGO2 protein (AGO2-miRNome) in mouse lactating mammary gland. This study enabled the identification of 164 and 167 miRNA in mouse and bovine, respectively. Among the 30 miRNA most highly expressed in each species, 24 were common to both species and six of them were preferentially highly expressed in lactating than non-lactating mammary gland. The potential functional roles of these 24 miRNA were deduced using DIANA-miRPath software, based on miRNA/mRNA interactions. Moreover, seven putative novel miRNA were identified. Using DAVID analysis, it was concluded that the predicted targets of two of these putative novel miRNA are involved in mammary gland morphogenesis.

Conclusion/significance: Our study provides an overview of the characteristics of lactating mouse and bovine mammary gland miRNA expression profiles. Moreover, species-conserved miRNA involved in this fundamental biological function were identified. These miRNomes will now be used as references for further studies during which the impact of animal breeding on the miRNA expression will be analysed.

Citation: Le Guillou S, Marthey S, Laloë D, Laubier J, Mobuchon L, et al. (2014) Characterisation and Comparison of Lactating Mouse and Bovine Mammary Gland miRNomes. PLoS ONE 9(3): e91938. doi:10.1371/journal.pone.0091938

Editor: Sebastien Pfeffer, French National Center for Scientific Research - Institut de biologie moléculaire et cellulaire, France

Received October 8, 2013; **Accepted** February 17, 2014; **Published** March 21, 2014

Copyright: © 2014 Le Guillou et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was partially supported by the INRA AIP BioRessources funding. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. No additional external funding received for this study.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: LeProvost@jouy.inra.fr

Introduction

MicroRNA (miRNA), or endogenous small RNA (18–22 nt), are negative regulators of gene expression, capable of exerting pronounced effects on the translation and stability of mRNA [1–3]. It is estimated that miRNA genes may account for 2% to 5% of all mammalian genes and collectively regulate the expression of up to 60% of protein-coding genes [4,5]. miRNA-mediated gene regulation is crucial to all biological processes such as cellular growth, cell differentiation or death [6–8], as well as metabolism [9–12]. Moreover, most of miRNA are expressed in a spatio-temporal pattern [13], suggesting that they play specific functions [8]. Despite considerable growth in their number in the miRBase database (http://microrna.sanger.ac.uk/), the field of miRNA research remains uncharted territory.

miRNA-mediated regulation is thought to require a minimally stable interaction between an mRNA and an miRNA and an Argonaute (AGO) protein, comprising a tightly associated miRNA-associated ribonucleoprotein (miRNP), which is the core of the RNA-induced silencing complex (RISC) [14,15]. In mammals, the AGO subfamily comprises four proteins (AGO1-4). Whilst all AGO proteins are translation repressors, only AGO2 exerts endonuclease activity (reviewed in [16]). This protein family is used to identify mRNA targets using the immunopurification techniques which have recently been developed to isolate RISC associated mRNA and miRNA [17]. In two recent studies [18,19] based on the cloning and deep sequencing of endogenous miRNA associated with AGO1-3, no evidence for major miRNA sorting was found in human cells. Until now, the correlation between the miRNome obtained from complete tissue and that associated with AGO proteins has only been weakly documented [20].

Studies of miRNA in mammary gland have mostly focused on human breast cancer, and functional studies have identified miRNA playing both tumour suppressing and oncogenic roles by targeting the mRNA involved in breast cancer [21]. However, the mammary gland is a dynamic organ that undergoes important physiological changes during the female reproductive cycle. One

important stage in this cycle is lactation, when the mammary gland is mainly made up of mammary epithelial cells which are involved in specific biological functions such as milk component biosynthesis and secretion [22–24].

Relatively little is known about the role of miRNA during normal mammary gland development or lactation. Ucar and colleagues [25] showed that *miR-212* and *miR-132* are essential during mammary gland development. A link between miRNA and mammary epithelial progenitor cells has been evidenced using the Comma-Dbeta mouse mammary epithelial cell line [26,27]. The regulation of both epithelial-mesenchymal transition (EMT) and EMT-associated stem cell properties via the tumour suppressor p53-mediated transcriptional activation of *miR-200c* has also been demonstrated [28]. Le Guillou *et al.* [29] recently showed that the over expression of an miRNA, *miR-30b*, in the mouse mammary gland results in a lactation defect characterised by the presence of acini structures with abnormally small lumen and defective of lipid droplet formation. These studies thus revealed the crucial role of miRNA with respect to mammary gland biology.

miRNA expression patterns have been described in normal mouse and ruminant mammary glands at different stages [30–35], but the miRNA profiles obtained were not exhaustive because of limitations to the technologies used. However, high-throughput sequencing technology has now become a powerful tool to describe an exhaustive miRNA repertoire and discover new miRNA [36,37].

Whilst very recent studies of miRNA repertories in goat and bovine mammary gland tissues during dry period, early, peak and late lactation have been performed using high-throughput sequencing techniques [38–41], the description of mammary gland miRNomes is still limited. In particular, no reports on the miRNA repertoire in the mouse mammary gland, or any comparisons between species to characterise conserved miRNA in this biological function, have been presented.

The principal objective of the work reported here was therefore to identify the crucial miRNA involved in lactation. We thus identified and compared the exhaustive repertoires of miRNA, known and novel, expressed in mouse and bovine mammary glands during established lactation using Solexa deep sequencing technology. We characterised a set of miRNA that are conserved and highly expressed during lactation, as well as miRNA related to different species and different physiological stages. To widen the knowledge on miRNA loading in RISC, we also compared the whole miRNome *versus* the miRNome associated with the AGO2 protein, or the AGO2-miRNome, in the lactating mouse mammary gland. The predicted biological processes targeted by the most frequently detected miRNA were then discussed.

Materials and Methods

Animals and tissue collection

All experiments involving animals were performed in strict accordance with the guidelines of the Code for Methods and Welfare Considerations in Behavioural Research with Animals (Directive 86/609EC) and the recommendations of the French Commission de Génie Génétique (Permit number 12931 (01.06.2003)) and CEMEAA (Ethics Committee for Animal Experimentation in Auvergne, number 02) which approved this study. Every effort was made to minimise animal suffering.

Left and right abdominal mammary glands (#4) were collected from two primiparous FVB/N mice at mid-lactation (day-12). The day of parturition was designated as day 0 of lactation. No litters containing fewer than five pups were used for any of the experiments. When sampling, the lymph node of the mammary gland was removed, and the tissue was frozen immediately.

Bovine mammary tissue was collected from four multiparous Holstein dairy cows at mid-lactation. Biopsies were performed on the upper one-third of the posterior area of one udder using the method described by Farr *et al.* [42]. Approximately 500 mg of mammary tissue were collected, rinsed in 0.9% sterile saline solution, inspected to verify tissue homogeneity and then snap-frozen.

Both bovine and mouse mammary gland samples were stored at −80°C until RNA extraction.

Tissue lysates and Argonaute-2 co-immunoprecipitation

Mouse mammary glands were homogenised individually in 1 mL lysis buffer (20 mM Tris HCl pH 7.5, 200 mM NaCl, 2.5 mM $MgCl_2$, 0.5% Triton ×100, complete EDTA-free protease inhibitors (Roche) and 100 U/mL RNase OUT (Invitrogen)) per 100 mg tissue and stored in ice. Homogenates were centrifuged at 10,000 g, for 10 min. at 4°C. The supernatants were recovered, and kept at 4°C pending AGO2 co-immunoprecipitation. 50 µl Dynabeads® Protein G (Immunoprecipitation Kit- Dynabeads® Protein G; Cat. No. 100.07D; Invitrogen) per sample were prepared according to the manufacturer's protocol and 5 µg anti-AGO2 monoclonal antibody (Abnova, EIF2C2 monoclonal antibody (M01), clone 2E12-1C9; Cat. No. H00027161-M01), diluted in Ab Binding and Washing Buffers provided with the supplier's kit, were added to each aliquot of beads. Supernatants from mammary lysis were subsequently added to the beads and incubated overnight under constant rotation at 4°C. The beads were washed five times with 200 µL lysis buffer and finally resuspended in 90 µL lysis buffer supplemented with 10 µL 0.1 M DTT.

RNA isolation

Total RNA were isolated from mouse tissue biopsies or from the samples obtained after AGO2 co-immunoprecipitation using the RNA NOW kit (Ozyme), with overnight precipitation so as to guarantee a maximum yield of small RNA. Bovine total RNA were prepared from about 50 mg mammary tissue using the Nucleospin® miRNA isolation kit (Macherey-Nagel Inc.) according to the manufacturer's instructions. The concentration and purity of total RNA were estimated by spectrophotometry (Nanodrop™, ND-1000) and its integrity was ascertained by migration on 2% agarose gel and analysed by displaying 28S and 18S rRNA. Bovine samples were pooled in equal amounts by pairs to obtain 10 µg RNA from each sample. Both mouse and bovine samples were precipitated using sodium acetate 3M, 96% ethanol and 5 mg/mL glycogen.

Small library preparation and sequencing

Libraries were prepared simultaneously using the Illumina small RNA kit (Illumina) from GATC Biotech Company, according to the manufacturer's instructions. Briefly, the small RNA (below 500 nt) were isolated from total RNA using the mirVana miRNA isolation kit (Ambion) and then size-fractionated and purified on a denaturing 15% polyacrylamid gel, and stained with SYBR Green II. The small RNA fractions (19–29 nt) were collected by passive elution of the RNA from the gel, then precipitated with ethanol and dissolved in water. The small RNA thus isolated were poly(A)-tailed and an RNA adapter was ligated to the 5′-phosphate of the RNA. First-strand cDNA synthesis was performed using an oligo(dT)-adapter primer and M-MLV reverse transcriptase. The resulting cDNA were PCR-amplified to about 10–20 ng/µL using high fidelity DNA polymerase, over 18 to 26 cycles. The primers

(sense: 5′- AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTC-TTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT-3′ and antisense: 5′-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT-Barcode-GTGACT-GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTTTTTTTTT-TTTTTTTTTTTTTTTT-3′) used for the PCR amplification were designed for the purpose of TruSeq sequencing according to the instructions provided by Illumina. The barcode sequences attached to the 5′-end of the cDNA are listed in Table S1. The PCR products (total length of 165–175 bp) were analysed by capillary electrophoresis on a Shimadzu MultiNA microchip electrophoresis system and purified using the Agencourt AMPure XP kit (Beckman Coulter Genomics). Libraries were sequenced on an Illumina HiSeq 2000 by GATC Biotech Company, according to Solexa's sequencing method. All RNA sequencing data were subsequently deposited in the Gene Expression Omnibus (GEO): GSE53511.

Sequencing data analyses and discovery of novel miRNA

After removing the poly-A stretches, data analyses were mainly performed using miRDeep2 software [43] as described in Figure S1. After filtering for their size (17–28 nt), the cleaned sequences were clustered into unique reads and then mapped to the mouse (GRCm38.71) and bovine (UMD3.1.71) reference genomes using the mapper.pl module from miRDeep2. Novel miRNA and precursors were identified using the miRDeep2 core module miRDeep2.pl (including the presence of reads corresponding to typical products of miRNA biogenesis, stability of the putative pre-miRNA hairpin and homology to previously identified miRNA). For both species, novel miRNA datasets were created by adding miRNA predicted with a miRDeep2 score >0 to known miRNA for the species (miRBase v20). The same operation was performed to create a new data set of precursors for both species. The quantifier.pl miRDeep2 module was then used to map the unique reads, new sets of miRNA and all known miRNA (miRBase v20) on the new sets of miRNA precursors. The quantification results generated by this module were then filtered with a custom perl script parse_miRDeep2_outputs.pl (https://mulcyber.toulouse.inra.fr/projects/bioinfoutils/) to eliminate any redundancy between known and putative novel miRNA.

Analysis of differential expression

A differential expression analysis between mouse and AGO2-miRNomes was performed using R version 3.0.1 (R Development Core Team, 2013, http://www.R-project.org) with the Bioconductor DESeq2 package, version 1.0.17 [44]. DESeq2 utilises a negative binomial distribution to model read counts per miRNA and implements a method to normalise these counts. This normalisation procedure uses the library median of the ratios between the read count and the geometric mean of each gene as a scaling factor for each library. Fold changes were estimated using an empirical Bayes shrinkage procedure. This helps to moderate the large spread in fold changes for genes with low counts, while it has negligible effect on genes with high counts. Since hypothesis tests are performed for gene-by-gene differential analyses, the p-values obtained need to be adjusted to correct for multiple testing. However, procedures to adjust p-values in order to control the number of false positives found often lead to a loss of power to detect truly differentially expressed genes because of the large number of hypothesis tests performed. To reduce the impact of such procedures, the filtering method described by Rau *et al.* [45] was used to remove genes that appeared to generate an uninformative signal. This method identifies a filtering threshold that maximizes so-called filtering similarity among replicates. Tests for differential expression were only applied to genes whose maximal count across all four samples was higher than its threshold. This method was implemented under the Bioconductor HTSFilter package, version 1.0.0. [45]. The threshold value was found to be equal to 175. Applying this filtering reduced the 1,750 miRNA to just 299. The p-values were adjusted for multiple testing using the Benjamini and Hochberg method [46], and those with an adjusted p-value$<$0.05 were considered to be significant.

miRNA targeted pathway analysis

miRNA targeted pathway analysis was performed using the computational application DIANA miRPath v2.0 [47], applied to the top 24 most highly expressed miRNA in mouse and bovine lactating mammary glands. miRNA targets were predicted with high accuracy based on DIANA-microT-CDS [48]. Targets of putative novel miRNA were predicted using TargetScanMouse Custom release 5.2 [5] and then their functional analysis was performed using DAVID Bioinformatics Tools [49,50].

Results and Discussion

Characterisation of lactating mouse and bovine mammary gland miRNomes

Four libraries were constructed using small RNA isolated from lactating mouse (2) and bovine (2 pools of 2 cows) mammary glands and sequenced using Illumina/Solexa technology. More than 10 million reads were obtained from each library (Table 1). After removing the poly-A stretches, 9.26 and 10.51 million reads of 17–28 nt on average for the two samples of each species, were obtained from the mice and bovine libraries, respectively (Table 1). These clean and sized reads corresponded to 86.1% and 91.9% of mouse and bovine reads, respectively. They were mapped to the mouse (GRCm38.71) and bovine (UMD3.1.71) genomes and aligned against miRBase (version 20.0). 62,046 and 46,169 unique sequences were identified in mouse and bovine samples, respectively, corresponding to three categories based on their hits: (i) known miRNA in the species, corresponding to 824 and 487 in mouse and bovine, respectively; (ii) novel miRNA in the species, but also identified in other species, corresponding to 1 and 167 miRNA in mouse and bovine, respectively; and (iii) predicted novel miRNA corresponding to 126 and 679 miRNA in mouse and bovine, respectively (Figure 1A, Table S2). The quantity of predicted novel miRNA and of miRNA identified in other species but unknown in the sequenced species, was more important in bovine than in mouse and this could probably be explained by the smaller number of studies performed in bovine than in the mouse. However, the number of predicted novel mouse miRNA identified here (126) remained substantial. Our data also significantly increased knowledge of bovine miRNA and the number of miRBase entries. However, in both species, predicted novel miRNA and known miRNA in other species were represented by a small number of read counts in most of cases, and only a very small percentage of reads (0.9 to 0.1%), confirming that the use of NGS technology allowed results close to the complete miRNA profile. However, deeper sequencing would be able to reveal more low abundant miRNA.

In a recent study, Mullokandov *et al.* [51] showed that miRNA representing less than 100 reads per million (RPM) are unlikely to be functionally relevant and they found that the majority of suppressed sensors correspond to miRNA or miRNA families expressed above 1,000 RPM. Only a small number of miRNA were expressed at a sufficient concentration to mediate sensor regulation.

Reads representing more than 100 RPM in at least one of the four libraries corresponded to 164 and 167 miRNA in mouse and

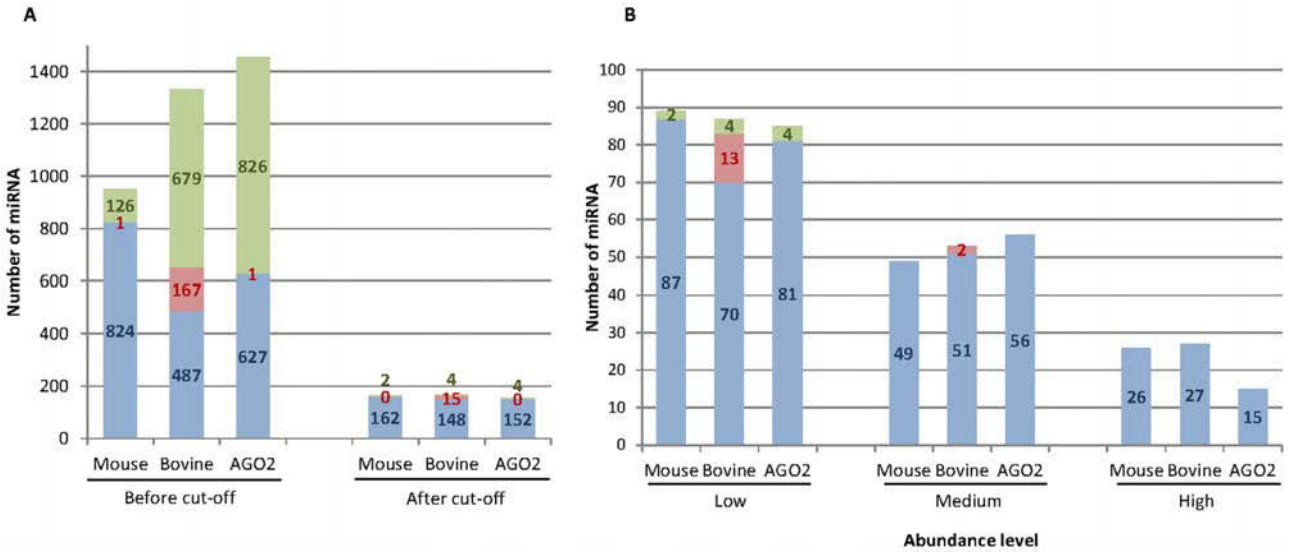


Figure 1. Characterisation of mouse and bovine lactating mammary gland libraries. A. miRNA identification in mouse and bovine lactating mammary glands. Unique sequences in mouse, bovine and AGO2-miRNomes were identified and classified in three categories according to their hits: (i) known miRNA in the species (blue), (ii) miRNA identified in other species (red) and (iii) predicted novel miRNA (green). Numbers of miRNA are presented before and after applying the 100 RPM cut-off point. **B. Distribution of miRNA according to their abundance in mouse and bovine lactating mammary glands.** The miRNA were classified in three categories: low, 100≤miRNA<1,000 RPM; medium, 1,000≤miRNA<10,000 RPM; and high, miRNA≥10,000 RPM.
doi:10.1371/journal.pone.0091938.g001

bovine, respectively (Figure 1A). Application of this threshold resulted in the elimination of a significant number of miRNA, which accounted for only 0.5% and 0.6% of the reads in mouse and bovine, respectively. Mullokandov *et al.* [51] precised that as the targets of one miRNA are subject to regulation by all family members, the cumulative concentration of an entire miRNA family could be considered. By pooling miRNA sharing seeds, the number of different seed sequences reaching 1,000 RPM corresponds to 50 in each of the species (Table S3), which probably represent the major part of miRNA with suppressive activity.

In each miRNome, the miRNA could be classified as a function of their abundance (Figure 1B). Twenty six and 27 miRNA were highly expressed with more than 10,000 RPM, which constituted 78.1% and 76.6% of the total reads in mouse and bovine, respectively. Forty nine and 53 miRNA in mouse and bovine, respectively, were expressed at moderate levels of between 1,000 and 10,000 RPM. Eighty nine and 87 miRNA in mouse and bovine, respectively, were expressed at low levels of between 100 and 1,000 RPM. All predicted novel miRNA were expressed with a low abundance.

Comparison of mouse and bovine lactating mammary gland miRNomes

One purpose of the present study was to evaluate miRNome conservation between mouse and bovine mammary glands during lactation. By comparing the two miRNomes, 123 miRNA were

Table 1. Summary of sequencing data lactating mouse, bovine and AGO2 mammary gland miRNA libraries.

	Mouse		Bovine		AGO2	
	Sample 1	**Sample 2**	**Sample 1**	**Sample 2**	**Sample 1**	**Sample 2**
Raw reads	10,782,945	10,738,221	10,847,425	12,034,673	12,940,967	13,643,425
Clean reads[a]	9,909,832	8,760,102	9,951,849	11,245,052	5,485,346	7,610,033
Sized reads[b]	9,817,286	8,708,817	9,877,580	11,149,432	5,307,791	7,368,804
All unique sequences corresponding to sized reads	128,806	90,569	97,136	111,437	55,616	305,201*
Mapped reads[c]	9,369,334	8,402,247	9,549,490	10,802,108	4,674,418	6,508,282
Unique sequences corresponding to mapped reads	72,653	51,438	40,750	51,587	26,843	230,688*

[a]poly-A stretches removed.
[b]17–28 nt size filtering,reads used by miRDeep2 quantification process.
[c]reads with at least one and at most five reported alignments, used by the miRDeep2 prediction process.
* In AGO sample 2, many reads below 10 counts were present, subsequently discarded by miRDeep2 processes.
doi:10.1371/journal.pone.0091938.t001

found to be present in both species (Table S2). Moreover, 41 (39 known and 2 predicted novel) miRNA were detected in mouse but not in bovine and 44 (40 known and 4 predicted novel) miRNA were detected in bovine, but not in mouse. The number of miRNA exclusive to one of these two species, in this study, appeared high, but more than 80% of them had a low expression level and represented fewer than 0.6% of the reads.

Deep sequencing can reliably profile miRNA abundance relative to total miRNA, and its normalisation enables comparison of the ranking of miRNA expression between different samples. The mouse and bovine miRNA abundance profiles were strongly conserved with a correlation of ranks of 0.72. However, few exceptions with different ranks of expression between species were observed. For example, *miR-146b-5p* and *miR-378a-3p* were highly expressed in mouse but they were present at a low level of expression in bovine; inversely, *miR-199b-5p*, *miR-423-5p* and *miR-193a-5p* were weakly expressed in mouse but highly in bovine (Table S2).

We can hypothesized that the miRNome differences observed between mouse and bovine could be the existence of inherent species differences [52]; for example differences in the relative proportion of secretory epithelium and adipocytes in cow *versus* mouse. To attenuate this point, the characterisation was performed on mammary gland from lactating animals, at which time the organ is mainly composed of mammary epithelial cells in both species. Moreover, cattle have been selected for sustained milk production, and this could explain some of the miRNome differences observed *versus* the mouse data. Although the data were obtained using the same procedure and the same bioinformatics and biostatistical analyses during this study, we could not exclude the possibility that such differences might be due to technical biases [53,54,55] or to the RNA isolation methods used.

Amongst the 30 most expressed miRNA in each miRNome, six miRNA were present only in the mouse top 30, and six others in the bovine top 30 (Figure 2). Among them, four miRNA (*miR-29b-3p*, *miR-181a-5p*, *miR-181b-5* and *miR-451a-5p*) and five miRNA (*miR-20a-5p*, *miR-23b-3p*, *miR-26b-5p*, *miR-99a-5p* and *miR-199a-3p*) in the mouse and bovine, respectively, were expressed in the other species with moderate (over 10,000 reads) to high abundance (Table S2). 24 miRNA were common to both species (Figure 2) and, in order to estimate their impact to the lactation process, their presence was compared with the 30 miRNA most highly expressed from different organs, from published data obtained with the high-throughput sequencing technology (Table S4, Figure S2). Fifteen of them were present in the top 30 of several tissues such as brain, muscle, liver, lung or endometrium (in bold in Table S4). Most of these 15 had already been defined as abundant and ubiquitously expressed miRNA by Landgraf *et al.* [56] in their foundation work on the mammalian miRNA expression atlas. These 15 miRNA may be important regulators of fundamental and common biological processes and we can hypothesise that they are involved in basic processes of mammary gland biology but not necessarily in its specific functions, such as milk component synthesis or secretion. For example, six are members of the *let-7* gene family known to be ubiquitously expressed and involved in regulating cell proliferation and differentiation (reviewed in [57]). Among the 24 common miRNA, seven other miRNA (*miR-16-5p*, *miR-23a-3p*, *miR-126-5p*, *miR-126-3p*, and three members of the *miR-200* family (*miR-200a-3p*, *miR-200b-3p*, *miR-200c-3p*)) were mainly detected in the top 30 of different epithelial tissues, such as kidney, lung or endometrium (Table S4, Figure S2), suggesting that they could be involved in physiological processes linked to epithelial cell functions. Indeed, the importance of the *miR-200* family to normal mammary gland development was recently reported by Chang *et al.* [28] and Nagaoka *et al.* [58]. Moreover two miRNA (*miR-22-3p* and *miR-141-3p)* were only detected among the 24 common miRNA of our studies on the mammary gland, thus suggesting the value of further investigating their role. The expression of the seven miRNA detected in the top 30 of epithelial tissues and the two miRNA expressed only in mammary gland (*miR-22-3p* and *miR-141-3p*) were compared with those on published non-lactating mammary gland miRNomes generated from several species (bovine [40], caprine [38,39,41] and human [59]) using the same NGS technology. Six of them (*miR-126-5p*, *miR-16-5p*, and members of the *miR-200* family (*miR-141-3p*, *miR-200a-3p*, *miR-200b-3p*, *miR-200c-3p*)) were not present amongst the 30 highly abundant miRNA in non-lactating miRNomes. It can therefore be suggested that these six miRNA may have functions linked to the lactation process. It would be interesting to investigate their function further in order to confirm this hypothesis.

Characterisation of AGO2-miRNome in lactating mouse mammary gland

In mouse lactating mammary gland, miRNA associated with AGO2 protein (AGO2-miRNome) were exhaustive described on small RNA isolated by co-immunoprecipitation using anti-AGO2 antibody (Figure S3) and deep sequencing. Two libraries from two animals were produced and an average of more than 13 million reads was obtained (Table 1). The data were analysed as described previously. After cleaning and sizing, 6.34 million reads of 17–28 nt were obtained. Around 50% of these reads were eliminated. This percentage was high, and in line with the results obtained by immunoprecipitation using the anti-AGO protein approach [60]. After normalisation and applying a cut-off point at 100 RPM, 152 known miRNA and four predicted novel miRNA were identified (Figure 1A). The miRNA were distributed between different levels of abundance (Figure 1B), which showed that 15 of them were highly expressed.

The mouse miRNome from the total RNA was then compared with the AGO2-miRNome. Before the 100 RPM cut-off point was applied, the lists of the miRNA were not identical. In fact, some miRNA identified in the mouse mammary gland miRNome were not found in the AGO2-miRNome and conversely (Table S2). The difference occurred on miRNA with a low reads: all miRNA identified after application of the cut-off point in one miRNome were present in the other miRNome but some of them were expressed below 100 RPM (Table S5). Some of this difference could be explained by a lower concentration of total RNA in the immunoprecipitated samples than that obtained from the organ, which impacted the composition of the libraries.

For each miRNA, AGO2-RISC loading was characterised by the comparing of the read counts after normalisation of the whole and AGO2-miRNomes. For example, miRNA expressed with the same number of counts in the two miRNomes were considered to be fully loaded in AGO2-RISC. The miRNA were classified according to their percentage loading in AGO2-RISC (Table S5). Eighty seven miRNA were expressed at the same levels in AGO2- and whole miRNomes (Figure 3). Sixty miRNA were significantly less loaded (or depleted) in AGO2-RISC (p-value$<$0.05), including seven that were loaded at less than 10% (*miR-674-5p*, *miR-34c-5p*, *miR-196a-5p*, *let-7j-5p*, *miR-34a-5p*, *let-7d-5p* and *miR-185-5p*). Thirty eight were present with more counts in the AGO2- compared with the whole miRNomes. As observed by Burroughs *et al.* [18], our data suggests that each miRNA would not be loaded in an equivalent way in the AGO-RISC. In our study, miRNA enriched or depleted in AGO2-RISC were not the same as those seen in human THP-1 cells [18], showing that the enrichment and depletion processes are dependent on the biological context.

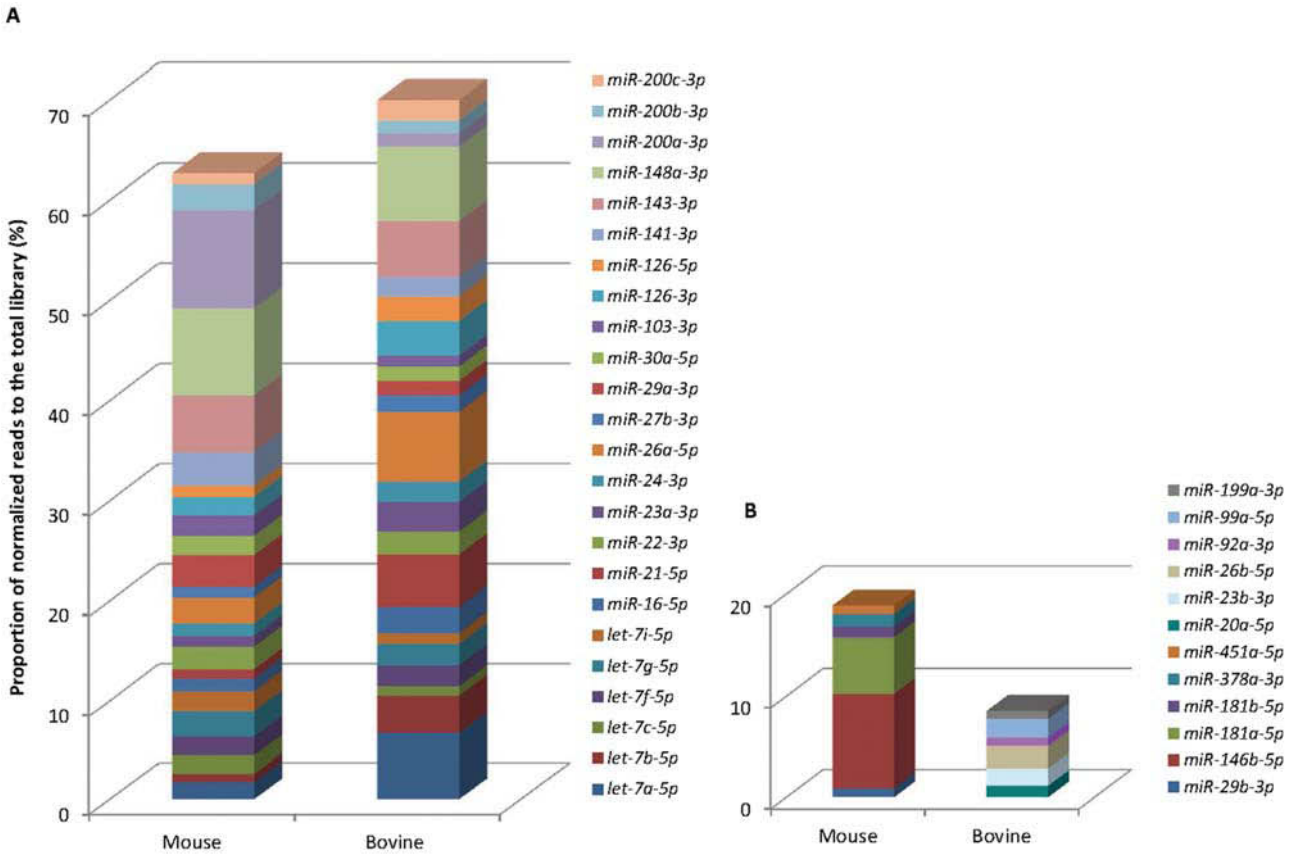


Figure 2. The top 30 most highly expressed miRNA in mouse and bovine lactating mammary glands. Representation of the percentage of normalised reads in the total library of the 24 miRNA common to the mouse and bovine species (**A**) and of the six miRNA present in only one species (**B**).
doi:10.1371/journal.pone.0091938.g002

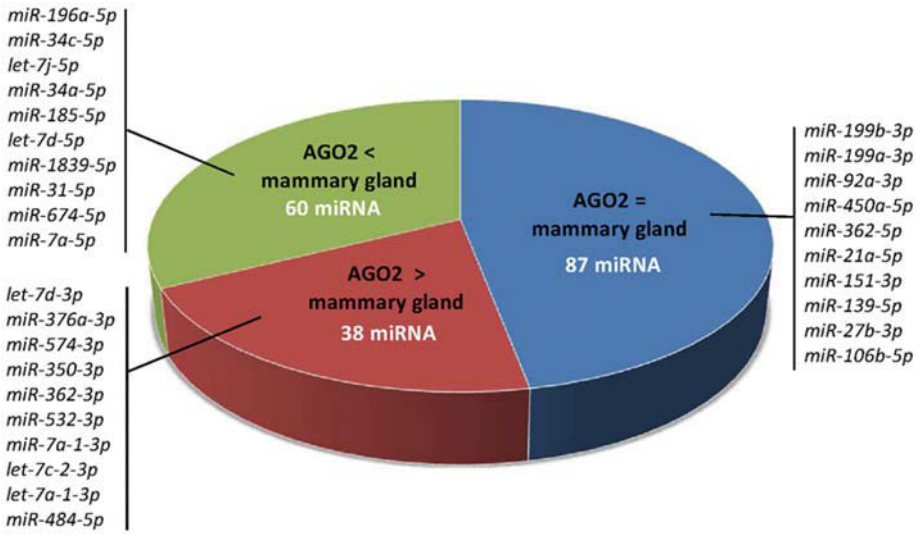


Figure 3. Characterisation of mouse AGO2-RISC loading. Proportion of miRNA expressed with an equivalent (=) or a different (> or <) abundance in AGO2-RISC and mammary gland miRNomes. A few representative examples are presented for each category and the complete data are listed in Table S5.
doi:10.1371/journal.pone.0091938.g003

Identification of putative novel microRNA

The NGS technology also constitutes a powerful tool to identify novel miRNA. Using the miRDeep2 package, 126 and 679 novel miRNA were predicted in the mouse and bovine miRNomes, respectively. However, after a cut-off point was applied at 100 RPM, only two and four predicted novel miRNA (Table 2, Figure 4) were retained in the mouse and bovine, respectively. They were expressed at low levels which could explain why they had not been described previously. Moreover, four predicted novel miRNA (after the cut-off at 100 RPM) were detected in the AGO2-miRNome. As mentioned by Burroughs *et al.* [18], the presence of mRNA and small RNA other than miRNA, in immunoprecipited samples, is important. For this reason, filters for different contaminants following the miRDeep2 analysis were added. Two of the four novel miRNA initially predicted from AGO2 samples corresponded to an mRNA and an snRNA. The other two predicted novel miRNA were present in the mouse

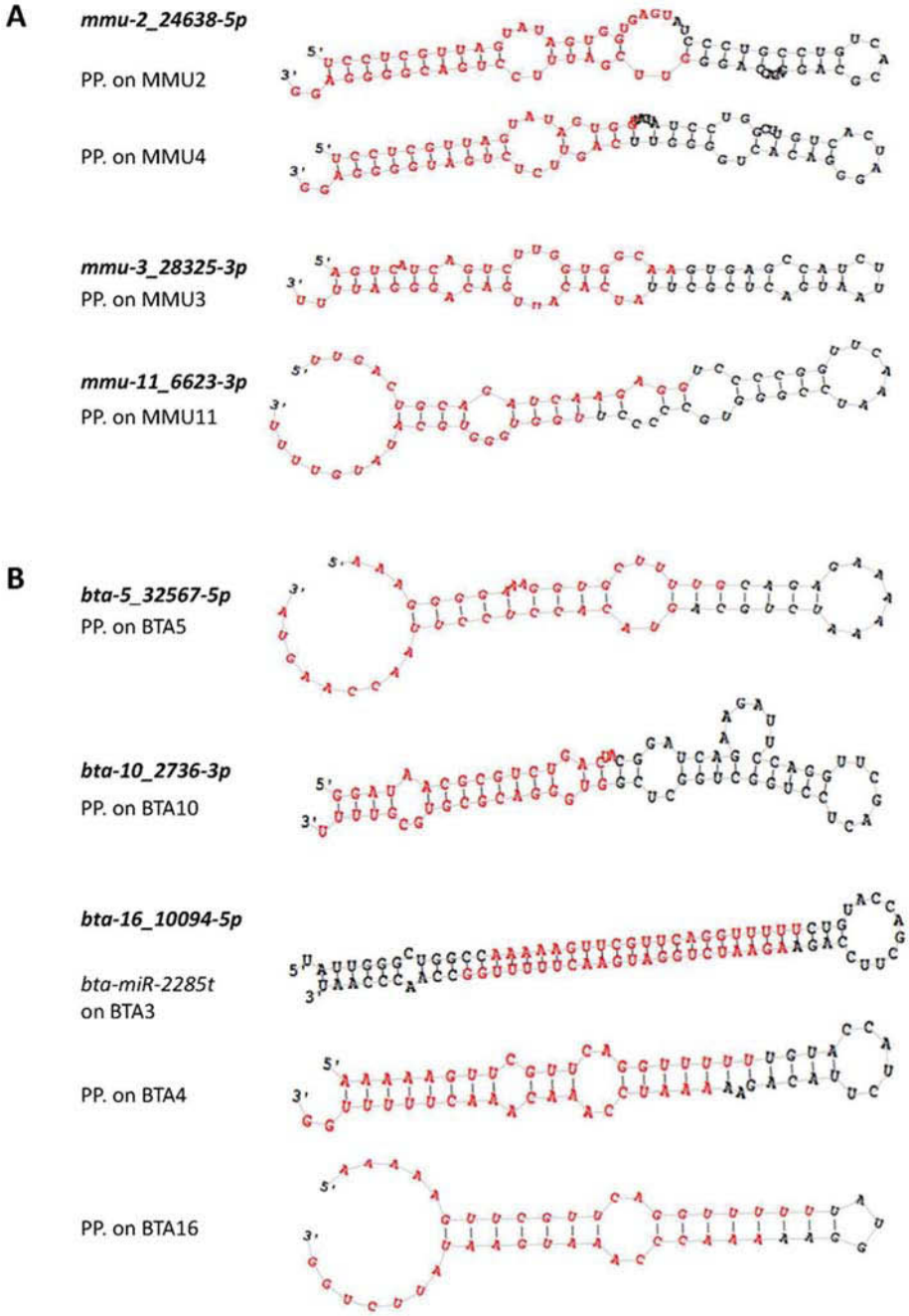


Figure 4. Predicted precursor structures of mouse (A) and bovine (B) predicted novel miRNA. Secondary structures of predicted precursor (PP) hairpins corresponding to seven predicted novel miRNA identified in this study using miRDeep2 software. The predicted miRNA mature sequences -5p and -3p are highlighted in red. Several putative precursors were located for three of them.
doi:10.1371/journal.pone.0091938.g004

Table 2. Predicted novel mouse and bovine miRNA.

miRNome	Name	Sequence with predicted seed	Read counts	miRDeep2 score	Example miRBase miRNA with the same seed
Mouse	*mmu-3_28325-3p*	A**UCACAUU**GACAGGGAUUUU	1,165	3.5	*mmu-miR-23a-3p*
	mmu-11_6623-3p	U**GGUGGGU**GCAUAUGUUUU	3,204	5.1	*aly-miR294a-3p*
Bovine	*bta-5_32567-5p*	A**AAGGGGA**AAGGUGCUUUUG	7,442	3.5	*cin-miR-4005b-3p*
	bta-10_2736-3p	G**UGGGACG**CGUGCGUUUU	7,790	1.2	*gga-miR-1670*
	bta-16_10094-5p	A**AAAAGUU**CGUUCAGGUUUUU	2,047	4.2	*bta-miR-2284j*
	bta-16_10667-5p	C**AUUGGUG**GUUCAGUGGU	1,628	4.8	*zma-miR171c-5p*
AGO2	*mmu-2_24638-5p*	U**CCUCGUU**AGUAUAGUGGUGAGU	727	1.1	*nve-miR-2033-3p*
	mmu-3_28325-3p	A**UCACAUU**GACAGGGAUUUU	2,054	3.5	*mmu-miR-23a-3p*

In bold type: seed.
doi:10.1371/journal.pone.0091938.t002

miRNome, but only one was retained because the other was expressed below 100 RPM.

If we considered the predicted novel miRNA present in at least one miRNome after application of the cut-off point at 100 RPM, we were able to detect three and four different predicted novel miRNA in the mouse and bovine, respectively. Moreover, three of them (*mmu-2_24638-5p*, *bta-16_10094-5p*, *bta-16_10667-5p*) were localised in several genomic positions, thus corresponding to several potential new precursors (Figure 4).

The evolution of novel miRNA families is intimately linked to that of novel cell types associated with highly specialised biological functions [61]. They may provide an important substrate for the emergence of new regulatory activities, with a higher degree of tissue specificity and lower level of expression [62]. Because the mammary gland is an evolutionarily a recent organ, and lactation is one of the most remarkable products of evolution, the predicted novel miRNA described in this study could correspond to tissue-specific miRNA of importance to the functioning of this organ.

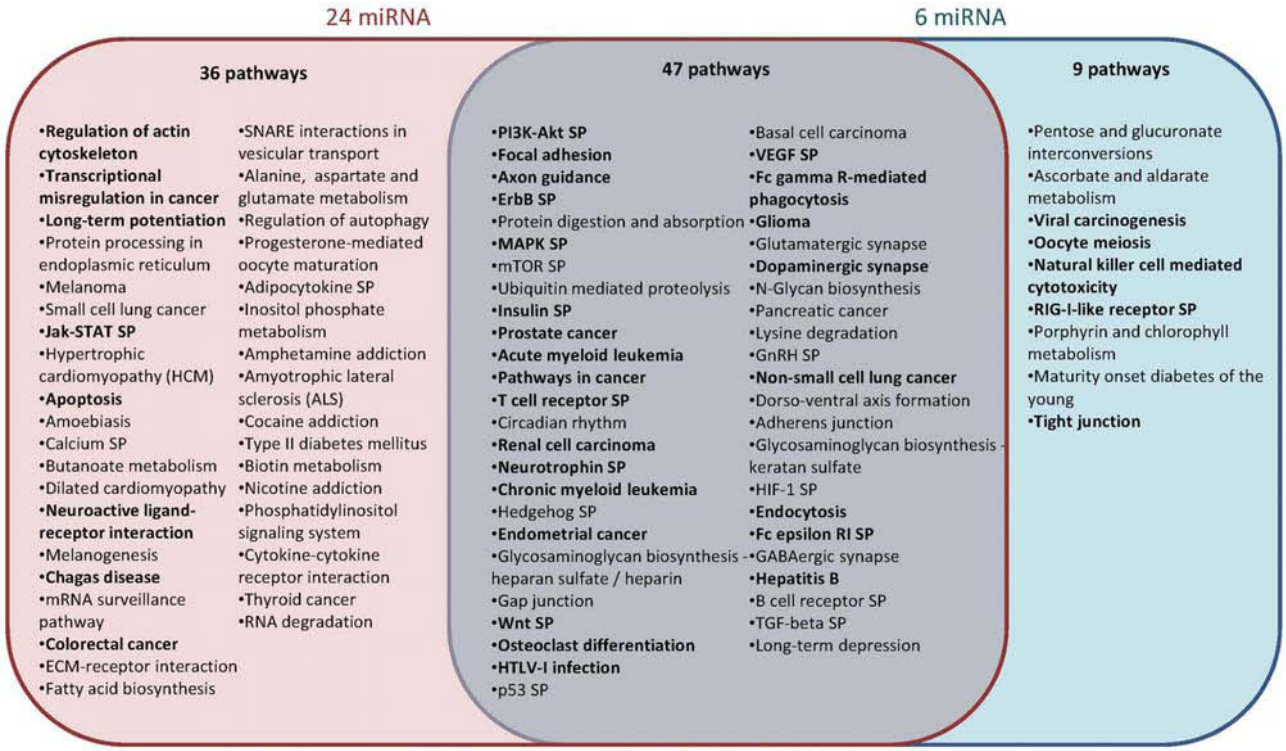


Figure 5. Pathways targeted by the miRNA highly expressed in mouse and bovine mammary glands. KEGG function annotations, ordered by ascending p-values (<0.05, Table S6), for the 24 miRNA in the top 30 common to mouse and bovine and the six miRNA highly expressed in lactating but not non-lactating mammary glands. Biological processes targeted by 23 or 24/24 miRNA and 6/6 miRNA are indicated in bold type. SP, signaling pathway.
doi:10.1371/journal.pone.0091938.g005

Among the seven novel miRNA predicted in this study, five contained a seed that already exists in known miRNA. Two novel miRNA displayed significant homology to those known in the species (*mmu-3_28325-3p* to *mmu-miR-23a-3p* and *bta-16_10094-5p* to *bta-miR-2284j*). miRNA *mmu-3_28325-3p* was also present in the AGO2-miRNome, which is a further argument to support the idea that this miRNA is not a false positive miRNA. Moreover, *miR-23a* has been described as being involved in the processes of EMT [63] or apoptosis [64]. As these processes are important in the mammary gland biology, the role of *mmu-3_28325-3p*, it would be interesting to investigate this feature further. Furthermore, the miRDeep2 data results specified that miRNA *bta-16_10094-5p* miRNA is perfectly aligned to the 5′ position of the known precursor *bta-miR-2285t* (miRBase reference MI0022348; data not shown), for which only the mature 3p is currently described. Thereby, this predicted novel bovine miRNA appears to be a member of the *bta-miR-2284/2285* bovine-specific family, which has more than 40 members spanning the entire bovine genome [65,66].

miRNA target gene predictions and KEGG pathway analysis

To investigate the functional role of the 24 common miRNA highly expressed in bovine and mouse mammary glands during lactation, target gene predictions were performed based on miRNA/mRNA interactions using Diana-microT v3.0. The predicted target genes were classified according to KEGG function annotations which allowed the identification of 83 biological processes with a p-value$<$0.05 (Figure 5 and Table S6). The most enriched signalling pathways were found to be the PI3K-Akt, MAPK, insulin, Wnt and calcium pathways. Focal adhesion, axon guidance and ubiquitin mediated proteolysis were identified as being some of the most targeted functions by these 24 miRNA (Figure 5). Genes involved in cellular structure (gap junction, focal adhesion and adherens junction) also seemed to be preferentially targeted by these miRNA.

As for the miRNA highly expressed during lactation but not during non-lactating stages, the same types of analysis were performed on the six miRNA identified (*miR-126-5p*, *miR-16-5p*, *miR-141-3p*, *miR-200a-3p*, *miR-200b-3p*, *miR-200c-3p*). KEGG annotation identified 56 biological processes with a p-value$<$0.05, including 47 pathways common to the previous analysis. Some pathways, involved in important functions in the mammary gland (protein processing in the endoplasmic reticulum, the Jak-STAT signalling pathway, apoptosis, the calcium signaling pathway, ECM-receptor interaction or cytokine-cytokine receptor interaction) were predicted as targeted by the 24 miRNA, but they were not detected using the six miRNA found to be highly expressed during lactation but not during non-lactation stages. Moreover, five pathways significantly targeted by these six miRNA only were identified and included the tight junction pathway involved in cellular structure. Some genes in this pathway important to mammary gland biology, such as *Pten*, *Ocln* and *Gnai*, were identified as being targeted by more than one of the six miRNA.

Highly expressed miRNA seemed to be involved in pathways important to mammary gland biology, and better characterisation of their expression profiles in terms of physiological status will enable a refinement of their function.

Regarding the seven predicted novel miRNA, their gene targets and functions were also predicted. In all cases, some important pathways (Table S7) in mammary gland function, such as the Wnt signalling pathway or apoptosis, were identified. Several genes involved in "mammary gland development" or "lactation" (*Chuk*, *Ccnd1*, *Met*, *Prlr*, *Stat5b*, *Elf5*, *Tgfbr2*) were targeted by *mmu-3_28325-3p*. Moreover, other genes involved in "mammary gland morphogenesis" (*Notch1*, *Sox9*, *Areg*, *Btrc*, *Esr1*, *Igf1*, *Igf1r*, *Nr3c1*, *Pax6*, *Trp63*) or "mammary gland epithelial cell proliferation" (*Sox9*, *Areg*, *Btrc*, *Col8a1*, *Esr1*) were targeted by *bta-16_10094-5p*. These results suggest that the predicted novel miRNA *mmu-3_28325-3* and *bta-16_10094-5p* are likely to play a key role in the biology of the mammary gland.

Conclusion

This study constitutes the first report of multispecies (mouse and bovine) mammary miRNomes in the context of lactation and the identification of some species-specific miRNA involved in this fundamental biological function. The miRNomes were completed by characterisation of an exhaustive list of miRNA present in mouse AGO2-RISC. The miRNomes generated will be used as a reference for further studies during which the impact of breeding on these miRNomes will be evaluated. The data obtained here are also important and essential to the next stage of this research, which will focus on the functional characterization of miRNA in the mammary gland during lactation.

Supporting Information

Figure S1 Flow charts of data processing steps. Flow charts for (**A**) the creation of a new miRNA reference dataset, (**B**) the quantification of all sample and (**C**) the filtering and cleaning of raw outputs. For each step (in dotted borders) the input, work flow and output are shown. Files are presented in rectangular boxes; processes are presented in rounded boxes. MirDeep2 internal processes and output files are in orange. Original reference files are in blue, while new files produced by our process (in black) are in green. The file formats are: .fa, fasta; .arf, arf mapping format; .mrd, miRDeep2 text output; .csv, csv spreadsheet.
(TIF)

Figure S2 Expression of 3 miRNA of the top 30 most highly expressed miRNA in epithelial and non-epithelial tissues confirming NGS data. Relative expression of *miR-200a-3p* (TaqMan® ID 000502, Applied Biosystems), *miR-26a-5p* (TaqMan® ID 000405) and *let-7c-5p* (TaqMan® ID 000379) were determined by RT-qPCR, on Mastercycler RealPlex 4 (Eppendorf®), in epithelial (mammary gland at lactation day-12 (MG) and kidney (K)) and non-epithelial (brain (B) and liver (L)) mouse tissue samples. miRNA expression were normalized to U6 expression (TaqMan ® ID 001973). Values are means ± S.E. (n = 3 technical repetitions on 3 different individuals).
(TIF)

Figure S3 AGO2 enrichment after immunoprecipitation (IP). Anti-Ago2 Western-blot on an 10% Bis-acrylamide Tris gel (EIF2C2 monoclonal antibody (M01), clone 2E12-1C9, Cat. No. H00027161-M01, Abnova). Endogenous mouse AGO2 protein weight: 97 kDa. 1, 2 and 3: mammary gland lysates of 3 samples (input fractions, 50 µg per lane); 4 and 5: IP fractions of 2 samples ($<$5 µg per lane).
(TIF)

Table S1 Barcode sequences attached to the 5′-end of the cDNA used for the libraries preparation and sequencing.
(DOCX)

Table S2 Quantification (normalized sequencing reads) of known miRNA in the species (A) or in other species (B) and predicted novel miRNA (C) in mouse, AGO2 and bovine miRNomes of lactating mammary gland.
(DOCX)

Table S3 miRNA sharing identical seeds reaching cumulative 1,000 RPM threshold in lactating mouse and bovine mammary miRNomes.
(DOCX)

Table S4 Tissues expression of the 24 common miRNA of the top 30 most expressed miRNA in bovine and mouse mammary glands. All the data considered for this comparison have been obtained by NGS technology on organs. **References** : Brain [67]; Endometrium [68]; Lung [69]; Muscle [70]; Liver [71]; Kidney [72]; Bladder [73]; Stomach [74]; Heart [75].
(DOCX)

Table S5 AGO2-RISC loading (p-value<0.05) of the 185 miRNA expressed in the mouse miRNome and AGO2-miRNome: (**A**) miRNA showing statistical equivalent abundances into both miRNomes, (**B**) miRNA significantly enriched in AGO2-RISC and (**C**) miRNA significantly less loaded in AGO2-RISC.
(DOCX)

Table S6 Pathways targeted by miRNA highly expressed in mouse and bovine mammary gland.
(DOCX)

Table S7 Major pathways targeted by the predicted novel miRNA highly expressed in mouse and bovine mammary gland.
(DOCX)

Acknowledgments

We are grateful to D. Milenkovic, M. Jansa-Perez and V. Hawken for their critical reading of the manuscript. We also thank J. Domagalski for bovine RNA extractions and J. Castille for technical assistance.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: SLG CL FLP. Performed the experiments: SLG JL. Analyzed the data: SLG SM DL CL FLP. Contributed reagents/materials/analysis tools: SLG JL SM DL. Wrote the paper: SLG LM CL FLP.

References

1. Valencia-Sanchez MA, Liu J, Hannon GJ, Parker R (2006) Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. Genes Dev 20: 515–524.
2. Bartel DP (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. Cell 136: 215–233.
3. Ameres SL, Zamore PD (2013) Diversifying microRNA sequence and function. Nat Rev Mol Cell Biol 14: 475–488.
4. Berezikov E, Guryev V, van de Belt J, Wienholds E, Plasterk RH, et al. (2005) Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes. Cell 120: 21–24.
5. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP (2009) Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. Genome Res 19: 92–105.
6. Ambros V (2004) The functions of animal microRNAs. Nature 431: 350–355.
7. Song L, Tuan RS (2006) MicroRNAs and cell differentiation in mammalian development. Birth Defects Res C Embryo Today 78: 140–149.
8. Sun K, Lai EC (2013) Adult-specific functions of animal microRNAs. Nat Rev Genet 14: 535–548.
9. Wilfred BR, Wang WX, Nelson PT (2007) Energizing miRNA research: a review of the role of miRNAs in lipid metabolism, with a prediction that miR-103/107 regulates human metabolic pathways. Mol Genet Metab 91: 209–217.
10. Lynn FC (2009) Meta-regulation: microRNA regulation of glucose and lipid metabolism. Trends Endocrinol Metab 20: 452–459.
11. Esau C, Davis S, Murray SF, Yu XX, Pandey SK, et al. (2006) miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. Cell Metab 3: 87–98.
12. Moore KJ, Rayner KJ, Suarez Y, Fernandez-Hernando C (2010) microRNAs and cholesterol metabolism. Trends Endocrinol Metab 21: 699–706.
13. Ambros V (2011) MicroRNAs and developmental timing. Curr Opin Genet Dev 21: 511–517.
14. Pillai RS, Bhattacharyya SN, Artus CG, Zoller T, Cougot N, et al. (2005) Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. Science 309: 1573–1576.
15. Wang Y, Juranek S, Li H, Sheng G, Tuschl T, et al. (2008) Structure of an argonaute silencing complex with a seed-containing guide DNA and target RNA duplex. Nature 456: 921–926.
16. Hutvagner G, Simard MJ (2008) Argonaute proteins: key players in RNA silencing. Nat Rev Mol Cell Biol 9: 22–32.
17. Beitzinger M, Meister G (2011) Experimental identification of microRNA targets by immunoprecipitation of Argonaute protein complexes. Methods Mol Biol 732: 153–167.
18. Burroughs AM, Ando Y, de Hoon MJ, Tomaru Y, Suzuki H, et al. (2011) Deep-sequencing of human Argonaute-associated small RNAs provides insight into miRNA sorting and reveals Argonaute association with RNA fragments of diverse origin. RNA Biol 8: 158–177.
19. Dueck A, Ziegler C, Eichner A, Berezikov E, Meister G (2012) microRNAs associated with the different human Argonaute proteins. Nucleic Acids Res 40: 9850–9862.
20. Matkovich SJ, Van Booven DJ, Eschenbacher WH, Dorn GW 2nd (2011) RISC RNA sequencing for context-specific identification of in vivo microRNA targets. Circ Res 108: 18–26.
21. Le Quesne J, Caldas C (2010) Micro-RNAs and breast cancer. Mol Oncol 4: 230–241.
22. Anderson SM, Rudolph MC, McManaman JL, Neville MC (2007) Key stages in mammary gland development. Secretory activation in the mammary gland: it's not just about milk protein synthesis! Breast Cancer Res 9: 204.
23. Hennighausen L, Robinson GW (2005) Information networks in the mammary gland. Nat Rev Mol Cell Biol 6: 715–725.
24. Capuco AV, Wood DL, Baldwin R, McLeod K, Paape MJ (2001) Mammary cell number, proliferation, and apoptosis during a bovine lactation: relation to milk production and effect of bST. J Dairy Sci 84: 2177–2187.
25. Ucar A, Vafaizadeh V, Jarry H, Fiedler J, Klemmt PA, et al. (2010) miR-212 and miR-132 are required for epithelial stromal interactions necessary for mouse mammary gland development. Nat Genet 42: 1101–1108.
26. Ibarra I, Erlich Y, Muthuswamy SK, Sachidanandam R, Hannon GJ (2007) A role for microRNAs in maintenance of mouse mammary epithelial progenitor cells. Genes Dev 21: 3238–3243.
27. Greene SB, Gunaratne PH, Hammond SM, Rosen JM (2010) A putative role for microRNA-205 in mammary epithelial cell progenitors. J Cell Sci 123: 606–618.
28. Chang CJ, Chao CH, Xia W, Yang JY, Xiong Y, et al. (2011) p53 regulates epithelial-mesenchymal transition and stem cell properties through modulating miRNAs. Nat Cell Biol 13: 317–323.
29. Le Guillou S, Sdassi N, Laubier J, Passet B, Vilotte M, et al. (2012) Overexpression of miR-30b in the developing mouse mammary gland causes a lactation defect and delays involution. PLoS One 7: e45727.
30. Avril-Sassen S, Goldstein LD, Stingl J, Blenkiron C, Le Quesne J, et al. (2009) Characterisation of microRNA expression in post-natal mouse mammary gland development. BMC Genomics 10: 548.
31. Sdassi N, Silveri L, Laubier J, Tilly G, Costa J, et al. (2009) Identification and characterization of new miRNAs cloned from normal mouse mammary gland. BMC Genomics 10: 149.
32. Wang C, Li Q (2007) Identification of differentially expressed microRNAs during the development of Chinese murine mammary gland. J Genet Genomics 34: 966–973.
33. Gu Z, Eleswarapu S, Jiang H (2007) Identification and characterization of microRNAs from the bovine adipose tissue and mammary gland. FEBS Lett 581: 981–988.
34. Wang M, Moisa S, Khan MJ, Wang J, Bu D, et al. (2012) MicroRNA expression patterns in the bovine mammary gland are affected by stage of lactation. J Dairy Sci 95: 6529–6535.
35. Galio L, Droineau S, Yeboah P, Boudiaf H, Bouet S, et al. (2013) MicroRNA in the ovine mammary gland during early pregnancy: spatial and temporal expression of miR-21, miR-205, and miR-200. Physiol Genomics 45: 151–161.
36. Huang J, Ju Z, Li Q, Hou Q, Wang C, et al. (2011) Solexa sequencing of novel and differentially expressed microRNAs in testicular and ovarian tissues in Holstein cattle. Int J Biol Sci 7: 1016–1026.
37. Chen X, Li Q, Wang J, Guo X, Jiang X, et al. (2009) Identification and characterization of novel amphioxus microRNAs by Solexa sequencing. Genome Biol 10: R78.
38. Ji Z, Wang G, Xie Z, Zhang C, Wang J (2012) Identification and characterization of microRNA in the dairy goat (Capra hircus) mammary gland by Solexa deep-sequencing technology. Mol Biol Rep 39: 9361–9371.

39. Ji Z, Wang G, Xie Z, Wang J, Zhang C, et al. (2012) Identification of Novel and Differentially Expressed MicroRNAs of Dairy Goat Mammary Gland Tissues Using Solexa Sequencing and Bioinformatics. PLoS One 7: e49463.
40. Li Z, Liu H, Jin X, Lo L, Liu J (2012) Expression profiles of microRNAs from lactating and non-lactating bovine mammary glands and identification of miRNA related to lactation. BMC Genomics 13: 731.
41. Li Z, Lan X, Guo W, Sun J, Huang Y, et al. (2012) Comparative transcriptome profiling of dairy goat microRNAs from dry period and peak lactation mammary gland tissues. PLoS One 7: e52388.
42. Farr VC, Stelwagen K, Cate LR, Molenaar AJ, McFadden TB, et al. (1996) An improved method for the routine biopsy of bovine mammary tissue. J Dairy Sci 79: 543–549.
43. Friedlander MR, Mackowiak SD, Li N, Chen W, Rajewsky N (2012) miRDeep2 accurately identifies known and hundreds of novel microRNA genes in seven animal clades. Nucleic Acids Res 40: 37–52.
44. Anders S, Huber W (2010) Differential expression analysis for sequence count data. Genome Biol 11: R106.
45. Rau A, Gallopin M, Celeux G, Jaffrezic F (2013) Data-based filtering for replicated high-throughput transcriptome sequencing experiments. Bioinformatics 29: 2146–2152.
46. Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. J Roy Stat Soc Ser B (Methodological) 57: 289–300.
47. Vlachos IS, Kostoulas N, Vergoulis T, Georgakilas G, Reczko M, et al. (2012) DIANA miRPath v.2.0: investigating the combinatorial effect of microRNAs in pathways. Nucleic Acids Res 40: W498–504.
48. Maragkakis M, Reczko M, Simossis VA, Alexiou P, Papadopoulos GL, et al. (2009) DIANA-microT web server: elucidating microRNA functions through target prediction. Nucleic Acids Res 37: W273–276.
49. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA (2009) Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. Nucleic Acids Res 37: 1–13.
50. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA (2009) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. Nat Protoc 4: 44–57.
51. Mullokandov G, Baccarini A, Ruzo A, Jayaprakash AD, Tung N, et al. (2012) High-throughput assessment of microRNA activity and function using microRNA sensor and decoy libraries. Nat Methods 9: 840–846.
52. Rowson AR, Daniels KM, Ellis SE, Hovey RC (2012) Growth and development of the mammary glands of livestock: a veritable barnyard of opportunities. Semin Cell Dev Biol 23: 557–566.
53. Jayaprakash AD, Jabado O, Brown BD, Sachidanandam R (2011) Identification and remediation of biases in the activity of RNA ligases in small-RNA deep sequencing. Nucleic Acids Res 39: e141.
54. Sun G, Wu X, Wang J, Li H, Li X, et al. (2011) A bias-reducing strategy in profiling small RNAs using Solexa. RNA 17: 2256–2262.
55. Hafner M, Renwick N, Brown M, Mihailovic A, Holoch D, et al. (2011) RNA-ligase-dependent biases in miRNA representation in deep-sequenced small RNA cDNA libraries. RNA 17: 1697–1712.
56. Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, Sewer A, Iovino N, et al. (2007) A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. Cell 129: 1401–1414.
57. Boyerinas B, Park SM, Hau A, Murmann AE, Peter ME (2010) The role of let-7 in cell differentiation and cancer. Endocr Relat Cancer 17: F19–36.
58. Nagaoka K, Zhang H, Watanabe G, Taya K (2013) Epithelial Cell Differentiation Regulated by MicroRNA-200a in Mammary Glands. PLoS One 8: e65127.
59. Farazi TA, Horlings HM, Ten Hoeve JJ, Mihailovic A, Halfwerk H, et al. (2011) MicroRNA sequence and expression analysis in breast tumors by deep sequencing. Cancer Res 71: 4443–4453.
60. Hafner M, Lianoglou S, Tuschl T, Betel D (2012) Genome-wide identification of miRNA targets by PAR-CLIP. Methods 58: 94–105.
61. Berezikov E (2011) Evolution of microRNA diversity and regulation in animals. Nat Rev Genet 12: 846–860.
62. Zhu Y, Skogerbo G, Ning Q, Wang Z, Li B, et al. (2012) Evolutionary relationships between miRNA genes and their activity. BMC Genomics 13: 718.
63. Zheng H, Li W, Wang Y, Xie T, Cai Y, et al. (2013) miR-23a inhibits E-cadherin expression and is regulated by AP-1 and NFAT4 complex during Fas-induced EMT in gastrointestinal cancer. Carcinogenesis.
64. Lian S, Shi R, Bai T, Liu Y, Miao W, et al. (2013) Anti-miRNA-23a Oligonucleotide Suppresses Glioma Cells Growth by Targeting Apoptotic Protease Activating Factor-1. Curr Pharm Des 19: 6382–6389.
65. Guduric-Fuchs J, O'Connor A, Cullen A, Harwood L, Medina RJ, et al. (2012) Deep sequencing reveals predominant expression of miR-21 amongst the small non-coding RNAs in retinal microvascular endothelial cells. J Cell Biochem 113: 2098–2111.
66. Bao H, Kommadath A, Sun X, Meng Y, Arantes AS, et al. (2013) Expansion of ruminant-specific microRNAs shapes target gene expression divergence between ruminant and non-ruminant species. BMC Genomics 14: 609.
67. Inukai S, de Lencastre A, Turner M, Slack F (2012) Novel MicroRNAs Differentially Expressed during Aging in the Mouse Brain. PLoS One 7: e40028.
68. Liu JL, Liang XH, Su RW, Lei W, Jia B, et al. (2012) Combined analysis of microRNome and 3′-UTRome reveals a species-specific regulation of progesterone receptor expression in the endometrium of rhesus monkey. J Biol Chem 287: 13899–13910.
69. Podolska A, Anthon C, Bak M, Tommerup N, Skovgaard K, et al. (2012) Profiling microRNAs in lung tissue from pigs infected with Actinobacillus pleuropneumoniae. BMC Genomics 13: 459.
70. Hou X, Tang Z, Liu H, Wang N, Ju H, et al. (2012) Discovery of MicroRNAs associated with myogenesis by deep sequencing of serial developmental skeletal muscles in pigs. PLoS One 7: e52123.
71. Li D, Liu X, Lin L, Hou J, Li N, et al. (2011) MicroRNA-99a inhibits hepatocellular carcinoma growth and correlates with prognosis of patients with hepatocellular carcinoma. J Biol Chem 286: 36677–36685.
72. Timoneda O, Balcells I, Nunez JI, Egea R, Vera G, et al. (2013) miRNA expression profile analysis in kidney of different porcine breeds. PLoS One 8: e55402.
73. Chen YH, Wang SQ, Wu XL, Shen M, Chen ZG, et al. (2013) Characterization of microRNAs expression profiling in one group of Chinese urothelial cell carcinoma identified by Solexa sequencing. Urol Oncol 31: 219–227.
74. Ribeiro-dos-Santos A, Khayat AS, Silva A, Alencar DO, Lobato J, et al. (2010) Ultra-deep sequencing reveals the microRNA expression pattern of the human stomach. PLoS One 5: e13205.
75. Leptidis S, El Azzouzi H, Lok SI, de Weger R, Olieslagers S, et al. (2013) A deep sequencing approach to uncover the miRNOME in the human heart. PLoS One 8: e57800.

Les miRNomes dressés à partir des glandes mammaires de souris et de vache en lactation étaient composés de 164 et 167 miARN, respectivement, dont quelques nouveaux miARN (deux et quatre, chez la souris et la vache, respectivement) qui pourront implémenter les bases de données pour ces deux espèces. Outre l'établissement des miRNomes mammaires, leur comparaison a permis de révéler 123 miARN annotés en commun entre les deux espèces dont 24 parmi les 30 miARN les plus abondants de chaque miRNome. Parmi ces 24 miARN fortement exprimés et communs aux deux espèces, neuf ont montré une expression forte dans les tissus épithéliaux comparativement aux tissus non épithéliaux et six s'expriment préférentiellement pendant la période de lactation. L'analyse des voies biologiques impactées par ces 24 miARN a montré qu'ils pourraient avoir un rôle important dans différentes fonctions de la glande mammaire telles que la prolifération cellulaire ou la morphogenèse de ce tissu. Enfin, un miRNome (AGO2-miRNome) a aussi été établit à partir des miARN chargés dans la protéine AGO2. La comparaison de ce miRNome avec le miRNome total chez la souris a souligné le fait que les miARN ne sont pas tous chargés de façon équivalente dans le complexe RISC.

La conservation des miARN entre ces deux espèces suggèrent que la souris pourrait être un modèle pertinent pour l'étude de miARN bovin dans la glande mammaire.

I.2) ANNOTATION DU GENOME CAPRIN A L'AIDE DU MIRNOME ETABLIT CHEZ LA CHEVRE EN LACTATION

Malgré quelques études ayant fourni des listes de miARN exprimés dans différents tissus (muscle, peau, testicules, glande mammaire) chez la chèvre, il n'existait pas de miRNome de référence pour cette espèce et aucun miARN caprin n'était recensé dans les bases de données telles que miRBase au début de ma thèse. L'identification des miARN dans la glande mammaire de cette espèce, système homologue, va permettre d'implémenter les quelques données existantes. Par ailleurs, le génome de la chèvre a été séquencé et assemblé en 2013 (Dong *et al.,* 2013). Il n'a été que partiellement annoté puisque seuls les gènes codants pour des protéines étaient disponibles avant la réalisation de mes travaux.

Dans ce contexte, l'objectif de cette étude était de dresser un miRNome de référence chez la chèvre et d'utiliser ces miARN pour enrichir l'annotation du génome caprin. Ainsi, un miRNome a été établi par séquençage haut débit à partir des ARN issus de la glande

mammaire de dix chèvres au pic de lactation. Les données de localisation chromosomique des miARN ont permis, entre autre, d'identifier des clusters et des miARN intragéniques dans le génome caprin. L'ensemble des travaux est présenté dans l'**Article 2**.

Article 2: Annotation of the goat genome using Next Generation Sequencing of microRNA expressed by the lactating mammary gland: comparison of three approaches. *Mobuchon L, Marthey S, Boussaha M, Le Guillou S, Leroux C, Le Provost F.* BMC Genomics. 2015 Apr 11;16:285. doi: 10.1186/s12864-015-1471-y.

Mobuchon et al. BMC Genomics (2015) 16:285
DOI 10.1186/s12864-015-1471-y

BMC Genomics

RESEARCH ARTICLE Open Access

Annotation of the goat genome using next generation sequencing of microRNA expressed by the lactating mammary gland: comparison of three approaches

Lenha Mobuchon[1,2,3], Sylvain Marthey[1], Mekki Boussaha[1], Sandrine Le Guillou[1], Christine Leroux[2,3] and Fabienne Le Provost[1*]

Abstract

Background: MicroRNAs (miRNA) are small endogenous non-coding RNA involved in the post-transcriptional regulation of specific mRNA targets. The first whole goat genome sequence became available in 2013, with few annotations. Our goal was to establish a list of the miRNA expressed in the mammary gland of lactating goats, thus enabling implementation of the goat miRNA repertoire and considerably enriching annotation of the goat genome.

Results: Here, we performed high throughput RNA sequencing on 10 lactating goat mammary glands. The bioinformatic detection of miRNA was carried out using miRDeep2 software. Three different methods were used to predict, quantify and annotate the sequenced reads. The first was a *de novo* approach based on the prediction of miRNA from the goat genome only. The second approach used bovine miRNA as an external reference whereas the last one used recently available goat miRNA. The three methods enabled the prediction and annotation of hundreds of miRNA, more than 95% were commonly identified. Using bovine miRNA, 1,178 distinct miRNA were detected, together with the annotation of 88 miRNA for which corresponding precursors could not be retrieved in the goat genome, and which were not detected using the *de novo* approach or with the use of goat miRNA. Each chromosomal coordinate of the precursors determined here were generated and depicted on a reference localisation map. Forty six goat miRNA clusters were also reported. The study revealed 263 precursors located in goat protein-coding genes, amongst which the location of 43 precursors was conserved between human, mouse and bovine, revealing potential new gene regulations in the goat mammary gland. Using the publicly available cattle QTL database, and cow precursors conserved in the goat and expressed in lactating mammary gland, 114 precursors were located within known QTL regions for milk production and composition.

Conclusions: The results reported here represent the first major identification study on miRNA expressed in the goat mammary gland at peak lactation. The elements generated by this study will now be used as references to decipher the regulation of miRNA expression in the goat mammary gland and to clarify their involvement in the lactation process.

Keywords: miRNA, Goat, Mammary gland, Lactation, Deep sequencing, Chromosomal location, Host genes

* Correspondence: Fabienne.LeProvost@jouy.inra.fr
[1]INRA, UMR1313 Génétique Animale et Biologie Intégrative, F-78350 Jouy-en-Josas, France
Full list of author information is available at the end of the article

BioMed Central

© 2015 Mobuchon et al.; licensee BioMed Central. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

MicroRNAs (miRNA) are small non-coding RNA that regulate targeted mRNA expression at a post-transcriptional level [1,2]. It is estimated that miRNA genes may account for 2-5% of all mammalian genes and regulate the expression of up to 60% of protein-coding genes [3,4]. miRNA play a major role in a broad range of biological processes. They are encoded in the genome and transcribed in a polII-dependent manner [5,6] as long transcripts from which long hairpin precursors are generated (pre-miRNA, ~70 nt) and cleaved out by the microprocessor Drosha endonuclease and cofactors [7]. The pre-miRNA are then exported to the cytosol where they are cleaved by the Dicer protein, releasing the loop and a duplex consisting of the mature -5p and -3p miRNA [7,8]. The miRNA are subsequently incorporated in the miRNA-induced silencing complex (miRISC) so that they can act on their targets.

Within a genome, a particular locus may carry several miRNA genes in what is called a cluster, defined as having a distance of less than 10 kb between each miRNA [9]. The expression of clustered miRNA is highly correlated, as they are often co-expressed from a single promoter as a single polycistronic transcript with neighbouring miRNA [10,11]. An internal coordination of clustered miRNA to regulate downstream biological networks has been suggested [12].

Approximately half of vertebrate miRNA are located in intergenic regions, referred to as intergenic miRNA [13,14]. The other half are intragenic, localized in introns and exons (about 40% and 10%, respectively) of protein-coding transcription units [14]. Intragenic miRNA tend to be co-expressed with their host genes [13]. Host genes and their resident miRNA have been considered to have synergistic effects [15,16]. Indeed, genes highly correlated in expression with an intragenic miRNA gene have been found to be more likely predicted as miRNA targets [17].

In the goat, the first publicly-available whole genome sequence (CHIR_1.0) was released in 2013 [18]. It consists of 30 pseudo-chromosomes (2.52 Gb) and an artificial chromosome designated as U (138 Mb) [18]. The high level of colinearity between goat and cattle chromosomes enabled assembly of the goat genome using the cattle genome as a reference. The annotation of potential goat protein-coding genes was performed using the homology-based annotation of proteins from cattle and humans [18].

Deep whole transcriptome sequencing, also known as RNA sequencing (RNA-seq), coupled with the development of several computational approaches, has offered numerous opportunities to discover and study the occurrence of miRNA across the genome [19,20]. Moreover, the availability of whole genome sequences has enabled the rapid annotation of miRNA. In the goat, some studies have been undertaken to determine miRNA in different tissues using this technology. The miRNA thus detected were firstly annotated using the sequences available in miRBase. For example, cattle and sheep miRNA from miRBase were used to annotate several miRNA in the skin of cashmere goats, and in the testis and mammary gland during both dry periods and at peak lactation [21-23]. Both ruminant and sheep genomes were also used to map the sequencing reads, as described by Ji *et al.* [19], who identified several miRNA in the goat mammary gland at early lactation. Furthermore, available Expressed Sequences Tags (EST) for the goat, combined with miRNA from numerous species (sheep, cow, pig, dog and horse) enabled the characterisation of hundreds of miRNA in goat ovaries and muscle [24,25]. Once the goat genome had been released, it started to be used for miRNA identification. Dong *et al.* [18] also identified 487 miRNA in their assembly using predictions by the INFERNAL software [26] against the Rfam database. Among the 487 miRNA found, 157 were located in 44 genomic clusters containing between two and 46 miRNA. Comparing the miRNA sequences from human, cattle, dog, chimpanzee, mouse and rat, they determined six goat-specific miRNA [18]. The goat genome was also utilized for the mapping of sequencing reads from goat testis, urine and skeletal muscle, and annotation of the miRNA thus characterized was performed by sequence homology with sheep, cow or human miRNA [27,28]. Finally, in order to map sequencing reads to the goat genome, miRDeep2 software combined with sequences from miRBase were used to detect 205 known and nine putative miRNA in goat hair follicles [29]. Although the goat genome has recently enabled the identification of several known and putative miRNA in different goat tissues as described above, it is still necessary to implement the reference list for goat miRNA, particularly in the lactating mammary gland, as much as decipher the involvement of miRNA in lactation which has recently begun to be investigated *in vitro* or in other species [30-33]. In the goat, a potential role for *miR-103* and *miR-27a* in the regulation of milk fat synthesis in mammary epithelial cells has been reported [34,35]. Despite these studies, the role of mammary miRNA is still poorly documented and greater knowledge of mammary goat miRNA will enable elucidation of the functions of miRNA in this organ.

Our increasing knowledge of the goat genome means it is now relevant to determine associations of marker alleles with phenotypes of interest in this species that are indicative of quantitative trait loci (QTL). In livestock, the detection of QTL is a step towards identifying genes and causal polymorphisms for traits of importance to agriculture and selection [36]. Most studies focused on detecting QTL for milk production have been carried out in cattle [37-40], and only preliminary studies have been performed in the goat [41], perhaps because of the

lack of genomic tools for this species. A clearer understanding of miRNA and their localisation in the goat genome may offer perspectives to decipher the complexity of traits in dairy goats.

The work presented was therefore intended to generate an overview of miRNA expressed in lactating goat mammary gland. The precise location of their genes in the goat genome was determined by comparing three approaches to predict and annotate the sequencing reads. The localisation of miRNA precursors was compared in human, mouse and cattle in order to predict the genomic localisation of goat miRNA which might suggest conserved regulation in this species. Their genomic repartition and conservation across the 3 species mentioned above as well as their position relative to known bovine milk QTL, were investigated. Our findings offer new data on goat miRNA and genome annotation that will enable further studies in this species.

Methods

Animals and tissue sampling

All animal manipulations were performed in strict accordance with the guidelines of the Code for Methods and Welfare Considerations in Behavioral Research with Animals (Directive 86/609 EC) and the recommendations of the CEMEAA (Ethics Committee for Animal Experimentation in Auvergne). Every effort was made to minimize animal suffering. Ten peak-lactating Alpine goats (48 ± 2 d post-partum), from the INRA Experimental Farm in Lusignan (France) were slaughtered, and directly after death, ~50 g of mammary gland were collected under sterile conditions from the secretory area containing lobulo-alveolar structures (acini). The samples were frozen immediately in liquid nitrogen and stored at −80°C until RNA extraction.

RNA isolation

Total RNA was extracted from ~150 mg mammary tissue using TRIZol® Reagent (Life Technologies) and further purified with the SV Total RNA Isolation system (Promega) to eliminate any contaminating genomic DNA. RNA purity and concentration were estimated by spectrophotometry (Nanodrop™, ND-1000) and using a 2100 Bioanalyzer Instrument (Agilent). Samples with a RNA Integrity Number (RIN) higher than 8, corresponding to high RNA quality, were used for the study.

Library preparation and sequencing

Library preparation and sequencing was performed by the IGBMC Microarray and Sequencing Platform (Strasbourg, France). The TruSeq™ small RNA kit protocol (Illumina) was followed to generate small RNA libraries directly from ~7 μg of total RNA, suitable for subsequent high throughput sequencing. Briefly, during the first step, RNA adapters were ligated sequentially to each end of the RNA; firstly the 3′ RNA adapter (5′ TGGAATTCTCGGGTGC CAAGG 3′) which is specifically designed to target microRNAs and other small RNAs containing a 3′ hydroxyl group resulting from enzymatic cleavage by Dicer or other RNA processing enzymes, and then the 5′ RNA adapter (5′ GTTCAGAGTTCTACAGTCCGACGATC 3′). Small RNA ligated with 3′ and 5′ RNA adapters were then reverse transcribed and PCR amplified (30 sec at 98°C; [10 sec at 98°C, 30 sec at 60°C, 15 sec at 72°C] × 13 cycles; 10 min at 72°C) to obtain cDNA. The final step was acrylamide gel purification of the 140–150 nt amplified cDNA (corresponding to cDNA obtained from small RNA + 120 nt from the adapters). The libraries were checked for quality and then quantified using the 2100 Bioanalyzer Instrument (Agilent). Libraries were loaded in the flowcell at an 8 pM concentration and clusters were generated using Cbot and sequenced on HiSeq 2500 (Illumina) as single-end 50 base reads, according to the manufacturer's instructions. The quantity and quality of reads for each library are shown in Additional file 1: Table S1. RNA sequencing data were deposited in the Gene Expression Omnibus (GEO): GSE61025.

Sequencing data processing

After removing sequences which corresponded to the sequencing adapters, and filtering by size (17–28 nt), using Cutadapt [42] data analyses were processed using miRDeep2 software [43], as described by Le Guillou *et al.* [44] and performed on the bioinformatics platform Genotoul (http://bioinfo.genotoul.fr/). The cleaned sequences were clustered into unique reads and then mapped to the reference goat genome (CHIR_1.0, [18]) using mapper.pl module. Putative miRNA and precursors were identified using the miRDeep2 core module, miRDeep2.pl (including reads corresponding to typical products of miRNA biogenesis, stability of the putative pre-miRNA hairpin and homology to previously identified miRNA). The miRDeep2 core algorithm needs to use known miRNA from the species under analysis, held in a reference database such as miRBase [45]. As few goat miRNA are reported in miRBase v21, three approaches were used. Thus, the use of the 2 miRNA from the virus BK Polyomavirus (*Bkv) (*precursor*: bkv-mir-B1*, mature: *bkv-miR-B1-5p* and *bkv-miR-B1-3p*), the 793 bovine miRNA (*Bos taurus, bta*), or the 436 goat miRNA from miRBase v21 were compared. Three independent sets of potential precursors (from BK Polyomavirus, bovine and goat) were created from the miRDeep2 prediction with a miRDeep2 score ≥0. Further, precursors from the BK Polyomavirus, bovine or goat containing known miRNA not found in potential precursors were added to the sets. The same operation was then performed to create three

independent datasets containing putative miRNA and all known miRNA from miRBase v21. The quantifier.pl miRDeep2 module was then used to map unique reads and new sets of miRNA on new sets of potential precursors. The quantification results produced by the quantifier.pl module were then filtered with a custom perl script parse_miRDeep2_outputs.pl (https://mulcyber.toulouse.inra.fr/projects/bioinfoutils/) to eliminate any redundancy between known and putative miRNA. miRNA with at least ten read counts summing the ten libraries were considered, thus putative miRNA can be submitted to miRBase [46].

Quantitative RT-PCR

Nine miRNA were chosen for RT-qPCR validation; miR-29a-3p (TaqMan® ID 007600_mat, Applied Biosystems), miR-99a-5p (TaqMan® ID 006254_mat), miR-126-3p (TaqMan® ID 008451_mat), miR-140-3p (TaqMan® ID 471823_mat), miR-222-3p (TaqMan® ID 000525), miR-223-3p (TaqMan® ID 002295), miR-204-5p (TaqMan® ID 000508), miR-409-3p (TaqMan® ID 002332), miR-6119-5p (Custom TaqMan® small RNA Assay). Reverse transcription was achieved on 10 ng of total RNA using the TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) kit following the manufacturer's instructions. In the thermal cycler (StepOne+, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), each 15 μL RT reaction followed 30 min at 16°C, 30 min at 42°C, 5 min at 85°C. Then, 1.3 μL of miRNA-specific cDNA from the reaction were amplified using the TaqMan® Small RNA Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) following the manufacturer's instructions. Amplification was performed at 95°C for 10 min, pursued by 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. All miRNA levels were normalized to the values of U6 snoRNA [47,48].

Screening for intragenic miRNA in the human, mouse, cattle and goat genomes

The chromosomal positions of miRNA in the human, mouse and cattle genomes were downloaded from miRBase v21 (http://mirbase.org/). Datasets for protein-coding genes were downloaded from BioMart Ensembl release 78, using the latest version of the genome (GRch38 for human, GRCm38.p3 for mouse and UMD3.1 for cattle (http://www.ensembl.org/biomart)). The positions of mRNA and the Coding Protein Sequence on the goat genome were obtained from Dong et al. [18]. Comparisons of the chromosomal locations of miRNA and protein-coding genes were performed using the IntersectBed tool in BEDTools software [49] with options requiring the same strandedness and an overlap of 100% necessary to cross miRNA and gene coordinates.

Screening for miRNA in QTL

All Bovine QTL were downloaded from CattleQTLdb (AnimalQTLdb release 22, http://www.animalgenome.org). QTL traits linked to milk lactose, fat and protein content or yield and milk somatic cell scores, with a significance equal to significant and/or a p-value <0.05 were extracted from the entire bovine QTL file. Screening for mammary miRNA in the QTL was performed using IntersectBed with the options used to compare the chromosomal location of miRNA and protein-coding genes.

Results and discussion

Comparison of strategies for miRNA sequence identification

Next generation sequencing (NGS) technologies coupled with bioinformatic analysis offer a powerful method to analyze miRNA gene expression which allows for both the measurement of known miRNA and the identification of novel miRNA [50]. Unlike other technologies, they enable not only the discovery of novel miRNA but also the capacity to detect weakly expressed miRNA.

Here, we performed RNA-Seq on RNA isolated from the mammary gland of lactating goats, using Illumina/Solexa NGS technologies. Bioinformatic analyses of sequenced products were performed using miRDeep2 software which can identify known and putative miRNA with an accuracy of 98.6-99.9%, as reported by Friedländer *et al.* [43]. As in a previous study where the mammary gland miRNome of lactating cow was established [44], the miRDeep2 software was used to determine the miRNome of lactating goat mammary gland. As required by the miRDeep2 algorithm, both a list of known miRNA and a whole genome sequence are necessary for the species of interest in order to predict and quantify miRNA from the sequencing reads. During this study, and using the whole goat genome that has recently become available [18], three strategies (Figure 1) were compared for the prediction and annotation of miRNA. The first strategy was a *de novo* approach based on the use of BK Polyomavirus, a species that is phylogenetically distant from goat, with very few known miRNA (1 precursor and its 2 miRNA) were available in miRBase v21 and for which we checked that corresponding sequences could not be found in the goat genome. Thus this strategy was unable to retrieve viral miRNA in the goat genome and only managed to predict potential precursor from it. The second strategy used bovine precursors from miRBase v21, because bovine is a phylogenetically related species of the goat and has almost twice the number of goat miRNA. Finally, the third strategy was based on the use of goat precursors very recently available in miRBase v21.

Prediction of miRNA

The first step in the process was the prediction of precursors from the location of mapped reads on the goat

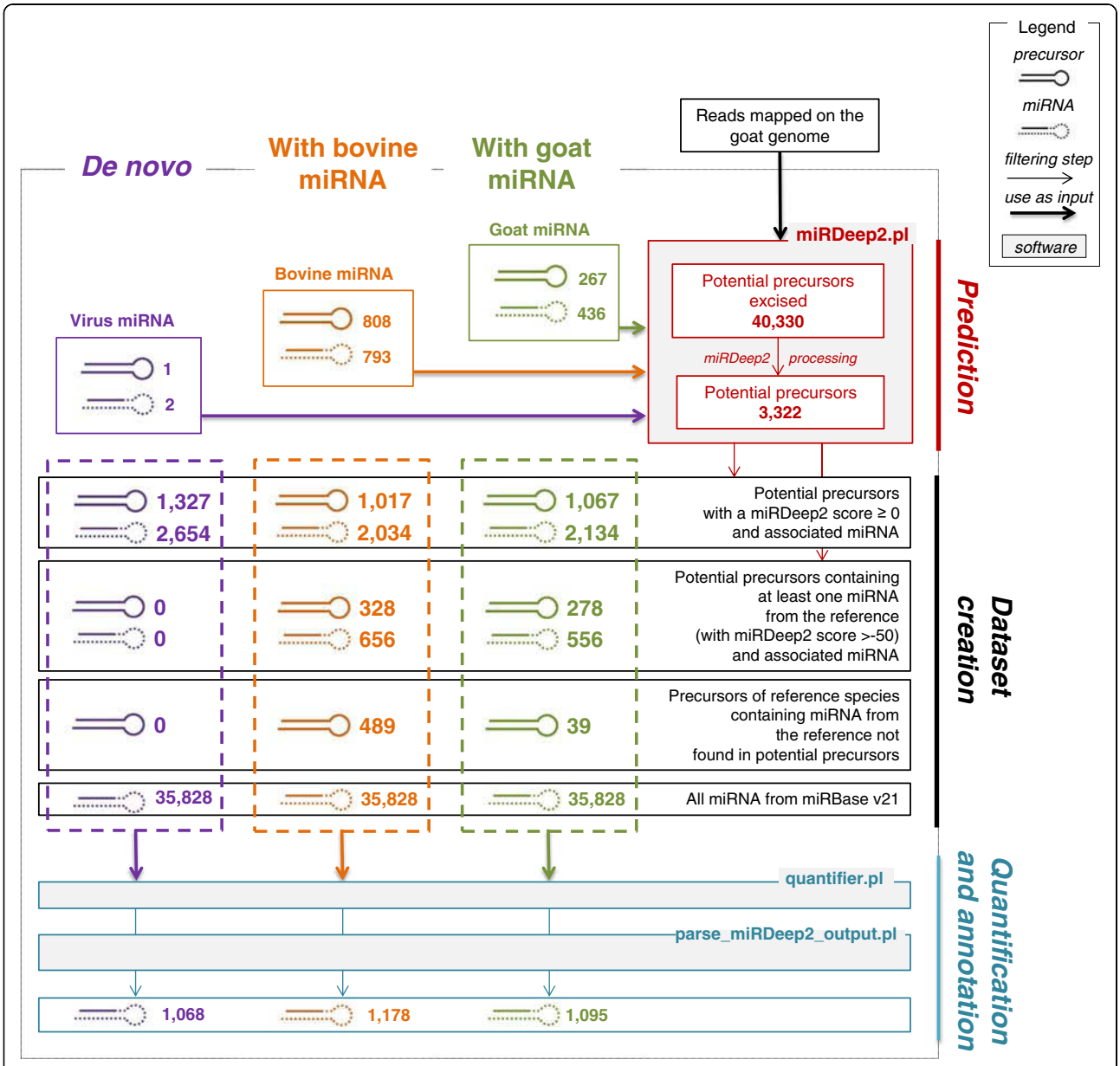


Figure 1 Summary of the three approaches used to predict, quantify and annotate sequencing reads. Common processes and results are indicated in red for the prediction step and in blue for the quantification and annotation steps. Specific processes and results are indicated in purple for the *de novo* approach, in orange and green for the approach using bovine and goat miRNA, respectively.

genome using miRDeep2 (Figure 1). The miRDeep2 core algorithm scores each potential precursor excised from the goat genome principally for the combined compatibility of energy stability, positions and frequencies of reads with the Dicer processing signature [51]. The prediction results produced by miRDeep2 revealed the same number of potential precursors (3,322) with the three strategies (Figure 1). As a result, external information did not influence either precursor prediction or the associated scores.

Precursors with a miRDeep2 score ≥0 were retained as new potential precursors in this study. The three strategies produced different numbers of potential precursors with a miRDeep2 score ≥0. Thus 1,327 potential precursors were identified using the *de novo* approach, while 1,017 and 1,067 potential precursors were predicted using the bovine and goat miRNA-based strategy, respectively (Figure 1). These differences were due to 328 and 278 potential precursors containing mature miRNA known in bovine and goat respectively, and referred to not as potential precursors but known precursors. Overall, we obtained 1,345 potential precursors using the bovine and goat approaches, of which 1,284

(95%) were common with the *de novo* approach (Figure 2).

The differences between the three analyses were due to dual causality. The first is the random component of the prediction, which constitutes the RandFold significance. Indeed, some potential precursors had a p-value close to the threshold ($p \leq 0.05$), and this value varied at each prediction, directly impacting the associated miRDeep2 score (+3.8 for a significant p-value) and then put some precursors above or below the miRDeep2 threshold we fixed. The second difference between analyses only affected potential precursors which contains known miRNA of the reference species. Actually, some miRNA were known only in bovine (for instance *miR-1260b*) or in goat (for instance *miR-374e*), enabling the identification of specific potential precursors (15 in bovine and 4 in goat).

Our prediction results thus showed that the use of precursors from an external reference (i.e. bovine in this study) or miRNA for the studied species is not necessary to predict most of precursors from the genome (95%). Therefore, for a species with none or only a few miRNA in miRBase, a *de novo* prediction can produce results almost as complete as if precursors from an external or studied species were used.

For each approach, two sets of data were thus created: i) one containing potential precursors with or not known miRNA of the species, and ii) one containing putative miRNA and all known miRNA from miRBase v21 (Figure 1).

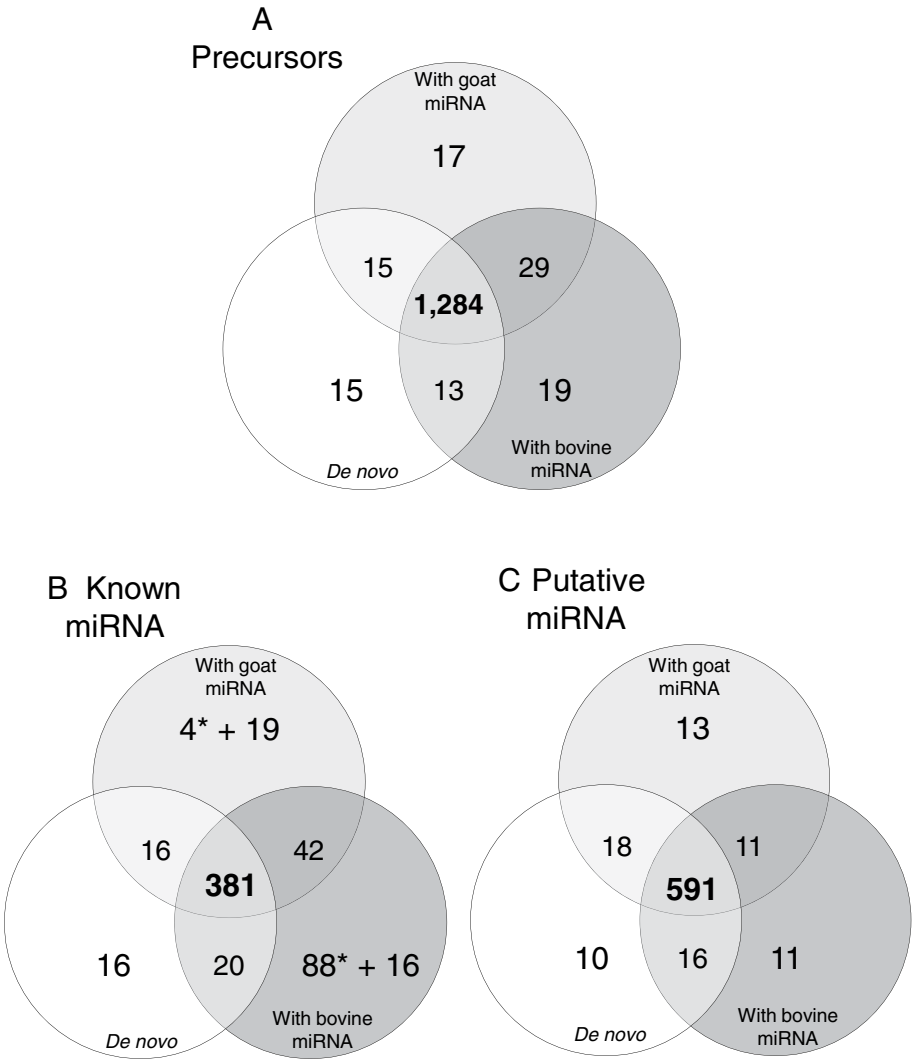


Figure 2 Comparison of the number of potential precursor and miRNA obtained by the three approaches. Potential precursors are represented in **A**, known and putative miRNA are represented in **B** and **C**, respectively. *: Adding precursors of reference species containing known miRNA not found initially in potential precursors enabled the annotation of 88 and 4 miRNA with the approach using bovine and goat miRNA, respectively.

miRNA identification and quantification

Use of the quantifier.pl module and the custom script parse_miRDeep2_outputs.pl, as described by Le Guillou *et al.* [44], allowed us to map sequencing reads as well as the set of data containing miRNA (putative and known) on the data set containing potential precursors. Only precursors carrying miRNA with at least ten counts summing all libraries were retained reducing the numbers of potential precursors to 913 in the *de novo* approach, 924 with bovine and goat miRNA (Table 1, 'Filtered'). In addition, depending on the location of reads relative to the position of known miRNA from miRBase on the "potential precursors", reads were assigned to miRNA, and two miRNA (5p and 3p) were retained for each precursor. This step enabled the quantification and annotation of 1,068, 1,178 and 1,095 distinct miRNA using the *de novo*, bovine or goat miRNA approaches, respectively; these included both known and putative miRNA which had not previously been described in any species from miRBase v21. The quantifier.pl module from miRDeep2 provided secondary structures of precursors containing known or putative miRNA and few examples are exposed in Additional file 2: Figure S1. Then, among the common miRNA obtained using the three methods, 381 were known miRNA and 591 were putative miRNA (Figure 2). As different precursors produce identical miRNA, the number of miRNA annotated here was not the double of the number of precursors. This similar annotation of mature miRNA was not surprising regarding these miRNA because of the strong similarity between sets of "potential precursors". We also observed few putative miRNA that were only found using one or other of the approaches, corresponding to potential precursors with a random score ≥0 (Figure 2).

In addition, using the bovine or goat miRNA method, 489 bovine or 39 goat precursors (Figure 1) were added to the set of "potential precursors", in which 138 and 25 precursors (Table 1, category of 'known precursors') enabled the supplementary quantification and annotation of 88 and 4 miRNA in bovine and goat approaches, respectively (Table 1, Figure 2). It appears that these miRNA corresponded to precursors not detected as potential precursors predicted by miRDeep2 at the prediction step. Therefore, the associated genome regions containing these

Table 1 Comparison of precursors' annotation results using the three approaches

		De novo	Bovine	Goat
Potential precursors	***Reads mapped (%)****	***75.1***	***74.9***	***74.9***
	Total	**1,327**	**1,017**	**1,067**
	Filtered :**	**913**	**924**	**924**
	miRNA -5p and -3p	**305**	**299**	**305**
	−5p + −3p annotated	172	172	172
	−5p annotated + −3p putative	20	20	20
	−5p putative + −3p annotated	14	13	14
	−5p + −3p putative	99	94	99
	Only -5p	**298**	**303**	**305**
	−5p annotated	53	59	59
	−5p putative	245	244	243
	Only -3p	**310**	**322**	**317**
	−3p annotated	60	67	66
	−3p putative	250	255	251
Known precursors	***Reads mapped (%)****	***0***	***2.9***	***2***
	Total	**1**	**808**	**267**
	Filtered:**	**0**	**138**	**25**
	−5p + −3p known	0	4	8
	Only -5p known	0	55	8
	Only -3p known	0	49	8
	−5p known + −3p annotated	0	17	0
	−3p known + −5p annotated	0	13	1

Annotated miRNA correspond to miRNA annotated by homology (perfect match full length) with mature miRNA from miRBase v21. Putative miRNA correspond to miRNA not yet described in any species. In bold, numbers correspond to the total of each subcategory.

*Percentage of reads mapped on the set of potential precursors.

**Only potential precursors with cumulative counts >10 have been retained.

miRNA may not be available in the actual version of the goat genome. Our results indicate that using an external reference combined with a good quality reference genome could produce a list of the miRNA expressed in a specific tissue. Indeed, the use of bovine precursors enabled the quantification of 88 more miRNA when compared with the *de novo* approach or using goat miRNA, giving an overview of the miRNA expressed in the lactating goat mammary gland. The use of bovine miRNA was also able to provide an assessment of the quality of the goat genome assembly, as this was only assembled very recently in its first version, CHIR_1.0, which might not be totally complete. Dong *et al.* [18] specified that around 89% of their raw paired-end sequences mapped to the assembled goat genome, suggesting that additional miRNA might still be found in the remaining 11%. Consequently, the 88 miRNA identified using bovine precursors may contribute to improving our knowledge of the genome.

Furthermore, our results pointed to the fact that about 23% of total reads did not map on the set of "potential precursors" (Table 1). They may correspond to miRNA that are not found in the goat genome or in bovine precursors. As an example, sequences with at least 500 summing reads in the 10 libraries may have represented 60% of unmapped reads corresponding to 445 unique sequences. To clarify the origin of these unmapped reads, a blast against all miRNA from miRBase v21 (one mismatch or gap allowed) was performed. Two sequences corresponding to miR-143 represented 20% of unmapped reads (Additional file 3: Table S2). Taken together, 88 of these unique sequences corresponded to 40 distinct miRNA, at least 37 of which are known in the bovine and needed to be taken into account during quantification. For example, a precursor containing mature miR-143 was predicted in the goat (chr7_10657), but the sequence of the potential precursor reported by miRDeep2 stopped at the end of the predicted mature miRNA. According to Friedländer *et al.* [43], the precursor sequence is the consensus precursor miRNA sequence inferred from deep sequencing reads. It represents the Drosha hairpin product, and does not include a substantial flanking genomic sequence, unlike most miRBase precursors. The absence of these flanking regions prevented mapping of these reads on potential precursors (reads mapping on "potential precursors" allowed 0 mismatches). The same scenario was hypothesized for the 36 miRNA known in bovine.

The combination of the tools used (quantifier.pl, parse_mirdeep2_outputs.pl, mature miRNA from miRBase) was sufficiently powerful to annotate potential precursors. Therefore, in order to produce the most complete annotation of the goat genome, the results of the approach using bovine miRNA were retained for the remainder of the analysis. The goat mammary gland miRNome established here thus comprised 1,178 mature miRNA, divided into 629 known and 549 putative miRNA (Additional file 4: Table S3, Additional file 5: Table S4). The expressions of nine miRNA were confirmed using RT-qPCR (Additional file 6: Figure S2).

Annotation of the goat genome

An overview of precursors and miRNA expressed in the goat mammary gland at peak lactation was thus produced and each precursor was positioned on goat chromosomes (Figures 3, 4 and Additional file 7: Figure S3, Additional file 4: Table S3). The example of CHI 19 is shown in Figure 3. The 924 precursors were distributed throughout the chromosomes. Those with the most precursors were CHI 21, CHI X and CHI 19, having 76, 69 and 47 miRNA genes, respectively. Our results agreed with the chromosomal distribution of miRNA identified in previous reports [18,22], although we were able to provide a longer list of precursors representing around 2-fold of those previously described (487 and 464 locations identified by Dong *et al.* [18] and Wu *et al.* [22], respectively, versus 924 in the current study). Goat and bovine chromosomes have a high colinearity with those containing the most precursors being BTA 21, BTA X, and BTA 19 [52]. In addition, chromosome length does not correlate to the number of precursors, as previously observed by Ghorai and Ghosh [53]. Thus, for example, one of the longest goat chromosomes is CHI 2 (135 Mb) which only carries 21 precursors, while CHI 21 (63 Mb) carries 76 precursors (Figure 4). Density defined as the number of precursors/chromosome size is lower for CHI 6 and CHI 14 with a density of 0.13 and 0.14 respectively, while CHI 21 has a higher density of 1.13. However, chromosome X in several mammalian species has been reported to carry a higher density of miRNA precursors than those associated with autosomes in the testis, while precursors linked to the X chromosome have higher substitution rates than miRNA linked to autosomal chromosomes [54]. However, in the current instance, CHI X had a density of 0.57, representing the chromosome with the fifth highest density of precursors.

Because of the high colinearity between the goat and bovine genomes [18] most of the precursors identified during our study were located at identical positions in both species. However, the 21 members' *mir-2284*, a ruminant-specific miRNA family [55], were not located on the same chromosome in the bovine and goat genomes, except for four precursors (*mir-2284ab*, *mir-2285 k*, *mir-2285 l* and *mir-2285o*). Furthermore, we used the publicly available genome to map our sequencing reads, containing chromosomes, scaffold and contigs. We were thus able to identify some precursors that were identical between chromosomes and contigs; for example, *mir-2284y* was retrieved on both. The high sequence homology between miRNA produced by many

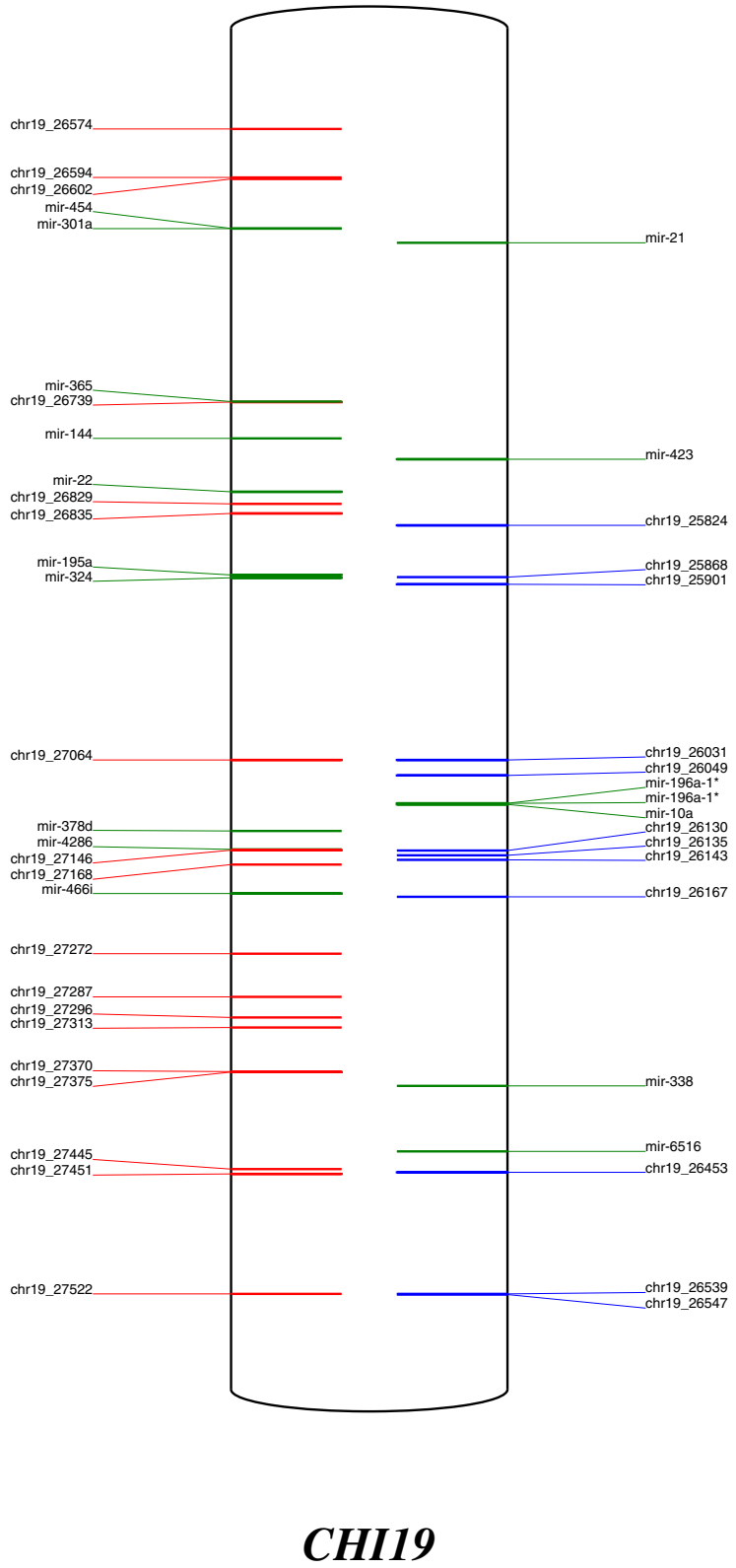


Figure 3 Map of the CHI 19 location of miRNA precursors. In left, putative (red) and known (green) miRNA localized on the + strand. In right, putative (blue) and known (green) miRNA localized on the - strand.

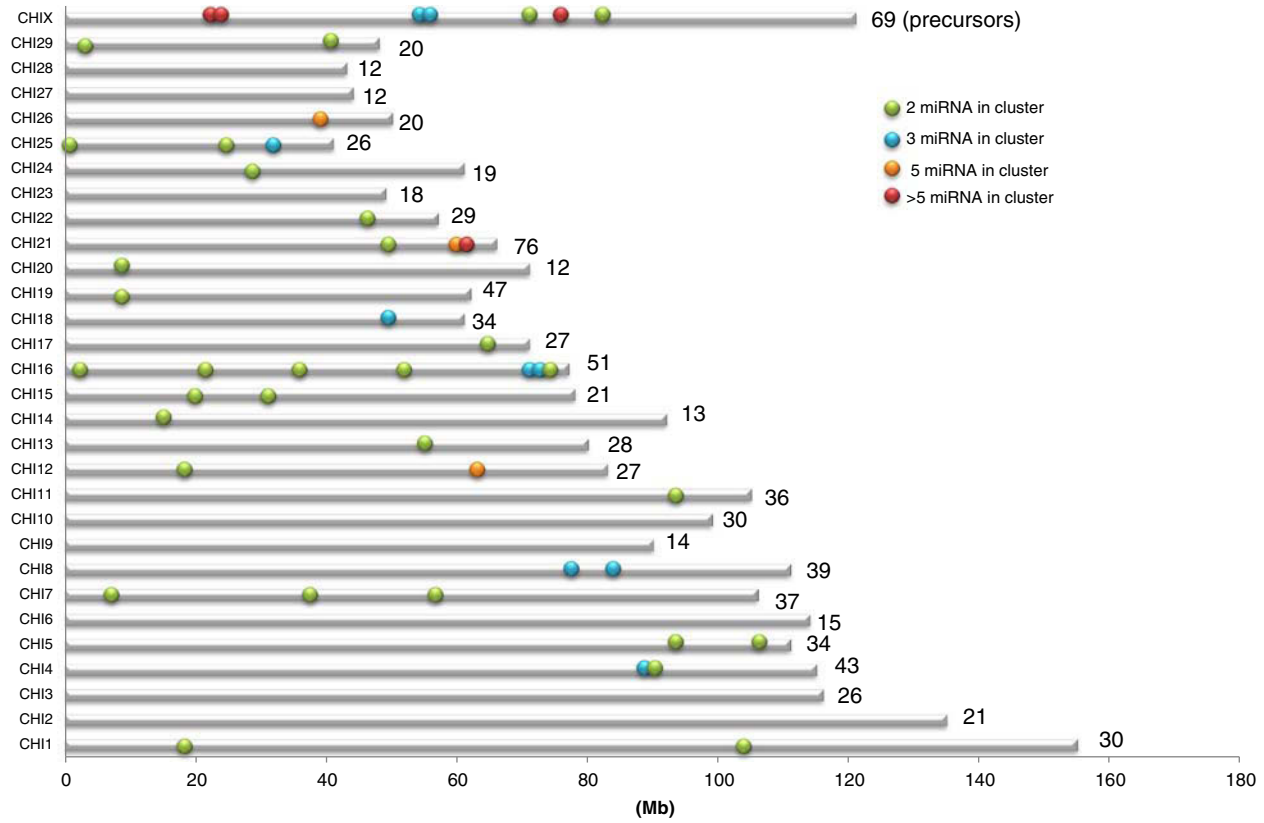


Figure 4 Number of precursors and clusters in each goat chromosome. Clusters were positioned on chromosomes. Interdistance between precursors of less than 10 kb was considered to be a cluster. The number of precursors per chromosome is indicated at the extremity of each chromosome.

mir-2284 family precursors may explain why they could be retrieved at several chromosomal locations and elucidate the difference in chromosomal positions between goat and bovine. This family was not yet fully described in goat although ruminant-specific miRNA may contribute to understand specific features of those species, especially in terms of lactation.

The goat genome contains large numbers of ruminant-specific repeat regions that account for 42.2% of the genome [18]. This can be perceived through miRNA annotation, because we identified several identical precursors with different locations. For example, on CHI 16, 2 precursors were predicted to produce *miR-29c*. Otherwise, a particular situation was observed because 29 overlapping precursors were detected on the goat genome. Indeed, at the same chromosomal location, one precursor was predicted by miRDeep2 with associated miRNA -5p and -3p, and another was predicted from the -3p of the first precursor. It was possible that both might produce identical miRNA -3p and -5p. No other such example exists in miRBase v21. Because they produced identical mature miRNA, the same name was assigned to these overlapping precursors (Additional file 4: Tables S3, Additional file 8: Table S5, Additional file 9: Table S6, and Additional file 10: Table S7).

In animals, miRNA genes are often found to be clustered on the genome [56,57]. For this reason, precursors located in close proximity to each other were searched for, with an inter-miRNA distance smaller than 10 kb [9]. Our results revealed the presence of 46 clusters containing 165 precursors which represented 18% of all the precursors identified during our study, which was less than in the cow where clustered miRNA genes represent 26% of all known bovine miRNA (Figure 4, Additional file 8: Table S5) [52]. The number of cluster varies according to the species, since 36%, 46% and 47% of miRNA are found clustered in zebrafish, mouse and human, respectively [9,58]. Most of the precursor clusters reported here were discistronic, in the sense that they comprised two precursors, as is usually observed [12]. But larger clusters exist on the goat genome; for example, CHI 21 carries a cluster of 41 precursors, which appears to be conserved in mammals [18], close to a cluster on BTA 21 containing 47 precursors. Moreover, 7 clusters were only made up of putative precursors, the largest of which contained 5 putative precursors on CHI

26. Most miRNA genes within 50 kb of each other displayed highly correlated expression patterns, as they could be processed from a polycistronic primary transcript [11]. However, due to their complex maturation and degradation, Guo and Lu [59] showed that they might also display differences in their levels of expression. Furthermore, miRNA genes in a cluster may have a functional relationship *via* co-regulating or coordinated regulatory processes [60]. Clusters often contain members of different miRNA families, particularly in animal genomes [1]. In the present case, several members of the same family (such as the *let-7* family) were identified as being clustered, as well as the largest miRNA gene cluster localized on CHI 21 which contained 16 members of the mir-154 family. Unrelated miRNA in the same cluster are often assumed to have similar targeting properties [56]. Further studies are necessary to clearly understand how the expression of goat miRNA clusters is regulated.

Intragenic goat miRNA and the conservation of their location among human, mouse and cow

Unlike the whole genome sequences of other livestock species, the goat genome has not yet been very well characterized. To date, almost 22,175 protein-coding genes have been annotated, based on the bovine and human genome annotation data available [18]. On the other hand, it has been estimated that up to half of all vertebrate miRNA are processed from introns of protein-coding genes, or from genes encoding for other non-coding RNA [13].

By investigating intragenic precursors in the goat genome, 322 precursors were found to be located in goat mRNA and CDS, representing about 35% of all the precursors identified during our study. However, miRNA that share the same strand orientation of their host genes have similar transcription mechanisms [1,61]. Thus, 263 precursors were detected in 217 goat mRNA and CDS regions (Additional file 9: Table S6) with the same orientation, representing about 28% of all the precursors identified during the study. Among the 263 goat intragenic precursors, 68 were known and 195 were putative precursors. The low percentage of intragenic precursors (28%), compared with the 50% quoted in the literature, might have been due to a lack of annotation for protein-coding genes on the goat genome. Genome annotation could therefore be improved by determining the localisation of miRNA.

Twenty one host genes contained 2 or more precursors, such as *MCM7* on CHI 25 and *GABRE* on CHI X, which contained a cluster of 3 precursors. As for host gene functions, some of these are major actors in development of the mammary gland; for example, members of the ErbB signaling pathway (*ERBB2)*, or members of the Wnt signaling pathway such as *RSPO2* [62,63]. Others host genes play a critical role in mammary metabolism, such as *VLDLR* (Very low density lipoprotein receptor), *SREBF2* (Sterol responsive element binding factor 2), or *AGPAT6* (1-Acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 6) (Additional file 9: Table S6).

Interestingly, among the 217 host genes, the expression of 76 coding genes was confirmed in the mammary gland of the same goat using previous data from microarrays ([64]; GEO Series accession number GSE6380). According to these observations, only 35% of host genes were expressed in the mammary gland at peak lactation. This low percentage is likely due to a lack of completeness of the microarray. The difference observed might also be due to the difference in detection level of the techniques employed.

Taken together, a clearer understanding of intragenic goat miRNA may highlight potential new regulations of miRNA and gene expression, some of which may play critical roles in the lactation function.

Conservation of the location of miRNA/host genes throughout a species genome may offer a useful tool for its annotation. In human, mouse and cattle, 1,018, 694, and 285 precursors, respectively, in protein-coding genes have been detected as having the same orientation (Table 2). During the present study, a comparison of intragenic precursors in human, mouse and cattle with intragenic goat precursors revealed conservation of the location of 43 precursors (Figure 5, Additional file 10: Table S7). Due to the lack of annotation of goat protein-coding genes, we were not able to identify the precise location of conserved, intronic or exonic resident miRNA and compare it with conserved locations in the human, mouse or cow genomes. Godnic *et al.* [65] screened for intragenic precursors in the human, mouse and chicken genomes and found 27 precursors with conserved co-locations between the 3 species. Among these, 16 precursors were found amongst the 43 conserved between human, mouse, cow and goat in our analysis (*let-7 g, mir-101-2, mir-103, mir-107, mir-128-1, mir-1306, mir-140, mir-15b, mir-16b, mir-211, mir-218-1, mir-26a-1, mir-32, mir-33a, mir-455, let-7-2*), so the location of these precursors appears to be highly conserved in all vertebrates. Six intragenic precursors were found on

Table 2 Intragenic miRNA precursors in human, mouse, cow and goat

	Human	Mouse	Cow	Goat
Known miRNA genes	1,881	1,193	808	924
Within protein-coding genes	1,018	694	285	263
% of known miRNA	*54%*	*58%*	*35%*	*28%*

Human, mouse and cattle precursors were downloaded from miRBase v21, and protein-coding gene locations were downloaded from BioMartEnsembl (http://www.ensembl.org/biomart). The locations of goat mRNA were obtained from Dong et al. [18].

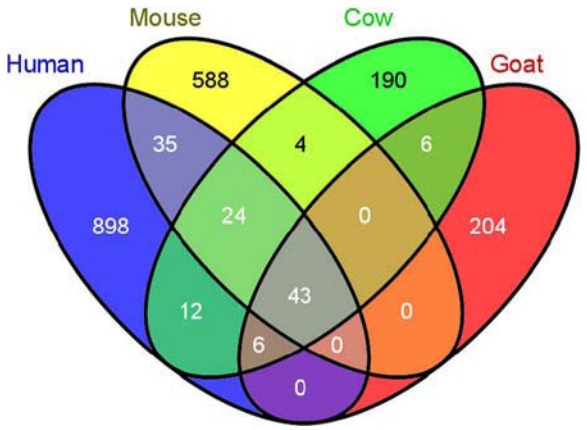


Figure 5 Conserved intragenic precursors in human, mouse, cow and goat. Human, mouse and cattle precursors were obtained from miRBase v21, and the locations of protein-coding genes were downloaded from BioMartEnsembl (http://www.ensembl.org/biomart). The locations of goat mRNA were obtained from Dong et al. [18].

chromosome X in human, mouse, cow and goat. Chromosome X was the only chromosome on which the locations of host genes were conserved between species compared using autosomes. The location of host genes on chromosome X appears to be markedly conserved between species (Additional file 10: Table S7). As some goat precursors were localized in genes coding for proteins for which the Ensembl name was not available, referred to as "deprecated identifiers" (Additional file 9: Table S6), the comparison with intragenic precursors in human, mouse and cow enabled the characterization of seven host genes per type of conservation (Additional file 9: Table S6). Furthermore, the locations of 24 precursors were conserved between human, mouse and cow (Figure 5). Among these 24 intragenic precursors, ten were detected in the goat during the present study. These ten miRNA could also be localized in protein-coding genes in the goat, but the lack of annotation of the goat genome probably prevented their identification. In addition, among these ten miRNA, *mir-128-2*, *mir-218-2* and *mir-301a* were found in the *ARPP21* (cAMP-regulated phosphoprotein), *SLIT3* (Slit homolog 3) and *SKA2* (Spindle and kinetochore associated complex subunit 2) genes in human, mouse, cow and chicken [65]. By investigating annotated goat mRNA, transcript coding for SKA2 was found to be annotated in the goat genome, suggesting that *mir-301a* is not intragenic in goat. However, the transcript coding for both ARPP21 and SLIT3 could not be retrieved. Furthermore, the genomes of human, mouse, cow and chicken have been well characterized by comparison with very recently assembled goat genome. Consequently, it could be hypothesized that *ARPP21* and *SLIT3* have not yet been described in the goat genome, and the presence of conserved intragenic precursors may indicate the location of these genes in this genome. Among the seven other conserved intragenic precursors in human, mouse and cow, *mir-1249* in the host gene *KIAA0930* and *mir-499* in the host gene *MYH7B* (Myosin heavy chain 7B cardiac muscle beta) were not retrieved either in the goat protein-coding genes available, suggesting once again that these genes have yet to be described in the goat genome. Using the conservation of precursor locations in well-known genomes may constitute a useful tool to predict the location of protein-coding genes that have not yet been described in newly assembled genomes such as the goat.

Evidence suggests that intragenic miRNA and host genes might be processed from the same RNA [66], and are often co-expressed with their host genes [13,67]. Previous studies indeed reported that conserved resident precursors such as *mir-26a/b* might cooperate with their host genes, the carboxy-terminal domain RNA polymerase II polypeptide A small phosphatase (*CTDSP*) family, in the regulatory network of G1/S phase transition [68]. Another example is *mir-33a*, which may act in concert with its *SREBF2* host genes to govern intracellular function and cholesterol homeostasis in vertebrates, thus representing an example of miRNA-host gene cooperation in regulating a metabolic pathway [69]. Evaluating the expression of host genes relative to that of their resident precursors in the lactating mammary gland could provide new insights into the regulation of mammary function and/or development.

Screening for miRNA in bovine quantitative trait loci

Results of the QTL mapping studies that have been performed in livestock species are available in the animal QTL database (http://www.animalgenome.org/). Because no QTL mapping studies have been reported for goat in this QTL database, bovine QTL data were used in our study to investigate the localization of precursors expressed in mammary gland QTL. In cattle, some 2,307 QTL out of a total of 8,305 have been reported to be associated with milk traits (Additional file 11: Table S8).

Comparative mapping enables exploitation of the whole genome sequence and its annotation available for a model species, and inference of this information to other species whose genome annotation has not been well characterized. In this regard, a comparative analysis of the known goat precursors identified in the present study and the precursors expressed in bovine lactating mammary gland [44] was performed, and revealed 255 highly precursors conserved between these species.

Out of these, 114 were located within QTL regions associated with milk traits and distributed within all bovine chromosomes except BTA 1, 9, 11, 12, 17, 28 and X (Table 3). Cattle QTL have very large genome coverage and therefore could explain the anchorage of a high number of miRNA in

Table 3 Goat miRNA in milk bovine QTL

	Associated with production	*Associated with components*				*Associated with health*
	Milk yield	**Milk fat**	**Milk protein**	**Milk cells**		
		Milk fat percentage and content	***Milk fat yield***	***Milk protein percentage and content***	***Milk protein yield***	***Somatic cell score***
BTA2						mir-26b
BTA 3	mir-186	mir-190b, mir-186	mir-190b, mir-186, mir-101-1	mir-190b,, mir-186, mir-101-1	mir-190b, mir-186	mir-190b,
BTA 4	mir-129-1	mir-490, mir-671, mir-196b, mir-148a, mir-335			mir-671, mir-148a, mir-196b	mir-671
BTA 5	mir-33a, let-7a-3, let-7b, mir-331, mir-26a-2, mir-1251, mir-135a-2	mir-33a, mir-331, mir-26a-2, mir-677, mir-135a-2, mir-1251	mir-331, mir-26a-2, mir-677, mir-135a-2, mir-1251	mir-33a, mir-331, mir-26a-2, mir-677, mir-135a-2, mir-1251	mir-331, mir-26a-2, mir-677, mir-135a-2, mir-1251	mir-331, mir-26a-2, mir-135a-2, mir-1251
BTA 6	mir-2284ab, mir-218-1	mir-2284ab, mir-218-1	mir-2284ab, mir-218-1	mir-2284ab, mir-218-1	mir-218-1	mir-2284ab, mir-218-1
BTA 7	mir-181c, mir-1271, mir-143, mir-145, mir-378a, mir-146a	mir-340, mir-1271, mir-145, mir-378a, mir-143, mir-146a	mir-340	mir-181c,	mir-181c, mir-143, mir-145, mir-378a, mir-146a	mir-181c, mir-143, mir-145, mir-378a, mir-146a
BTA 8					mir-455, mir-23b,, mir-24-1, let-7d	mir-31
BTA 10	mir-628		mir-628, mir-7859	mir-7859	mir-628, mir-7859	mir-628, mir-7859
BTA 12						
BTA 13	mir-499		mir-1388, mir-6123, mir-296, mir-499		mir-6123, mir-296, mir-499	
BTA 14	mir-151, mir-30d, mir-30b	mir-151, mir-30d, mir-30b,	mir-151, mir-30d, mir-30b	mir-151, mir-30d, mir-30b	mir-151, mir-30d, mir-30b	mir-151, mir-30d, mir-30b
BTA 15			mir-34b, mir-34c, mir-670, mir-129-2, mir-130a		mir-34b, mir-34c, mir-670, mir-129-2, mir-130a	
BTA 16	mir-34a				mir-34a, mir-29b-2, mir-29c	
BTA 18	let-7e, mir-125a, mir-138-2, mir-140, mir-99b			mir-99b, let-7e, mir-125a		mir-138-2, mir-140, mir-769,

Table 3 Goat miRNA in milk bovine QTL *(Continued)*

			mir-769, mir-99b, let-7e, mir-125a		mir-769, mir-99b, let-7e, mir-125a	mir-99b, let-7e, mir-125a
BTA 19		mir-423, mir-196a-1, mir-10a, mir-338, mir-6516	mir-423, mir-196a-1, mir-10a, mir-338	, mir-423, mir-196a-1, mir-10a, mir-338		mir-423, mir-196a-1, mir-10a, mir-338
BTA 20	mir-449a, mir-582,	mir-582, mir-449a	mir-582	mir-582, mir-449a	mir-582, mir-449a	mir-582, mir-449a
BTA 21	mir-184, mir-7-1, mir-345, mir-127, mir-432, mir-136, mir-370, mir-379, mir-411a, mir-380, mir-411b, mir-758, mir-494, mir-543, mir-495, mir-376e, mir-376c, mir-376d, mir-376b, mir-376a, mir-1185, mir-381, mir-487b, mir-541, mir-655, mir-487a, mir-382, mir-134, mir-154a, mir-154b, mir-154c, mir-377, mir-541, mir-3957, mir-412, mir-369, mir-410, mir-656, mir-342, mir-382, mir-411c, mir-495, mir-665, mir-493, mir-485	mir-1185, mir-345, mir-127, mir-432, mir-136, mir-370, mir-379, mir-411a, mir-380, mir-411b, mir-758, mir-494, mir-543, mir-495, mir-376e, mir-376c, mir-376d, mir-376b, mir-376a, mir-1185, mir-381, mir-487b, mir-541, mir-655, mir-487a, mir-382, mir-134, mir-154a, mir-154b, mir-154c, mir-377, mir-541, mir-3957, mir-412, mir-369, mir-410, mir-656, mir-342, mir-382, mir-411c, mir-495, mir-665, mir-493, mir-485				mir-7-1
BTA 22			mir-135a-1, mir-191, mir-425	mir-26a-1, mir-138-1, mir-135a-1, let-7 g, mir-191, mir-425, mir-128-2		
BTA 23	mir-133b, mir-2285ad		mir-133b, mir-2285ad	mir-133b	mir-133b, mir-2285ad	mir-2285ad
BTA 24						mir-1-2, mir-133a-2
BTA 25	mir-106b, mir-25, mir-93				mir-106b, mir-25, mir-93	mir-193b
BTA 26	mir-146b, mir-202	mir-146b, mir-202	mir-146b, mir-202	mir-146b, mir-202	mir-146b, mir-202	
BTA 27	mir-383	mir-383			mir-383	
BTA 29	mir-194-2, mir-192				mir-708, mir-194-2, mir-192	

The names and locations of goat miRNA precursors identified during this study were compared with bovine miRNA expressed during lactation [44] and localized in QTL associated with milk (http://www.animalgenome.org).

these QTL regions. The presence of miRNA clusters in these QTL regions was also noted. Indeed, the larger cluster containing 42 precursors (*mir-379/656* cluster) in the bovine genome was found within a QTL region for milk fat percentage and content on BTA 21. The *mir-34b/34c* cluster, containing *mir-34b*, *mir-34c*, *mir-670*, *mir-129-2* and *mir-130a*, was also identified within QTL regions for milk fat yield and for milk protein yield on BTA 15.

Interestingly, several precursors were only found in QTL associated with one type of trait; for example, *mir-26b* on BTA 2 located in a QTL associated with the somatic cell score. On BTA 15, the 5 intraQTL precursors were found relative to milk fat and protein yield. Furthermore, on BTA 7, mir-340 was only found in QTL associated with milk fat. Finally, an intragenic miRNA, *mir-33a*, was also localized in a QTL linked to milk fat content. As mentioned above, the host gene of *mir-33a*, *SREBF2*, is known to regulate the expression of several lipogenic enzymes in numerous tissues involving the mammary gland, and plays a key role in controlling cholesterol homeostasis [70]. Intragenic *mir-33a* and the host gene *SREBF2* may act in a coordinated manner to govern lipid metabolism [69], their presence in QTL associated with milk fat content possibly revealing a role for this cooperation in the regulation of milk fatty acid traits. However, further investigations are needed to attribute different QTL to miRNA and their cooperation, because although the presence of precursors in QTL has been shown, no studies have yet attempted to unravel the role of miRNA in milk QTL traits.

Although QTL regions are not well conserved between breeds within the same species nor between different species, it is well documented that syntenic regions are highly conserved between species [71]. It is impossible at this stage to infer any association between these highly conserved goat miRNA genes and milk traits. However, syntenic regions may contain highly conserved orthologous genes and this information could constitute a starting point to study association of genes or clusters of genes with particular traits. Further validation studies should therefore be undertaken in order to check whether miRNA genes that are highly conserved in cattle could also be associated with milk traits.

Conclusions

The present study provides a full catalogue of miRNA expressed in the goat mammary gland at peak lactation, together with each chromosomal location. To the best of our knowledge, this work represents a significant enrichment of the repertoire of goat miRNA and their location on the genome.

During this study, the bioinformatic detection of goat miRNA was carried out using three alternative strategies. The first one was a *de novo* predictive approach using the whole goat genome sequence for mapping and annotating sequenced reads. The second and third approaches involved a bovine and goat miRNA gene repertoire, respectively, as reference. Comparing the three approaches demonstrated that the second produced more exhaustive results, but *de novo* prediction revealed identical results that could be used as in a predictive and quantification strategy for species for which no or only a few miRNA have been reported in miRBase and whose genome is not fully known.

We report the identification of 924 miRNA in the goat mammary gland, 263 of which were found to be intragenic. Of these, the intragenic locations of 43 goat precursors were found to be conserved among human, mouse and cow, suggesting a conserved regulation of their expression between species regarding these intragenic miRNA. Conservation of the location of miRNA allowed us to hypothesize as to the location of genes that have not yet been annotated in the goat genome.

Preliminary studies to compare the goat and cattle genomes showed that 114 conserved precursors expressed in the lactating mammary gland of both species were localized within QTL regions associated with milk production traits. Further analyses are now required to clarify the potential effects of mammary miRNA on milk production traits, particularly in the goat.

All the goat miRNA identified during this work will be added to miRBase and can therefore serve as a reference for future studies.

Availability of supporting data

The data sets supporting the results of this article are available in Gene Expression Omnibus (GEO) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/) with accession number: GSE61025.

Additional files

Additional file 1: Table S1. Read counts and percentage of read positions with an average base quality over 30.

Additional file 2: Figure S1. Structure of some randomly chosen known and predicted precursors. In red associated miRNA.

Additional file 3: Table S2. Sequences of unmapped reads on potential precursors.

Additional file 4: Table S3. Chromosomal location of precursors on the goat genome.

Additional file 5: Table S4. Goat miRNA expressed in the lactating mammary gland.

Additional file 6: Figure S2. Quantitative RT-PCR validation of NGS data.

Additional file 7: Figure S3. Map of miRNA precursors on the goat genome CHIR_1. At the left of the chromosome, putative (red) and known (green) precursors localized on the + strand,. At the right of the chromosome, putative (blue) and known (green) precursors localized on the − strand.

Additional file 8: Table S5. Cluster of precursors in the goat genome.

Additional file 9: Table S6. Intragenic goat precursors.

Additional file 10: Table S7. Intragenic precursors conserved in human, mouse, cattle and goat.

Additional file 11: Table S8. Bovine QTL associated with milk.

Competing interests
The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions
Conceived and designed the experiments: LM, CL, FLP. Performed the experiments: LM, SM Analysed the data: LM, SM, MB, SLG, CL, FLP. Wrote the paper: LM, CL, FLP. All authors read and approved in the final manuscript.

Acknowledgements
L Mobuchon is funded by INRA and ApisGène grants under the NutriMirMa project.

Author details
[1]INRA, UMR1313 Génétique Animale et Biologie Intégrative, F-78350 Jouy-en-Josas, France. [2]INRA, UMR1213 Herbivores, F-63122 Saint Genès Champanelle, France. [3]Clermont Université, VetAgro Sup, UMR Herbivores, BP 10448F-63000 Clermont-Ferrand, France.

Received: 4 March 2015 Accepted: 18 March 2015
Published online: 11 April 2015

References
1. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell. 2004;116(2):281–97.
2. Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. Nature. 2010;466(7308):835–40.
3. Berezikov E, Guryev V, van de Belt J, Wienholds E, Plasterk RH, Cuppen E. Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes. Cell. 2005;120(1):21–4.
4. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. Genome Res. 2009;19(1):92–105.
5. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. Embo J. 2004;23(20):4051–60.
6. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. Nat Rev Mol Cell Biol. 2014;15(8):509–24.
7. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. Nat Cell Biol. 2009;11(3):228–34.
8. Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK, Jin H, Kim VN. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. Genes Dev. 2004;18(24):3016–27.
9. Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ. miRBase: tools for microRNA genomics. Nucleic Acids Res. 2008;36(Database issue):8.
10. Ambros V. The functions of animal microRNAs. Nature. 2004;431(7006):350–5.
11. Baskerville S, Bartel DP. Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. RNA. 2005;11(3):241–7.
12. Yuan X, Liu C, Yang P, He S, Liao Q, Kang S, et al. Clustered microRNAs' coordination in regulating protein-protein interaction network. BMC Syst Biol. 2009;3(65):1752–0509.
13. Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. Genome Res. 2004;14(10A):1902–10.
14. Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. Nat Rev Mol Cell Biol. 2009;10(2):126–39.
15. Rearick D, Prakash A, McSweeny A, Shepard SS, Fedorova L, Fedorov A. Critical association of ncRNA with introns. Nucleic Acids Res. 2011;39(6):2357–66.
16. Lutter D, Marr C, Krumsiek J, Lang EW, Theis FJ. Intronic microRNAs support their host genes by mediating synergistic and antagonistic regulatory effects. BMC Genomics. 2010;11(224):1471–2164.
17. Tsang J, Zhu J, van Oudenaarden A. MicroRNA-mediated feedback and feedforward loops are recurrent network motifs in mammals. Mol Cell. 2007;26(5):753–67.
18. Dong Y, Xie M, Jiang Y, Xiao N, Du X, Zhang W, et al. Sequencing and automated whole-genome optical mapping of the genome of a domestic goat (Capra hircus). Nat Biotechnol. 2013;31(2):135–41.
19. Ji Z, Wang G, Xie Z, Zhang C, Wang J. Identification and characterization of microRNA in the dairy goat (*Capra hircus*) mammary gland by solexa deep-sequencing technology. Mol Biol Rep. 2012;39(10):9361–71.
20. Metpally RP, Nasser S, Malenica I, Courtright A, Carlson E, Ghaffari L, et al. Comparison of analysis tools for miRNA high throughput sequencing using nerve crush as a model. Front Genet. 2013;4 (20):1–13.
21. Liu Z, Xiao H, Li H, Zhao Y, Lai S, Yu X, et al. Identification of conserved and novel microRNAs in cashmere goat skin by deep sequencing. PLoS One. 2012;7(12):7: e50001.
22. Wu J, Zhu H, Song W, Li M, Liu C, Li N, et al. Identification of conservative microRNAs in Saanen dairy goat testis through deep sequencing. Reprod Domest Anim. 2014;49(1):32–40.
23. Li Z, Liu H, Jin X, Lo L, Liu J. Expression profiles of microRNAs from lactating and non-lactating bovine mammary glands and identification of miRNA related to lactation. BMC Genomics. 2012;13:731.
24. Zhang XD, Zhang YH, Ling YH, Liu Y, Cao HG, Yin ZJ, et al. Characterization and differential expression of microRNAs in the ovaries of pregnant and non-pregnant goats (Capra hircus). BMC Genomics. 2013;14(157):1471–2164.
25. Ling YH, Ren CH, Guo XF, Xu LN, Huang YF, Luo JC, et al. Identification and characterization of microRNAs in the ovaries of multiple and uniparous goats (Capra hircus) during follicular phase. BMC Genomics. 2014;15(339):1471–2164.
26. Nawrocki EP, Kolbe DL, Eddy SR. Infernal 1.0: inference of RNA alignments. Bioinformatics. 2009;25(10):1335–7.
27. Longpre KM, Kinstlinger NS, Mead EA, Wang Y, Thekkumthala AP, Carreno KA, et al. Seasonal variation of urinary microRNA expression in male goats (Capra hircus) as assessed by next generation sequencing. Gen Comp Endocrinol. 2014;20(14):00011–2.
28. Wang Y, Zhang C, Fang X, Zhao Y, Chen X, Sun J, et al. Identification and profiling of microRNAs and their target genes from developing Caprine skeletal muscle. PLoS One. 2014;9(5):e96857.
29. Wu Z, Fu Y, Cao J, Yu M, Tang X, Zhao S. Identification of differentially expressed miRNAs between white and black hair follicles by RNA-sequencing in the goat (Capra hircus). Int J Mol Sci. 2014;15(6):9531–45.
30. Le Guillou S, Sdassi N, Laubier J, Passet B, Vilotte M, Castille J, et al. Overexpression of miR-30b in the developing mouse mammary gland causes a lactation defect and delays involution. PLoS One. 2012;7(9):e45727.
31. Li HM, Wang CM, Li QZ, Gao XJ. Mir-15a decreases bovine mammary epithelial cell viability and lactation and regulates growth receptor expression. Molecules. 2012;17(10):12037–48.
32. Wang J, Bian Y, Wang Z, Li D, Wang C, Li Q, et al. MicroRNA-152 regulates DNA methyltransferase 1 and is involved in the development and lactation of mammary glands in dairy cows. PLoS One. 2014;9(7):e101358.
33. Zhang C, Zhao Y, Wang Y, Wu H, Fang X, Chen H. Deep RNA sequencing reveals that microRNAs play a key role in lactation in rats. J Nutr. 2014;144(8):1142–9.
34. Lin X, Luo J, Zhang L, Wang W, Gou D. MiR-103 controls milk fat accumulation in goat (Capra hircus) mammary gland during lactation. PLoS One. 2013;8(11):e79258.
35. Lin XZ, Luo J, Zhang LP, Wang W, Shi HB, Zhu JJ. mir-27a suppresses triglycerides accumulation and affects gene mRNA expression associated with fat metabolism in dairy goat mammary gland epithelial cells. Gene. 2013;521(1):15–23.
36. Seaton G, Haley CS, Knott SA, Kearsey M, Visscher PM. QTL Express: mapping quantitative trait loci in simple and complex pedigrees. Bioinformatics. 2002;18(2):339–40.
37. Zhang Q, Boichard D, Hoeschele I, Ernst C, Eggen A, Murkve B, et al. Mapping quantitative trait loci for milk production and health of dairy cattle in a large outbred pedigree. Genetics. 1998;149(4):1959–73.
38. Heyen DW, Weller JI, Ron M, Band M, Beever JE, Feldmesser E, et al. A genome scan for QTL influencing milk production and health traits in dairy cattle. Physiol Genomics. 1999;1(3):165–75.
39. Plante Y, Gibson JP, Nadesalingam J, Mehrabani-Yeganeh H, Lefebvre S, Vandervoort G, et al. Detection of quantitative trait loci affecting milk production traits on 10 chromosomes in Holstein cattle. J Dairy Sci. 2001;84(6):1516–24.
40. Ashwell MS, Heyen DW, Sonstegard TS, Van Tassell CP, Da Y, VanRaden PM, et al. Detection of quantitative trait loci affecting milk production, health, and reproductive traits in Holstein cattle. J Dairy Sci. 2004;87(2):468–75.

41. Roldan DL, Rabasa AE, Saldano S, Holgado F, Poli MA, Cantet RJ. QTL detection for milk production traits in goats using a longitudinal model. J Anim Breed Genet. 2008;125(3):187–93.
42. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. EMBnetjournal. 2011;17(1):10–2.
43. Friedlander MR, Mackowiak SD, Li N, Chen W, Rajewsky N. miRDeep2 accurately identifies known and hundreds of novel microRNA genes in seven animal clades. Nucleic Acids Res. 2012;40(1):37–52.
44. Le Guillou S, Marthey S, Laloe D, Laubier J, Mobuchon L, Leroux C, et al. Characterisation and comparison of lactating mouse and bovine mammary gland miRNomes. PLoS One. 2014;9(3):e91938.
45. Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. Nucleic Acids Res. 2006;34(Database issue):D140–4.
46. Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. Nucleic Acids Res. 2014;42(Database issue):25.
47. Masotti A, Caputo V, Da Sacco L, Pizzuti A, Dallapiccola B, Bottazzo GF. Quantification of small non-coding RNAs allows an accurate comparison of miRNA expression profiles. J Biomed Biotechnol. 2009;659028(10):1.
48. Li D, Liu H, Li Y, Yang M, Qu C, Zhang Y, et al. Identification of suitable endogenous control genes for quantitative RT-PCR analysis of miRNA in bovine solid tissues. Mol Biol Rep. 2014;41(10):6475–80.
49. Quinlan AR, Hall IM. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. Bioinformatics. 2010;26(6):841–2.
50. Hafner M, Landgraf P, Ludwig J, Rice A, Ojo T, Lin C, et al. Identification of microRNAs and other small regulatory RNAs using cDNA library sequencing. Methods. 2008;44(1):3–12.
51. Friedlander MR, Chen W, Adamidi C, Maaskola J, Einspanier R, Knespel S, et al. Discovering microRNAs from deep sequencing data using miRDeep. Nat Biotechnol. 2008;26(4):407–15.
52. Romao JM, Jin W, He M, McAllister T, le Guan L. MicroRNAs in bovine adipogenesis: genomic context, expression and function. BMC Genomics. 2014;15(137):1471–2164.
53. Ghorai A, Ghosh U. miRNA gene counts in chromosomes vary widely in a species and biogenesis of miRNA largely depends on transcription or post-transcriptional processing of coding genes. Front Genet. 2014;5(100):1–11.
54. Guo X, Su B, Zhou Z, Sha J. Rapid evolution of mammalian X-linked testis microRNAs. BMC Genomics. 2009;10(97):1471–2164.
55. Bao H, Kommadath A, Sun X, Meng Y, Arantes AS, Plastow GS, et al. Expansion of ruminant-specific microRNAs shapes target gene expression divergence between ruminant and non-ruminant species. BMC Genomics. 2013;14(609):1471–2164.
56. Kim VN, Nam JW. Genomics of microRNA. Trends Genet. 2006;22(3):165–73.
57. Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. Embo J. 2002;21(17):4663–70.
58. Thatcher EJ, Bond J, Paydar I, Patton JG. Genomic organization of zebrafish microRNAs. BMC Genomics. 2008;9(253):1471–2164.
59. Guo L, Lu Z. Global expression analysis of miRNA gene cluster and family based on isomiRs from deep sequencing data. Comput Biol Chem. 2010;34(3):165–71.
60. Xu J, Wong C. A computational screen for mouse signaling pathways targeted by microRNA clusters. RNA. 2008;14(7):1276–83.
61. Li SC, Tang P, Lin WC. Intronic microRNA: discovery and biological implications. DNA Cell Biol. 2007;26(4):195–207.
62. Normanno N, Bianco C, Strizzi L, Mancino M, Maiello MR, De Luca A, et al. The ErbB receptors and their ligands in cancer: an overview. Curr Drug Targets. 2005;6(3):243–57.
63. Gauger KJ, Shimono A, Crisi GM, Schneider SS. Loss of SFRP1 promotes ductal branching in the murine mammary gland. BMC Dev Biol. 2012;12(25):12–25.
64. Ollier S, Robert-Granie C, Bernard L, Chilliard Y, Leroux C. Mammary transcriptome analysis of food-deprived lactating goats highlights genes involved in milk secretion and programmed cell death. J Nutr. 2007;137(3):560–7.
65. Godnic I, Zorc M, Jevsinek Skok D, Calin GA, Horvat S, Dovc P, et al. Genome-wide and species-wide in silico screening for intragenic MicroRNAs in human, mouse and chicken. PLoS One. 2013;8(6):e65165.
66. Shomron N, Levy C. MicroRNA-biogenesis and Pre-mRNA splicing crosstalk. J Biomed Biotechnol. 2009:594678(10):1–6.
67. Ronchetti D, Lionetti M, Mosca L, Agnelli L, Andronache A, Fabris S, et al. An integrative genomic approach reveals coordinated expression of intronic miR-335, miR-342, and miR-561 with deregulated host genes in multiple myeloma. BMC Med Genomics. 2008;1(37):1755–8794.
68. Zhu Y, Lu Y, Zhang Q, Liu JJ, Li TJ, Yang JR, et al. MicroRNA-26a/b and their host genes cooperate to inhibit the G1/S transition by activating the pRb protein. Nucleic Acids Res. 2012;40(10):4615–25.
69. Najafi-Shoushtari SH, Kristo F, Li Y, Shioda T, Cohen DE, Gerszten RE, et al. MicroRNA-33 and the SREBP host genes cooperate to control cholesterol homeostasis. Science. 2010;328(5985):1566–9.
70. Bommer GT, MacDougald OA. Regulation of lipid homeostasis by the bifunctional SREBF2-miR33a locus. Cell Metab. 2011;13(3):241–7.
71. Guan G, Yi M, Kobayashi T, Hong Y, Nagahama Y. A syntenic region conserved from fish to Mammalian x chromosome. Int J Evol Biol. 2014;873935(10):18.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- **Convenient online submission**
- **Thorough peer review**
- **No space constraints or color figure charges**
- **Immediate publication on acceptance**
- **Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar**
- **Research which is freely available for redistribution**

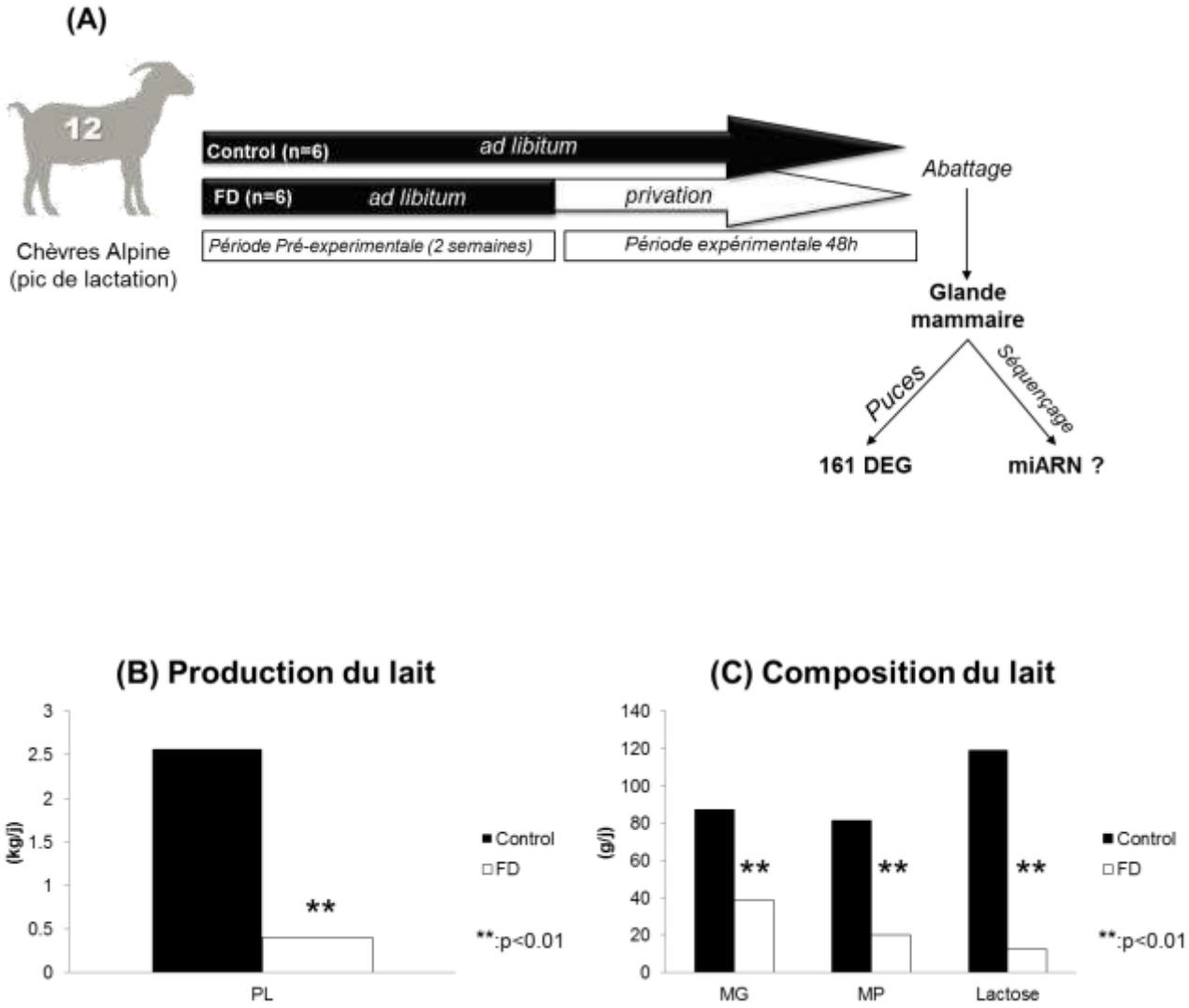
Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

BioMed Central

Le faible nombre de données disponibles chez la chèvre, nous a conduit à mettre en œuvre différentes approches d'analyse des données de séquençage. Leur comparaison a permis de démontrer qu'une prédiction *de novo* des miARN à partir du génome de l'espèce étudiée était une approche pertinente. Cette approche a fourni des résultats de prédiction identiques à ceux obtenus lorsque les miARN de l'espèce étudiée ou d'une espèce externe (le bovin, dans ce cas) étaient utilisés. Notre étude a donc permis de montrer que cette approche de prédiction *de novo* des miARN est pertinente chez des espèces n'ayant pas ou peu de miARN connus ou un génome incomplet. De plus, l'utilisation des précurseurs bovins pour l'annotation et la quantification des miARN a permis d'identifier plusieurs précurseurs n'ayant pas de coordonnées sur le génome caprin, suggérant que ce dernier n'est pas complétement assemblé. Les coordonnées chromosomiques des 924 précurseurs identifiés dans cette étude ont servi à dresser une carte de référence de l'emplacement des miARN sur les chromosomes caprins, sur laquelle les 46 clusters de précurseurs caractérisés ont également été placés. Ces clusters apportent une information quant à la régulation de l'expression des miARN qui les composent. L'identification des 263 précurseurs intragéniques et la conservation de 43 d'entre eux chez l'homme, la souris et le bovin sont aussi informatifs quant à la régulation de l'expression de ces miARN mais également de leurs gènes hôtes. La conservation de ces miARN intragéniques renseigne quant à la pression de sélection des gènes au cours de l'évolution de ces espèces. Enfin, l'identification de miARN dans des QTL associés à la production et la composition du lait permet de souligner quelques miARN qui pourraient avoir un rôle important sur la lactation.

Ces miRNomes de référence (murins, bovins et caprins) peuvent ainsi être utilisés pour étudier l'effet de différentes conditions d'élevage sur l'expression des miARN dans la glande mammaire, comme par exemple l'effet de différents challenges nutritionnels.

Figure 51 Privation alimentaire de 48h chez la chèvre en lactation. (A) Schéma expérimentale et résultats de transcriptomique. (B) (C) Effet de la privation sur la production et la composition du lait, respectivement. FD: Food Deprived, MG: Matières Grasses, MP: Matières Protéiques, PL : Production du Lait. *D'après Ollier et al., 2007.*



II. REGULATION NUTRITIONNELLE DES MIARN DANS LA GLANDE MAMMAIRE DE RUMINANTS EN LACTATION

Les miRNomes générés par les études précédentes ont été utilisés dans le cadre de cette thèse en tant que références pour l'étude de l'impact de la nutrition sur l'expression des miARN dans la glande mammaire de ruminants en lactation. Dans ce contexte, le premier objectif de cette étude était d'identifier les miARN dont l'expression est affectée par l'alimentation dans la glande mammaire. Le second objectif était de mettre en relation les données de miRNome et de transcriptome obtenues auparavant avec les mêmes échantillons afin d'identifier le rôle potentiel des miARN nutrirégulés sur l'expression des gènes différentiellement exprimés en fonction des différentes conditions nutritionnelles.

Ainsi, dans un premier temps, l'effet de l'alimentation a été étudié par une analyse globale de l'expression des miARN chez des chèvres placées en condition nutritionnelle extrême (privées d'aliments pendant 48h comparativement à des chèvres nourries de façon à couvrir leurs besoins). Dans un second temps, un modèle proche des conditions d'élevage a été choisi. L'effet d'une supplémentation en huile de tournesol a été traité par une analyse globale chez la vache en lactation et par une approche ciblée chez la chèvre en lactation.

II.1) EFFET D'UNE PRIVATION ALIMENTAIRE

II.1.1) ETUDE DE L'IMPACT SUR LE MIRNOME MAMMAIRE CHEZ LA CHEVRE EN LACTATION

L'approvisionnement de la glande mammaire en nutriments est crucial pour la fonction de lactation. Ainsi une privation d'alimentation pendant 48h entraine une forte chute de la production laitière associée à une diminution de la sécrétion des matières grasses dans le lait et d'une modification de la composition en acides gras (Figure 51) (Massart-Leen et Peeters, 1985, Ollier *et al.,* 2007). De plus, la comparaison des transcriptomes mammaires des chèvres en lactation privées ou non d'alimentation pendant 48h a permis d'identifier 161 gènes différentiellement exprimés (DEG) (ajusté avec la correction Bonferroni à 0.01%), dont 88% sont sous-exprimés suggérant une chute brutale du fonctionnement cellulaire. Parmi ces

derniers, sont présents les gènes codants pour le métabolisme des protéines du lait, du lactose et des lipides. L'étude souligne aussi la modification de l'expression de 14 DEG impliqués dans la prolifération et la différenciation cellulaire et/ou une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans la mort cellulaire programmée (de type I ou II) chez les chèvres privées d'alimentation. Ces observations suggèrent la mise en place des premières étapes d'involution dans la glande mammaire des chèvres privées d'alimentation (Ollier *et al.,* 2007). Cependant les mécanismes régulant l'expression de ces gènes en réponse à la nutrition ne sont pas encore connus. A travers leur rôle de régulateur transcriptionnel de leur ARNm cible, les miARN offrent des pistes pour comprendre les mécanismes de régulations des gènes en réponse à la privation alimentaire.

Par conséquent, notre étude visait à identifier l'impact de la privation alimentaire de 48h sur le miRNome mammaire chez des chèvres en lactation. Les miARN issus de la glande mammaire des chèvres nourries ou privées d'alimentation pendant 48h ont été séquencés par la méthode Solexa, Illumina. L'étude a aussi permis de mettre en relation ces données de séquençage haut débit avec les 161 DEG identifiés antérieurement par puces à ADN chez les mêmes individus. Ces travaux sont présentés dans l'**Article 3**.

Article 3: Food deprivation affects the miRNome in the lactating goat mammary gland. *Mobuchon L, Marthey S, Le Guillou S, Laloë D, Le Provost F, Leroux C*. PloS One, 2015 Oct 16;10(10):e0140111. doi: 10.1371

PLOS | ONE

RESEARCH ARTICLE

Food Deprivation Affects the miRNome in the Lactating Goat Mammary Gland

Lenha Mobuchon[1,2,3], Sylvain Marthey[1], Sandrine Le Guillou[1], Denis Laloë[1], Fabienne Le Provost[1], Christine Leroux[2,3]*

1 INRA, UMR1313 Génétique Animale et Biologie Intégrative, F-78350, Jouy-en-Josas, France, **2** INRA, UMR1213 Herbivores, F-63122, Saint Genès Champanelle, France, **3** Clermont Université, VetAgro Sup, UMR1213 Herbivores, BP 10448, F-63000, Clermont-Ferrand, France

* Christine.Leroux@clermont.inra.fr

CrossMark
click for updates

OPEN ACCESS

Citation: Mobuchon L, Marthey S, Le Guillou S, Laloë D, Le Provost F, Leroux C (2015) Food Deprivation Affects the miRNome in the Lactating Goat Mammary Gland. PLoS ONE 10(10): e0140111. doi:10.1371/journal.pone.0140111

Editor: Christian Schönbach, Nazarbayev University, KAZAKHSTAN

Received: March 17, 2015

Accepted: September 22, 2015

Published: October 16, 2015

Copyright: © 2015 Mobuchon et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: RNA sequencing data were deposited in the Gene Expression Omnibus (GEO): GSE61025.

Funding: This study was supported by the ApisGene (France) and INRA. Lenha Mobuchon's grant was financially supported by INRA and ApisGene. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Background

Nutrition affects milk composition thus influencing its nutritional properties. Nutrition also modifies the expression of mammary genes, whose regulation is not fully understood. MicroRNAs (miRNA) are small non coding RNA which are important post-transcriptional regulators of gene expression by targeting messenger RNAs. Our goal was to characterize miRNA whose expression is regulated by nutrition in the lactating goat mammary gland, which may provide clues to deciphering regulations of the biosynthesis and secretion of milk components.

Methodology/principal findings

Using high-throughput sequencing technology, miRNomes of the lactating mammary gland were established from lactating goats fed ad libitum or deprived of food for 48h affecting milk production and composition. High throughput miRNA sequencing revealed 30 miRNA with an expression potentially modulated by food deprivation; 16 were down-regulated and 14 were up-regulated. Diana-microT predictive tools suggested a potential role for several nutriregulated miRNA in lipid metabolism. Among the putative targets, 19 were previously identified as differently expressed genes (DEG). The functions of these 19 DEG revealed, notably, their involvement in tissue remodelling.

Conclusion/significance

In conclusion, this study offers the first evidence of nutriregulated miRNA in the ruminant mammary gland. Characterization of these 30 miRNA could contribute to a clearer understanding of gene regulation in the mammary gland in response to nutrition.

Introduction

The mammary gland synthesizes and secretes large quantities of milk components during lactation; these include proteins, lactose and lipids which have a considerable effect on the

nutritional, technological and sensory properties of milk. Ruminant milk production and composition are linked to both intrinsic and extrinsic factors, such as nutrition [1]. The synthesis and secretion of milk components by mammary epithelial cells involve numerous genes. Interestingly, nutrition affects the expression of genes encoding important factors for milk production in ruminants [2–4]. More precisely, 48 hours of food deprivation applied to lactating goats was shown to cause a drop in milk production and component secretion, associated with the altered expression of 161 genes, including those coding for lipogenic enzymes and major milk proteins [2]. However, the mechanisms underlying the regulation by nutrition of these genes remain poorly documented.

MicroRNAs (miRNA) are small non-coding RNA of ~22 nucleotides in length that principally regulate gene expression by altering mRNA stability or translation. MiRNA are thought to regulate at least ~60% of genes and are involved in all cellular processes [5–8]. Increasing numbers of miRNA are now being identified thanks to the latest advances in deep sequencing which enables access to an overview of the miRNA expressed in a tissue (referred to a miRNome).

However, few studies have reported the role of miRNA in development of the mammary gland [9–13] and in the lactation function [14, 15]. In particular, miRNA have been characterized in the ruminant mammary gland [16–19]. Recent *in vitro* studies have notably revealed potential roles for *miR-103* and *miR-27a* in the regulation of milk fat synthesis in goat mammary epithelial cells [20, 21].

Moreover, miRNA expression and function have been reported to be modulated by diets involving a deficiency or augmented intake [22, 23]. For example, caloric restriction up-regulates the expression of *miR-140-3p* in the epiphyseal growth plate of rats, determined using microarray and RT-qPCR analyses [24]. Ørom *et al.* [25] demonstrated that caloric restriction for six months had a considerable effect on the miRNA profile of the mouse mammary gland, determined by microarray. In addition, the expression of about fifteen known and predicted miRNA was changed in the muscle of monkeys subjected to caloric restriction when compared to those receiving an *ad libitum* diet [26]. Nevertheless, the nutritional regulation of ruminant miRNome is still poorly documented. In particular, in the ruminant mammary gland, no studies offering evidence of the effects of nutrition on miRNA expression have yet been performed.

Therefore, in order to better understand the mechanisms underlying the regulation of mammary gene expression in response to dietary factors, the aim of this study was to obtain an overview of mammary miRNA of goat which received two different diets and to identify miRNA differently expressed in these two conditions. Moreover, we studied the relationship between differently expressed miRNA and genes in the same samples. To our knowledge, this is the first study to have addressed the impacts of nutrition on the expression of miRNA in the mammary gland of ruminants and on lactation.

Materials and Methods

Ethics Statement

This study was performed at the experimental unit of INRA Research Center of Theix in 2003. At that time we did not require to submit each animal trail to ethical committee, the institute had its recommendations of the Animal Care as well as the Ethics Committee for Animal Experimentation of our region (Auvergne: CEMEAA number 02) that have been strictly followed. To minimize suffering, all goats were euthanized using captive bolt gun followed by exsanguination at the abattoir of the research center under accreditation number 63 345 001. All samples have been collected once the animals have been slaughtered and not while they were alive.

Animals and RNA preparation

Twelve Alpine goats at peak lactation (48±2 days post-partum at the beginning of the experiment) from the Lusignan experimental station (France) were chosen based on their homogeneity of their milk yield, number of lactations and their genotype at the α-S1-casein locus which has an impact on milk protein content and indirectly on milk fat content. Goats were fed twice daily an orchard grass hay-based diet for two weeks during the pre-experimental period. Forty-eight hours before slaughtering, six goats were fed *ad libitum* (Control), whereas the six others were food deprived (FD). Milk was collected 15 min before euthanization (S1 Fig). Tissues samples were collected within 30 min after euthanization. All animal manipulations and samples collection were the same as described by Ollier *et al.* [2]. Mammary gland tissues were isolated just after slaughtering, snap frozen immediately and stored at -80°C. RNA were extracted using TRIZol® Reagent (Life Technologies) and further purified using the SV Total RNA isolation system (Promega) to eliminate contaminating genomic DNA. The concentration and quality of RNA preparations were assessed using spectrophotometry (Nanodrop™, ND-1000) and 2100 Bioanalyzer Instrument (Agilent). Samples with an RNA Integrity Number (RIN) higher than eight were used. For high throughput sequencing, RNA from four Control goats and six FD goats were used.

Sequencing library preparation and data processing

The preparation and sequencing of libraries were performed by the IGBMC Microarray and Sequencing Platform (Strasbourg, France). Briefly, 7 μg of total RNA were used to generate small RNA libraries using the TruSeq™ Small RNA kit protocol (Illumina). In the first step, RNA adapters were ligated sequentially to each end of the RNA: first the 3′ RNA adapter (5′ TGGAATTCTCGGGTGCCAAGG 3′) that was specifically modified to target small RNA, then the 5′ RNA adapter (5′ GTTCAGAGTTCTACAGTCCGACGATC 3′). Small RNA ligated with 3′ and 5′ adapters were reverse transcribed and PCR amplified (30 sec at 98°C; [10 sec at 98°C, 30 sec at 60°C, 15 sec at 72°C] x 13 cycles; 10 min at 72°C) to obtain cDNA constructs. Finally, acrylamide gel purification of the 140–150 nt amplified cDNA constructs (corresponding to cDNA inserts from small RNA + 120 nt from the adapters) was performed. The libraries were checked for quality and then quantified using a 2100 Bioanalyzer Instrument (Agilent). The libraries were loaded in the flowcell at a concentration of 8 pM and clusters were generated using the Cbot before being sequenced on HiSeq 2500 (Illumina) as single-end 50 base reads, according to Illumina's instructions.

For analysis, sequences of adapters were removed using Cutadapt [27] and reads were filtered according to their size (17–28 nt). Data analyses were processed using mostly miRDeep2 software [28] as described by Le Guillou *et al.* [19]. The cleaned sequences were clustered into unique reads and then mapped to the reference Goat genome (CHIR_1.0, http://goat.kiz.ac.cn/GGD/, [29]). Precursors and miRNA were identified using the miRDeep2 core module, miRDeep2.pl. Potential miRNA datasets were created by adding known miRNA in goat (miRBase v21) to miRNA associated with predicted precursors with a miRDeep2 score $\geq$0. This number scored for the likelihood for a miRNA to be a real precursor according to the combined of energetic stability, positions and frequencies of read with Dicer processing. This score is comprised between 10 and -10, so a score $\geq$0 has been chosen representing because it allowed the discovery of a maximum of miRNA minimizing the rate of false positives. Then, the same operation was performed to create a data set of potential precursors. The quantifier.pl miRDeep2 module was then used to map unique reads, the set of potential miRNA and all known miRNA (miRBase v21) on the set of potential precursors enabling the annotation of miRNA. The quantification results produced by the quantifier.pl module were then filtered with a custom perl script

parse_miRDeep2_outputs.pl (https://mulcyber.toulouse.inra.fr/projects/bioinfoutils/) to eliminate any redundancy between known and predicted miRNA. RNA sequencing data were deposited in the Gene Expression Omnibus (GEO): GSE61025.

Quantitative RT-PCR

Seven miRNA were chosen for RT-qPCR validation among known miRNA which expression was affected by the food deprivation and based on their level of expression; *miR-99a-5p* (TaqMan® ID 006254_mat, Applied Biosystems), *miR-126-3p* (TaqMan® ID 008451_mat), *miR-140-3p* (TaqMan® ID 471823_mat), *miR-222-3p* (TaqMan® ID 000525), *miR-223-3p* (TaqMan® ID 002295), *miR-204-5p* (TaqMan® ID 000508), *miR-409-3p* (TaqMan® ID 002332). Reverse transcription was achieved on 10 ng of total RNA using the TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. In the thermal cycler (StepOne+, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), each 15 μL RT reaction followed 30 min at 16°C, 30 min at 42°C and 5 min at 85°C. Then, 1.3 μL of miRNA-specific cDNA from the reaction were amplified using TaqMan® Small RNA Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Amplification was performed at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 15 sec and 60°C for 1 min. All miRNA levels were normalized to the values of *U6* snoRNA [30, 31] and the results expressed as fold changes of threshold cycle (Ct) values relative to the control using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method [32].

Statistical analysis

For sequencing data, a comprehensive description of miRNA expression patterns was first of all made using a specific principal component analysis (PCA). Each goat is represented by a point, each colour corresponds to a diet and goats which have received the same diet are connected to their barycentre and an inertia ellipse.

Statistical analysis to determine differential expression was performed with R version 3.0.2 (R Development Core Team, 2013, http://www.R-project.org/) using the Bioconductor package DESeq2 version 1.0.17 [33]. DESeq2 utilizes a negative binomial distribution to model read counts per miRNA and then implements a method to normalise the counts. This normalisation procedure uses the library median of the ratios between the read count and the geometric mean of each miRNA as a scaling factor for each library. Fold changes were estimated using an empirical Bayes shrinkage procedure.

This procedure helps to moderate the broad spread in fold changes for genes with low counts, while it has negligible effect on genes with high counts. Since hypothesis tests are performed for miRNA-by-miRNA differential analyses, the p-values obtained need to be adjusted to correct for multiple testing. However, procedures to adjust p-values in order to control the number of false positives found often lead to a loss of power to detect truly differentially expressed miRNA because of the large number of hypothesis tests performed. To reduce the impact of such procedures, the filtering method described by Rau *et al.* [34] was used to remove genes that appeared to generate an uninformative signal. This method identifies a filtering threshold that maximizes so-called filtering similarity among replicates. Tests for differential expression were only applied to miRNA whose maximum count across all ten samples was higher than its threshold. This method was implemented under the Bioconductor HTSFilter package, version 1.0.0. The threshold value was found to be equal to 28. The p-values were adjusted for multiple testing using the Benjamini and Hochberg method [35], and those with an adjusted p-value <0.1 were considered to be significant.

For RT-qPCR analyses, data are represented as log base 2 of the fold change between Control and FD goats. The data were analysed using the Mann-Whitney test performed using R version 3.0.2 (R Development Core Team, 2013, http://www.R-project.org/).

Analysis of targeted pathways

Putative targets for differently expressed miRNA were predicted with a high degree of accuracy based on DIANA-microT-CDS version 5.0 [36] (http://diana.imis.athena-innovation.gr/). Targets of predicted miRNA were searched using TargetScan Custom release version 5.2 [37] (http://www.targetscan.org/). Putative targeted pathways were investigated through the use of QIAGEN's Ingenuity Pathway Analysis (IPA, QIAGEN Redwood City, www.qiagen.com/ingenuity).

Results and Discussion

Global description of mammary miRNomes in lactating goats

Ten libraries were constructed from the mammary gland of four Control and six FD goats using the Illumina/Solexa technology. A mean of about 14.2 and 16.4 million reads were obtained from the Control and FD libraries, respectively (Table 1). After removing sequencing adapters and filtering reads by their size, 6.8 and 8.5 million reads of 17–28 nt were obtained for the Control and FD libraries, respectively. The reads were mapped to the goat genome (CHIR 1.0), and clustered in 67,971 and 75,474 unique sequences, on average, in the Control and FD libraries, respectively. Using the goat precursors reported in miRBase version 21 (v21), 1,070 precursors were first of all predicted by miRDeep2 for Control and FD goats. Then, using all matures from miRBase v21, it was possible to identify 1,804 miRNA. This step allowed the detection of 539 known miRNA, corresponding to 422 miRNA known in goat and 117 miRNA not yet described in the goat but known in other species. In addition, 1,265 predicted miRNA were characterized, corresponding to miRNA never described in any species.

By performing expression pattern analysis using PCA, the ten libraries appeared to be clearly discriminated according to the treatments applied to the goats (Fig 1).

Using HTSFilter [34], a statistical threshold was applied and reduced the 1,804 miRNA detected to 470, 343 were known and 127 predicted (S1 Table). At this step, lists of miRNA were conserved between the different nutritional conditions.

Table 1. Summary of sequencing data.

	Control[a]	FD[b]
Raw reads	14,214,146	16,415,279
Cleaned reads[c]	13,787,000	15,681,069
Sized reads[d]	6,838,797	8,464,633
Sized and unique sequences processed	215,663	204,005
Reads mapped[e]	5,784,949	7,278,339
Unique sequences corresponding to mapped reads	67,971	75,474

[a]means of data for the 4 Control goat libraries

[b]means of data for the 6 FD goat libraries

[c]sequencing adapters removed

[d]17-28 nt size filter, used by the miRDeep2 software

[e]reads with at least one and at most five reported alignments, used by the miRDeep2 software.

doi:10.1371/journal.pone.0140111.t001

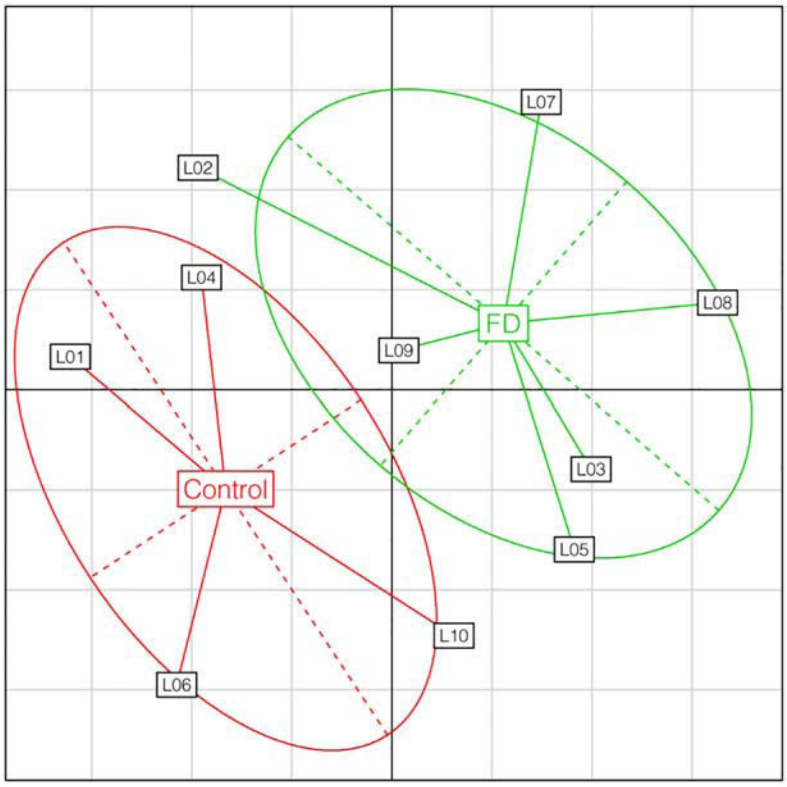


Fig 1. Principal component analyses of miRNA in Control and FD goats. L0X: represent 1 library, FD: Food deprived. Analyses were performed on miRNA for libraries according to the diet received by the goats. The two different diets are labelled within their 95% inertia ellipse (Red: Control; Green: FD).

doi:10.1371/journal.pone.0140111.g001

Identification of miRNA differentially expressed in the mammary gland of goats after food deprivation

To identify miRNA significantly affected by food deprivation, a differential analysis was performed. Using the DESeq2 package, of the 470 miRNA remaining after the HTSFilter analysis, 30 miRNA were found to be differently expressed between Control and FD goats, of which 14 were up-regulated and 16 were down-regulated (Table 2). Among the potentially nutriregulated miRNA, 19 were known miRNA and 11 were predicted (Table 2 and S2 Table; S2 Fig). Among these 30 potentially nutriregulated miRNA pointed out by high-throughput sequencing, the expression of seven miRNA have been studied by RT-qPCR analysis on 12 goats (six Control and six FD) (S3 Fig) with the aim to reinforce the sequencing data. Probably due to the difference of sensibility and normalization, only the expression of *miR-204-5p* was found significantly affected when analysed using RT-qPCR. Nevertheless, the orientation of regulation of all miRNA tested was in accordance with data obtained by sequencing data. It should be noted that nutritional intervention studies aim to measure low changes in gene expression. In these conditions, it has been suggested that PCR should not be considered as validation tool but as complementary technology [38]. The authors concluded that PCR approach allowed picking up the expression of genes that were not measurable on high throughput technology but also vice versa, and that both techniques have their own (dis)advantages and specificities. For less pronounced changes, both technologies may be useful as complementation rather than validation.

Table 2. MiRNA whose expression was affected by food deprivation in lactating goat mammary gland.

miRNA name	Family	Sequence	Control*	FD*	Fold change (FD/control)	P-value adjusted
Known miRNA						
miR-6119-5p		AGAGGTAAAAAATTGATTTGACT	19,082	14,396	0.77	0.07
miR-126-3p	mir-126	TCGTACCGTGAGTAATAATGC	17,218	22,489	1.28	0.06
miR-660-5p	mir-188	TACCCATTGCATATCGGAGCTGT	7,698	6,144	0.81	0.09
miR-99a-5p	mir-10	AACCCGTAGATCCGATCTTGT	5,533	7,709	1.35	0.06
miR-451-5p	mir-451	AAACCGTTACCATTACTGA	4,957	6,855	1.33	0.1
let-7c-5p	let-7	TGAGGTAGTAGGTTGTATGGTT	4,934	6,427	1.28	0.06
miR-140-3p	mir-140	ACCACAGGGTAGAACCACGGAC	3,798	4,888	1.27	0.09
miR-409-3p	mir-154	GAATGTTGCTCGGTGAACCCC	1,954	1,159	0.66	0.06
miR-125b-3p	mir-10	ACAAGTCAGGCTCTTGGGACC	1,918	2,496	1.27	0.06
miR-222-3p	mir-221	AGCTACATCTGGCTACTGGGTCTC	812	1,408	1.47	0.09
miR-204-5p	mir-204	TTCCCTTTGTCATCCTATGCCT	541	1,113	1.8	0.00
miR-99a-3p	mir-10	CAAGCTCGCTTCTATGGGTCTGT	472	615	1.27	0.08
miR-196a-5p	mir-196	TAGGTAGTTTCATGTTGTTGG	413	663	1.47	0.06
miR-494-3p	mir-154	TGAAACATACACGGGAAACCTCT	311	197	0.67	0.05
miR-223-3p	mir-223	TGTCAGTTTGTCAAATACCCCA	245	552	1.65	0.06
miR-188-5p	mir-188	CATCCCTTGCATGGTGGAGGG	117	81	0.73	0.09
miR-671-5p	mir-671	AGGAAGCCCTGGAGGGGCTGGAGG	73	50	0.73	0.09
miR-541-5p	mir-541	AAAGGATTCTGCTGTCGGTCCCACT	29	15	0.64	0.08
miR-223-5p	mir-223	TGTGTATTTGACAAGCTGAGTTG	17	34	1.6	0.06
Predicted miRNA						
chr12_17655-3p		CCCGGGTTTCGGCACCA	611	337	0.66	0.09
chr19_26739-5p		GAGGGTTTGGGTTTGGTCGTGGGA	508	289	0.67	0.09
chr3_4386-5p		ATAGTTCATTCAGGTTTTTCTG	420	227	0.66	0.09
chr27_34538-5p		AAAGTTCATTCAGGTTTTTCTG	412	224	0.66	0.09
chr3_4386-3p		GAAGAATCTGAATGAACATTT	253	152	0.66	0.05
chr23_30758-5p		GGGGATGTAGCTCAGTGGTAGA	133	68	0.66	0.09
chr9_13534-5p		GTACATGATGACAACTGGCTC	83	113	1.33	0.06
chr12_18027-5p		GAAAGGTTCATTTGGGTTTTT	56	97	1.51	0.08
chr22_29775-3p		ATCAGAGTCACGGCACCA	37	16	0.59	0.05
chr3_3319-5p		GAAAGTTTGTTTGGGTTTTTC	39	13	0.63	0.08
chr4_6064-5p		CCCGATCTTGTCTGATC	29	10	0.63	0.08

*Mean of normalized read counts.

The seed region of each miRNA is underlined. A positive log2 fold change means the corresponding miRNA is more highly expressed in FD goats than in Controls and vice versa. P-values were adjusted using the Benjamini-Hochberg [35] correction at 10%.

doi:10.1371/journal.pone.0140111.t002

Looking at the abundance of the 30 nutriregulated miRNA, two known miRNA (*miR-126-3p* and *miR-6119-5p*) were very highly expressed with normalized read counts greater than 10,000, while seven (*let-7c-5p*, *miR-99a-5p*, *miR-125b-3p*, *miR-140-3p*, *miR-409-3p*, *miR-451-5p* and *miR-660-5p*) were highly expressed and represented by normalized read counts of between 1,000 and 10,000 (Table 2). In addition, seven known (*miR-99a-3p*, *miR-188-5p*, *miR-196a-5p*, *miR-204-5p*, *miR-222-3p*, *miR-223-3p* and *miR-494-3p*) and six predicted miRNA (*chr3_4386-3p*, *chr3_4386-5p*, *chr12_17655-3p*, *chr19_26739-5p*, *chr23_30758-5p* and *chr27_34538-5p*) were expressed at moderate levels with normalized read counts of between

100 and 1,000, and three known (*miR-223-5p*, *miR-541-5p* and *miR-671-5p*) and five predicted (*chr3_3319-5p*, *chr4_6064-5p*, *chr9_13534-5p*, *chr12_18027-5p* and *chr23_30758-5p*) were weakly expressed with normalized read counts below 100. This last category may have a lesser impact in cells because of their weak expression.

Interestingly, the expression of both matures of the same precursor (*mir-99*, *mir-223* and *chr3_4384*) were affected by nutrition. This case has only ever been reported once for *miR-9/9**, whose expression was dramatically decreased after maternal supplementation with retinoic acid in the rat embryo spina bifida model [39]. The regulation may occur on the promoter of miRNA gene leading to deregulate both -5p and -3p strands. In all other cases in the literature, only one strand of the precursor has been found to be affected by nutrition. These observations suggest that two different regulatory mechanisms may exist. In this case, the regulation may happen on the stability of one or the other strand leading to the deregulation of only one strand by nutrition which seems to be the main mechanism in our study. These two different mechanisms of regulation require further investigations.

Otherwise, two clusters, defined as miRNA genes with an inter-distance $\leq$10 kb [40], were altered by food deprivation. Indeed, *miR-494-3p*, *miR-409-3p* and *miR-541-5p* are members of the greatest and conserved miRNA cluster located on goat chromosome 21. These three miRNA were down-regulated by food deprivation and their expressions were well correlated with a high mean Pearson correlation coefficient of 0.8. Similarly, *let-7c-5p* and *mir-99*, which clustered on the goat's X chromosome, were up-regulated in FD goats and displayed a strong mean Pearson correlation coefficient of 0.8. These results are consistent with the previously reported co-regulation of clustered miRNA, where they were transcribed as a long polycistron [41].

Among the nutriregulated miRNA, five (*miR-126-3p*, *miR-140-3p*, *miR-223-3p*, *miR-409-3p*, *miR-451-5p*) have previously been described as being affected by caloric restriction in others species and tissues. The expressions of *miR-223-3p* and *miR-409-3p* were increased, whereas that of *miR-451-5p* was decreased in skeletal muscle of monkeys receiving a restricted diet [26]. Conversely, *miR-409-3p* was down-regulated in the blood of mice receiving about 60% of their normal diet, whereas the expression of *miR-451-5p* was increased [42]. Most notable was the fact that the expressions of *miR-409-3p* (down-regulated in FD) and *miR-451-5p* (up-regulated in FD) appeared to be sensitive to caloric restriction. This apparent discrepancy between findings may have been due to the type of restriction, and probably to the tissues and species studied. In addition, the expressions of *miR-126-3p* and *miR-140-3p*, which were up-regulated in our study, were down-regulated in the epiphyseal growth plate of Sprague-Dawley rats by 60% food restriction for 10 days [24]. Although this nutritional model appears to be the closest to ours, deprivation in our case was much more drastic because the animals received no nutrients at all. Finally, among the predicted miRNA, the *chr3_4386-5p* and *chr27_34538-5p* sequences were found to be almost similar except at position 2, suggesting that these miRNA may belong to the same miRNA family. In addition some nutriregulated miRNA belonged to the same family. Indeed, *miR-409-3p* and *miR-494-3p* belonged to the *mir-154* family and *miR-188-5p* and *miR-660-5p* to the *mir-188* family (Table 2). Interestingly, it is known that members of a miRNA family are designed to execute similar biological functions [43]. Therefore, nutriregulated miRNA sharing the same family may have linked roles in the lactating mammary gland.

Putative functions of nutriregulated miRNA

Among the 30 miRNA that were regulated in our model, only a few have previously been described in the mammary gland. In the mouse mammary gland, *miR-126-3p* may inhibit cell proliferation; it may also regulate the expression of *CSN2* coding for β-casein, one of the major milk proteins, and PGR (ProGesteron Receptor) protein [44]. In addition, *miR-99a-5p* has

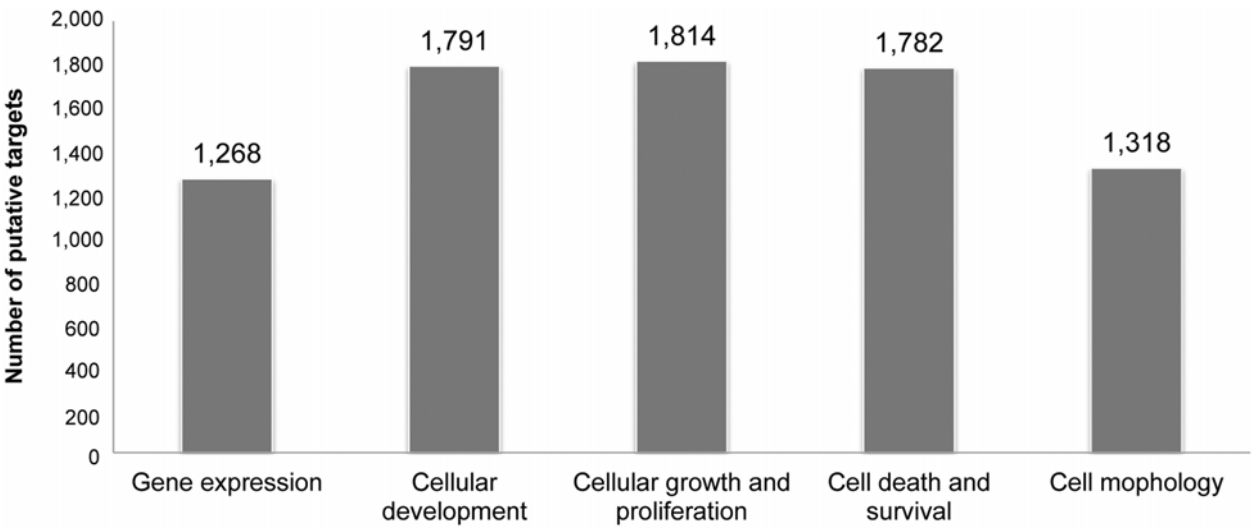


Fig 2. Molecular and cellular functions of potentially targeted genes by the 30 nutriregulated miRNA. Data were analysed through the use of QIAGEN's Ingenuity Pathway Analysis (IPA®, QIAGEN Redwood City, www.qiagen.com/ingenuity).

doi:10.1371/journal.pone.0140111.g002

been described as a modulator of the TGF β pathway affecting epithelial-to-mesenchyme transition in normal mouse mammary gland [45]. Therefore, in order to investigate the functional role of the 30 nutriregulated miRNA in the mammary gland, target gene predictions were performed based on miRNA/mRNA interactions using Diana-microT v5.0 for known miRNA and TargetScan Custom v5.2 for predicted miRNA. Because no predictive tools have so far been designed for ruminants, conservation between goat miRNA and humans was checked, particularly concerning the seed region that determines miRNA interactions with mRNA targets. Thus, 7,129 different putative targets for the 30 nutriregulated miRNA were identified. Investigating the molecular and cellular functions of these targets using Ingenuity Pathway Analysis revealed that "gene expression", "cellular development" and "cellular growth and proliferation" were the three pathways most significantly targeted (Fig 2). These findings suggest that food deprivation might lead to a change in gene expression through the actions of miRNA linked to cellular growth and proliferation, as well as the remodelling of mammary cells, as has been observed in this organ in the event of nutrient restriction [46].

In addition, some putative targets of nutritregulated miRNA in this study were associated with involution in the mammary gland; these included factors promoting involution such as *CASP3*, *IL6* and *STAT3*, or factors inhibiting involution such as *BCL2* [47, 48] (S3 Table). Markers of autophagosome formation, *MAP1LC3B2* and *ATG7*, were also found to be potentially targeted by *miR-188-5p* and *miR-223-3p*, respectively. These observations were in line with the drop in milk production and component synthesis previously observed in FD goats [2].

Potential involvement of nutriregulated miRNA in the mammary biosynthesis and secretion of milk components

Potential involvement in mammary lipid metabolism. Of all the 7,129 putative targets of nutriregulated miRNA, particular efforts were made to identify those involved in lipid metabolism. Very interestingly, nutriregulated miRNA may act in fatty acid availability (*VLDLR*), synthesis (*ACACA*), transport (*FABP*), activation (*ACS*) and desaturation (*SCD*), triglyceride synthesis (*AGPAT*) and in genes coding for proteins associated with the milk fat globule membrane (*BTN*, *XDH*) (Fig 3) [49]. Several nutriregulated miRNA also target transcription factors

such as the SREBF1 and PPARγ cofactors, *PPARGC1A* and *PPARGC1B* that govern the expression of essential lipogenic enzymes in the mammary gland (Fig 3). Moreover, other genes related to milk lipid metabolism, such as *INSIG2* (INSulin_Induced Genes 2) which codes for an endoplasmic reticulum protein that blocks the processing of SREBP, is predicted to be targeted by *chr12_18027-5p* [50]. Elsewhere, *miR-204-5p* may also target *LPIN2* (LiPIN 2), recently characterized in the bovine mammary gland [49] and involved in triacylglycerol accumulation [51]. The gene coding for FADS1 (Fatty Acid DeSaturase 1), which plays a role in triacylglycerol synthesis [52], is potentially targeted by *miR-671-5p*. Furthermore, *miR-125b-3p*, *miR-494-3p* and *chr3_3319-5p* may conjointly target *ABCA1* (ATP-Binding Cassette subfamily A member 1) which has been hypothesized to play a role in the transfer, storage and removal of cholesterol in the mammary gland [53]. Finally, five nutriregulated miRNA: *miR-222-3p*, *miR-188-5p*, *miR-541-5p*, *miR-494-3p* and *chr3_3319-5p*, may target *PTEN* (Phosphatase and TENsin homologue) (Fig 4). In particular, *miR-494-3p* binding has been confirmed experimentally in bronchial epithelial cells [54]. The role of *PTEN* has been characterized in dairy cow mammary epithelial cells (DCMECs), revealing that it plays a crucial role in the viability and proliferation capacity of cells, as well as in the secretion of β casein, triglycerides and lactose. In particular, *PTEN* may regulate the expression of key lactation-related pathways such as *PPARγ*, *SREBF1*, *mTOR*, *PRLR* and *GLUT1*, suggesting a pleiotropic role for *PTEN* in the lactation process [55].

Among the predicted miRNA, *chr3_3319-5p* appeared to be of great interest. Indeed, *chr3_3319-5p* potentially targets numerous genes involved in mammary metabolism. Its seed region is similar to that of *hsa-miR-561-3p*. This miRNA has not yet been reported in either the goat or cattle, but its identical seed region with *hsa-miR-561* suggests that this miRNA is part of the *mir-561* family, even though the function of this family is not yet known in the mammary gland (Fig 4, S4 and S5 Tables).

Taken together, these observations highlight a potentially synergistic action of miRNA in regulating mammary metabolic pathways, and offer perspectives for the study of new types of regulation in the lactating mammary gland in response to dietary treatments. Those miRNA which expression was affected by nutrition may modulate that of the genes responsible for fatty acid metabolism, lipid droplet formation and/or milk fat globule secretion at the same time, and thus consequently have a crucial role to play in the synthesis and secretion of milk components. In particular, *miR-409-3p* and *miR-494-3p* may target numerous genes involved in lipid metabolism and its regulation. It was notable that they belong to the same cluster and the same family, *mir-154*, which could be of considerable interest in future studies.

Potential involvement in the metabolism of mammary protein and lactose. Proteins are also a principal constituent of milk and are synthesized by mammary epithelial cells during lactation. Amino acids are supplied to the mammary epithelial cells by a system of amino acid membrane transporters [56]. Among the genes putatively targeted by nutriregulated miRNA, several amino acid transporters were identified (Table 3). The availability of amino acids in the mammary gland is important for the regulation of translation, and also appears to be one of the major limitations affecting milk protein synthesis [57], and nutriregulated miRNA may regulate this availability. Caseins (αs1, αs2, β andκ), the major milk proteins, are phosphorylated in mammary epithelial cells. This phosphorylation is involved in aggregation of the four caseins in micelles before their secretion into milk. Despite this key role, the phosphorylation step in mammary epithelial cells is still poorly documented. Interestingly, *miR-222-3p*, *miR-409-3p*, *miR-541-5p*, *miR-6119-5p*, *miR-660-5p*, *chr23_30758-5p* and *chr3_4386-5p* potentially target several genes coding for casein kinases 1 and 2 alpha and gamma (S4 Table). In addition, *miR-204-5p* potentially targets *ELF5* (E74-like factor 5) which belongs to the JAK-STAT signalling pathway and is essential for the expression of milk-related genes, particularly those coding

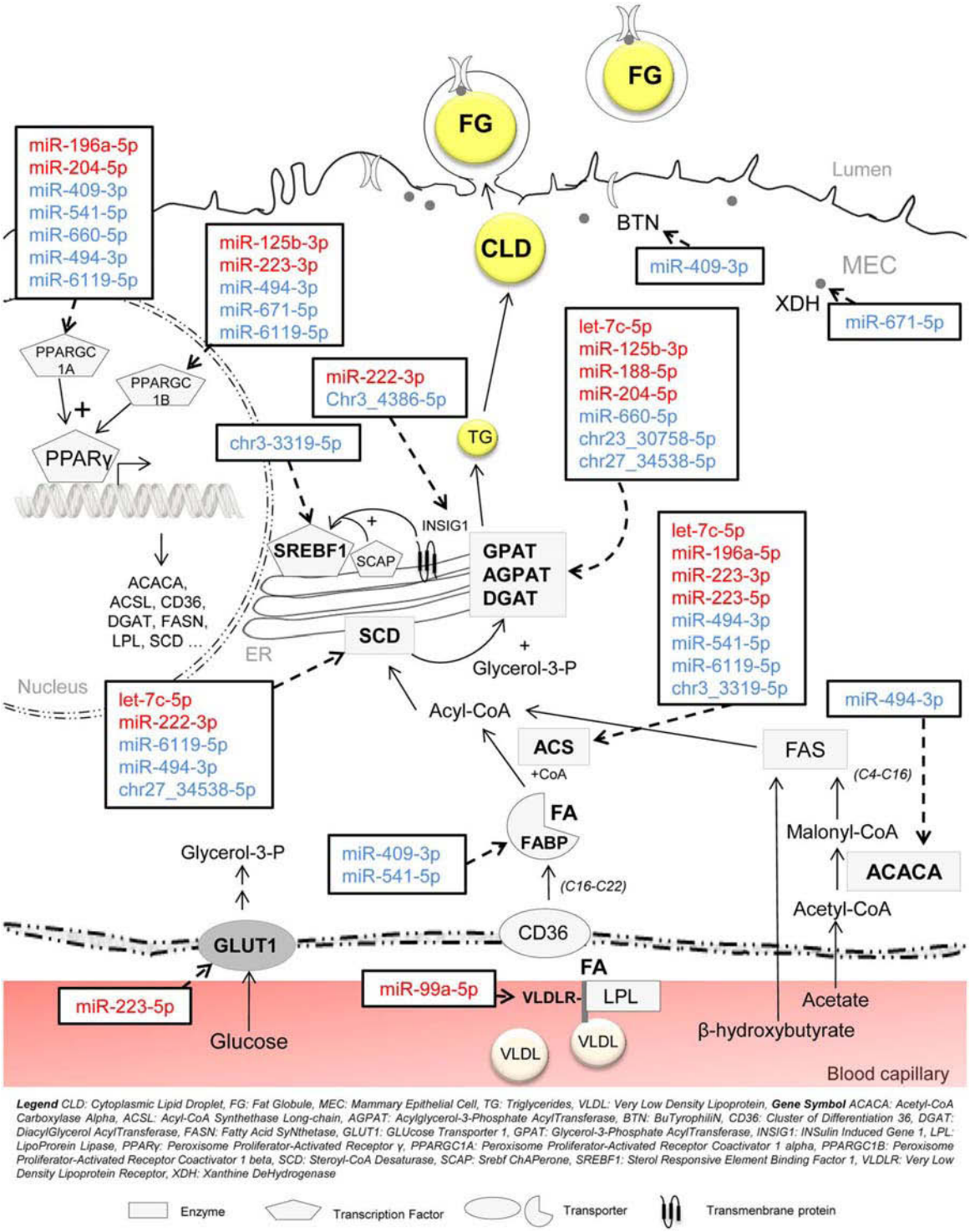


Fig 3. Potential involvement of nutriregulated miRNA in milk fat synthesis. In red, miRNA which expression was up-regulated in FD goat mammary glands compared with Controls, while those whose expression was down-regulated are in blue.

doi:10.1371/journal.pone.0140111.g003

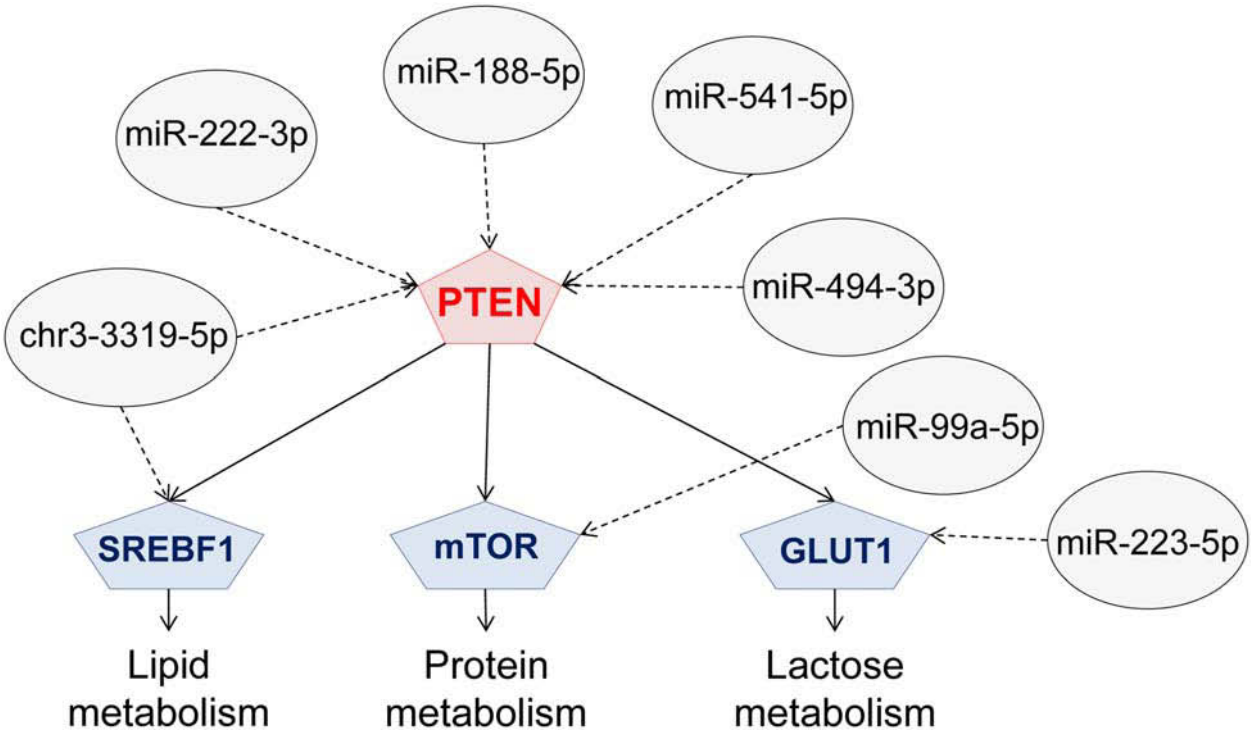


Fig 4. Potential contribution of nutriregulated miRNA to regulating PTEN and associated networks. GLUT1: GLUcose Transporter 1, mTOR: mechanistic Target Of Rapamycin, PTEN: Phosphatase and TENsin homolog, SREBF1: Sterol REsponsive Binding Factor 1.

doi:10.1371/journal.pone.0140111.g004

Table 3. Amino acid transporters potentially targeted by nutriregulated miRNA.

miRNA	Gene	Protein	Associated transport system	Description	*References*
miR-223-5p, miR-541-5p, miR-671-5p	SLC1A1	GLT-1;EAAT1	X^-_{AG}	Na+-dependent system for anionic amino acids	[61, 62]
miR-223-5p	SLC1A3	GLAST; EAAT1	X^-_{AG}	Na+-dependent system for anionic amino acids	[61]
miR-6119-5p	SLC1A4	ASCT1-SATT	ASC	Na+-dependent transporter, particularly linear dipolar amino acids (L-alanine, L-serine, L-cysteine)	[56]
miR-409-3p, miR-541-5p, chr3_3319-5p	SLC6A6	Taut	System Gly	Na+-Cl^--dependent system specific to β-amino acids	[61]
miR-671-5p	SLC7A1	CAT-1	y+	Na+-independent system specific to cationic amino acids	[63]
miR-126-3p	SLC7A5	LAT1	L	Na+-dependent electroneutral transport mechanism for neutral amino acids	[59]
miR-196a-5p, miR-223-3p	SLC7A8	LAT2	L	Na+-dependent electroneutral transport mechanism for neutral amino acids	[62]
miR-409-3p, miR-494-3p	SLC15A2	PEPT2	H+-peptide cotransporter 2	Proton-peptide electrogenic transporter	[64]
miR-671-5p	SLC36A1	PAT1		Proton/amino acid symporter	[59]
let-7c-5p, miR-409-3p, miR-494-3p	SLC38A2	SNAT2	System A	Na+-dependent system for amino neutral acids	[62]

Putative targets were predicted from DIANA microT v5.0 [36] for known miRNA and Custom Target Scan v5.2 [37] for predicted miRNA.

doi:10.1371/journal.pone.0140111.t003

for major milk proteins [58, 59]. Above all, *miR-99a-5p* was found to potentially target *mTOR* (mechanistic Target Of Rapamycin) and its binding site has been confirmed experimentally using the Luciferase Reporter Assay in breast cancer cell lines [60]. The regulation of protein synthesis in all mammalian tissues is under the control of *mTOR*, and especially the translation step. In addition, *mTOR* may also have a function in milk protein synthesis [59] (S4 Table), suggesting a potential role of *miR-99a-5p* in controlling this process.

Regarding differentially expressed miRNA targeting the SLC (Solute Carrier) family (S4 Table), *miR-223-5p* was found to target *SLC2A1* (GLUT1). Glucose is the primary precursor for lactose synthesis, the main milk carbohydrate. In the mammary gland of lactating cows, *GLUT1* mRNA and protein were shown to be strongly expressed whereas they were barely detectable in dry cows [65]. In addition, GLUT1 protein represents about half of glucose transporters in the Golgi membranes of lactating rat epithelial cells [66]. Consequently, *miR-223-5p* may have a role in regulating glucose uptake and lactose synthesis, a hypothesis which requires further investigation.

Putative targets differently expressed in FD goats

Of all the putative targets predicted for nutriregulated miRNA, 47 were among the genes previously identified as being significantly affected (named DEG) by food deprivation using a microarray technique [2] (S5 Table). One to six miRNA were predicted to targets these 47 DEG. In addition, when the way of variations in DEG and nutriregulated miRNA was taken account, 19 DEG were found to be potentially targeted by nutriregulated miRNA, including 18 down-regulated DEG which might be targeted by one to three up-regulated miRNA (Table 4) one up-regulated DEG (*CD24*) might be targeted by *chr3_3319-5p* which was down-regulated in FD goats. By investigating the cellular and molecular functions of these 19 DEG, "cellular death and survival", "cellular morphology" and "cell-to-cell interaction" were found to be among the five most targeted functions (data not shown). This suggests that the deregulation of miRNA may explain the phenotype of mammary tissue remodelling previously hypothesized in FD goats [2]. Among the DEG that may be targeted by three nutriregulated miRNA, *ESR1* is a transcription factor that regulates genetic programming of cell cycle progression and growth in the mammary gland. The knockout of *ESR1* in mice suggests its crucial role in alveologenesis during lactation [67]. Interestingly, *ESR1* was down-regulated by food deprivation and potentially targeted by *miR-125b-3p*, *miR-222-3p*, and *chr19_26739-5p*, and up-regulated in the mammary gland of FD goats. In addition *miR-222-3p* has been confirmed as directly targeting *ESR1* in breast cancer cell lines [68]. Its binding site (Fig 5) is conserved among different species, including cattle and goats. These observations suggest that the up-regulation of *miR-222-3p* by food deprivation may be responsible for the down-regulation of *ESR1*.

Furthermore, 11 nutriregulated miRNA (Table 4) were found to potentially target DEG in which three predicted miRNA *chr3_3319-5p*, *chr9_13534-5p* and *chr12_18027-5p*. Of the 11 nutriregulated miRNA that could target DEG, *let-7c-5p*, *miR-223-3p* and *miR-204-5p* may target seven, five and four DEG, respectively (Table 4). Notably, *miR-204-5p* and *miR-223-3p* are nutriregulated miRNA with the highest fold change in high throughput sequencing. In addition, *miR-223-3p* may target five DEG, three of which (*ANKFY1*, *PLAGL2* and *ZCCHC14*) encode for zinc finger proteins that bind DNA, suggesting that this miRNA may indirectly regulate gene transcription. Consequently, the deregulation of *miR-204-5p* and *miR-223-3p* by food deprivation may have a significant impact in the mammary gland through the regulation of DEG.

Co-localization of nutriregulated miRNA with QTL associated with traits

Quantitative Trait Loci (QTL) have been associated with economically important traits such as health through the detection of clinical mastitis (somatic cell score) as well as milk production

Table 4. Differently expressed genes potentially targeted by nutriregulated miRNA.

miRNA	Differently Expressed Genes
let-7c-5p	ABCC5, ANKFY1, DCBLD1, DCUN1D3, DPAGT1, LEPREL2, PLAGL2
miR-99a-3p	ZCCHC14
miR-125b-3p	ESR1
miR-140-3p	PLAGL2
miR-204-5p	IRF2BP2, KCNH8, PHLDB1, TSPAN31
miR-222-3p	ESR1, INSIG1
miR-223-3p	ANKFY1, ARFIP1, MYO1B, PLAGL2, ZCCHC14
miR-223-5p	EFHC1
chr3_3319-5p	**CD24**
chr9_13534-5p	ESR1, ZCCHC14
chr12_18027-5p	RAD9A, TMEM2

In bold, miRNA or DEG whose expression are upregulated by the food deprivation. ABCC5: ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 5, ANKFY1: Ankyrin repeat and FYVE domain-containing protein 1, ARFIP1: Arfaptin-1, CD24: Signal transducer CD24 precursor, DCBLD1: Discoidin, CUB and LCCL domain-containing protein 1 precursor, DCUN1D3: DCN1, defective in cullin neddylation 1, domain containing 3, DPAGT1: UDP-N-acetylglucosamine-dolichyl-phosphate N-acetylglucosaminephosphotransferase, EFHC1: EF-hand domain-containing protein 1, ESR1: Oestrogen receptor alpha, INSIG1: Insulin-induced gene 1 protein, IRF2BP2: Interferon regulatory factor 2 binding protein 2, KCNH8: Potassium voltage-gated channel subfamily H member 8, LEPREL2: Prolyl 3-hydroxylase 3 precursor, MYO1B: Myosin Ib, PHLDB1: Pleckstrin homology-like domain family B member 1, PLAGL2: Zinc finger protein PLAGL2, RAD9A: Cell cycle checkpoint control protein Rad9A, TMEM2: Transmembrane protein 2, TSPAN31: Tetraspanin-31, ZCCHC14: Zinc finger CCHC domain-containing protein 14.

doi:10.1371/journal.pone.0140111.t004

and composition (lactose, protein and fat) in livestock, particularly cattle [69]. However no QTL are yet available in the goat. Using conservation between species, cow miRNA expressed during lactation and conserved in the goat have been located in cattle QTL associated with milk production and composition (personal communication). Among the 30 miRNA nutriregulated in the present study, *mir-671* was located in QTL linked to somatic cells on bovine chromosome 4 (Table 5). It is also located in a QTL region associated with both milk protein yield and milk fat percentage and content. In addition, *mir-140* is located in QTL associated with the somatic cell score and milk yield on bovine chromosome 18. Furthermore, *mir-409*, *mir-494* and *mir-541* belonging to a large and conserved cluster in mammals have also been located in QTL associated with milk yield and milk fat percentage and content on bovine chromosome 21. As well as having many putative targets involved in lipid metabolism (Fig 3, S4 Table), *miR-494-3p* and *miR-409-3p* are also positioned in QTL regions associated with milk fatty acids, thus rendering these two miRNA good candidates to study their involvement in the regulation of milk lipid synthesis. The co-localization of nutriregulated miRNA with QTL associated with milk composition may provide clues to their role in the regulation of milk traits.

Conclusion

The findings reported here highlight for the first time using high throughput miRNA sequencing, 30 known or predicted miRNA in the ruminant mammary gland which expression seems to be nutriregulated. Among these 30 potentially interesting miRNA, members of clusters and similar families were found. Five of them have already been reported as being affected by

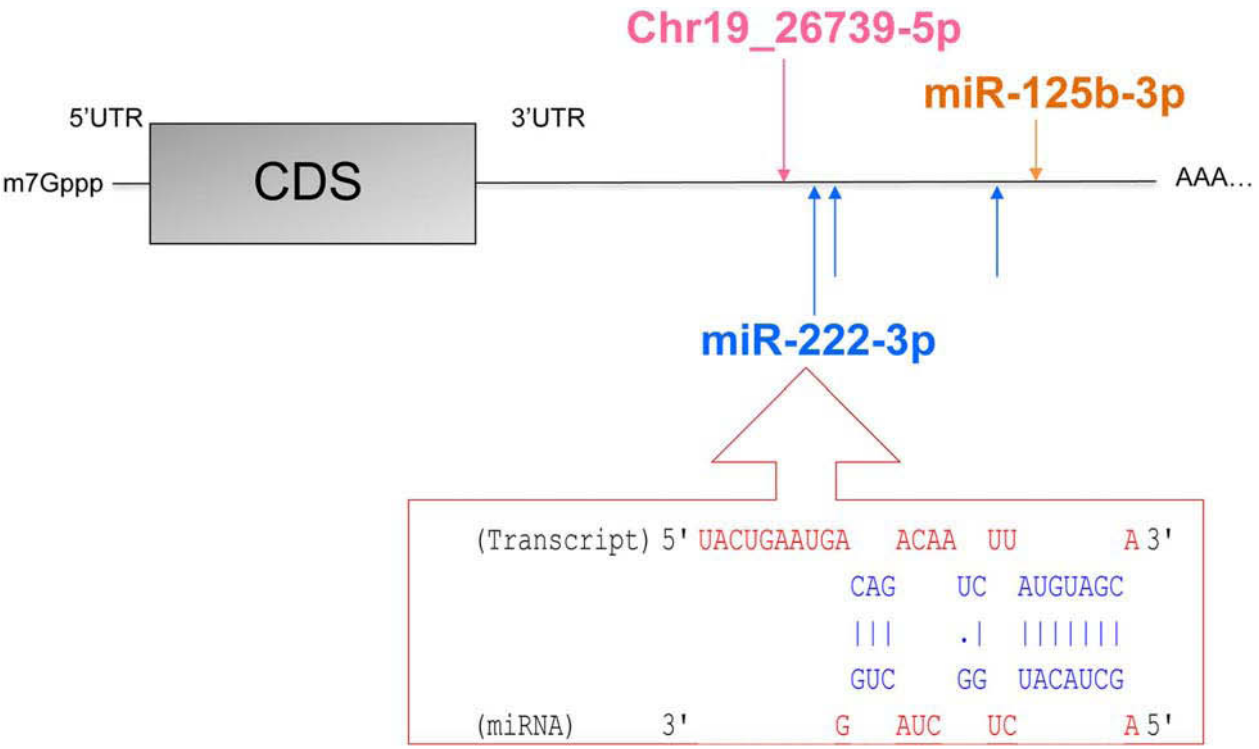


Fig 5. Nutriregulated miRNA binding sites on *ESR1* mRNA. Analyses were performed using DIANA microT v5.0 [36] for miR-125b-3p and miR-222-3p and Custom Target Scan v5.2 [37] for chr19_26739-5p. The interaction between 3'UTR of ESR1 and the seed region of miR-222-3p of one binding site is described in the box.

doi:10.1371/journal.pone.0140111.g005

nutrition in other species and tissues. By investigating the genes they might target, some nutriregulated miRNA appear to be good candidates for further studies in mammary gland biology. For example, *miR-494-3p*, located in QTL associated with milk fat in cows, may be preponderant for milk lipid synthesis, notably through the regulation of *PTEN*, and in targeting *mTOR*, *miR-99a-5p* may regulate milk protein synthesis. The links between miRNA and DEG previously identified by transcriptomic assays show that 19 DEG may be targeted by nutriregulated miRNA. These observations highlighted two miRNA, *miR-204-5p* and *miR-223-3p*, whose expression was the most markedly affected by food deprivation and which may target several DEG, suggesting important roles for both miRNA in the nutritional regulation of gene expression in the mammary gland. Nevertheless, further studies are necessary to support our results and to decipher the function of these miRNA in mammary epithelial cells.

Table 5. Nutriregulated miRNA which bovine equivalent is located in QTL associated with milk production and composition.

QTL	*Associated with milk components*		*Associated with mammary tissue health*
Bovine chromosome	**Fat percentage and content**	**Protein yield**	**Somatic cell score**
BTA 4	mir-671	mir-671	mir-671
BTA 18			mir-140
BTA 21	mir-494, mir-541, mir-409a		

Conservation between nutriregulated and bovine miRNA was checked and their localization in QTL (CattleQTLdb, http://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/BT/) associated with milk was investigated.

doi:10.1371/journal.pone.0140111.t005

MiRNA offer new insights to understand the impact of nutrition on the mammary gland and may help to clarify mammary gene regulation in order to modulate milk quality via nutrition. The nutrition model of food deprivation used in this study was a large challenge, so further studies should be performed with a diet that could be applied by livestock farmers in order to identify the nutriregulation of miRNA under breeding conditions.

Supporting Information

S1 Fig. Milk production, fat, protein and lactose in Control and FD goats. Data were extracted from [2] and were analysed with a Mann-Whitney test (n = 6). **: $p<0.01$.d: day.
(TIF)

S2 Fig. Structure of predicted precursors whose miRNA are differently expressed in FD versus Control goats. Putative targets were predicted from DIANA microT v5.0 [36] for known miRNA and Custom Target Scan v5.2 [37] for predicted miRNA.
(TIF)

S3 Fig. Quantitative RT-PCR validation of NGS data. The expression of miRNA was normalized with the expression of U6 in Control and FD goats. The relative abundance of the miARN is represented with boxplots (n = 6).
(TIF)

S1 Table. miRNA expressed in lactating goat mammary glands.
(XLSX)

S2 Table. Characteristics of nutriregulated predicted miRNA.
(XLSX)

S3 Table. Example of putative targets involved in mammary involution.
(XLSX)

S4 Table. Selected putative targets involved in mammary metabolism.
(XLSX)

S5 Table. Differently expressed genes potentially targeted by nutriregulated miRNA.
(XLSX)

Acknowledgments

Authors are grateful to L. Bernard for tissues isolation at slaughterhouse. They also specially thank J. Domagalski and J. Laubier for technical assistance for RNA extraction and RT-qPCR advices, respectively, as well as A. De La Foye for her help in statistics and Y. Chilliard and J. Rouel for their advices in nutrition.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CL FLP. Performed the experiments: LM. Analyzed the data: LM SM SLG DL. Contributed reagents/materials/analysis tools: LM FLP CL DL SLG SM. Wrote the paper: LM FLP CL.

References

1. Chilliard Y, Ferlay A. Dietary lipids and forages interactions on cow and goat milk fatty acid composition and sensory properties. Reprod Nutr Dev. 2004; 44(5):467–92. PMID: 15636165

2. Ollier S, Robert-Granie C, Bernard L, Chilliard Y, Leroux C. Mammary transcriptome analysis of food-deprived lactating goats highlights genes involved in milk secretion and programmed cell death. J Nutr. 2007; 137(3):560–7. PMID: 17311940
3. Bernard L, Leroux C, Chilliard Y. Expression and nutritional regulation of lipogenic genes in the ruminant lactating mammary gland. Adv Exp Med Biol. 2008;(606:):67–108.
4. Bionaz M, Loor JJ. Ruminant metabolic systems biology: reconstruction and integration of transcriptome dynamics underlying functional responses of tissues to nutrition and physiological state. Gene Regul Syst Bio. 2012; 6:109–25. doi: 10.4137/GRSB.S9852 PMID: 22807626
5. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell. 2004; 116(2):281–97. PMID: 14744438
6. Ambros V. The functions of animal microRNAs. Nature. 2004; 431(7006):350–5. PMID: 15372042
7. Bushati N, Cohen SM. microRNA functions. Annu Rev Cell Dev Biol. 2007; 23:175–205. PMID: 17506695
8. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. Genome Res. 2009; 19(1):92–105. doi: 10.1101/gr.082701.108 PMID: 18955434
9. Ibarra I, Erlich Y, Muthuswamy SK, Sachidanandam R, Hannon GJ. A role for microRNAs in maintenance of mouse mammary epithelial progenitor cells. Genes Dev. 2007; 21(24):3238–43. PMID: 18079172
10. Greene SB, Gunaratne PH, Hammond SM, Rosen JM. A putative role for microRNA-205 in mammary epithelial cell progenitors. J Cell Sci. 2010; 123(Pt 4):606–18. doi: 10.1242/jcs.056812 PMID: 20103531
11. Le Guillou S, Sdassi N, Laubier J, Passet B, Vilotte M, Castille J, et al. Overexpression of miR-30b in the developing mouse mammary gland causes a lactation defect and delays involution. PLoS One. 2012; 7(9):e45727. doi: 10.1371/journal.pone.0045727 PMID: 23029204
12. Llobet-Navas D, Rodriguez-Barrueco R, Castro V, Ugalde AP, Sumazin P, Jacob-Sendler D, et al. The miR-424(322)/503 cluster orchestrates remodeling of the epithelium in the involuting mammary gland. Genes Dev. 2014; 28(7):765–82. doi: 10.1101/gad.237404.114 PMID: 24636986
13. Yoo KH, Kang K, Feuermann Y, Jang SJ, Robinson GW, Hennighausen L. The STAT5-regulated miR-193b locus restrains mammary stem and progenitor cell activity and alveolar differentiation. Dev Biol. 2014; 395(2):245–54. doi: 10.1016/j.ydbio.2014.09.012 PMID: 25236432
14. Li HM, Wang CM, Li QZ, Gao XJ. Mir-15a decreases bovine mammary epithelial cell viability and lactation and regulates growth receptor expression. Molecules. 2012; 17(10):12037–48. doi: 10.3390/molecules171012037 PMID: 23085654
15. Wang J, Bian Y, Wang Z, Li D, Wang C, Li Q, et al. MicroRNA-152 Regulates DNA Methyltransferase 1 and Is Involved in the Development and Lactation of Mammary Glands in Dairy Cows. PLoS One. 2014; 9(7):e101358. doi: 10.1371/journal.pone.0101358 PMID: 24987964
16. Gu Z, Eleswarapu S, Jiang H. Identification and characterization of microRNAs from the bovine adipose tissue and mammary gland. FEBS letters. 2007; 581(5):981–8. PMID: 17306260
17. Li Z, Liu H, Jin X, Lo L, Liu J. Expression profiles of microRNAs from lactating and non-lactating bovine mammary glands and identification of miRNA related to lactation. BMC Genomics. 2012; 13:731. doi: 10.1186/1471-2164-13-731 PMID: 23270386
18. Li Z, Lan X, Guo W, Sun J, Huang Y, Wang J, et al. Comparative transcriptome profiling of dairy goat microRNAs from dry period and peak lactation mammary gland tissues. PLoS One. 2012; 7(12): e52388. doi: 10.1371/journal.pone.0052388 PMID: 23300659
19. Le Guillou S, Marthey S, Laloe D, Laubier J, Mobuchon L, Leroux C, et al. Characterisation and comparison of lactating mouse and bovine mammary gland miRNomes. PLoS One. 2014; 9(3):e91938. doi: 10.1371/journal.pone.0091938 PMID: 24658750
20. Lin X, Luo J, Zhang L, Wang W, Gou D. MiR-103 controls milk fat accumulation in goat (Capra hircus) mammary gland during lactation. PLoS One. 2013; 8(11):e79258. doi: 10.1371/journal.pone.0079258 PMID: 24244462
21. Lin XZ, Luo J, Zhang LP, Wang W, Shi HB, Zhu JJ. mir-27a suppresses triglycerides accumulation and affects gene mRNA expression associated with fat metabolism in dairy goat mammary gland epithelial cells. Gene 2013; 521(1):15–23. doi: 10.1016/j.gene.2013.03.050 PMID: 23537996
22. Shah MS, Davidson LA, Chapkin RS. Mechanistic insights into the role of microRNAs in cancer: influence of nutrient crosstalk. Frontiers in genetics. 2012; 3:1–14.
23. Garcia-Segura L, Perez-Andrade M, Miranda-Rios J. The Emerging Role of MicroRNAs in the Regulation of Gene Expression by Nutrients. J Nutrigenet Nutrigenomics. 2013; 6(1):16–31. doi: 10.1159/000345826 PMID: 23445777

24. Pando R, Even-Zohar N, Shtaif B, Edry L, Shomron N, Phillip M, et al. MicroRNAs in the growth plate are responsive to nutritional cues: association between miR-140 and SIRT1. J Nutr Biochem. 2012; 23 (11):1474–81. doi: 10.1016/j.jnutbio.2011.09.010 PMID: 22402365

25. Orom UA, Lim MK, Savage JE, Jin L, S A.D., Lisanti MP, et al. MicroRNA-203 regulates caveolin-1 in breast tissue during caloric restriction. Cell Cycle. 2012; 11(7):1291–5. doi: 10.4161/cc.19704 PMID: 22421148

26. Mercken EM, Majounie E, Ding J, Guo R, Kim J, Bernier M, et al. Age-associated miRNA alterations in skeletal muscle from rhesus monkeys reversed by caloric restriction. Aging. 2013; 5(9):692–703. PMID: 24036467

27. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. EMBnetjournal. 2011; 17(1):10–2.

28. Friedlander MR, Mackowiak SD, Li N, Chen W, Rajewsky N. miRDeep2 accurately identifies known and hundreds of novel microRNA genes in seven animal clades. Nucleic Acids Res. 2012; 40(1):37–52. doi: 10.1093/nar/gkr688 PMID: 21911355

29. Dong Y, Xie M, Jiang Y, Xiao N, Du X, Zhang W, et al. Sequencing and automated whole-genome optical mapping of the genome of a domestic goat (Capra hircus). Nat Biotechnol. 2013; 31(2):135–41. doi: 10.1038/nbt.2478 PMID: 23263233

30. Masotti A, Caputo V, Da Sacco L, Pizzuti A, Dallapiccola B, Bottazzo GF. Quantification of small non-coding RNAs allows an accurate comparison of miRNA expression profiles. J Biomed Biotechnol. 2009; 659028(10):1.

31. Li D, Liu H, Li Y, Yang M, Qu C, Zhang Y, et al. Identification of suitable endogenous control genes for quantitative RT-PCR analysis of miRNA in bovine solid tissues. Mol Biol Rep. 2014; 41(10):6475–80. doi: 10.1007/s11033-014-3530-x PMID: 24973888

32. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods. 2001; 25(4):402–8. PMID: 11846609

33. Anders S, Huber W. Differential expression analysis for sequence count data. Genome Biol. 2010; 11 (10):2010–11.

34. Rau A, Gallopin M, Celeux G, Jaffrezic F. Data-based filtering for replicated high-throughput transcriptome sequencing experiments. Bioinformatics. 2013; 29(17):2146–52. doi: 10.1093/bioinformatics/btt350 PMID: 23821648

35. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a pratical and powerful approach to multiple testing. J R Statist Soc B. 1995; 57(1):289–300.

36. Paraskevopoulou MD, Georgakilas G, Kostoulas N, Vlachos IS, Vergoulis T, Reczko M, et al. DIANA-microT web server v5.0: service integration into miRNA functional analysis workflows. Nucleic Acids Res. 2013; 41(Web Server issue):W169–73. doi: 10.1093/nar/gkt393 PMID: 23680784

37. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets: Cell. 2005; 120(1):15–20. PMID: 15652477

38. Gaj S, Eijssen L, Mensink RP, Evelo CT. Validating nutrient-related gene expression changes from microarrays using RT(2) PCR-arrays. Genes Nutr. 2008; 3(3–4):153–7. doi: 10.1007/s12263-008-0094-1 PMID: 19034552

39. Zhao JJ, Sun DG, Wang J, Liu SR, Zhang CY, Zhu MX, et al. Retinoic acid downregulates microRNAs to induce abnormal development of spinal cord in spina bifida rat model. Childs Nerv Syst. 2008; 24 (4):485–92. PMID: 17962954

40. Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. Nucleic Acids Res. 2014; 42(Database issue):D68–73. doi: 10.1093/nar/gkt1181 PMID: 24275495

41. Baskerville S, Bartel DP. Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. RNA. 2005; 11(3):241–7. PMID: 15701730

42. Dhahbi JM, Spindler SR, Atamna H, Yamakawa A, Guerrero N, Boffelli D, et al. Deep sequencing identifies circulating mouse miRNAs that are functionally implicated in manifestations of aging and responsive to calorie restriction. Aging. 2013; 5(2):130–41. PMID: 23470454

43. Ding J, Zhou S, Guan J. miRFam: an effective automatic miRNA classification method based on n-grams and a multiclass SVM. BMC Bioinformatics. 2011; 12(216):1471–2105.

44. Cui W, Li Q, Feng L, Ding W. MiR-126-3p regulates progesterone receptors and involves development and lactation of mouse mammary gland. Mol Cell Biochem. 2011; 355(1–2):17–25. doi: 10.1007/s11010-011-0834-1 PMID: 21526342

45. Turcatel G, Rubin N, El-Hashash A, Warburton D. MIR-99a and MIR-99b modulate TGF-beta induced epithelial to mesenchymal plasticity in normal murine mammary gland cells. PLoS One. 2012; 7(1): e31032. doi: 10.1371/journal.pone.0031032 PMID: 22299047

46. Dessauge F, Lollivier V, Ponchon B, Bruckmaier R, Finot L, Wiart S, et al. Effects of nutrient restriction on mammary cell turnover and mammary gland remodeling in lactating dairy cows. J Dairy Sci. 2011; 94(9):4623–35. doi: 10.3168/jds.2010-4012 PMID: 21854935

47. Zarzynska J, Motyl T. Apoptosis and autophagy in involuting bovine mammary gland. J Physiol Pharmacol. 2008; 59 Suppl 9:275–88. PMID: 19261986

48. Watson CJ, Kreuzaler PA. Remodeling mechanisms of the mammary gland during involution. Int J Dev Biol. 2011; 55(7–9):757–62. doi: 10.1387/ijdb.113414cw PMID: 22161832

49. Bionaz M, Loor JJ. Gene networks driving bovine milk fat synthesis during the lactation cycle. BMC Genomics. 2008; 9(366):1471–2164.

50. Baylin A, Deka R, Tuitele J, Viali S, Weeks DE, McGarvey ST. INSIG2 variants, dietary patterns and metabolic risk in Samoa. Eur J Clin Nutr. 2013; 67(1):101–7. doi: 10.1038/ejcn.2012.124 PMID: 22968099

51. Phan J, Peterfy M, Reue K. Lipin expression preceding peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is critical for adipogenesis in vivo and in vitro. J Biol Chem. 2004; 279(28):29558–64. PMID: 15123608

52. Han LQ, Li HJ, Wang YY, Zhu HS, Wang LF, Guo YJ, et al. mRNA abundance and expression of SLC27A, ACC, SCD, FADS, LPIN, INSIG, and PPARGC1 gene isoforms in mouse mammary glands during the lactation cycle. Genet Mol Res. 2010; 9(2):1250–7. doi: 10.4238/vol9-2gmr814 PMID: 20603810

53. Mani O, Korner M, Sorensen MT, Sejrsen K, Wotzkow C, Ontsouka CE, et al. Expression, localization, and functional model of cholesterol transporters in lactating and nonlactating mammary tissues of murine, bovine, and human origin. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2010; 299(2):R642–54. doi: 10.1152/ajpregu.00723.2009 PMID: 20445153

54. Liu L, Jiang Y, Zhang H, Greenlee AR, Han Z. Overexpressed miR-494 down-regulates PTEN gene expression in cells transformed by anti-benzo(a)pyrene-trans-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide. Life Sci. 2010; 86(5–6):192–8. doi: 10.1016/j.lfs.2009.12.002 PMID: 20006626

55. Wang Z, Hou X, Qu B, Wang J, Gao X, Li Q. Pten regulates development and lactation in the mammary glands of dairy cows. PLoS One. 2014; 9(7):e102118. doi: 10.1371/journal.pone.0102118 PMID: 25009983

56. Shennan DB, Boyd CA. The functional and molecular entities underlying amino acid and peptide transport by the mammary gland under different physiological and pathological conditions. J Mammary Gland Biol Neoplasia. 2014; 19(1):19–33. doi: 10.1007/s10911-013-9305-5 PMID: 24158403

57. Shennan DB, Peaker M. Transport of milk constituents by the mammary gland. Physiol Rev. 2000; 80 (3):925–51. PMID: 10893427

58. Harris J, Stanford PM, Sutherland K, Oakes SR, Naylor MJ, Robertson FG, et al. Socs2 and elf5 mediate prolactin-induced mammary gland development. Mol Endocrinol. 2006; 20(5):1177–87. PMID: 16469767

59. Bionaz M, Loor JJ. Gene networks driving bovine mammary protein synthesis during the lactation cycle. Bioinform Biol Insights. 2011; 5:83–98. doi: 10.4137/BBI.S7003 PMID: 21698073

60. Hu Y, Zhu Q, Tang L. MiR-99a antitumor activity in human breast cancer cells through targeting of mTOR expression. PLoS One. 2014; 9(3):e92099. doi: 10.1371/journal.pone.0092099 PMID: 24637915

61. Kansal VK, Sharma R, Rehan G. Characterization of anionic amino acid transport systems in mouse mammary gland. Indian J Exp Biol. 2000; 38(11):1097–103. PMID: 11395952

62. Baik M, Etchebarne BE, Bong J, VandeHaar MJ. Gene expression profiling of liver and mammary tissues of lactating dairy cows. Asian Australas J Anim Sci. 2009; 22(6):871–84.

63. Baumrucker CR. Cationic amino acid transport by bovine mammary tissue. J Dairy Sci. 1984; 67 (11):2500–6. PMID: 6440910

64. Zhou MM, Wu YM, Liu HY, Zhao K, Liu JX. Effects of tripeptides and lactogenic hormones on oligopeptide transporter 2 in bovine mammary gland. J Anim Physiol Anim Nutr. 2011; 95(6):781–9.

65. Komatsu T, Itoh F, Kushibiki S, Hodate K. Changes in gene expression of glucose transporters in lactating and nonlactating cows. J Anim Sci. 2005; 83(3):557–64. PMID: 15705752

66. Madon RJ, Martin S, Davies A, Fawcett HA, Flint DJ, Baldwin SA. Identification and characterization of glucose transport proteins in plasma membrane- and Golgi vesicle-enriched fractions prepared from lactating rat mammary gland. Biochem J. 1990; 272(1):99–105. PMID: 2264840

67. Feng Y, Manka D, Wagner KU, Khan SA. Estrogen receptor-alpha expression in the mammary epithelium is required for ductal and alveolar morphogenesis in mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007; 104 (37):14718–23. PMID: 17785410

68. Zhao JJ, Lin J, Yang H, Kong W, He L, Ma X, et al. MicroRNA-221/222 negatively regulates estrogen receptor alpha and is associated with tamoxifen resistance in breast cancer. J Biol Chem. 2008; 283 (45):31079–86. doi: 10.1074/jbc.M806041200 PMID: 18790736

69. Ashwell MS, Heyen DW, Sonstegard TS, Van Tassell CP, Da Y, VanRaden PM, et al. Detection of quantitative trait loci affecting milk production, health, and reproductive traits in Holstein cattle. J Dairy Sci. 2004; 87(2):468–75. PMID: 14762090

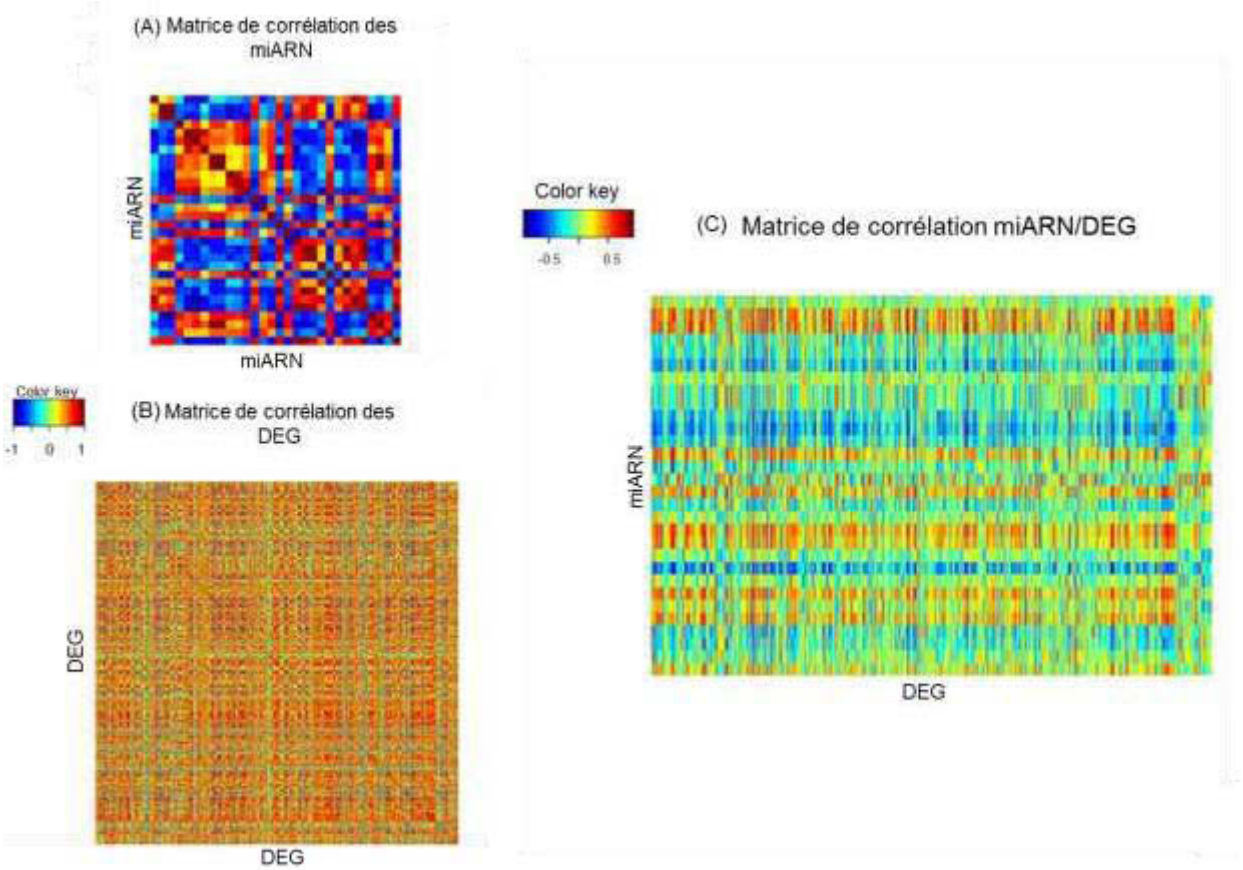
L'analyse des miRNomes issus des chèvres alimentées et non alimentées a permis d'identifier 30 miARN dont l'expression est modifiée par la privation alimentaire, parmi lesquels 11 nouveaux miARN. La régulation par le niveau alimentaire de l'expression de cinq miARN connus (*miR-126-3p, miR-140-3p, miR-223-3p, miR-409-3p* et *miR-451-5p*) est en accord avec des données déjà publiées montrant la modification de leur expression par une restriction calorique dans d'autres tissus et espèces. L'analyse des cibles de l'ensemble des 30 miARN nutrirégulés a révélé que ces derniers étaient principalement impliqués dans le remodelage tissulaire et la prolifération cellulaire. Ces miARN pourraient contribuer au phénotype d'involution des glandes mammaires des chèvres privées, qui a été suggérée par l'étude antérieure au niveau des transcrits. L'analyse des cibles a également permis d'identifier de nombreux gènes impliqués dans la synthèse des lipides du lait mais aussi de nombreux transporteurs d'acides aminés, suggérant que les miARN nutrirégulés pourraient également avoir un rôle dans la synthèse et la sécrétion des constituants du lait. De plus, parmi les cibles prédites, 19 DEG ont été identifiés et leur expression est régulée inversement à celle des miARN les ciblant. Certains DEG comme *ESR1*, qui est ciblé par trois miARN nutrirégulés, semblent des candidats intéressants pour étudier les mécanismes de régulation des miARN par la nutrition.

A l'issue de cette étude, il nous a paru pertinent d'étudier de façon plus approfondie la fonction de certains miARN nutrirégulés comme *miR-140-3p*, *miR-99a-5p* et *miR-222-3p* et qui semblent, à travers leurs cibles prédites, réguler des gènes importants pour la prolifération et le métabolisme cellulaire. Afin de déterminer le rôle des miARN nutrirégulés sur la fonction de lactation, ces trois miARN ont été sélectionnés afin d'effectuer une étude fonctionnelle *in vitro* dans des cellules épithéliales mammaires bovines. Cette étude fait l'objet du paragraphe **III**.

II.1.2) Correlation statistique entre DEG et miARN nutriregules

Les effets de la privation alimentaire ont été étudiés sur des échantillons d'ARN caprins à travers deux approches globales : des puces à ADN pour analyser les ARNm (Ollier *et al.,* 2007) et du séquençage haut débit pour les miARN (article 3). Comme vu dans le paragraphe précèdent des liens existent entre certains ARNm et miARN, dont les expressions sont affectées par le challenge nutritionnel. L'analyse des relations entre ces données inter-corrélées nécessite le développement de nouveaux algorithmes et/ou modèles statistiques. C'est dans le cadre du développement de techniques adaptées à ce type de données et de

Figure 52 Matrice de corrélation entre les expressions des miARN nutrirégulés (30) et les gènes différentiellement exprimés (958) dans la glande mammaire des chèvres privées d'alimentation pendant 48 h. Les cases rouges et bleues correspondent à des miARN, DEG ou miARN/ DEG très corrélés ou anti-corrélés entre eux, respectivement.



recherche de corrélation qu'un crédit incitatif 'Multilevel Data Integration' du département Phase de l'INRA a été initié. La comparaison de plusieurs modèles statistiques a été réalisée afin d'expliquer les liaisons entre deux ensembles de variables quantitatives potentiellement inter-corrélées et mesurées sur un faible nombre d'individus. Plus particulièrement, avec nos jeux de données, l'objectif était d'expliquer la régulation des DEG en réponse à la privation alimentaire par les miARN.

Ainsi la méthode de Sparse-PLS (Partial Least Squares) a été choisie pour la comparaison des données issues de puces et de séquençage haut débit. La régression PLS est préconisée en présence d'un grand nombre de variables présentant de la colinéarité (et même si le nombre de variables explicatives est supérieur au nombre d'observations). Elle consiste à réaliser un compromis entre deux objectifs. Le premier est de maximiser la variance expliquée des prédicteurs (principe de l'ACP). Le second est de maximiser la corrélation entre les variables à expliquer (les DEG) et les variables explicatives (les miARN nutrirégulés) (principe de la régression). De ce fait, une transformation linéaire est réalisée sur les expressions des DEG permettant une compression des données et réduisant le nombre de variables. Cette compression passe par la détermination de deux critères le Q^2 et R^2 fournissant un indice sur la qualité prédictive du modèle. Les analyses ont été réalisées avec le package du logiciel R, mixOmics et dans le cadre du stage d'Alyssa Imbert (Alyssa Imbert, 2015).

La première étape de l'analyse a consisté à ré-analyser les données de puces de façon à les rendre comparables avec les données de NGS. En effet, les p-values des résultats statistiques des puces avaient été corrigées avec la méthode Bonferroni au seuil de 0,01% alors que les p-values des données de séquençage haut-débit avaient été corrigées avec la méthode de Benjamini-Hochberg au seuil de 10%. En appliquant cette dernière correction aux résultats statistiques des puces, 958 DEG ont été identifiés. Parmi ces 958 DEG, sont présents les gènes codant pour les protéines majeures du lait comme les caséines (*CSN1S1, CSN1S2A, CSN2, CSN3*), les protéines du lactosérum (*LALBA* et *LGB*), les gènes impliqués dans la synthèse des protéines (*EIF4A3* et de nombreux transporteurs d'acides aminés) ainsi que de nombreux gènes codant pour les enzymes clés de la lipogenèse (*ACACA, AGPAT3, FASN, INSIG1*). Par conséquent, l'analyse Sparse-PLS a eu pour but d'identifier parmi ces 958 DEG, ceux dont l'expression pourrait être expliquée par l'un ou plusieurs des 30 miARN nutrirégulés.

Tableau 12 Gènes différentiellement exprimés dans la glande mammaire des chèvres privées d'alimentation pendant 48h et dont les expressions peuvent être expliquées par les variations d'expression des miARN par la méthode SPARSE-PLS.

Identifiant	Symbole du gène	Nom du gène	Coefficient de corrélation	Ciblé par	Liens entre gènes
Bt00006334	ACTG1	ACTin Gamma 1	0.376		
Bt00007865	**ATP6V1A**	**ATPase, H+ transporting, lysosomal 70kDa, V1 subunit A**	**0.263**	**miR-409-3p**	
Bt00007021	BBX	Bobby Sox homolog	0.286		
Bt00006676	BCL2L13	BCL2 Like 13	0.193		
Bt00007242	C16orf59	Chromosome 16 open reading frame 59	0.178		
Bt00006149	CCDC58	Coiled Coil Domain Containing 58	0.287		
Bt00005063	CCDC99	spindle apparatus coiled-coil protein 1	0.257		
Bt00003905	CD164	CD164 molecule, sialomucin	0.48		
Bt00008311	CD24	CD24 molecule	0.517		Il existe deux éléments de réponse à l'œstrogène dans le promoteur de CD24, auxquels ESR1 peut se fixer et régule négativement l'expression de CD24 (Surowiak *et al.*, 2006, Kaipparettu *et al.*, 2008).
Bt00007604	CD81	CD81 molecule	0.505		
Bt00001514	COL13A1	COLagen 13 Alpha 1	0.468		
Bt00004753	COMMD4	COMM domain containing 4	0.466		
Bt00003846	**DDX55**	**DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 55**	**0.299**	**miR-409-3p**	
Bt00000913	EFNA1	Ephrin A 1	0.235		
Bt00001523	**ESR1**	**Estrogen Receptor 1**	**0.46**	**miR-125b, miR-222-3p**	
Bt00007290	FOLR1	FOLate Receptor 1	0.544		
Bt00004249	GFRAL	GDNF family R alpha like	0.211		
Bt00007200	GNB2L1	Guanine Nucleotide Binding protein (G protein), beta polypeptide 2-Like 1	0.467		
Bt00007586	GRTP1	GRowth hormone regulated TBC Protein 1	0.204		

Tableau 12 (Suite)

Identifiant	Symbole du gène	Nom du gène	Coefficient de corrélation	Ciblé par	Liens entre gènes
Bt00005555	**HSPA8**	**Heat Shock 70kDa Protein 8**	**0.448**	**miR-222-3p**	
Bt00005195	KCTD1	potassium Channel Tetramerization Domain containing 1	0.56		
Bt00006987	KCTD21	potassium Channel Tetramerization Domain containing 21	0.401		
Bt00008014	KIAA0133		0.636		
Bt00003257	**KIAA0753**		**0.45**	**miR-409-3p**	
Bt00004243	KLHL13	KeLcH-Like family member 13	0.385		
Bt00001156	**LRRC28**	**Leucine Rich Repeated Containing 28**	**0.14**	**miR-409-3p**	
Bt00006956	LRRC41	Leucine Rich Repeat Containing 41	0.527		
Bt00007508	**MAT2A**	**Methionine Adenosyltransferase II, Alpha**	**0.551**	**miR-125b-3p, miR-222-3p**	
Bt00001120	MGST3	Microsoma Glutathione S-Transferase 3	0.361		
Bt00003643	NAG	N-AcetylGlucosaminidase, alpha	0.25		
Bt00007064	Ø		0.559		
Bt00004612	Ø		0.419		
Bt00001264	Ø		0.398		
Bt00004902	PCBP2	Poly(rC) Binding Protein 2	0.283		
Bt00004291	PLXNB3	PLeXiN B3	0.534		
Bt00000408	**PPP1R12A**	**Protein PhosPhatase 1, Regulatory subunit 12A**	**0.366**	**miR-222-3p**	
Bt00001482	PRF1	delta-like 1 homolog	0.462		
Bt00003466	PSMD4	Proteasome 26S subunit, non-ATPase 4	0.231		
Bt00004950	PXN	PaXiliN	0.267		CD24 entraine la phosphorylation de PXN dans des cellules cancéreuses colorectales (Chen *et al.,* 2013). RANBP9 régule positivement l'expression de PXN (Woo *et al.,* 2012) et GNB2L1 module sa phosporylation (Ron *et al.,* 2013).

Tableau 12 (Fin)

Identifiant	Symbole du gène	Nom du gène	Coefficient de corrélation	Ciblé par	Liens entre gènes
Bt00006748	RANBP9	RAN Binding Protein 9	0.293		
Bt00006682	RPL6	Ribosomal Protein 6	0.175		
Bt00007716	RPL9	Ribosomal Protein 9	0.531		
Bt00006475	RTEL1	Regulator of Telomere Elongation heLicase 1	0.422		
Bt00003328	SLC4A3	SoLute Carrier family 4 member 3	0.322		
Bt00006287	SNRP70	Small Nuclear RibonucleoProtein 70 kDa	0.349		
Bt00000309	**SPTY2D1**	**SPT2, Suppressor of Ty, Domain containing 1**	**0.474**	**miR-222-3p**	
Bt00003602	TMEM19	TransMEMbrane protein 19	0.299		
Bt00000870	TMSB10	ThyMoSin Beta 10	0.513		
Bt00000509	TNFRSF18	Tumor Necrosis Factor Receptor SuperFamily, member 18	0.495		
Bt00001608	TXNDC12	ThioredoXiN Domain Containing 12 (endoplasmic reticulum)	0.395		
Bt00007016	TXNIP	ThioredoXiN Interacting Protein	0.453		
Bt00003895	UACA	Uveal Autoantigen with Coiled-coil domains and Ankyrin repeats	0.392		
Bt00006892	UBL3	UBiquitin Like 3	0.32		
Bt00006974	UIMC1	Ubiquitin Interaction Motif Containing 1	0.173		
Bt00005858	ZNF470	Zinc Finger Protein 470	0.161		

*En **gras**, les DEG ciblés par des miARN. En **rouge**, les DEG ciblés par des miARN et dont les expressions sont anti-corrélées.*

Des matrices de corrélation des expressions entre miARN nutrirégulés et DEG ont été construites (Figure 52). Les expressions des miARN entre eux ou des DEG entre eux peuvent être très positivement (rouge sur la matrice de corrélation) ou négativement corrélées (bleu sur la matrice corrélation). De façon intéressante, les expressions de certains DEG et miARN semblent très corrélées ou anti-corrélées (Figure 52).

De plus, au vu des Q^2 et R^2 obtenus par l'analyse de Sparse-PLS, 55 ARNm (Tableau 12) dont l'expression pourrait être expliquée par quatre miARN connus (*miR-125b-3p, miR-140-3p, miR-222-3p, miR-409-3p*) et un nouveau miARN (*chr12_17655-3p*) ont été sélectionnés. L'ARNm dont l'expression semble la mieux expliquée est *KIAA0133* (coefficient de corrélation de 0,636) et celui qui est le moins est *LRRC28* (coefficient de corrélation de 0,14). Certains de ces DEG appartiennent à des boucles de régulation communes. Par exemple, il existe deux éléments de réponse aux œstrogènes dans le promoteur du gène codant pour CD24 et ESR1 peut s'y fixer pour réguler négativement l'expression de ce gène (Surowiak *et al.,* 2006, Kaipparettu *et al.,* 2008). A son tour, CD24 ainsi que GNB2L1 régule la phosphorylation de PXN, une protéine du cytosquelette impliquée dans l'adhésion de la cellule à la matrice extracellulaire (Chen *et al.,* 2013, Ron *et al.,* 2013) (Figure 53).

Parmi ces 55 ARNm sélectionnés par l'analyse Sparse-PLS, neuf sont des cibles potentielles de *miR-125b-3p, miR-222-3p* et *miR-409-3p*. En revanche, aucun de ces 55 ARNm ne sont des cibles potentielles de *miR-140-3p* et *chr12_17655-3p*. De plus, lorsque le sens de variation est pris en compte, cinq ARNm montrent une anti-corrélation avec les miARN les ciblant (Figure 54). Ainsi, cette analyse souligne de nouveau la régulation d'*ESR1*. En effet, *ESR1*, qui est sous exprimé dans la glande mammaire des chèvres privées, peut être ciblé par *miR-125b-3p* et *miR-222-3p* qui sont surexprimés chez les mêmes animaux. L'interaction directe de *miR-222-3p* a été montrée *in vitro* dans des cellules de cancer du sein (Adai *et al.,* 2008). Cette hypothèse de régulation déjà soulevée dans la discussion de l'article 3 conforte les résultats de cette nouvelle méthode d'analyse statistique. L'ensemble de ces analyses pointent *ESR1*, qui pourrait être un candidat intéressant pour comprendre la régulation des DEG par les miARN, surtout que ce gène contrôle la croissance du tissu mammaire. Cette cohérence sur le plan biologique donne foi aux résultats obtenus par la méthode Sparse-PLS. Cette première étude de corrélation a aussi mis en évidence quatre autres ARNm, *ATP6V1A*, *DDX5*, *KIAA0753* et *LRRC28*, dont les expressions étaient augmentées dans la glande mammaire des animaux privés par rapport aux animaux contrôles.

Figure 53 Relation entre les gènes différentiellement exprimés (DEG) dans la glande mammaire des chèvres privées d'alimentation. CD24: CD24 molecule, ERE: Estrogen Responsive Elements, ESR1: oEStrogen Receptor, GNB2L1: Guanine Nucleotide Binding protein (G protein), beta polypeptide 2-Like 1, PXN: PaXiliN.

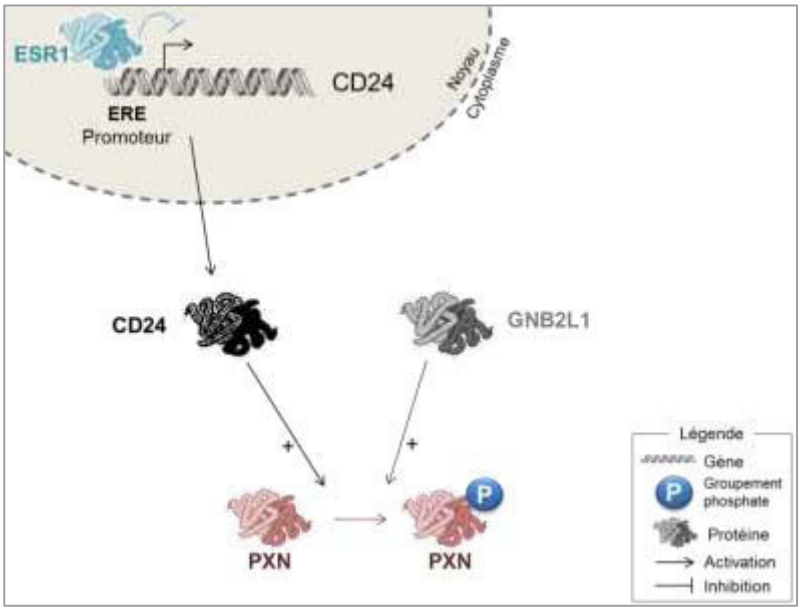
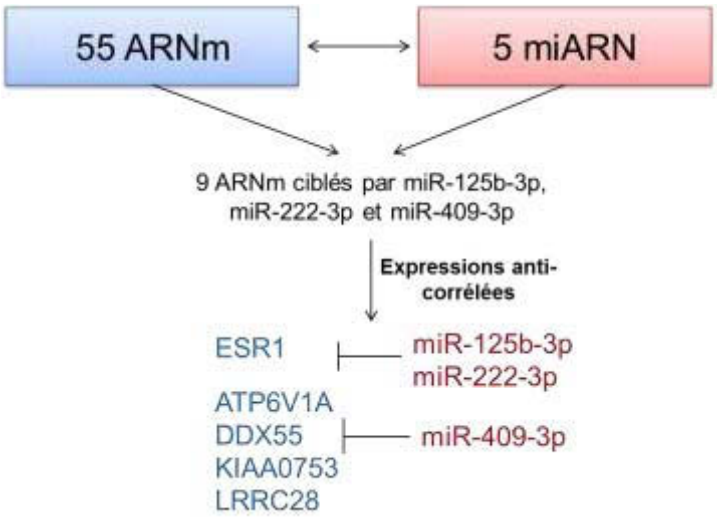


Figure 54 Liens entre les ARNm et les miARN différentiellement exprimés par la privation alimentaire de 48h dans la glande mammaire de chèvre en lactation et sélectionnés par la méthode de Sparse-PLS. ATP6V1A: ATPase H+ transporting, lysosomal 70 kDa, V1, subunit A, DDX55: DEAD boX polypeptide 55, ESR1: oEStrogen Receptor 1, LRRC28: Leucine Riche Repeated Containing 28.



Ces quatre ARNm sont des cibles prédites de *miR-409-3p*, dont l'expression était diminuée dans la glande mammaire des chèvres privées (Figure 55).

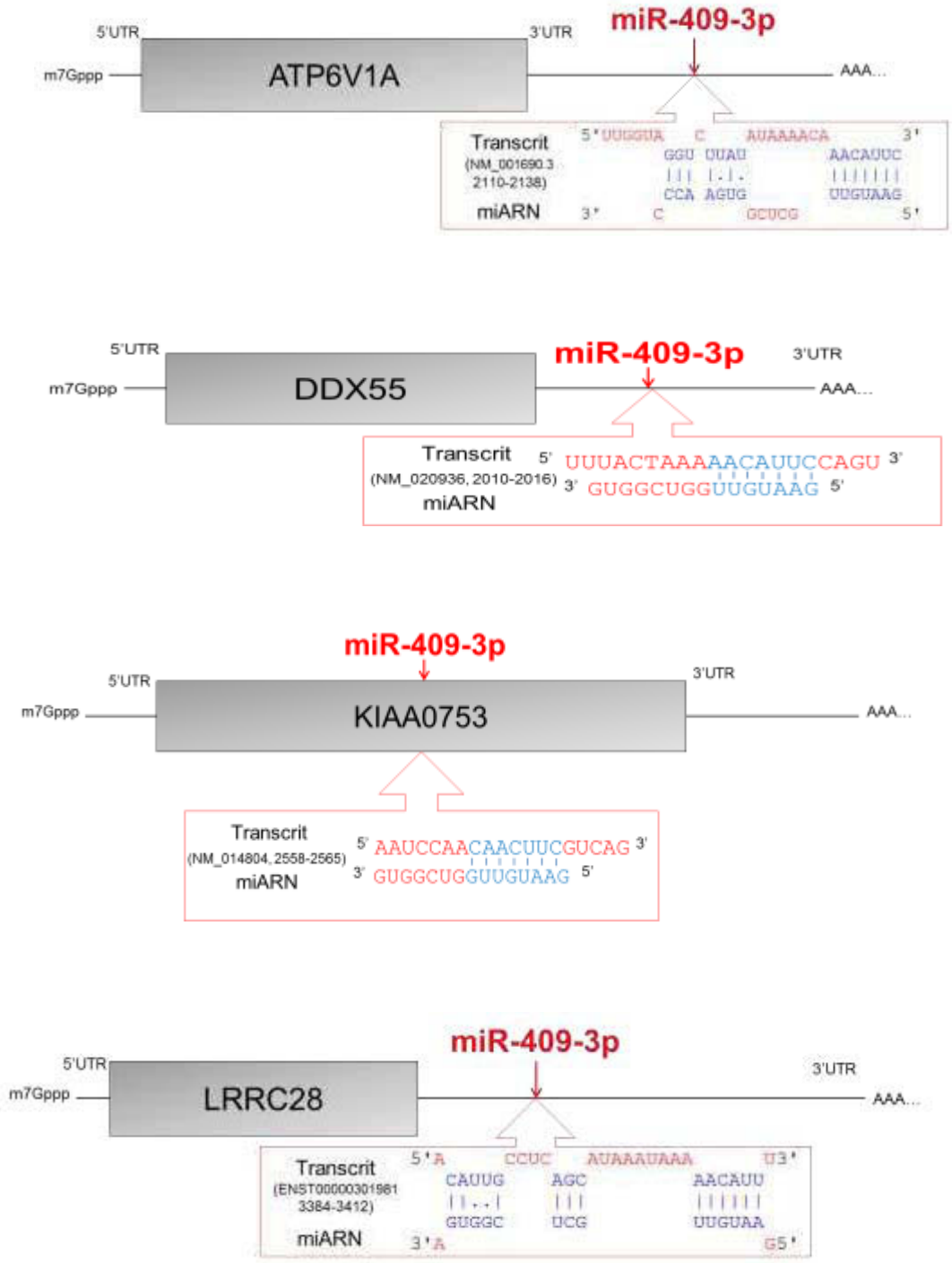
D'après ce modèle statistique, *miR-409-3p* semble être le miARN pouvant expliquer la régulation du plus grand nombre de DEG, bien que les coefficients de corrélation ne soient pas très forts pour ces quatre ARNm, particulièrement pour *LRRC28* (R^2: 0.14). Les fonctions biologiques de *KIAA0753* et *LRRC18* ne sont pas connues. En revanche, le gène d'*ATP6V1A* code pour une protéine composant le complexe enzymatique ATPase, présent dans les vacuoles cellulaires, qui entraine l'acidification des organites intracellulaires. Ce processus est important pour l'endocytose, la dégradation des protéines et le transport membranaire couplé. Enfin, *DDX5* appartient à la famille des protéines à boite DEAD, impliquée dans de nombreux processus dont la régulation de la traduction de l'ARN ou la prolifération cellulaire.

L'intérêt de *miR-409-3p* est renforcé par le fait qu'il a été principalement décrit comme régulant la migration et l'invasion cellulaires dans différents cancers de tissus épithéliaux comme la vessie ou l'estomac (Xu *et al.,* 2013, Zheng *et al.,* 2012, Josson *et al.,* 2014). De surcroit, ce miARN est un des miARN nutrirégulés dont l'expression est la plus influencée par une restriction ou privation alimentaire puisqu'elle est affectée par une restriction calorique dans le sang de souris (Dhabbi *et al.,* 2013) ou dans le muscle squelettique de singe Rhésus (Mercken *et al.,* 2013). Ce miARN semble réguler des gènes dont l'expression est ubiquitaire et dont le rôle est principalement la régulation de la prolifération et le transport cellulaire. Il pourrait constituer un miARN candidat à étudier dans le cadre d'autres challenges nutritionnels.

Seulement cinq DEG sur 55 sélectionnés par le modèle statistique sont des cibles prédites des miARN nutrirégulés et sont anti-corrélés à ces derniers. Ce faible chiffre peut s'expliquer par l'étape de prédiction des cibles qui a été effectuée par des logiciels bioinformatiques. En effet, les listes des gènes cibles potentiels fournies par ces logiciels ne sont pas exhaustives. De plus, les relations entre miARN et DEG peuvent être indirectes. Par exemple, un miARN peut réguler l'expression d'un DEG qui lui active à son tour un autre DEG. Enfin, beaucoup de relation entre gènes n'ont pas encore été démontrées.

Bien que les cinq miARN pouvant expliquer le mieux l'expression des DEG selon ce modèle statistique, ne ciblent pas des gènes clés de la synthèse et de la sécrétion des constituants du lait, les DEG potentiellement régulés sont majoritairement impliqués dans la

Figure 55 Gènes différentiellement exprimés (DEG) dans la glande mammaire des chèvres privées d'alimentation, ciblés et anti-corrélés avec *miR-409-3p*. ATP6V1A: ATPase, H+ transporting, lysosomal 70kDa, V1 subunit A, DDX5: DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 55, LRRC28: Leucine Rich Repeated Containing 28.



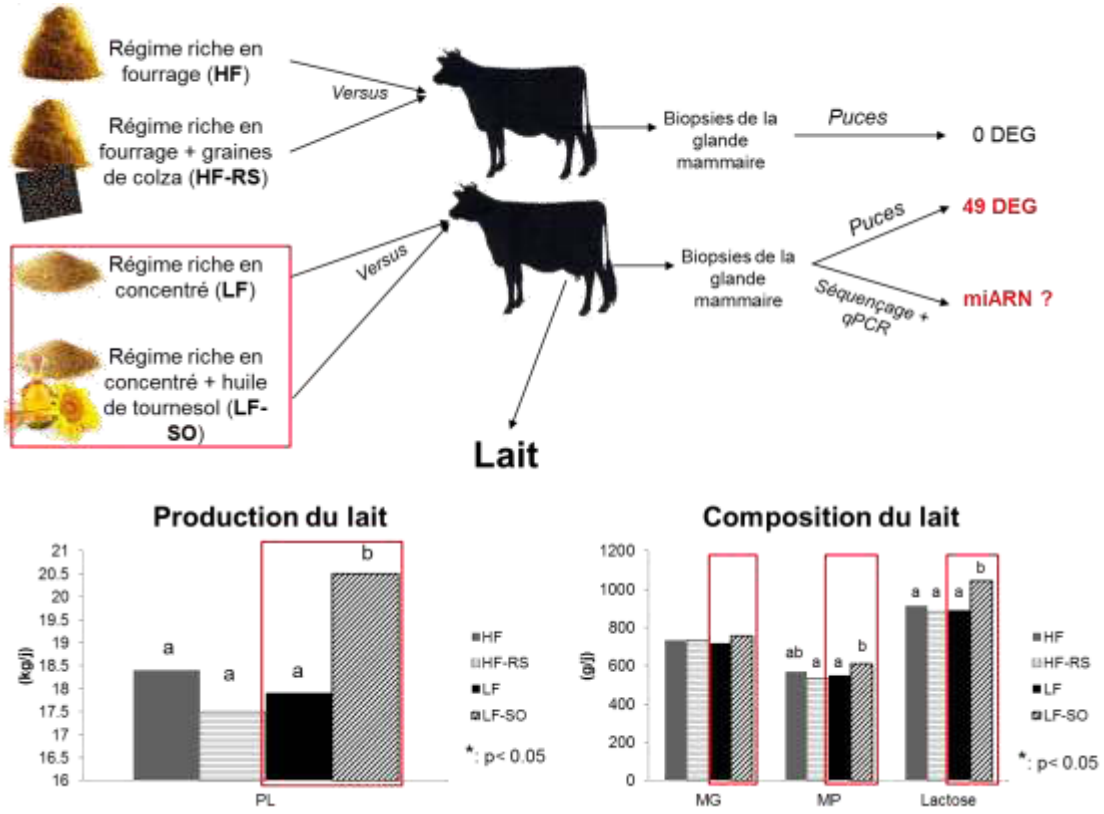
régulation de la prolifération cellulaire. Ceci semble cohérent avec la mise en place de la mort cellulaire suggérée dans la glande mammaire des animaux privés d'alimentation.

II.2) EFFET D'UNE SUPPLEMENTATION LIPIDIQUE

Outre l'étude d'un modèle expérimental extrême, mon travail visait également à préciser la régulation nutritionnelle de l'expression des miARN dans un modèle plus proche des conditions d'élevage. En effet, la composition du lait des ruminants peut être modulée de façon significative en réponse à l'alimentation, spécifiquement en réponse aux supplémentations lipidiques, qui ont un effet variable selon la nature et la forme des lipides ajoutés à la ration (Chilliard *et al.,* 2007). En particulier, l'ajout d'huile de tournesol riche en acide gras C18:2n-6 à une ration riche en concentré a pour effet de diminuer le taux d'AG saturés dans le lait (Chilliard *et al.,* 2007, Bernard *et al.,* 2009b). L'ajout de graines d'oléagineux dans la ration des vaches en lactation entraine également une diminution de la concentration en AG saturés, et augmente la concentration en C18:0, *cis*-9 18:1, des AG *trans* et des CLA cis 9 *trans*-11 dans le lait. De tels changements dans la composition de la matière grasse laitière pourraient influencer l'incidence de certaines pathologies chroniques chez le consommateur (Shingfield *et al.,* 2008, Givens, 2010). La synthèse des lipides du lait par la cellule épithéliale mammaire implique de nombreux gènes, comme vu dans l'introduction, dont l'expression peut être modifiée par le régime alimentaire (Bernard *et al.,* 2008, Ollier *et al.,* 2009) sans que les mécanismes de régulation ne soient connus.

Dans ce contexte, deux études utilisant quatre régimes ont été conçues pour entrainer un changement de la production et de la composition du lait chez la vache et la chèvre avec trois objectifs : (i) évaluer les effets du ratio fourrage-concentré sur les performances laitières ainsi que l'expression des gènes mammaires, (ii) diminuer la concentration en AG saturés et augmenter la concentration d'AG C18:1 *cis*-9 sans augmenter les AG *trans* en ajoutant des graines de colza entière à un régime à base de foin (Kennelly *et al.,* 1996), (iii) diminuer les AG saturés et augmenter les AG *trans* en ajoutant de l'huile de tournesol riche en AG C18:2 n-6 à un régime à base de foin et de concentré et riche en amidon (Figures 56 et 57) (Chilliard *et al.,* 2007, Bernard *et al.,* 2009b). Ces régimes ont été conçus pour être proche des rations distribuées en élevage. Ces quatre régimes ont été distribués aux animaux selon un carré latin; un régime riche en fourrage (ratio fourrage-concentré 65:35 chez la vache et 60:40 chez la

Figure 56 Effet du niveau du ratio fourrage/concentré et de l'addition de graines de colza entières ou d'huile de tournesol sur les paramètres zootechniques et l'expression des gènes dans la glande mammaire de vache en lactation. En rouge sont indiqués les régimes sélectionnés et leur effets sur la production, la composition du lait et l'expression des gènes dans la glande mammaire. HF: High Forage, HF-RS: High Forage with whole intact RapeSeeds, LF: Low Forage, LF-SO: Low Forage with Sunflower oil, MG: Matières Grasses, MP: Matières Protéiques, PL: Production du Lait. Les exposants ($^{a-b}$) correspondent à des moyennes significativement différentes des autres ($p < 0.05$). *D'après Leroux et al., soumis*.



chèvre) et ce même régime supplémenté en graines de colza (13.9 g/100g de matières sèches chez la vache et 460 g/j chez la chèvre) ainsi qu'un régime pauvre en fourrage (ratio fourrage-concentré 46:54 chez la vache et 40:60 chez la chèvre) et ce même régime supplémenté avec de l'huile de tournesol (4 g/100g de matières sèches chez la vache et 130 g/j chez la chèvre) (Ollier *et al.,* 2009, Leroux *et al.,* soumis). La supplémentation avec les graines de colza a eu un effet limité sur la production et la composition du lait alors que la supplémentation en huile de tournesol a entrainé un effet plus important sur ces paramètres. Les analyses transcriptomiques réalisées avant le début de ma thèse avaient montré que seule la supplémentation en huile de tournesol menait à un changement dans l'expression des gènes de la glande mammaire, ce qui n'était pas le cas avec la supplémentation en graines de colza. Ainsi pour la suite de mon travail, seul le régime pauvre en fourrage supplémenté ou non en huile de tournesol a été considéré.

II.2.1) Chez la vache en lactation

La supplémentation en huile de tournesol a entrainé une augmentation significative de la production laitière ainsi que des matières protéiques et du lactose (Figure 56). La composition en AG du lait a également été modifiée de la façon attendue c'est-à-dire que la supplémentation en huile de tournesol a provoqué une diminution en AG saturés, une augmentation des AG C18:0, C18 :1 *cis* 9, *cis* 9 *trans* 11 CLA, C18:2 n-6 et des AG *trans* (Leroux *et al.,* soumis). Au vu de la composition de ce lait, il pourrait offrir un profil plus favorable à la santé du consommateur. De plus, l'approche globale par puces a révélé un changement significatif de l'expression de 49 gènes dont 33% étaient impliqués dans les métabolismes protéique, glucidique ou lipidique. Parmi ces derniers, on retrouve les gènes codants pour *ApoH*, *BTN2A1*, *ELOVL6* et *LPL* qui sont des acteurs de la synthèse des lipides du lait. La régulation de l'expression de ces gènes en réponse à la supplémentation lipidique n'est pas connue. Ainsi les miARN pourraient fournir des pistes pour expliquer la régulation des DEG en réponse à la supplémentation.

L'objectif de cette étude était donc de déterminer les miARN dont l'expression est affectée par la supplémentation lipidique dans la glande mammaire des vaches en lactation et d'évaluer le rôle de ces miARN sur la régulation de l'expression des DEG. De ce fait, une analyse exploratoire a été menée dans laquelle des miARN issus de la glande mammaire de deux vaches contrôles et deux vaches supplémentées ont été séquencés. Cette analyse

exploratoire a permis de sélectionner huit miARN dont l'expression a ensuite été étudiée par qPCR. Ces travaux sont présentés dans l'**Article 4**.

Article 4: Sunflower oil supplementation affects the expression of *miR-20a-5p* and *miR-142-5p* in the lactating cow mammary gland. *Mobuchon L, Le Guillou S, Marthey S, Laubier J, Boby C, Laloë D, Le Provost F, Leroux C.* En préparation pour The Journal of Biological Chemistry.

Sunflower oil supplementation affects the expression of miR-20a-5p and miR-142-5p in the lactating bovine mammary gland.

Lenha Mobuchon[1,2,3], Sandrine Le Guillou[1], Sylvain Marthey[1], Johann Laubier[1], Denis Laloë[1], Fabienne Le Provost[1] and Christine Leroux*[2,3]

[1]INRA, UMR1313 Génétique Animale et Biologie Intégrative, F-78350, Jouy-en-Josas,

[2]INRA, UMR1213 Herbivores, F-63122, Saint Genès Champanelle

[3]Clermont Université, VetAgro Sup, UMR Herbivores, BP 10448, F-63000, Clermont-Ferrand

*Corresponding authors: christine.leroux@clermont.inra.fr

Keywords: *miRNA, lipid supplementation, mammary gland, cow*

Capsule:

Background

Mammary lipogenic genes are affected by lipid supplementation whose regulations are unclear.

Results

MiR-20a-5p and *miR-142-5p* were downregulated by a sunflower oil supplementation in lactating cow mammary gland and may have functions in lipid metabolism.

Conclusion

Those miRNA may explain lipogenic genes regulations after oil supplementation.

Significance

Lipid supplementation effects on mammary miRNA are shown for the first time.

Abstract

Background

Milk fat is crucial for the nutritional quality of ruminant milk. Oil supplementation affects milk fat composition, as well as lipogenic enzymes expression. Otherwise, miRNA are small non-coding RNA considered to be crucial regulators of gene expression at the post-transcriptional level offering clues to explain the regulation of genes by lipid supplementation.

Objectives

The present study aims to identify miRNA whose expression is modulated by a sunflower oil supplementation in the lactating cow mammary gland.

Methods

Eleven Holstein cows at the peak of lactation received a low forage diet with (LF-SO) or without (LF) 4% of sunflower oil. MiRNA were sequenced using the Illumina HiSeq 2000 technology on two pools of two cows from both diets. Eight miRNA were selected and sequencing data were compared with RT-qPCR.

Results

MiR-142-5p and *miR-20a-5p* were downregulated by the sunflower oil supplementation in the lactating cow mammary gland. Their putative targets corresponded to several genes involved in the lipid metabolism. Among those, nine genes were previously identified as significantly upregulated by the sunflower oil in which ELOVL6, a lipogenic enzyme. However, *in vitro*, the overexpression of *miR-142-5p*, *miR-20a-5p* or both, in bovine mammary epithelial cell line, did not induce a downregulation of ELOVL6.

Conclusions

This is the first evidence of the regulation of miRNA in the lactating cow mammary gland by lipid supplementation and would help to decipher the regulation of genes in response to the nutrition.

Introduction

The nutritional quality of milk depends on its composition, particularly its fatty acid fraction. Cow milk composition modulation presents a large interest to improve its ability to act on consumer health. Some fatty acids such as saturated fatty acids have been shown to have potentially negative effects on the consumer's health if they are consumed in excess whereas others (e.g. oleic acid, CLA) have positive effects. Ruminant milk fatty acids can change significantly in response to diets. Thus, nutritional strategies have been developed through dietary supplementation with plant oils or seeds to increase milk nutritional value (1). Milk fat synthesis and secretion involved numerous genes whom expression can be modulated by nutrition (2-6). In particular, transcriptomic assays revealed the modulation of 49 genes expression in mammary gland of lactating cows which received a sunflower oil supplement added to a low forage diet (7). Moreover, this diet increased milk yield associated with higher protein and lactose yield, but reduced milk fat.

Otherwise, microRNAs (miRNA), small non-coding RNA of 18-25 nucleotides, are known to be involved in many and various cellular processes (8-10). They regulate gene expression at the posttranscriptional level by binding their target mRNA through base-pairing interaction to mainly induce translational repression or mRNA degradation (11). The function of miRNA in the mammary gland biology remains poorly documented. Consequently to have a better knowledge of miRNA expression in this organ, profiles have been performed using high throughput sequencing. Several authors have established reference list of miRNA

expressed in the mammary gland of different species as human (12), mouse (13), rat (14), pig (15), cow (13,16,17) or goat (18-21). Recently, some miRNA have been identified to regulate the proliferation of mammary epithelial cells as *miR-101a* (22) and *miR-126-3p* (23) or impact the development of this organ as *miR-206* (24). In addition, the overexpression of *miR-30b* in the mouse mammary gland causes a lactation defect and delays the involution (25). Some miRNA may be involved in the function of lactation as *miR-15a* whose overexpression in bovine mammary epithelial cells inhibited the expression of *CSN2*, coding for β-casein, one of the major milk protein (26). All together, these results suggest that miRNA could have an important role in the mammary gland physiology and function.

Moreover, miRNA have been demonstrated as key regulators of lipid synthesis in various cell lines (27) and tissues (28-30), but only two studies have shown their implication in milk lipid synthesis. Thus, the overexpression of *miR-27a* or *miR-103* in goat mammary epithelial cells led to a change of fat droplet and triglycerides accumulation, decreased the ratio of unsaturated/saturated fatty acids and strongly affected the expression of genes associated with fat metabolism (31,32).

Recent data suggest that bioactive food components (micro- and macronutrients) affect the expression profile of miRNA or their function (33-37). In particular, dietary fat influence miRNA expression in several tissues. Thus in the liver of baboons which received a high cholesterol and high fat challenge diet, 28 miRNA were differently expressed compared with baboons received normal diet (38). In the retroperitoneal adipose tissue of mice, conjugated linoleic acid treatment modified the expression of *miR-103*, *miR-107*, *miR-143*, *miR-221* and *miR-222*, and their expression was correlated with genes having a high expression in adipocytes and related to lipid metabolism (39). In ruminants, few studies have investigated the impact of nutrition on miRNA expression. Moreover, Romao and colleagues shown that the expression of eight miRNA was highly influenced by a high fat diet in the backfat and

97 perirenal fat of steers (40). More recently, the expressions of 11 miRNA have been reported to
98 be affected by algae meal replaced flax oil in the subcutaneous and visceral adipose tissues of
99 lambs (41). In the mammary gland, the nutritional regulation of miRNA has been shown
100 through the effect of an extreme model since the expression of 30 miRNA has been modified
101 by a food deprivation in lactating goats (42). All these data clearly demonstrate the effect of
102 nutrition on miRNA genes expression in several tissues. However, in mammary gland no
103 study has highlighted the effect of diets similar to breeding conditions on miRNA expression.

104 Consequently, to have a better understanding of the regulation of gene expression in
105 the mammary gland in response to diet challenge, the present work aim to identify miRNA
106 whose expression are affected by a sunflower oil supplementation in lactating cows.

107

108 ## Materials and methods

109 ### Animals

110 Eleven multiparous Holstein cows at peak of lactation from Les Cèdres INRA experimental
111 station (France) were offered four experimental diets according to a 4 x 4 Latin Square with
112 three animals per group based on their homogeneity of milk yield and parity. Each period
113 lasted 28 days divided in the first 7 days for treatment adaptation, and the last 21 days cows
114 were fed one of the experimental diets. Diets were (1) an grass natural hay-based diet with
115 cows receiving a mixture of concentrates (Centraliment, Aurillac, France) to give
116 approximately a 65:35 forage-to-concentrate ratio, called "high forage" (HF); (2) HF diet
117 with 13.9g/100g of dry matter of whole intact rapeseeds (Centraliment, Aurillac, France),
118 substituting for corn grain, beet pulp and rapeseed meal (HF-RS); (3) an grass natural hay-
119 based diet with cows receiving a mixture of concentrates to give approximately a 46:54

120 forage-to-concentrate ratio, called "low forage" (LF); and (4) this same LF diet with 4 g/100g
121 of dry matter of sunflower oil (Huilerie de Lapalisse, Lapalisse, France) substituting for corn
122 grain (LF-SO). Mammary tissue was collected at the end of the experimental period from
123 cows by biopsies on the upper one-third of the posterior area of one udder using the method of
124 Farr *et al.* (43). Approximately 500 mg of mammary tissues were removed then rinsed in a
125 0.9% sterile saline solution, inspected to verify tissue homogeneity and snap-frozen in liquid
126 N2. For the current study, only samples from LF and LF-SO periods were chosen on the base
127 of their transcriptomic changes (7).

128 **RNA isolation, small library preparation, sequencing and data treatment**

129 RNA preparations were prepared from 50 mg of mammary tissue using Nucleospin® miRNA
130 isolation kit (Machery-Nagel, Inc.) as reported in Le Guillou *et al.* (13). For sequencing, RNA
131 from four cows were used and RNA samples were pooled, in equal amounts (10 µg of RNA
132 from each sample), by pairs according to their treatment (two pools LF and two pools LF-
133 SO). RNA were precipitated using sodium acetate 3 M, 96% ethanol and 5 mg/mL of
134 glycogen.

135 Library preparations and sequencing are reported in Le Guillou *et al.* (13). Briefly libraries
136 were prepared using Illumina small RNA kit and were sequenced on an Illumina HiSeq 2000
137 by GATC biotech Company (next Gen Lab, Konstanz, Germany) according to Solexa's
138 sequencing method. Data analyses were processed using the software miRDeep2 (44).

139 **Cell culture and transfection**

140 During routine culture cells were grown in monolayer on plastic culture flasks and in growth
141 medium comprising DMEM/F-12 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), RPMI-1640 and
142 NTC-135 in proportions 5:3:2 by vol. and enriched with α-lactose (2.77 nM), lactalbumin

143 enzymatic hydrolase (0.1%), glutathione (1.2 mM), bovine insulin (1 µg/mL), bovine holo-
144 transferrin (5 µg/mL), hydrocortisone (5 µg/mL) (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA), L-
145 ascorbic acid (10 µg/mL), progesteron (0.5 µg/mL), heat-inactivated FBS, penicillin-
146 streptomycin (50 UI/mL), fungizone (2.5 µg/mL) (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)
147 and glutamine (10 X) (Eurobio, Coutaboeuf, France). Cells were grown at 37°C, 5% CO_2 and
148 medium was changed very 48h (45). For transfection, confluent cells grown in monolayer
149 were trypsinized with Trypsin-0.25% EDTA and plated in 24 well at a concentration of
150 50,000 cells per well. On the following day, 10 pmol of *miR-20a-5p* and *miR-142-5p*
151 *mir*Vana™ mimics (*hsa-miR-20a-5p*, assay ID MC10057 and *bta-miR-142-5p*, assay ID
152 MC10404) and Lipofectamine® RNAiMAX Reagent were diluted with DMEM (Life
153 Technologies). Diluted miRNA mimics and Lipofectamine® RNAiMAX were diluted at 1:1
154 ratio and incubated 5 minutes at room temperature to create miRNA-lipid complex. Cells
155 were transfected for 24h, in triplicate. The *mir*Vana™ miRNA Mimic *miR-1* (Ambion, cat.
156 number 4464062) was used as positive control and its target *TWF1* was quantified to
157 determine whether the mimics is active in the cell. To estimate rate of transfection, the
158 BLOCK-iT™ Alexa Fluor® Red fluorescent Control (Life Technologies, cat. number 14750-
159 100) was used on the same plate. Cells were cultured on glass coverslips and transfections
160 were performed on the same time. Following 48h of transfection, cells were rinsed with PBS
161 and total RNA were extracted from cells using the RNA Now kit (Ozyme, cat. number
162 BX101) according to the manufacturer's instructions and with an overnight precipitation so as
163 to guarantee a maximum yield of miRNA. Cells on coverslips were fixed with 3%
164 formaldehyde (freshly prepared in PBS from a 32% stock solution, EMS Hatfield, USA) for
165 20 min and maintained at 4°C in PBS until they were mounted on glass slides using
166 VectaShield (Vector, USA) containing DAPI. Images were acquired thanks to a Leica

167 confocal microscope. Cells from three images of three different coverslips were counted.
168 Transfection experiments were repeated four times.

169 **Reverse transcription and Quantitative PCR**

170 Reverse transcription was performed on eight miRNA chosen according to their abundance in
171 the miRNome data, their stability intra-group, and their fold change (Table 1); *miR-15a-5p*
172 (TaqMan® ID 005892_mat, Applied Biosystems), *miR-17-5p* (TaqMan® ID 002308), *miR-*
173 *20a-5p* (TaqMan® ID 00580), *miR-33a-3p* (TaqMan® ID Custom Assay), *miR-126-3p*
174 (TaqMan® ID 008451_mat), *miR-142-5p* (TaqMan® ID 000465), *miR-181a-5p* (TaqMan®
175 ID 000480), *miR-223-3p* (TaqMan® 002295). Reverse transcription and quantitative PCR
176 were performed with the TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription (Applied Biosystems,
177 Foster City, CA, USA) and TaqMan® Small RNA Assays (Applied Biosystems, Foster City,
178 CA, USA), respectively, as described in (21). Reverse transcription were performed on RNA
179 pools as well as on individual RNA samples from all studied cows (n=11).

180 For gene assay, reverse transcription was performed on 500 ng of total RNA with the
181 SuperScript® VILO cDNA Synthesis kit according to the manufacturer's instructions
182 (Invitrogen) and under the following conditions: 42°C for 60 min and 85°C for 5 min.
183 Quantitative PCR were achieved using ABsolute Blue QPCR Mix, SYBR Green® (Thermo
184 Scientific™) according to the manufacturer's instructions on a Mastercycler ep Realplex
185 (Eppendorf), under the following conditions: 95°C for 15 min, 45 cycles of 95°C for 15 sec
186 and 60°C for 1 min, and a melting curve. Threshold cycles obtained for *ELOVL6* (F-
187 CAATATTTTCCCAGGGTTCTCC and R-AGCTGCCCTTTCAAGAGTTG) and *TWF1* (F-
188 GGCATCCAAGCAAGTGAAGA and R-GCTTCCTACACGACCCAATCA) were normalized
189 with the values of *GAPDH* (GlycerAldehyde-3-Phosphate DeHydrogenase, F-
190 ATGGTGAAGGTCGGAGTGAA and R-ACGATGTCCACTTTGCCAGA), and the results were

191 expressed as fold changes of threshold cycle (Ct) values relative to the control using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$
192 method (46).

193 **Statistical analysis**

194 Statistical analysis for the comparison of miRNomes was performed with R version 3.0.1 (R
195 Development Core Team, 2013) using the Bioconductor package DESeq2 version 1.0.17 (47)
196 as described in Le Guillou *et al.* (13). Data were filtered using the Bioconductor package
197 HTSFilter (48). The method aims to identify the threshold that maximizes the filtering
198 similarity among biological replicates, that is, one where most genes tend to either have
199 normalized counts less than or equal to the cutoff in all samples (i.e. filtered genes) or greater
200 than the cutoff in at least one sample (i.e. non-filtered genes). The threshold value was found
201 to be equal to 199. Applying this filtering reduces the 1,562 miRNA to 272. The p-values
202 were adjusted for multiple testing using the Benjamini-Hochberg method (49), and those with
203 an adjusted p-value < 0.05 were considered significant and p-value < 0.1 were considered as
204 tendencies.
205 Quantitative PCR data were analyzed with an ANOVA model using R version 3.0.1 (R
206 Development Core Team, 2013) for miRNA TaqMan® Assays. The model included the
207 effects of diet and the random effect of animal. For gene assays, data were analyzed with a
208 Mann-Whitney test using R version 3.0.1. Significance was also declared at p-value < 0.05
209 and $p < 0.1$ was considered as tendency.

210 **miRNA targeted pathways**

211 Conservation of seed regions between human and cattle for *miR-20a-5p* and *miR-142-5p* was
212 checked and putative targets for those miRNA were predicted with high accuracy based on
213 DIANA-microT-CDS v5.0 (50).
214

215 # Results

216 **Sunflower oil supplementation effects on bovine lactating mammary gland miRNome**

217 Four libraries were constructed using small RNA extracted from mammary gland of lactating
218 cows fed with a low forage (LF) diet and the same diet supplemented with 4% sunflower oil
219 (LF-SO) and sequenced using the Next Generation Sequencing (NGS) technology,
220 Illumina/Solexa (Table 2). More than 10 million of raw reads were obtained from each of the
221 4 libraries (LF1, LF2, LF-SO1 and LF-SO2). After removing sequencing adapters, more than
222 90% of raw reads were conserved in each library except for LF-SO2 in which around 77% of
223 raw reads were conserved. In average, 10,175,799 and 8,578,397 of filtered reads (17-28
224 nucleotides) were obtained in LF and LF-SO samples, respectively, and mapped on the cow
225 genome (UMD3.1.71). Then, 104,286 and 86,752 unique sequences were obtained in average
226 in LF and LF-SO samples, enabling the identification of 1,562 miRNA.

227 A first exploratory analysis was conducted on the 272 miRNA selected after the HTSFilter
228 (48), in which 18 predicted miRNA never identified in any species. Those predicted miRNA
229 will implement bovine miRNA database. This exploratory analysis did not enable to identify
230 miRNA significantly affected by the supplementation but several exhibited trends to be over
231 or under expressed after the sunflower oil supplementation.

232 **Comparison of miRNA expression using a different approach**

233 Eight miRNA (*miR-15a-5p, miR-17-5p, miR-20a-5p, miR-33a-3p, miR-126-3p, miR-181a-5p,*
234 *miR-142-5p* and *miR-223-3p*) were chosen in mammary miRNome according to their
235 homogeneity intra-group and their fold change (Table 1). Their expressions were analyzed
236 using qPCR on RNA pools used for sequencing analyses. Any miRNA were found
237 significantly affected by the sunflower oil supplementation using RT-qPCR on these RNA

238 samples. However, profiles obtained using both techniques were in accordance for all miARN
239 (Figure 1). Then, among both techniques, rank of expression of the eight selected miRNA was
240 conserved. For example *miR-126-3p* was the most highly detected in NGS (with 298,808
241 copies number) and qPCR and the expression of *miR-33a-3p* was the fewer in both techniques
242 compared with the other selected miRNA. Consequently, qPCR analysis has strengthened
243 data obtained by sequencing for the eight miRNA.

244 **Sunflower oil supplementation affects the expression of miRNA**

245 Behind the exploratory analysis on RNA pools, the expression of the eight miRNA selected
246 above were analyzed on a larger number of animals, since the 11 cows of the experiment
247 design were used for RT-qPCR analysis (Figure 2). Four miRNA (*miR-15a-5p, miR-33a-3p,*
248 *miR-126-3p* and *miR-223-3p*) were found upregulated in LF-SO cows compared with LF and
249 four miRNA (*miR-17-5p, miR-20a-5p, miR-142-5p* and *miR-181a-5p*) were found
250 downregulated. However, among them *miR-20a-5p* (p=0.08) shown tendency and *miR-142-5p*
251 (p=0.03) was significantly affected by the sunflower oil supplementation. In order to
252 investigate the functional role of *miR-20a-5p* and *miR-142-5p*, computational applications
253 were used to predict their targets. Among them several genes were involved in the lipid
254 metabolism (Table 3) and in identical regulating pathway (Figure 3).

255 **miR-20a-5p and miR-142-5p are predicted to target differentially expressed genes**
256 **(DEG) by sunflower oil**

257 With the aim to relate miRNA with their potential target which were previously detected as
258 differently expressed (DEG) using transcriptomic analyses on the same samples, links
259 between the putative targets of *miR-20-5p* and *miR-142-5p* and DEG were investigated.
260 Among the putative targets showing inverse responses to treatment compared with miRNA,
261 nine among the 49 DEG were found (7) (Table 4). Downregulated *miR-20a-5p* was found to

262 potentially target eight DEG up-regulated (*ELK4, ELOVL6, ETV1, KDM6B, KIAA1524,*
263 *LONP2, M6PR, USP12*) in LF-SO cows whereas *miR-142-5p* (downregulated) was found to
264 potentially target four up-regulated DEG (*ELK4, ELOVL6, ETV1, PIK3CD*). Especially both
265 miRNA may target *ELOVL6*, a fatty acid elongase (Figure 4), involved in the lipid
266 metabolism.

267 **Can miR-20a-5p and miR-142-5p regulate the expression of ELOVL6 ?**

268 To investigate whether *miR-20a-5p* and *miR-142-5p* may regulate the expression of *ELOVL6*
269 in the mammary epithelial cell, miRNA were overexpressed individually or together, using
270 miRNA mimics in bovine mammary epithelial cells BME-UV1. The expressions of *miR-20a-*
271 *5p* and *miR-142-5p* were highly increased in transfected cells compared with controls cells
272 (Figure 5A). To estimate transfection rate, a siRNA labelled with an Alexa Fluor® dye was
273 also transfected in BME-UV1 cells (Figure 5B). SiRNA was localized in cell cytoplasm in the
274 form of small red fluorescent granules. The counting of transfected cells compared with no-
275 transfected cells enable to determine a transfection rate of 40%, in mean. To ensure mimics is
276 functional in cells and regulate the expression of its target, *miR-1*, a highly conserved miRNA
277 among species which regulate the mRNA level of its target *TWF1* in numerous mammalian
278 cell lines, was simultaneously transfected. A significant decrease of *TWF1* expression was
279 found in BME-UV1 transfected with *miR-1* compared with control cells, in all transfection
280 assays (Figure 5C). This suggests that *miR-1* could interact with *TWF1* and downregulated its
281 expression highlightening the presence of enzymes responsible for miRNA action. *MiR-20a-*
282 *5p* and *miR-142-5p* were transfected individually or together for 48h in BME-UV1 cells and
283 the expression of *ELOVL6* was quantified. For the first assay, a significant decrease of
284 ELOVL6 expression was observed when miR-20a-5p and miR-142-2p were both transfected
285 compared with controls cells. However, this result could not be reproduced by the three others
286 experiments although a tendency could be observed for the second assay (Figure 6).

287 # Discussion

288 **Analyses of mammary miRNomes from LF and LF-SO cows**

289 To better understand the regulation underlying mammary gene expression in response to
290 dietary factors, miRNomes from cows receiving LF-SO diet or LF diet were compared. Each
291 miRNome was constituted of 272 miRNA. To have an exploratory study with the aim to
292 detect potentially altered miRNA expression, we sequenced two pools composed of two cows
293 from each diet. Moreover, next to the known too low number of samples analyzed by
294 sequencing, the duration of the supplementation may not be sufficient to observe significant
295 change in miRNA profiles. No miRNA were found to be significantly affected by the
296 sunflower oil supplementation by this first exploratory. Indeed, Karere *et al*. have performed a
297 seven weeks challenge on 12 of baboons and identified 28 miRNA differentially affected by a
298 high fat and high cholesterol diet, in the liver (38). In addition, Romao *et al.* have
299 characterized eight miRNA differentially expressed in the adipose tissue of eight steers in
300 response of 3.5 months of high fat diet (40). Those examples show that differentially
301 expressed miRNA were obtained in challenges including more animal than the present study
302 and longer treatment than 21 days. However, several miRNA shown trends to be up- or
303 downregulated in which eight miRNA were pointed out and analyzed using qPCR on the
304 same RNA pools. Several authors showed good correlation between data obtained between
305 the two different technics (51,52). Such agreement in data obtained using different approaches
306 strengthens our results (Figure 1).

307 **The expression of miR-20a-5p and miR-142-5p is affected by the sunflower oil**
308 **supplementation**

309 The exploratory RNA sequencing analyses performed on two pools of two animals for each
310 condition were completed to identify differently expressed miRNA by analyses performed on

311 11 animals for each condition from the experiment trial by individually RT-qPCR analyses.
312 Among the eight miRNA candidates identified in the exploratory analysis, this analyses with
313 more samples led to identify *miR-20a-5p* (p=0.08) and *miR-142-5p* (p=0.03) as miRNA with
314 expression decreased by the sunflower oil supplementation (Figure 2). If *miR-20a-5p*
315 response to lipid supplementation has not been described yet to our knowledge, the change in
316 the expression of *miR-142-5p* due to supplemented diet with sunflower oil is in line with
317 previous reported studies in adipose tissues. In fact, in the white adipose tissue of mice
318 received a high fat diet during 5 months, *miR-142-5p* was significantly upregulated compared
319 with control mice (53). Then, its expression was 2.5 and 2.8 fold higher in the subcutaneous
320 and visceral fat, respectively of lambs receiving, during 140 days, 3% of algae meal replaced
321 flax oil and barley grains (41). In addition, a high fat diet given in the form of flaxseeds to
322 steers during 14 weeks leaded to an increase of 185 fold and 968 fold of *miR-142-5p*
323 expression in the subcutaneous and visceral adipose tissues, respectively (40). In the present
324 study, a lower fold change was obtained for *miR-142-5p* (0.69) but the nutritional challenge
325 and the tissue are different with quoted studies. Both our results and those obtained on
326 adipose tissue suggest that the expression of *miR-142-5p* is highly influence by dietary lipids.
327 All the quoted studies showed an up-regulated expression of *miR-142-5p* after challenge diets
328 in the adipose tissue, whereas a downregulation of the expression of *miR-142-5p* was obtained
329 in LF-SO cows. In adipose tissue, studies above are in a context of lipid storage, while in the
330 present study the context of lipid secretion of milk components by the mammary is quite
331 different and may explain the difference of the response of *miR-142-5p* expression by diet.

332 **Putative role of miR-20a-5p and miR-142-5p in the lipid metabolism on the lactating**
333 **mammary gland**

334 *MiR-20a-5p* is part of the cluster *mir-17/92* which has been mostly described for its function
335 as oncomiR but it is also important for cell cycle proliferation, apoptosis and others biological

336 processes in several organs (54). Then, the role of *miR-20a-5p* and *miR-142-5p* has never
337 been investigated in the mammary gland. So to highlight the functional impact of *miR-20a-5p*
338 and *miR-142-5p* in the mammary gland, their targets were predicted using computational
339 applications.

340 Due to the effects of sunflower oil addition, on gene expression in lipid metabolism, our
341 attention has been focused on predicted targets involved in lipid metabolism (Table 3). For
342 example, among *miR-20a-5p* and *miR-142-5p* predicted targets, *LEPR* which is the leptin
343 receptor or *ABCA1* which is a transporter maintaining cholesterol homeostasis in the
344 mammary gland (55). *MiR-20a-5p* may act on lipoprotein metabolism by targeting
345 *APOBEC4*, *LDLR* and fatty acids import through *VLDLR*. Among putative targets, *SCD5*
346 plays a pivotal role in lipid metabolism in introducing a cis-double bond at the Δ9 position in
347 a wide range of fatty acids, and *BTN1A1* is a major constituent of the milk fat globule
348 membrane. *LPIN1* is also potentially targeted by *miR-20a-5p*. This gene is highly expressed in
349 the cow mammary gland at the peak of lactation and is involved in triacylglycerol
350 accumulation in adipose tissue (56). In the mammary gland, its role is not yet clear but could
351 be involved in milk fat synthesis, notably because it is essential for *PPARα* activation (57).
352 The members of PPAR family as *PPARα*, *PPARγ* and co-activator *PPARGC1B,* also targeted
353 by *miR-142-5p*, are transcription factors involved in the control of genes coding for lipogenic
354 enzymes, and are predicted to be targeted by *miR-20a-5p* (58). However, *PPARα* is modestly
355 expressed in the mammary gland (59,60). In addition direct interaction between *miR-20a-5p*
356 and *PPARγ* has been confirmed using luciferase assay in Cos-7 cells (61). *PPARγ* controls
357 most of the genes involved in milk fat synthesis as *FASN* (Fatty Acid SyNthetase), *ACACA*
358 (Acetyl-CoA Carboxylase Alpha), *SCD*, *ABCA1*, *BTN1A1* or *LPIN1* (62) (Figure 3). Taken
359 together, these predictions suggest a potential and crucial role of *miR-20a-5p* at different level
360 in milk fat synthesis.

361 Otherwise, *miR-142-5p* is also predicted to target two isoforms of the enzyme *ACSL* (Table
362 3). In the lactating bovine mammary gland, *ACSL1* has been shown to be the major isoform
363 (62) and activates newly synthesized fatty acids before they can be metabolized or inserted
364 into lipid droplets (63).

365 Consequently *miR-20a-5p* and *miR-142-5p* may impact the lipid metabolism in response to oil
366 supplementation according to their putative targets.

367 **Some previously identified DEG are predicted targets of miR-20a-5p and miR-142-5p**

368 Interestingly among predicted targets of *miR-20a-5p* and *miR-142-5p*, nine differentially
369 expressed genes (DEG) previously identified in the same samples by transcriptomic analysis
370 were found (Table 4). Both *miR-20a-5p* and *miR-142-5p* are predicted to target *ELK4* and
371 *ETV1* both known to be involved in replication, transcription and translation. *MiR-20a-5p* also
372 potentially target *KDM6B*, a demethylase, involved in the regulation of genes expression,
373 suggesting this miRNA could be involved in gene regulation in response to oil
374 supplementation.

375 Among predicted the nine DEG potentially targeted, four are involved in metabolism; *LONP2*
376 and *USP2* are part of the protein metabolism whereas *M6PR* plays a role in the carbohydrate
377 metabolism. Interestingly, both *miR-20a-5p* and *miR-142-5p* potentially target *ELOVL6*
378 overexpressed in LF-SO, which is a member of the fatty acid elongases family (Table 4,
379 Figure 4) (64), involved in the lipid metabolism. It was suggested that ruminant mammary
380 tissue lacks elongases (65) but several evidences shown the presence of *ELOVL* in the
381 mammary gland of mice (66-68) or members such as *ELOVL5* in lactating goat mammary
382 gland (69). However, its function in mammary gland has not yet been investigated but as in
383 lipogenic tissues it may catalyzes the elongation of saturated and monosaturated fatty acids
384 with 12, 14 and 16 carbons (64). So furthers studies need to decipher its role in mammary

385 tissues. It can be hypothesized that a fewer expression of *miR-20a-5p* and *miR-142-5p* may
386 contribute to the increased expression of *ELOVL6* in mammary gland of LF-SO cows.

387 **The overexpression of miR-20a-5p and miR-142-5p did not induce the downregulation**
388 **of ELOVL6 *in vitro*, in mammary epithelial cell line.**

389 To validate the regulation of *miR-20a-5p* and *miR-142-5p* on *ELOVL6*, these miRNA were
390 overexpressed in bovine mammary epithelial cell line. Although all experiments controls were
391 validated (Figure 5) and miRNA were highly expressed in transfected cells, surprisingly the
392 overexpression of *miR-20a-5p*, *miR-142-5p* or both did not lead to a decrease in *ELOVL6*
393 expression (Figure 6). The seed regions of *miR-20a-5p* and *miR-142-5p* (nucleotides 2-8) are
394 both fully complementary to *ELOVL6* sequence indicating that they could lead to the
395 degradation of the mRNA target through cleavage (70). Maybe *miR-20a-5p* and *miR-142-5p*
396 interact with the 3'UTR of *ELOVL6* and affect the translation of the transcript, reducing
397 *ELOVL6* protein level without affecting the mRNA level. This has been observed for *lin-4*
398 which reduced the amount of lin-14 protein without altering mRNA abundance (71,72).
399 Bound to their target, miRNA lead to the cleavage of the nascent polypeptide during
400 translation elongation (73). MiRNA mainly induce mRNA decay, but the regulation of the
401 amount of protein *ELOVL6* could be hypothesized in this case. Finally, the downregulation of
402 *miR-20a-5p* and *miR-142-5p* and the upregulation of *ELOVL6* were obtained in a context of
403 lactation, which was not reproduced in cultured cells. Cellular context may influence miRNA
404 function (74). Then, it's thinkable that in the context of BME-UV1 cells culture, *ELOVL6* is
405 expressed but the binding sites for *miR-20a-5p* and *miR-142-5p* are not accessible precluding
406 miRNA activities. Indeed, both proteins and other miRNA may bind to the 3'UTR of
407 ELOVL6. Finally, *in vivo*, the expression of *ELOVL6* was upregulated in the mammary gland
408 of cows received the sunflower supplementation whereas those of *miR-20a-5p* and *miR-142-*
409 *5p* were downregulated. Both miRNA might act to decrease the expression of *ELOVL6* at a

410 physiological level. The overexpression of miRNA have no effect because *miR-20a-5p* and
411 *miR-142-5p*-mediated regulation might already be at the maximum, and a higher
412 concentration of these latter therefore has no more effects. Further studies are required to
413 assess the direct involvement of *miR-20a-5p* and *miR-142-5p* on the regulation of *ELOVL6*
414 expression in the mammary gland.

415

416 To conclude, to our best knowledge it is the first study showing the effect of a lipid
417 supplementation on miRNA expression in the ruminant mammary gland. The sunflower oil
418 supplementation alters the expression of *miR-20a-5p* and *miR-142-5p* which potentially target
419 differentially expressed genes previously identified in the same samples. In particular, both
420 nutriregulated miRNA may target *ELOVL6* whose expression is also affected by the lipid
421 supplementation, but the overexpression of the two miRNA, individually or together, *in vitro*,
422 did not confirm the change in gene expression. Decipher the function of those miRNA in the
423 mammary gland and especially their impact on nutriregulated genes would be of great interest
424 to understand the effect of diet on milk synthesis regulations.

425

426 Acknowledgements

427 The authors are grateful to L. Bernard, Y. Chilliard and J. Rouel for animal experiments and
428 tissues isolation, as well as to F. Dessauge for providing BME-UV1 cells lines. They also
429 specially thank A. de la Foye for her help in statistics analyses. This works was supported by
430 INRA, AIP BioRessources and ApisGène.

431

432

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Author's contributions

Conceived and designed the experiments: LM, FLP, CL

Performed the experiments: LM, SLG, SM, JL

Analyzed the data: LM, SLG, SM, JL

Wrote the paper: LM, FLP, CL

References

1. Chilliard, Y., and Ferlay, A. (2004) Dietary lipids and forages interactions on cow and goat milk fatty acid composition and sensory properties. *Reprod Nutr Dev* **44**, 467-492
2. Bernard, L., Leroux, C., and Chilliard, Y. (2008) Expression and nutritional regulation of lipogenic genes in the ruminant lactating mammary gland. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 67-108
3. Ollier, S., Robert-Granié, C., Bernard, L., Chilliard, Y., and Leroux, C. (2007) Mammary trancriptome analysis of food deprived lactating goats highlights genes involved in milk secretion and programmed cell death. *J. Nutr.* **3**, 560-567
4. Ollier, S., Leroux, C., de la Foye, A., Bernard, L., Rouel, J., and Chilliard, Y. (2009) Whole intact rapeseeds or sunflower oil in high-forage or high-concentrate diets affects milk yield, milk composition, and mammary gene expression profile in goats. *J Dairy Sci* **92**, 5544-5560
5. Mach, N., van Baal, J., Kruijt, L., Jacobs, A., and Smits, M. (2011) Dietary unsaturated fatty acids affect the mammary gland integrity and health in lactating dairy cows. *BMC Proc* **3**, 1753-6561
6. Piantoni, P., Daniels, K. M., Everts, R. E., Rodriguez-Zas, S. L., Lewin, H. A., Hurley, W. L., Akers, R. M., and Loor, J. J. (2012) Level of nutrient intake affects mammary gland gene expression profiles in preweaned Holstein heifers. *J Dairy Sci* **95**, 2550-2561
7. Leroux, C., Bernard, L., Faulconnier, Y., Rouel, J., de la Foye, A., Domagalski, J., and Chilliard, Y. (Submitted) Bovine mammary nutrigenomics and changes in the milk composition due to rapeseed or sunflower oil supplementation of high-forage or high-concentrate diets. *Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics*
8. Ambros, V. (2004) The functions of animal microRNAs. *Nature* **431**, 350-355

465 9. Bushati, N., and Cohen, S. M. (2007) microRNA functions. *Annu Rev Cell Dev Biol* **23**, 175-
466 205
467 10. Ameres, S. L., and Zamore, P. D. (2013) Diversifying microRNA sequence and function. *Nat*
468 *Rev Mol Cell Biol* **14**, 475-488
469 11. Bartel, D. P. (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**,
470 281-297
471 12. Farazi, T. A., Horlings, H. M., Ten Hoeve, J. J., Mihailovic, A., Halfwerk, H., Morozov, P.,
472 Brown, M., Hafner, M., Reyal, F., van Kouwenhove, M., Kreike, B., Sie, D., Hovestadt, V.,
473 Wessels, L. F., van de Vijver, M. J., and Tuschl, T. (2011) MicroRNA sequence and
474 expression analysis in breast tumors by deep sequencing. *Cancer Res* **71**, 4443-4453
475 13. Le Guillou, S., Marthey, S., Laloe, D., Laubier, J., Mobuchon, L., Leroux, C., and Le Provost,
476 F. (2014) Characterisation and comparison of lactating mouse and bovine mammary gland
477 miRNomes. *PLoS One* **9**, e91938
478 14. Zhang, C., Zhao, Y., Wang, Y., Wu, H., Fang, X., and Chen, H. (2014) Deep RNA sequencing
479 reveals that microRNAs play a key role in lactation in rats. *J Nutr* **144**, 1142-1149
480 15. Peng, J., Zhao, J. S., Shen, Y. F., Mao, H. G., and Xu, N. Y. (2015) MicroRNA expression
481 profiling of lactating mammary gland in divergent phenotype swine breeds. *Int J Mol Sci* **16**,
482 1448-1465
483 16. Li, Z., Liu, H., Jin, X., Lo, L., and Liu, J. (2012) Expression profiles of microRNAs from
484 lactating and non-lactating bovine mammary glands and identification of miRNA related to
485 lactation. *BMC Genomics* **13**, 731
486 17. Li, R., Zhang, C. L., Liao, X. X., Chen, D., Wang, W. Q., Zhu, Y. H., Geng, X. H., Ji, D. J.,
487 Mao, Y. J., Gong, Y. C., and Yang, Z. P. (2015) Transcriptome microRNA profiling of bovine
488 mammary glands infected with Staphylococcus aureus. *Int J Mol Sci* **16**, 4997-5013
489 18. Ji, Z., Wang, G., Xie, Z., Wang, J., Zhang, C., Dong, F., and Chen, C. (2012) Identification of
490 novel and differentially expressed MicroRNAs of dairy goat mammary gland tissues using
491 solexa sequencing and bioinformatics. *PLoS One* **7**, 14
492 19. Ji, Z., Wang, G., Xie, Z., Zhang, C., and Wang, J. (2012) Identification and characterization of
493 microRNA in the dairy goat (*Capra hircus*) mammary gland by solexa deep-sequencing
494 technology. *Mol Biol Rep* **39**, 9361-9371
495 20. Li, Z., Lan, X., Guo, W., Sun, J., Huang, Y., Wang, J., Huang, T., Fang, X., and Chen, H.
496 (2012) Comparative transcriptome profiling of dairy goat microRNAs from dry period and
497 peak lactation mammary gland tissues. *PLoS One* **7**, e52388
498 21. Mobuchon, L., Marthey, S., Boussaha, M., Le Guillou, S., Leroux, C., and Le Provost, F.
499 (2015) Annotation of the goat genome using next generation sequencing of microRNA
500 expressed by the lactating mammary gland: comparison of three approaches. *BMC Genomics*
501 **16**, 285
502 22. Tanaka, T., Haneda, S., Imakawa, K., Sakai, S., and Nagaoka, K. (2009) A microRNA, miR-
503 101a, controls mammary gland development by regulating cyclooxygenase-2 expression.
504 *Differentiation* **77**, 181-187
505 23. Cui, W., Li, Q., Feng, L., and Ding, W. (2011) MiR-126-3p regulates progesterone receptors
506 and involves development and lactation of mouse mammary gland. *Mol Cell Biochem* **355**, 17-
507 25
508 24. Lee, M. J., Yoon, K. S., Cho, K. W., Kim, K. S., and Jung, H. S. (2013) Expression of miR-
509 206 during the initiation of mammary gland development. *Cell Tissue Res* **353**, 425-433
510 25. Le Guillou, S., Sdassi, N., Laubier, J., Passet, B., Vilotte, M., Castille, J., Laloë, D., Polyte, J.,
511 Bouet, S., Jaffrézic, F., Cribiu, E. P., VilotteJ.L., and Le Provost, F. (2012) Overexpression of
512 miR-30b in the developing mouse mammary gland causes a lactation defect and delays
513 involution. *PLoS One* **7**, e45727
514 26. Li, H. M., Wang, C. M., Li, Q. Z., and Gao, X. J. (2012) Mir-15a decreases bovine mammary
515 epithelial cell viability and lactation and regulates growth receptor expression. *Molecules* **17**,
516 12037-12048
517 27. Esau, C., Kang, X., Peralta, E., Hanson, E., Marcusson, E. G., Ravichandran, L. V., Sun, Y.,
518 Koo, S., Perera, R. J., Jain, R., Dean, N. M., Freier, S. M., Bennett, C. F., Lollo, B., and

519 Griffey, R. (2004) MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation. *J Biol Chem* **279**,
520 52361-52365
521 28. Lynn, F. C. (2009) Meta-regulation: microRNA regulation of glucose and lipid metabolism.
522 *Trends Endocrinol Metab* **20**, 452-459
523 29. Nakanishi, N., Nakagawa, Y., Tokushige, N., Aoki, N., Matsuzaka, T., Ishii, K., Yahagi, N.,
524 Kobayashi, K., Yatoh, S., Takahashi, A., Suzuki, H., Urayama, O., Yamada, N., and Shimano,
525 H. (2009) The up-regulation of microRNA-335 is associated with lipid metabolism in liver
526 and white adipose tissue of genetically obese mice. *Biochem Biophys Res Commun* **385**, 492-
527 496
528 30. Aranda, J. F., Madrigal-Matute, J., Rotllan, N., and Fernandez-Hernando, C. (2013)
529 MicroRNA modulation of lipid metabolism and oxidative stress in cardiometabolic diseases.
530 *Free Radic Biol Med* **16**, 00345-00346
531 31. Lin, X. Z., Luo, J., Zhang, L. P., Wang, W., Shi, H. B., and Zhu, J. J. (2013) mir-27a
532 suppresses triglycerides accumulation and affects gene mRNA expression associated with fat
533 metabolism in dairy goat mammary gland epithelial cells. *Gene* **521**, 15-23
534 32. Lin, X., Luo, J., Zhang, L., Wang, W., and Gou, D. (2013) MiR-103 controls milk fat
535 accumulation in goat (Capra hircus) mammary gland during lactation. *PLoS One* **8**, e79258
536 33. Ross, S. A., and Davis, C. D. (2011) MicroRNA, nutrition and cancer prevention. *Adv. Nutr.*
537 **2**, 472-485
538 34. Izzotti, A., Cartiglia, C., Steele, V. E., and De Flora, S. (2012) MicroRNAs as targets for
539 dietary and pharmacological inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutation Research*
540 **751**, 287-203
541 35. Shah, M. S., Davidson, L. A., and Chapkin, R. S. (2012) Mechanistic insights into the role of
542 microRNAs in cancer: influence of nutrient crosstalk. *Frontiers in genetics* **3**, 1-14
543 36. Garcia-Segura, L., Perez-Andrade, M., and Miranda-Rios, J. (2013) The Emerging Role of
544 MicroRNAs in the Regulation of Gene Expression by Nutrients. *J Nutrigenet Nutrigenomics*
545 **6**, 16-31
546 37. Milenkovic, D., Jude, B., and Morand, C. (2013) miRNA as molecular target of polyphenols
547 underlying their biological effects. *Free Radic Biol Med* **64**, 40-51
548 38. Karere, G. M., Glenn, J. P., VandeBerg, J. L., and Cox, L. A. (2012) Differential microRNA
549 response to a high-cholesterol, high-fat diet in livers of low and high LDL-C baboons. *BMC*
550 *Genomics* **13**, 1471-2164
551 39. Parra, P., Serra, F., and Palou, A. (2010) Expression of adipose microRNAs is sensitive to
552 dietary conjugated linoleic acid treatment in mice. *PLoS One* **5**, e13005
553 40. Romao, J. M., Jin, W., He, M., McAllister, T., and Guan, L. L. (2012) Altered microRNA
554 expression in bovine subcutaneous and visceral adipose tissue from cattle under different diet.
555 *PLoS One* **7**, e40605
556 41. Meale, S. J., Romao, J. M., He, M. L., Chaves, A. V., McAllister, T. A., and Guan, L. L.
557 (2014) Effect of diet on microRNA expression in ovine subcutaneous and visceral adipose
558 tissues. *J Anim Sci* **92**, 3328-3337
559 42. Mobuchon, L., Marthey, S., Le Guillou, S., Laloe, D., Le Provost, F., and Leroux, C. (2015)
560 Food deprivation affects the miRNome in the lactating goat mammary gland. *PLoS One* **In**
561 **Press**
562 43. Farr, V. C., Stelwagen, K., Cate, L. R., Molenaar, A. J., McFadden, T. B., and Davis, S. R.
563 (1996) An improved method for the routine biopsy of bovine mammary tissue. *J Dairy Sci* **79**,
564 543-549
565 44. Friedlander, M. R., Mackowiak, S. D., Li, N., Chen, W., and Rajewsky, N. (2012) miRDeep2
566 accurately identifies known and hundreds of novel microRNA genes in seven animal clades.
567 *Nucleic Acids Res* **40**, 37-52
568 45. Zavizion, B., van Duffelen, M., Schaeffer, W., and Politis, I. (1996) Establishment and
569 characterization of a bovine mammary epithelial cell line with unique properties. *In Vitro Cell*
570 *Dev Biol Anim* **32**, 138-148
571 46. Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using
572 real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402-408

573 47. Anders, S., and Huber, W. (2010) Differential expression analysis for sequence count data.
574 *Genome Biol* **11**, 2010-2011
575 48. Rau, A., Gallopin, M., Celeux, G., and Jaffrezic, F. (2013) Data-based filtering for replicated
576 high-throughput transcriptome sequencing experiments. *Bioinformatics* **29**, 2146-2152
577 49. Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995) Controlling the false discovery rate: a pratical and
578 powerful approach to multiple testing. *J R Statist Soc B* **57**, 289-300
579 50. Paraskevopoulou, M. D., Georgakilas, G., Kostoulas, N., Vlachos, I. S., Vergoulis, T.,
580 Reczko, M., Filippidis, C., Dalamagas, T., and Hatzigeorgiou, A. G. (2013) DIANA-microT
581 web server v5.0: service integration into miRNA functional analysis workflows. *Nucleic Acids*
582 *Res* **41**, 16
583 51. Git, A., Dvinge, H., Salmon-Divon, M., Osborne, M., Kutter, C., Hadfield, J., Bertone, P., and
584 Caldas, C. (2010) Systematic comparison of microarray profiling, real-time PCR, and next-
585 generation sequencing technologies for measuring differential microRNA expression. *Rna* **16**,
586 991-1006
587 52. Tam, S., de Borja, R., Tsao, M. S., and McPherson, J. D. (2014) Robust global microRNA
588 expression profiling using next-generation sequencing technologies. *Lab Invest* **94**, 350-358
589 53. Chartoumpekis, D. V., Zaravinos, A., Ziros, P. G., Iskrenova, R. P., Psyrogiannis, A. I.,
590 Kyriazopoulou, V. E., and Habeos, I. G. (2012) Differential expression of microRNAs in
591 adipose tissue after long-term high-fat diet-induced obesity in mice. *PLoS One* **7**, 4
592 54. Mogilyansky, E., and Rigoutsos, I. (2013) The miR-17/92 cluster: a comprehensive update on
593 its genomics, genetics, functions and increasingly important and numerous roles in health and
594 disease. *Cell Death Differ* **20**, 1603-1614
595 55. Mani, O., Sorensen, M. T., Sejrsen, K., Bruckmaier, R. M., and Albrecht, C. (2009)
596 Differential expression and localization of lipid transporters in the bovine mammary gland
597 during the pregnancy-lactation cycle. *J Dairy Sci* **92**, 3744-3756
598 56. Phan, J., and Reue, K. (2005) Lipin, a lipodystrophy and obesity gene. *Cell Metab* **1**, 73-83
599 57. Finck, B. N., Gropler, M. C., Chen, Z., Leone, T. C., Croce, M. A., Harris, T. E., Lawrence, J.
600 C., Jr., and Kelly, D. P. (2006) Lipin 1 is an inducible amplifier of the hepatic PGC-
601 1alpha/PPARalpha regulatory pathway. *Cell Metab* **4**, 199-210
602 58. Medina-Gomez, G., Gray, S., and Vidal-Puig, A. (2007) Adipogenesis and lipotoxicity: role of
603 peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) and
604 PPARgammacoactivator-1 (PGC1). *Public Health Nutr* **10**, 1132-1137
605 59. Rodriguez-Cruz, M., Tovar, A. R., del Prado, M., and Torres, N. (2005) [Molecular
606 mechanisms of action and health benefits of polyunsaturated fatty acids]. *Rev Invest Clin* **57**,
607 457-472
608 60. Bionaz, M., Hausman, G. J., Loor, J. J., and Mandard, S. (2013) Physiological and Nutritional
609 Roles of PPAR across Species. *PPAR Res* **807156**, 15
610 61. Zhang, J. F., Fu, W. M., He, M. L., Xie, W. D., Lv, Q., Wan, G., Li, G., Wang, H., Lu, G., Hu,
611 X., Jiang, S., Li, J. N., Lin, M. C., Zhang, Y. O., and Kung, H. F. (2011) MiRNA-20a
612 promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by co-regulating BMP
613 signaling. *RNA Biol* **8**, 829-838
614 62. Bionaz, M., and Loor, J. J. (2008) Gene networks driving bovine milk fat synthesis during the
615 lactation cycle. *BMC Genomics* **9**, 1471-2164
616 63. Mashek, D. G., McKenzie, M. A., Van Horn, C. G., and Coleman, R. A. (2006) Rat long chain
617 acyl-CoA synthetase 5 increases fatty acid uptake and partitioning to cellular triacylglycerol in
618 McArdle-RH7777 cells. *J Biol Chem* **281**, 945-950
619 64. Jakobsson, A., Westerberg, R., and Jacobsson, A. (2006) Fatty acid elongases in mammals:
620 their regulation and roles in metabolism. *Prog Lipid Res* **45**, 237-249
621 65. Moore, J. H., and Christie, W. W. (1981) *Lipid metabolism in the mammary gland of*
622 *ruminants.*,
623 66. Padovani, M., Lavigne, J. A., Chandramouli, G. V., Perkins, S. N., Barrett, J. C., Hursting, S.
624 D., Bennett, L. M., and Berrigan, D. (2009) Distinct effects of calorie restriction and exercise
625 on mammary gland gene expression in C57BL/6 mice. *Cancer Prev Res* **2**, 1076-1087
626 67. Rodriguez-Cruz, M., Sanchez, R., Sanchez, A. M., Kelleher, S. L., Sanchez-Munoz, F.,
627 Maldonado, J., and Lopez-Alarcon, M. (2011) Participation of mammary gland in long-chain

628 polyunsaturated fatty acid synthesis during pregnancy and lactation in rats. *Biochim Biophys*
629 *Acta* **4**, 284-293
630 68. Doria, M. L., Ribeiro, A. S., Wang, J., Cotrim, C. Z., Domingues, P., Williams, C.,
631 Domingues, M. R., and Helguero, L. A. (2014) Fatty acid and phospholipid biosynthetic
632 pathways are regulated throughout mammary epithelial cell differentiation and correlate to
633 breast cancer survival. *Faseb J* **28**, 4247-4264
634 69. Toral, P. G., Bernard, L., Delavaud, C., Gruffat, D., Leroux, C., and Chilliard, Y. (2013)
635 Effects of fish oil and additional starch on tissue fatty acid profile and lipogenic gene mRNA
636 abundance in lactating goats fed a diet containing sunflower-seed oil. *Animal* **7**, 948-956
637 70. Behm-Ansmant, I., Rehwinkel, J., and Izaurralde, E. (2006) MicroRNAs silence gene
638 expression by repressing protein expression and/or by promoting mRNA decay. *Cold Spring*
639 *Harb Symp Quant Biol* **71**, 523-530
640 71. Lee, R. C., Feinbaum, R. L., and Ambros, V. (1993) The C. elegans heterochronic gene lin-4
641 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell* **75**, 843-854
642 72. Wightman, B., Ha, I., and Ruvkun, G. (1993) Posttranscriptional regulation of the
643 heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. elegans. *Cell* **75**,
644 855-862
645 73. Stefani, G., and Slack, F. J. (2008) Small non-coding RNAs in animal development. *Nat Rev*
646 *Mol Cell Biol* **9**, 219-230
647 74. Erhard, F., Haas, J., Lieber, D., Malterer, G., Jaskiewicz, L., Zavolan, M., Dolken, L., and
648 Zimmer, R. (2014) Widespread context dependency of microRNA-mediated regulation.
649 *Genome Res* **24**, 906-919

650

651

652

653

654

655

656

657

658

659

660

661

662

663 **Figures**

664 Table 1: Characteristics of the eight miRNA selected for qPCR analysis.

665

miRNA	Sequence (5'->3')	Mean of normalized read counts	Fold change* (LF-SO/LF)
miR-15a-5p	TAGCAGCACATAATGGTTTGT	53,067	0.87
miR-17-5p	CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAGT	44,006	0.87
miR-20a-5p	TAAAGTGCTTATAGTGCAGGTAG	97,883	0.91
miR-33a-3p	CAATGTTTCCACAGTGCATCAC	91	0.51
miR-126-3p	CGTACCGTGAGTAATAATGCG	298,808	0.92
miR-142-5p	CATAAAGTAGAAAGCACTAC	5,079	0.73
miR-181a-5p	AACATTCAACGCTGTCGGTGAGTT	56,269	0.87
miR-223-3p	TGTCAGTTTGTCAAATACCCCA	783	0.81

666

667 **Fold change obtained by NGS. Cows received a low forage diet (LF) or the same diet supplemented with 4% of*
668 *sunflower oil (LF-SO). A fold change lower than 1 means that the corresponding miRNA is underexpressed in*
669 *LF-SO compared with LF cows.*

670

671

672

673

674

675

676

677

678 Table 2: Summary of sequencing data.

679

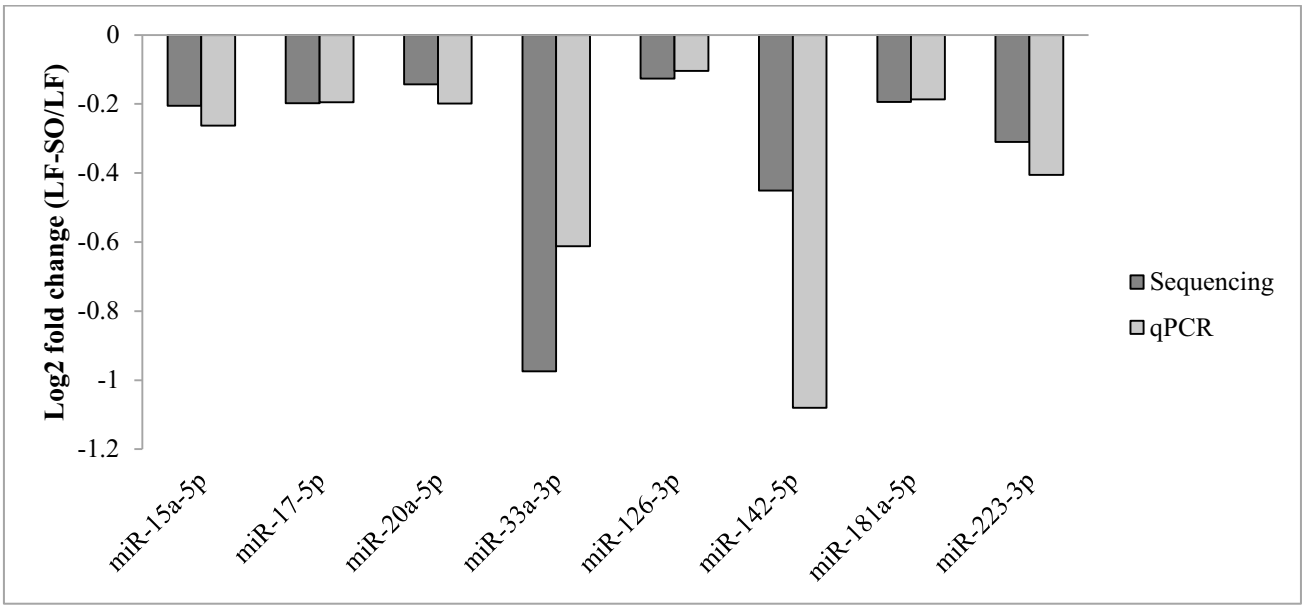
	LF		**LF-SO**	
	LF1	LF2	LF-SO1	LF-SO2
Raw reads	10,847,425	12,034,673	10,388,132	10,579,276
Clean reads[1]	9,951,849	11,245,052	9,810,954	8,140,532
% relative to raw data	*91.7%*	*93.4%*	*94.4%*	*76.9%*
Sized reads[2]	9,877,580	11,149,432	9,729,540	8,043,022
% relative to raw data	*91.1%*	*92.6%*	*93.7%*	*76%*
Mapped reads	9,549,490	10,802,108	9,456,179	7,700,615
% relative to sized reads	*96.7%*	*96.9%*	*97.2%*	*95.7%*
Unique sequence	97,136	111,437	85,543	87,971

[1]*Poly-A stretches and adaptors removed*
[2]*17-28 nt size filtering*

680

681 Figure 1: Comparison of sequencing and qPCR data. *Cows received a low forage diet (LF) or the*
682 *same diet supplemented with 4% of sunflower oil (LF-SO), n=2.*

683



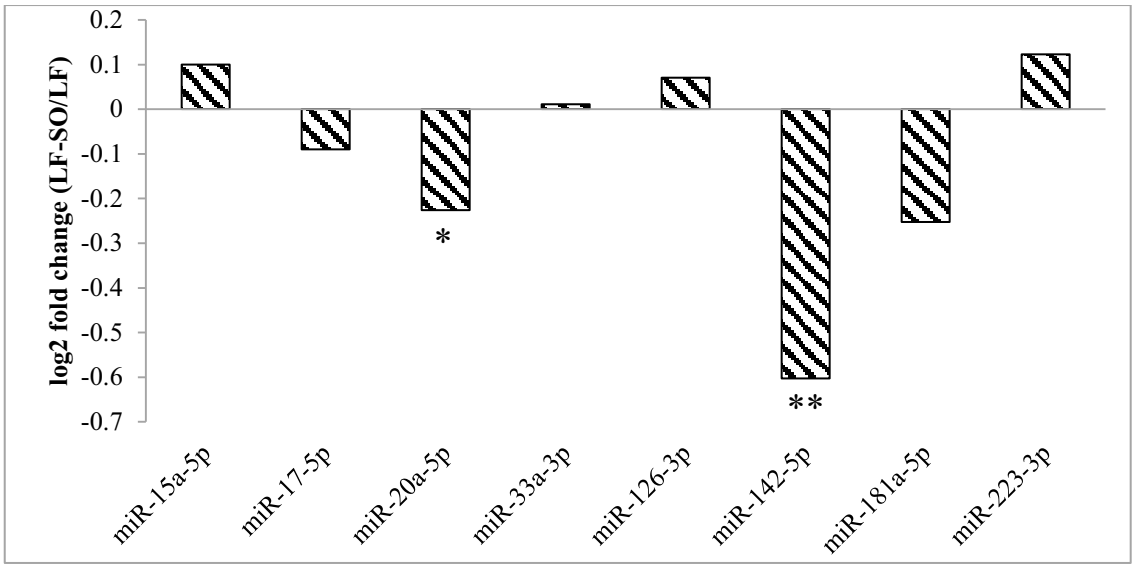
684

685

686 Figure 2: Analysis of the expression of eight miRNA in mammary gland of LF and LF-SO
687 cows by RT-qPCR. *Cows received a low forage diet (LF) or the same diet supplemented with 4% of*
688 *sunflower oil (LF-SO).* **0.01<p<0.05, *0.05<p<0.1, n=11.

689

690



691

692

693

694 Table 3: Targets of *miR-20a-5p* and *miR-142-5p* involve in the lipid metabolism.

695

miRNA	Gene symbol	Gene name
miR-20a-5p	**ABCA1**	**ATP-Binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1**
	APOBEC4	Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 4 (putative)
	APP	Amyloid beta (A4) precursor protein
	BTN1A1	Butyrophilin, subfamily 1, member 1
	ELOVL6	**ELOVL fatty acid elongase 6**
	LDLR	Low density lipoprotein receptor
	LPIN1	Lipin 1
	PPARA	Peroxisome proliferator-activated receptor alpha
	PPARG	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
	PPARGC1B	**Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 beta**
	SCD5	Steroyl-CoA desaturase
	VLDLR	Very low density lipoprotein receptor
miR-142-5p	**ABCA1**	**ATP-Binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1**
	ACADL	Acyl-CoA dehydrogenase, long chain
	ACAT1	Acetyl-CoA acetyltransferase 1
	ACSL1,6	Acyl-CoA synthetase long-chain family member 1,6
	ELOVL4, 5, 6	**ELOVL fatty acid elongase 4,5,6**
	LRP2, 4	Low density lipoprotein receptor related-protein 2, 4
	PPARGC1B	**Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 beta**

696

697 *miRNA's targets were predicted using Diana microT-CDS (http://diana.imis.athena-*
698 *innovation.gr/DianaTools/index.php?r=microT_CDS/).*
699 *In bold, targets predicted for both miRNA.*

700

701 Figure 3: Potential regulations of *miR-20a-5p* in milk fat metabolism. *ABCA1: ATP-Binding*
702 *Cassette subfamily A (ABC1) member1, BTN1A1: BuTyrophiliN subfamily 1, member A1, LPIN1: LiPIN1,*
703 *PPARγ: Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma, PPARGC1B: Peroxisome Proliferator-Activated*
704 *Receptor Gamma Coactivator 1 Beta, SCD: Steroyl-CoA Desaturase, VLDLR: Very Low Density Lipoprotein*
705 *Lipase Receptor.*

706

707

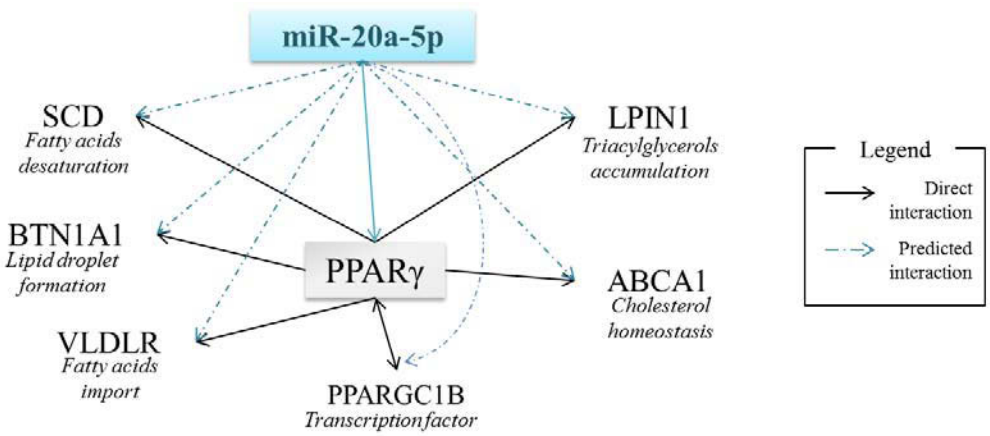
708

709

710

711

712



713 Table 4: Putative targets of *miR-20a-5p* and *miR-142-5p* among differently expressed genes
714 previously identified by microarrays.

715

miRNA	**Gene symbol**	**Gene name**	**Fold change**	**Functionnal category**
miR-20a-5p, miR-142-5p	ELK4	ETS-domain protein (SRF accessory protein 1)	1.13	Replication/Transcription/Translation
miR-20a-5p, miR-142-5p	ELOVL6	ELOVL fatty acid elongase 6	1.12	Cellular lipid metabolism & transport
miR-20a-5p, miR-142-5p	ETV1	ETS variant 1	1.25	Replication/Transcription/Translation
miR-20a-5p	KDM6B	Lysine (K)-specific demethylase 6B	1.19	Replication/Transcription/Translation
miR-20a-5p	KIAA1524	KIAA1524 ortholog	1.14	Cell cycle,cell growth, proliferation, differentiation & death
miR-20a-5p	LONP2	Lon peptidase 2n peroxisomal	1.17	Cellular protein metabolism & transport
miR-20a-5p	M6PR	Mannose-6-phophatase receptor (cation dependent)	1.09	Cellular carbohydrate metabolism & transport
miR-142-5p	PIK3CD	Phosphoinositide-3-kinase, catalytic, delta polypeptide	1.12	Immune, inflammatory and stress response
miR-20a-5p	USP12	Ubiquitin specific peptidase 12	1.11	Cellular protein metabolism & transport

716

717 *Differentially expressed genes were previously identified by microarrays (7).*

718

719 Figure 4: Predicted binding site of *miR-20a-5p* and *miR-142-5p* in the 3'UTR of *ELOVL6*.
720 *Binding sites were predicted with Diana microT-CDS (http://diana.imis.athena-*
721 *innovation.gr/DianaTools/index.php?r=microT_CDS/).*

722

723
724
725
726
727
728
729
730
731

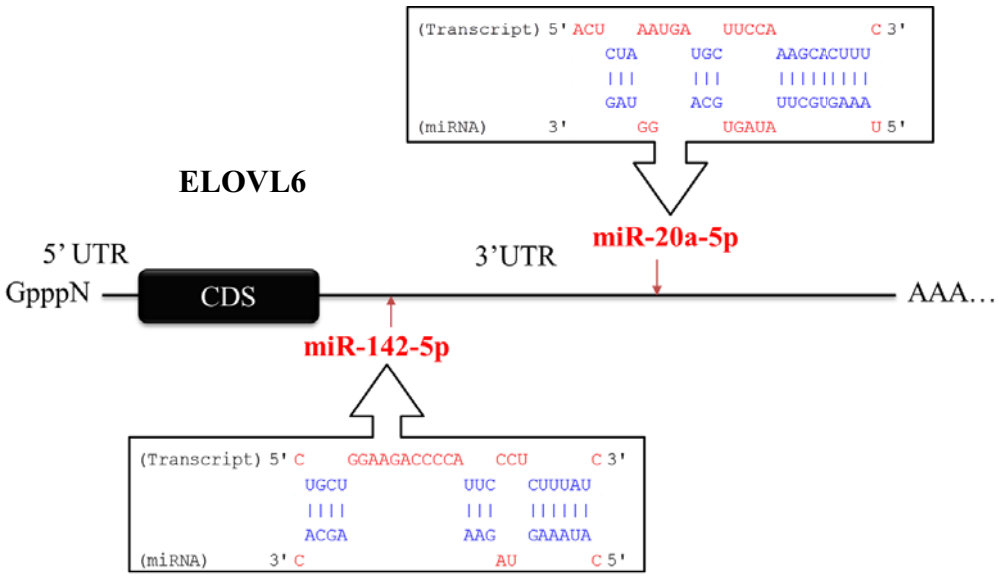
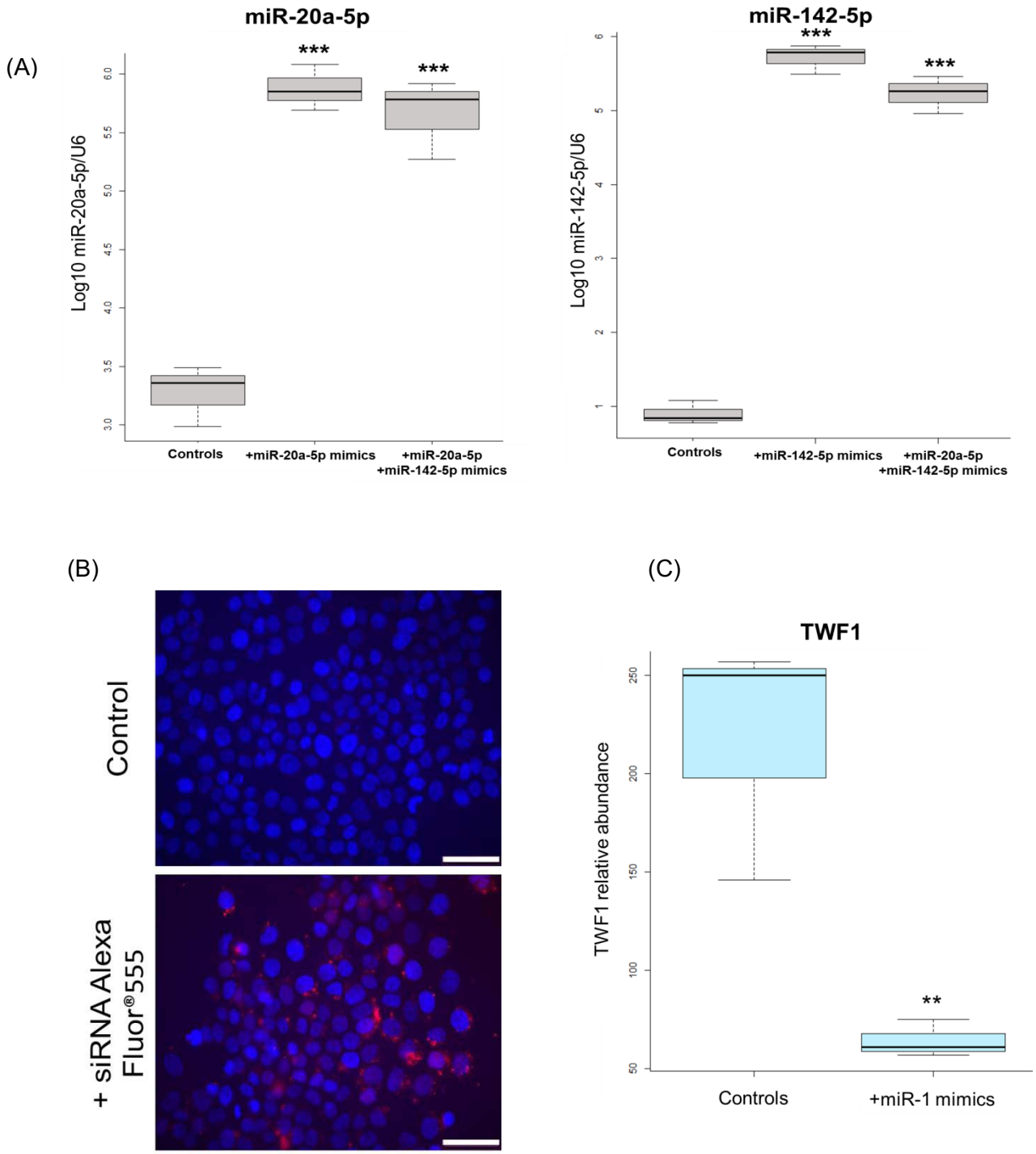


Figure 5: Transfection of *miR-20a-5p* and *miR-142-5p* in BME-UV1 cells. (A) Expression of *miR-20a-5p* and *miR-142-5p* in controls and transfected cells with miRNA mimics. *Data were obtained by RT-qPCR and normalized regarding U6 values. They are represented as* log_{10}. (B) Cell transfection with the siRNA Alexa Fluor ® 555. *The white bar corresponds to 100 µm.* (C) *TWF1* expression in controls and transfected cells with *miR-1* mimics. *Data were obtained by RT-qPCR, and normalized regarding GAPDH values.* ***:0.01> p, **: 0.01<p<0.05, n=3.



763 Figure 6: Expression of *ELOVL6* in controls and transfected cells. *Mimics were transfected*
764 *individually (+miR-20-a-5p mimics or +miR-142-5p mimics) or together (+miR-20a-5p+miR-142-5p mimics).*
765 *Data were obtained by RT-qPCR and normalized regarding GAPDH values.* *: 0.05<p<0.1, n=3.

766

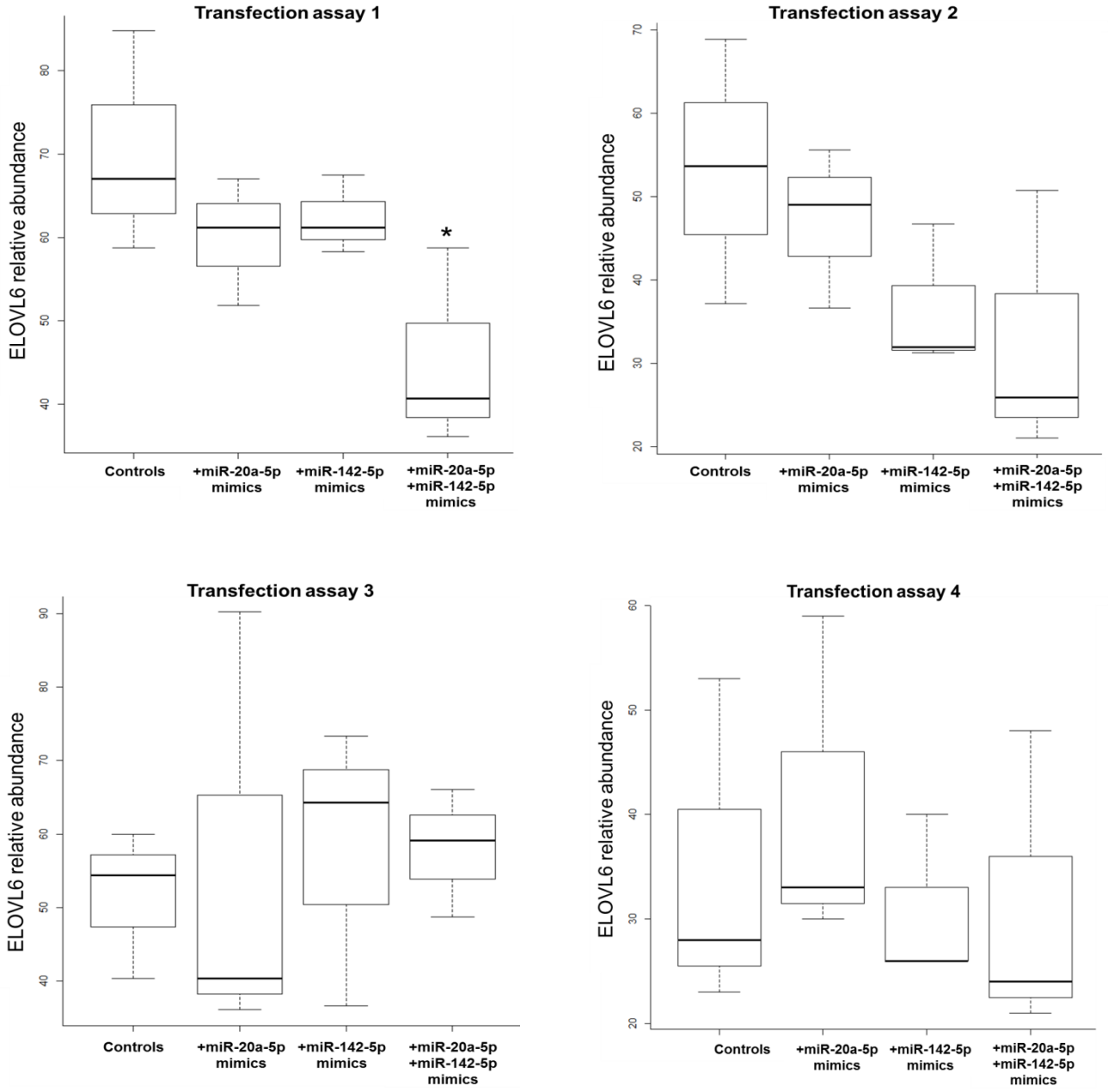
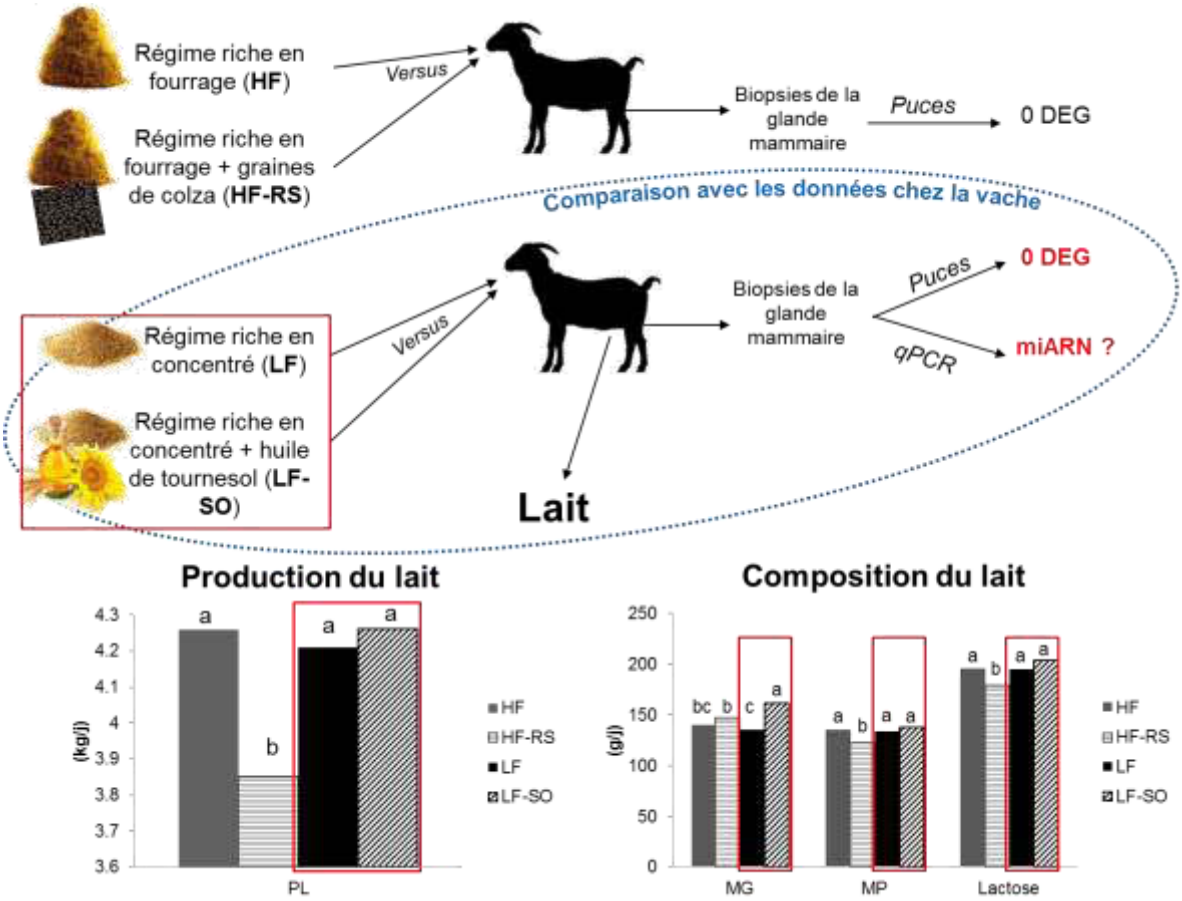


Figure 57 Effet du niveau du ratio fourrage/concentré et de l'addition de graines de colza entières ou d'huile de tournesol sur les paramètres zootechniques et l'expression des gènes dans la glande mammaire de chèvre en lactation. En rouge sont indiqués les régimes sélectionnés et leur effets sur la production, la composition du lait et l'expression des gènes dans la glande mammaire. HF: High Forage, HF-RS: High Forage with whole intact RapeSeeds, LF: Low Forage, LF-SO: Low Forage with Sunflower oil, MG: Matières Grasses, MP: Matières Protéiques, PL: Production du Lait. Les exposants ($^{a-c}$) correspondent à des moyennes significativement différentes des autres ($p < 0.05$). *D'après Ollier et al., 2009*.



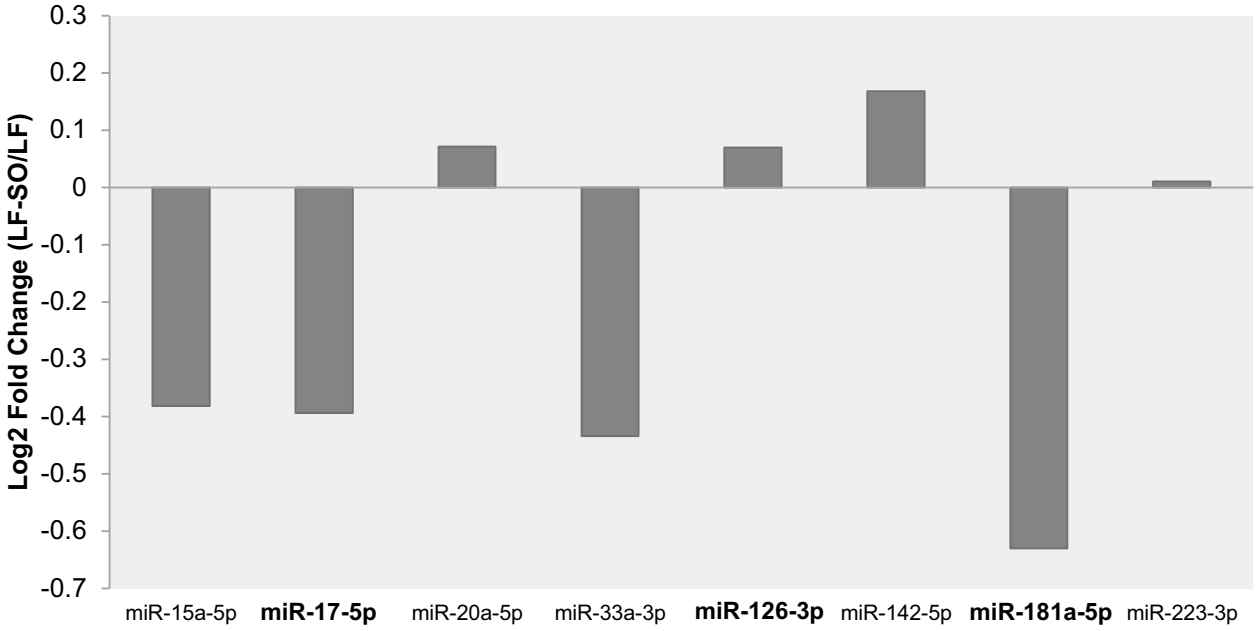
L'analyse exploratoire avait pour objectif d'identifier des miARN susceptibles d'être régulés par la supplémentation en huile de tournesol. Aussi les miRNomes issus des glandes mammaires des vaches supplémentées ou non ont été comparés. L'analyse des huit miARN sélectionnés après comparaison des miRNomes a confirmé l'expression différentielle de ces miARN par qPCR réalisés sur les échantillons de séquençage. L'analyse de l'expression des huit miARN par qPCR sur les 11 vaches (ensemble des animaux de l'expérimentation) a permis de souligner la sous-expression de deux miARN en réponse à la supplémentation: *miR-20a-5p* (p=0,08) et *miR-142-5p* (p=0,03). La variation d'expression de *miR-142-5p* est en accord avec la littérature puisqu'elle est aussi modifiée par différents régimes tels que des régimes riches en graisse dans d'autres tissus et d'autres espèces (Romao *et al.,* 2012, Meale *et al.,* 2014). L'analyse des cibles de ces deux miARN a révélé plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme des lipides tels que *PPARγ*, un régulateur central de la synthèse de la matière grasse laitière. Parmi les cibles prédites de *miR-20a-5p* et *miR-142-5p*, neuf DEG ont été identifiés. En particulier *ELOVL6,* gène codant pour une enzyme de la famille des élongases des AG, est une cible prédite de *miR-20a-5p* et *miR-142-5p*. Néanmoins la surexpression de ces deux miARN dans des cellules épithéliales mammaires en culture n'a pas engendré de diminution de l'expression d'*ELOVL6*.

II.2.2) CHEZ LA CHEVRE EN LACTATION

De façon similaire, l'effet de la supplémentation en huile tournesol a été évalué chez la chèvre en lactation (Ollier *et al.,* 2009). Ainsi, huit chèvres Alpine, au pic de lactation, ont reçu pendant 21 jours un régime à base de foin de Luzerne et un mélange de concentré selon le ratio fourrage-concentré 40:60 (régime **LF**) ou le régime LF supplémenté avec 130 g/j d'huile de tournesol substituée avec des graines de maïs (régime **LF-SO**) (Figure 57). La supplémentation a entrainé une augmentation des matières grasses et une diminution de la lipolyse dans le lait des chèvres supplémentées. De plus, l'ajout d'huile de tournesol aux rations a induit une modification de la concentration de presque tous les acides gras mesurés dans le lait des chèvres supplémentées. En revanche, l'analyse transcriptomique n'a pas permis de mettre en évidence de changement dans l'expression des gènes de la glande mammaire entre les chèvres témoins et supplémentées (Ollier *et al.,* 2009).

Ainsi, nous avons voulu tirer avantage des informations d'expression des miARN chez les vaches alimentées avec des régimes similaires pour identifier les miARN ayant une réponse commune à ce régime chez les caprins et les bovins. Par conséquent, l'expression des

Figure 58 Effet de la supplémentation en huile de tournesol sur l'expression des miARN mammaires chez des chèvres en lactation. n=4, LF: Régime riche en concentré, LF-SO: Régime riche en concentré supplémenté en huile de tournesol. Les miARN dont le sens de variation est identique chez la vache sont indiqués en gras.



huit miARN sélectionnés chez le modèle bovin a été quantifiée selon la même procédure (RT-qPCR) sur les échantillons de chèvres supplémentées ou non en huile de tournesol. Les résultats d'expression sont présentés sur la Figure 58.

Quatre des huit miARN sont sous exprimés chez les chèvres supplémentées (*miR-15a-5p, miR-17-5p, miR-33a-3p* et *miR-181a-5p*), trois sont surexprimés (*miR-20a-5p, miR-142-5p* et *miR-126-3p*) et *miR-223-3p* montre une expression équivalente entre les chèvres contrôles et supplémentées. La régulation de l'expression de trois miARN (*miR-17-5p, miR-126-3p* et *miR-181a-5p*) est identique à celle observée chez le bovin alors que l'expression des cinq autres miARN est différente entre les deux espèces, suggérant une réponse différente de ces miARN entre les deux espèces. Néanmoins, aucun miARN n'a été significativement affecté par la supplémentation lipidique. Ces résultats sont cohérents avec l'analyse de l'expression des gènes réalisée par puces, qui ne montrait pas de différence significative d'expression des ARNm suite à la supplémentation en huile de tournesol. La supplémentation lipidique mise en place n'a donc pas eu d'effet sur les gènes de la glande mammaire ni sur les miARN sélectionnés. Il existe une variabilité de réponse, entre les bovins et les caprins, à la supplémentation lipidique puisque 49 DEG et deux miARN sont différentiellement exprimés dans la glande mammaire des vaches supplémentées en huile de tournesol. Cette observation est en accord avec les données antérieures de comparaison des effets de supplémentations lipidiques montrant des différences de réponse entre les vaches et les chèvres. Cette différence de réponse entre les deux espèces de ruminants a d'ailleurs déjà été mise en évidence d'un point de vue de la composition du lait (Chilliard et Ferlay, 2004).

Pour conclure, ces travaux ont permis l'identification de 30 miARN régulés par une privation alimentaire chez la chèvre en lactation et deux miARN dont l'expression est modifiée par une supplémentation lipidique chez la vache en lactation. L'analyse des cibles de ces miARN suggère que ces miARN pourraient expliquer la régulation de certains DEG. Cette analyse a aussi indiqué que ces miARN pourraient avoir un rôle dans la régulation de la synthèse et de la sécrétion des constituants du lait. L'étude d'autres conditions nutritionnelles permettra de conforter ces résultats et de mettre en évidence de nouveaux miARN candidats.

Enfin, une étude fonctionnelle de trois miARN nutrirégulés dans ces modèles a été réalisée dans le but de mieux caractériser leur fonction dans la glande mammaire.

III. ROLE FONCTIONNEL DES MIARN NUTRIREGULES SUR LA LACTATION

Comme vu dans l'introduction, la fonction dans la glande mammaire de certains miARN comme *miR-30b* (Le Guillou *et al.,* 2012) commence à être élucidée. Cependant, l'impact des miARN sur la biologie de la glande mammaire est toujours peu connu. Les miARN nutrirégulés offrent de nouvelles pistes pour la compréhension de la régulation des gènes en réponse à la nutrition dans la glande mammaire. Ces miARN pourraient avoir un rôle dans la physiologie de la glande mammaire à travers la régulation de gènes connus pour être impliqués dans cette fonction. Ainsi parmi les 30 miARN régulés par la privation alimentaire chez la chèvre, trois miARN ont été sélectionnés pour une étude de leur fonction *in vitro* dans des cellules épithéliales mammaires (CEM) bovines. Ces trois miARN ont été sélectionnés selon plusieurs critères ; leur rang d'expression, leurs cibles déterminées par bio-informatique et la littérature existant autour de ces miARN. Ainsi, *miR-99a-5p, miR-140-3p* et *miR-222-3p* ont été choisis. Parmi ces trois miARN, *miR-140-3p* et *miR-99a-5p* présentaient de nombreuses cibles impliquées dans la prolifération et la mort cellulaire. D'après les quelques données de littérature, *miR-222-3p* a été impliqué dans le métabolisme des lipides, principalement dans le tissu adipeux (Parra *et al.,* 2010) et *miR-99a-5p* est prédit pour cibler des gènes impliqués dans la synthèse des lipides du lait, comme *SCD*. Seule une étude sur *miR-99a-5p* dans le tissu mammaire a été répertoriée dans la littérature (Turcatel *et al.,* 2012). En effet, *miR-99a-5p* serait impliqué dans un réseau complexe de régulation du facteur TGF-β, un régulateur de la transition épithélium-mésenchyme, dans des cellules normales de glande mammaire de souris (Turcatel *et al.,* 2012). Aussi, l'implication de *miR-140-3p* et *miR-99a-5p* a été étudiée dans la prolifération cellulaire et celle de *miR-222-3p* et *miR-99a-5p* dans le métabolisme des lipides.

La première étape pour l'analyse fonctionnelle des miARN a été le choix d'un modèle cellulaire. Il existe différents types de modèles *in vitro* mammaires parmi lesquels les lignées de cellules, les cultures primaires ou encore les explants de tissus. Ces deux derniers modèles conservent leurs caractéristiques physiologiques et les mécanismes de synthèse des constituants du lait d'un épithélium mammaire, mais leur durée *in vitro* est limitée dans le temps (Matitashvili *et al.,* 1997). Bien que la plupart des lignées de cellules épithéliales

mammaires ne possèdent pas la capacité de sécrétion, ces cellules peuvent perdurer sur plusieurs passages en culture. Dans l'objectif de rester au plus proche des modèles utilisés pour l'étude de la régulation nutritionnelle des miARN, une lignée de CEM bovines a été choisie. Les deux lignées bovines les plus couramment utilisées sont les MAC-T (Huynh *et al.,* 1991) et les BME-UV1 (Zavizion *et al.,* 1996). Cependant, les MAC-T sont instables d'un point de vue phénotypique et pourraient être composées de différents types cellulaires (Zavizion *et al.,* 1996). Les BME-UV1, quant à elles, ont principalement été utilisées pour étudier l'influence des facteurs de croissance sur la prolifération et la mort (Sobolewska *et al.,* 2009) et le métabolisme cellulaire (Liu *et al.,* 2006, MacFadden *et al.,* 2010). Ce modèle nous a donc paru adapté à l'objectif de l'étude fonctionnelle des miARN dans la prolifération cellulaire et le métabolisme des lipides que nous souhaitons réaliser.

Par ailleurs, pour déchiffrer la fonction des miARN, des approches *in vitro* ont été mises au point. En particulier, l'utilisation de duplex synthétiques d'ARN, appelés miARN mimics, permet d'augmenter le niveau d'un miARN en amplifiant son activité endogène. Cet outil offre l'opportunité de déréguler l'expression d'un miARN afin d'exacerber sa fonction cellulaire, et d'identifier plus facilement les voies biologiques impactées. Les mimics ont été développés pour être transfectés dans différents types de cellules dont les cultures de cellules mammifères.

Dans ce contexte, les objectifs de cette étude étaient de déterminer le rôle de *miR-140-3p* et *miR-99a-5p* dans la prolifération des CEM ainsi que d'identifier le rôle de *miR-222-3p* et *miR-99a-5p* dans le métabolisme des lipides dans ces mêmes cellules. Ainsi, ces miARN ont été surexprimés individuellement via l'utilisation de mimics dans la lignée de CEM bovines, BME-UV1. Ces travaux sont préliminaires mais ont été rédigés sous forme de l'**Article 5**.

Investigations of miRNA functions in the proliferation and lipid metabolism of bovine mammary epithelial cells

Introduction

The ability of ruminant mammary gland to produce milk is determined by the number of cells secreting milk and their level of activity (Boutinaud *et al.,* 2004). The mammary gland undergoes cyclic remodeling based on successive growth and involution of secretory tissues and apoptosis of mammary epithelial cells (MEC). A decline in MEC number during lactation must at least partially account for a decline in milk yield after the peak of lactation (Capuco *et al.,* 1997, Capuco and Ellis, 2005). Consequently the number of MEC, cells responsible for the synthesis of milk constituents (Fat, Proteins and Lactose), directly impacts the production of milk. Fat is one major constituents of milk representing about 37 g/L of milk components in cow (Clegg *et al.,* 2001). Milk fatty acids come from 2 different origins. The long-chain fatty acids come from triacylglycerols or non-esterified fatty acids present in plasma whereas the short- and medium chain fatty acids are synthesized *de novo* in the MEC. Milk fat synthesis and secretion are under the strict control of many lipogenic enzymes, some of them are specific of the *de novo* synthesis as the fatty acids synthase (*FASN*) or for the transport as the fatty acids binding protein (*FABP3*). Others share these different pathways as the stearoyl-CoA desaturase (*SCD1*) involved in fatty acids desaturation. Both pathways are under the control of transcriptional factors as the sterol responsive element protein 1 (*SREBP1)* (Bernard *et al.,* 2008).

Among *in vitro* MEC lines, BME-UV1 cells have been established from the mammary gland of a pregnant and lactating Holstein cow (Zavizion *et al.,* 1996). They have been mainly used to study the effect of growth factors (e.g. IGF1, EGF) on cell proliferation and apoptosis (Sobolewska *et al.,* 2009, Kozlowski *et al.,* 2011). BME-UV1 cells have also served to

identify the impacts of LXRα activation on its targets involved in lipid metabolism as *FASN* (MacFadden *et al.,* 2010). Those examples suggest that BME-UV1 could be a good model to study cell proliferation and metabolism.

Otherwise, microRNAs (miRNA) are 18-25 nucleotides single strand RNA that mediate post-transcriptional gene silencing by guiding Argonautes proteins to RNA targets (Hausser and Zavolan, 2014). By mainly repressing the expression of their mRNA targets, miRNA have been involved in most of the biological processes (Bartel *et al.,* 2004). In the mammary gland, although the role of miRNA need to be deciphered, some of them have been shown to impact cell proliferation. For instance, *miR-126* inhibits the proliferation of murine MEC and the expression of the β-casein gene, one of the major milk proteins, suggesting a role of this miRNA in the mammary gland physiology and functioning (Cui *et al.,* 2011). In addition, *miR-27a* and *miR-103* deregulation in goat MEC led to a modification in fat droplets formation, triglycerides accumulation and changed the expression of genes involved in milk lipid synthesis (Lin *et al.,* 2013, Lin *et al.,* 2013). The expression of miRNA in the mammary gland has been shown to be altered by different factors including nutrition. Thus a food deprivation in lactating goat mammary gland deregulated the expression of 30 miRNA (Mobuchon *et al.,* 2015), as *miR-99a-5p, miR-140-3p* and *miR-222-3p*. These three miRNA exhibited interesting predicted targets directly linked with the cell proliferation and lipid metabolism perturbations observed in the mammary gland of goat food-deprived (Ollier *et al.,* 2007). However, the function of *miR-99a-5p, miR-140-3p* and *miR-222-3p* remains to be deciphered.

The purpose of our work was to determine the effects of *miR-140-3p, miR-99a-5p* or *miR-222-3p* overexpression on the proliferation and/or lipid metabolism in bovine mammary epithelial cell line BME-UV1. Those miRNA may provide clues to understand the regulations of MEC proliferation and lipid metabolism which affect milk production.

Materials and methods

Media and reagents

RPMI-1640, NCTC-35, α-lactose monohydrate, lactalbumin enzymatic hydrolase, glutathione, L-ascorbic acid, bovine insulin, bovine holo-transferin, hydrocortisone and progesterone were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). DMEM/F-12, Fetal Bovine Serum (FBS), fungizone and antibody mouse anti-human conjugated Ki-67-FITC (cat. number 334711) were purchased from Life Technologies (Carlsbad, CA, USA). Glutamine was purchased from Eurobio (Courtaboeuf, France).

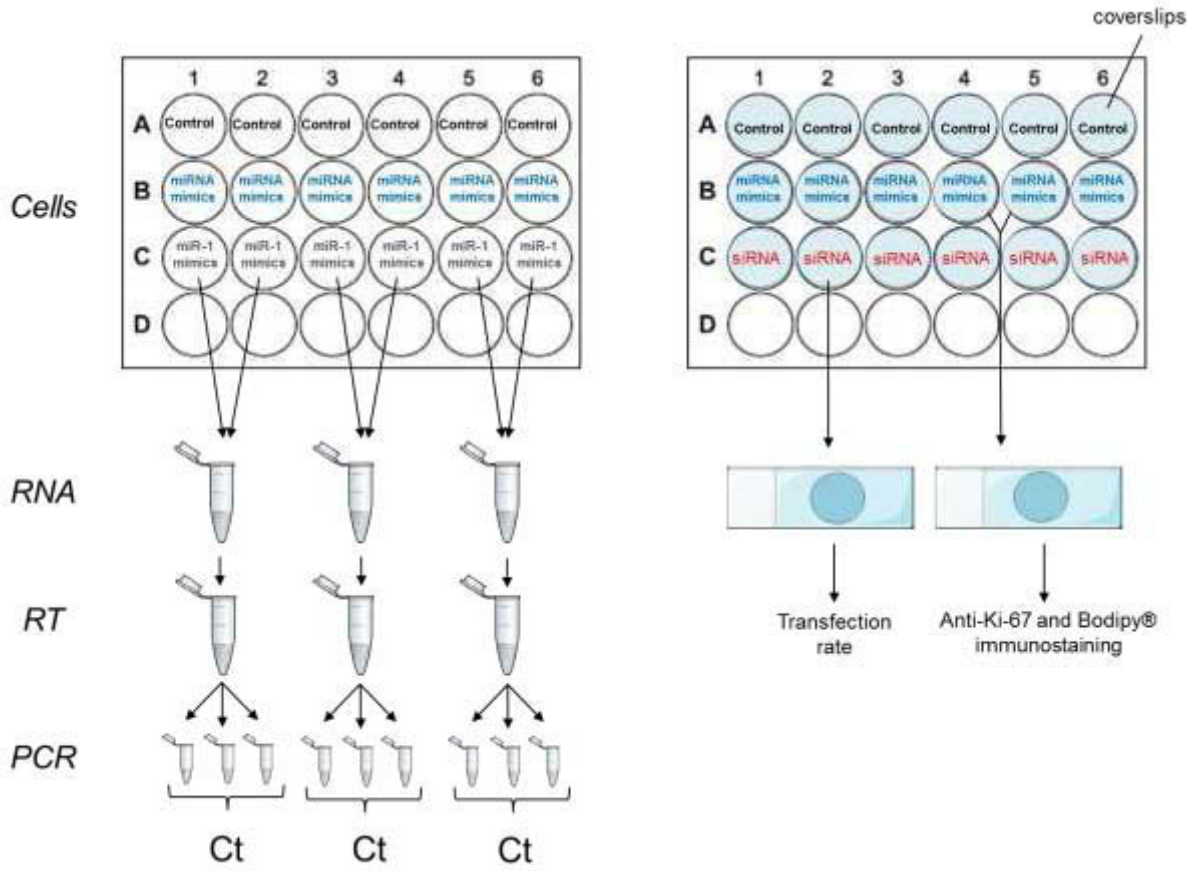
Cell culture

During routine culture cells were grown in monolayer on plastic culture flasks and in growth medium comprising DMEM/F-12, RPMI-1640 and NTC-135 in proportions 5:3:2 by vol. and enriched with α-lactose (2.77 nM), lactalbumin enzymatic hydrolase (0.1%), glutathione (1.2 mM), bovine insulin (1 µg/mL), bovine holo-transferrin (5 µg/mL), hydrocortisone (5 µg/mL), L-ascorbic acid (10 µg/mL), progesteron (0.5 µg/mL), heat-inactivated FBS, penicillin-streptomycin (50 UI/mL), fungizone (2.5 µg/mL) and glutamine (10 X). Cells were grown at 37°C, 5% CO_2 and medium was changed every 48h.

Cells transfection

For transfection, confluent cells grown in monolayer (passages 13) were trypsinized with Trypsin-0.25% EDTA and plated in 24 well at a concentration of 50,000 cells per well. On the following day, 10 pmol of *miR-99a-5p* mimics (mirVana™ mimics *bta-miR-99a-5p*, assay ID MC11624), *miR-140-3p* mimics (*bta-miR-140*, assay ID MC10064) or *miR-222-3p* mimics (*bta-miR-222-3p*, assay ID MC11376) and Lipofectamine® RNAiMAX Reagent were diluted with DMEM (Life Technologies). Diluted miRNA mimics and Lipofectamine® RNAiMAX mix were diluted at 1:1 ratio and incubated 5 min at room temperature to create miRNA-lipid

Figure 59 Experimental design of transfection assays. Ct: Cycle threshold, PCR: Polymerase Chain Reaction, RT: Reverse Transcription.



complex. Cells were transfected for 48h, in triplicate. To estimate rate of transfection, the BLOCK-iT™ Alexa Fluor® Red fluorescent Control (Life Technologies, cat. number 14750-100) was used on the same plate. The *mir*Vana™ miRNA Mimic *miR-1* (Ambion, cat. number 4464062) was used as positive control and its target *TWF1* was quantified to determine whether the mimics is active in the cell. Controls cells correspond to cell received DMEM instead of mimics and Lipofectamine® RNAiMAX in the same concentration as transfected cells. Experiments were repeated two or three times.

RNA isolation and RT-qPCR

After 48h of transfection, cells were rinsed once with PBS (Life Technologies). Total RNA were isolated from cells using the RNA Now kit (Ozyme, cat. number BX101) according to the manufacturer's instructions with an overnight precipitation so as to guarantee a maximum yield of miRNA (Figure 59).

For miRNA assay, reverse transcription (RT) and quantitative PCR (qPCR) steps were performed according to the manufacturer's protocol. *MiR-99a-5p*, *miR-140-3p* and *miR-222-3p* were quantified using RT-qPCR with TaqMan MicroRNA Assay (Life Technologies, cat. number 4427975, assay ID 006254_mat, 001188 and 002276, respectively). Briefly 10 ng of total RNA from cells were reverse transcribed under the conditions: 16°C for 30 min, 42°C for 30 min, and 85°C for 5 min. PCR reactions were as follows: 95°C for 10 min, 40 cycles of 95°C for 15s and 60°C for 1 min using the Mastercycler ep Realplex (Eppendorf). Data were normalized with the small RNA *RNU6B* (Life Technologies, cat. number 4427975, assay ID 001973), using the delta-delta Ct method ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) (Livak *et al.,* 2001).

For gene assay, RT was performed on 500 ng of total RNA with the SuperScript® VILO cDNA Synthesis kit according to the manufacturer's instructions (Invitrogen) and under the following conditions: 42°C for 60 min and 85°C for 5 min. qPCR were achieved using ABsolute Blue QPCR Mix, SYBR Green® (Thermo Scientific™) according to the

manufacturer's instructions on a Mastercycler ep Realplex (Eppendorf), under the following conditions: 95°C for 15 min, 45 cycles of 95°C for 15 sec and 60°C for 1 min, and a melting curve. Expression of TWF1 (F-GGCATCCAAGCAAGTGAAGA and R-GCTTCCTACACGACCCAATCA) were normalized with the values of the housekeeping gene PPIA (cyclophilin A, F-GGTGACTTCACACGCCATAATGGTA and R-GGACAAGATGCCAGGACCTGTATG). The expression of *FABP3* (F-CCTCTCCTTCCACTGACTGC and R-TTGACCTCAGAGCACCCTTT*),* *FASN* (F-ACCTCGTGAAGGCTGTGACTCA and R-TGAGTCGAGGCCAAGGTCTGAA*),* *SCD1* (F-TGCTGACAACTTATCTGGATGC and R-AAGGAATCCTGCAAACAGCTA, TaqMan® probe-CCAGAGCCTGCAGAAGTGGCTGGTATAA) and *SREBF1* (F-CCAGCTGACAGCTCCATTGA and R-TGCGCGCCACAAGGA) were normalized with the values of EIF3K (Eukaryotic translation Initiation Factor 3, subunit K, F-CCAGGCCCACCAAGAAGAA and R-TTATACCTTCCAGGAGGTCCAGT), RPLPO (Ribosomal Large P0, F-CAACCCTGAAGTGCTTGACAT and R-AGGCAGATGGATCAGCCA) and UXT2 (Ubiquitously Expressed Transcript 2, F-TGT GGCCCTTGGATATGGTT and R-GGTTGTCGCTGAGCTCTGTG), and represented as relative abudance.

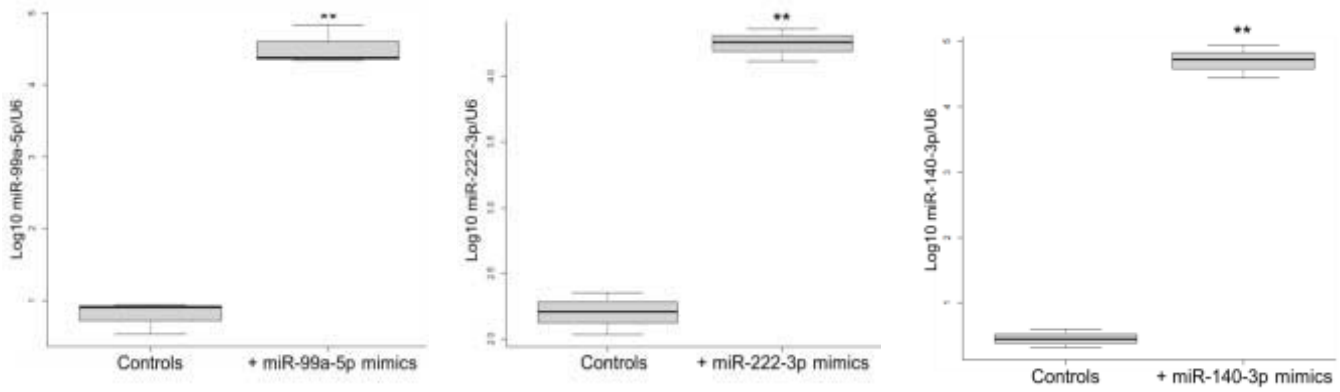
Immunostaining

For immunostaining, cells were cultured on glass coverslips and transfections were performed in the same time and way as cells cultured for RNA isolation (Figure 59). Following 48h of transfection, cells were rinsed with DPBS and fixed with 3% formaldehyde (freshly prepared in PBS from a 32% stock solution, EMS Hatfield, USA). Cells were then permeabilized by 15 min of treatment with PBS-0.05% Saponine and washed three times with PBS.

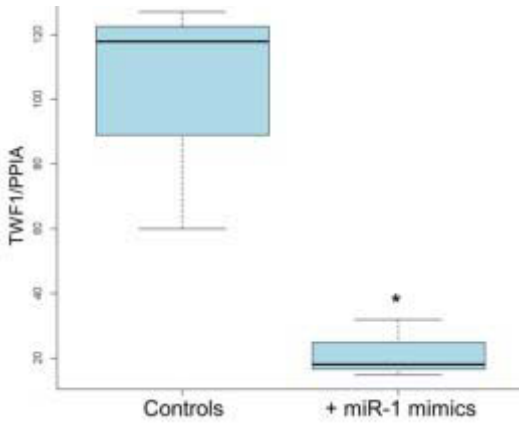
For proliferation measurement, cells were incubated for 60 min at room temperature with an anti-Ki-67-FITC conjugated antibody (MIB-1, cat. number 33-4711, Novex™) diluted

Figure 60 Transfection assays and controls. (A) *MiR-99a-5p, miR-140-3p* and *miR-222-3p* expression in controls and transfected cells with corresponding miRNA mimics. *Data were obtained by RT-qPCR and normalized regarding U6 values. They are represented as* log_{10}. (B) *TWF1* expression in controls and transfected cells with *miR-1* mimics. *Data were obtained by RT-qPCR and normalized regarding PPIA values. They are represented as relative abundance of TWF1. N=3, **:p<0.01, *:0.01<p<0.05. (*C) Cell transfection with the siRNA Alexa Fluor® 555. *The white bar corresponds to 100 µm.*

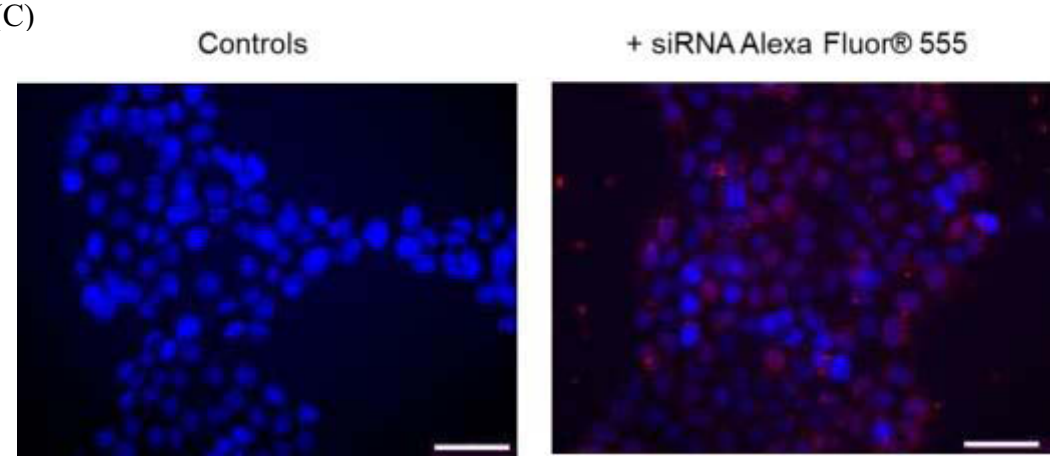
(A)



(B)



(C)



1:500 in PBS. For lipid metabolic studies, Bodipy 493/503 (Molecular probes) was dissolved in ethanol at 1 mg/mL and diluted 1:300 in PBS. Cells were incubated with diluted Bodipy for 20 min. For both studies, following staining cells were rinsed three times with PBS and coverslips were mounted on glass slides using VectaShield (Vector, USA) containing DAPI. Images were acquired thanks to a Leica confocal microscope. Cells from three pictures of three different coverslips were counted.

Statistical Evaluation

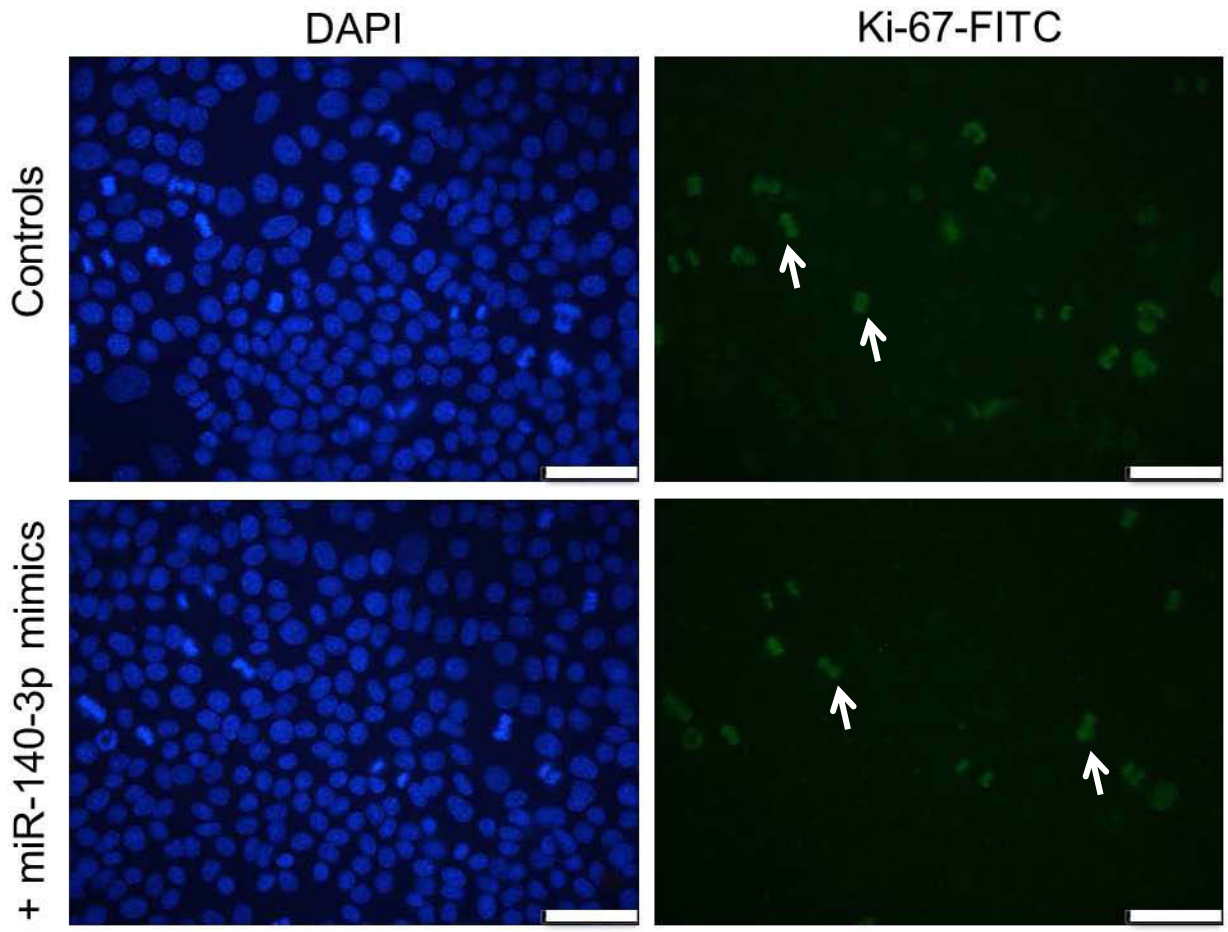
All data were treated with a Mann-Whitney test using R software (version 3.2.0), and significance was declared at $p \leq 0.05$.

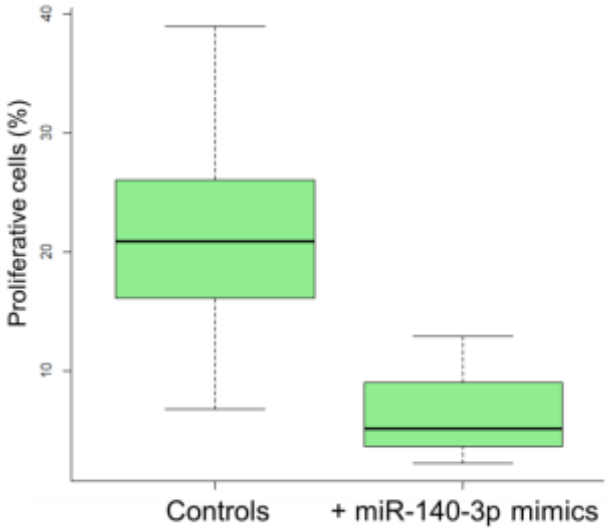
Results and discussion

MiRNA mimics transfection and controls

Currently miRNA functions can be increased either by viral overexpression or by using synthetic double-stranded miRNA that harbors chemical modifications to improve stability and cellular uptake, so called miRNA mimics technology (van Rooij and Kauppinen, 2014). The latter has been used in different cells lines to amplify endogenous functions of a miRNA and has shown efficiency in repressing target gene transcription (Barnes *et al.,* 2012, Zhang *et al.,* 2013 Montgomery *et al.,* 2014). Consequently miRNA mimics technology has been used in bovine mammary epithelial cell line, BME-UV1, to investigate the role of *miR-99a-5p, miR-140-3p* and *miR-222-3p* on cell proliferation and metabolism. MiRNA mimics were individually and independently transfected in cells. Quantification of their expression shown a very high and significant increase of miRNA expression in transfected cells compared with controls cells (Figure 60A). To inquire if miRNA mimics could be functional in cells, *miR-1*, a highly conserved miRNA from yeast to mammals has been transfected as well. This miRNA

Figure 61 Effect of *miR-140-3p* overexpression on the proliferation of BME-UV1. Immunostaining of controls and transfected BME-UV1 cells with *miR-140-3p* mimics with an anti-Ki-67-FITC antibody. Arrows indicate mitotic spindles. *The white bar corresponds to 100 µm.*



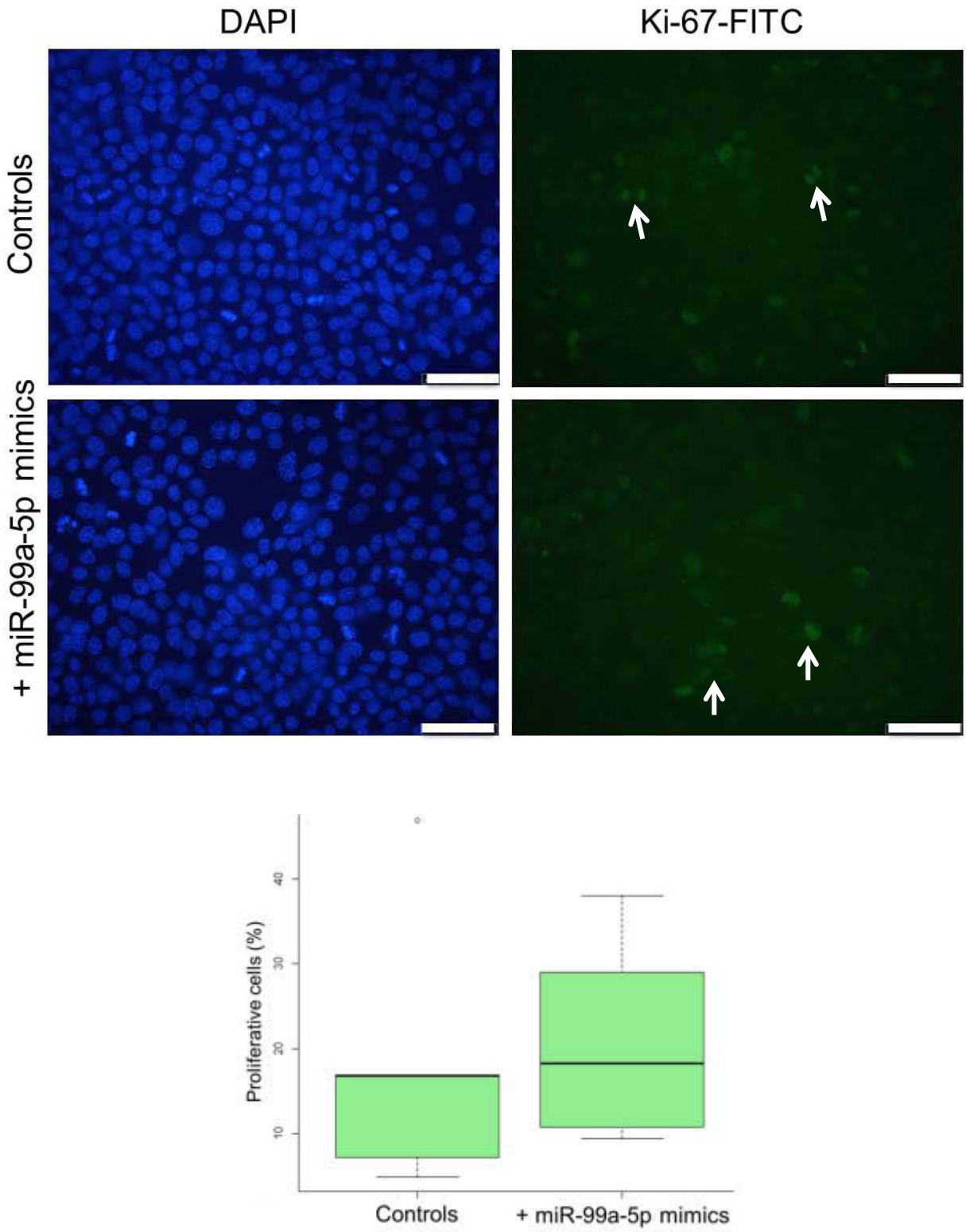


represses the expression of *TWF1*, an actin binding protein, at the post-transcriptional levels in numerous cells lines (Fischer *et al.,* 2013). BME-UV1 cells transfected with *miR-1* mimics exhibited a significant decrease of *TWF1* expression (Figure 60B); suggesting *miR-1* may have joined the RISC complex to act on its targets in cell. Finally, to estimate the transfection rate, a fluorescent siRNA was transfected and cells demonstrating red fluorescence were counted as transfected. Transfection rate for all transfection challenges was estimated to be comprised between 50 to 60% (Figure 60C).

Impact of miRNA on cell proliferation

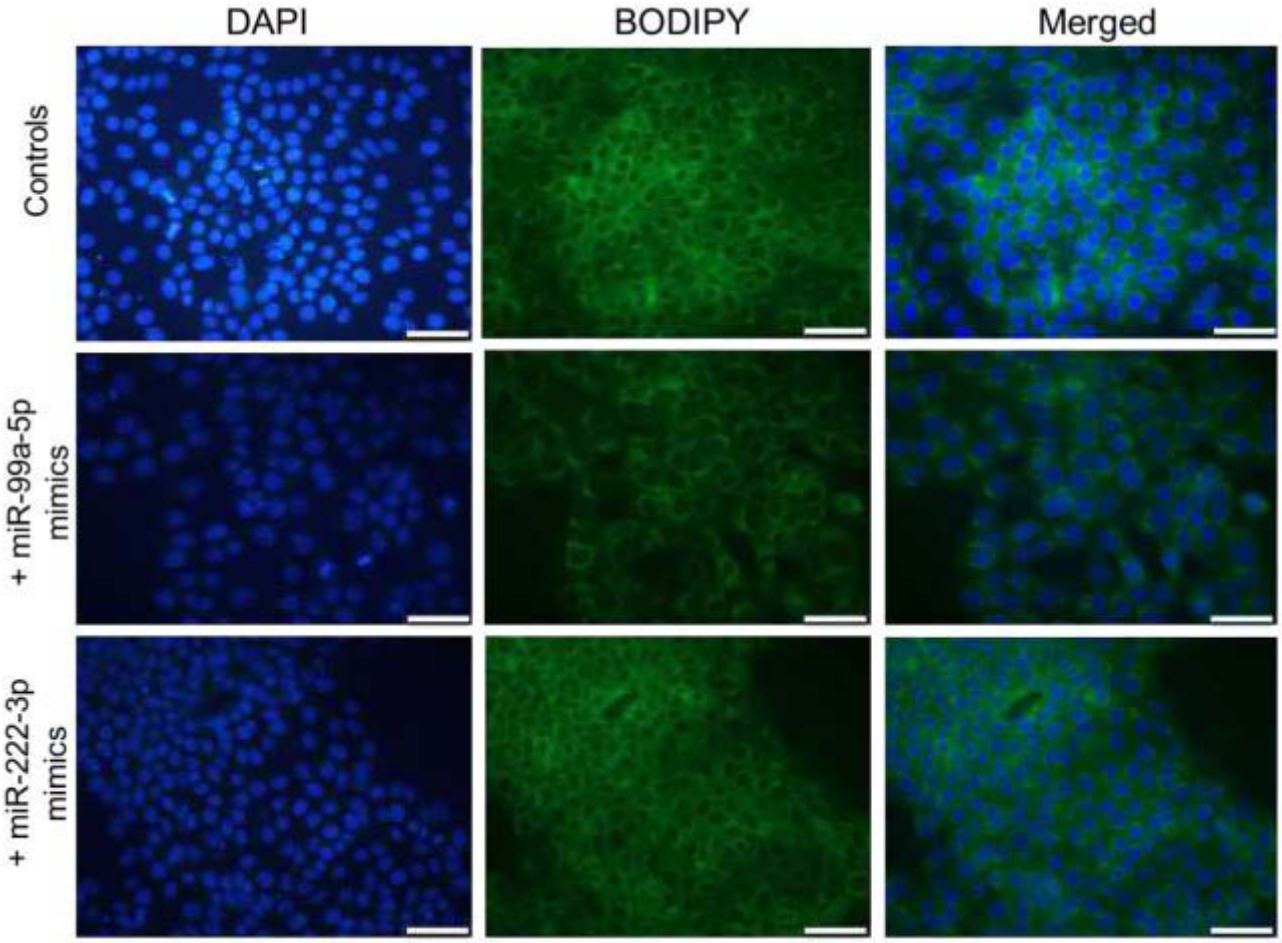
Among miRNA overexpressed in BME-UV1, *miR-99a-5p* and *miR-140-3p* were previously found increased in the mammary gland of food deprived goats (Mobuchon *et al.,* 2015) in which involution were hypothesized regarding mammary gene expression (Ollier *et al.,* 2007). In addition, *miR-140-3p* is an intragenic miRNA localized in the intron 16 of gene coding for *WWP2* (WW domain containing E3 ubiquitin Protein ligase 2) in several species including bovine. MiRNA and host genes are co-expressed (Rodriguez *et al.,* 2004). *MiR-140-3p* gene contains *ESR1* response elements in its promoter, and *ESR1* negatively regulate its expression (Zhang *et al.,* 2012). *ESR1* is especially known to control the genetic program of mammary cell as well as their growth (Feng, 2007). In addition, among predicted targets of *miR-140-3p* anti-apoptotic factors such as *BCL2* (B-cell CLL/Lymphoma 2) or majors cell cycle regulators as *CDK4/6* (Cyclin-Dependant Kinase 4/6) are found. Otherwise, *miR-99a-5p* is an intergenic miRNA clustered with *let-7c* gene. By targeting *mTOR* (mechanistic target Of Rapamycin) and *FGFR3* (Fibroblast Growth Factor Receptor 3), *miR-99a-5p* has been shown to inhibit the proliferation of numerous cancers cell lines (Oneyama *et al.,* 2011, Sun *et al.,* 2011, Cui *et al.,* 2012, Yen *et al.,* 2014). Its interaction with the mTOR/p-4E-BP1/p-S6K1 pathway enables *miR-99a-5p* to fulfill an anti-tumor function in breast cancer cell lines (Hu *et al.,* 2014). Finally, *miR-99a-5p* could modulate the TGF-β pathway via a complex network

Figure 62 Effect of *miR-99a-5p* overexpression on the proliferation of BME-UV1. Immunostaining of controls and transfected cells with *miR-99a-5p* mimics with an anti-Ki-67-FITC antibody. Arrows indicate mitotic spindles. *The white bar corresponds to 100 µm.*



and participate in the regulation of epithelium-to-mesenchyme transition of normal mouse mammary cells (Turcatel *et al.,* 2012). In addition, *IGF1R* (Insulin Growth Factor Receptor 1) is one of those predicted targets, suggesting *miR-99a-5p* could have important role in regulating cell proliferation. Consequently, through the predicted targets and the function of *miR-140-3p* and *miR-99a-5p* previously reported in other species both miRNA could act on mammary cells growth. In order to study the effect of *miR-99a-5p* and *miR-140-3p* on cell proliferation, controls and transfected cells with miRNA mimics were stained with the anti-Ki-67-FITC (Figure 61). The presence of Ki-67 antigen is only detectable in cell nucleus at G1, S or G2 steps of the cell cycle as well as at mitosis phase (Scholzen and Gerdes, 2000), representing a marker of cell proliferation. Staining underscored different structures of the mitotic spindle (Figure 61, arrows). Fluorescent cells counts exposed 20% of proliferative cells in controls and 5% in transfected cells with *miR-140-3p* mimics. However due to variability between cell proliferation, it was not significant. For *miR-99a-5p* (Figure 62), mitotic spindles were also notable in both treatments. However, cells counting did not enable to find any difference between controls (18% of proliferative cells) and transfected cells (20% of proliferative cells). One reason to explain this lack of difference could be the duration of transfection. Indeed, cells were transfected during 48h which may be shorter to identify an effect on proliferation. To optimize transfection efficiency cells were transfected at 70% confluent. Doubling time of BME-UV1 is 22-24h (Zavizion *et al.,* 1996) and consequently they were confluent after 48h of transfection. Allowing cells to transfect longer may cause cell death whatever the treatment. Nevertheless, the effect of *miR-15a* mimics transfection on the viability of bovine MEC was assessed after 24h of transfection by cells counting (Li *et al.,* 2012). In human adipose stem cells, the effect of *miR-103a-3p* on cells viability was measured after 48h of transfection by a Cell Counter (Kim *et al.,* 2015), suggesting that 48h is enough to evaluate the effect of miRNA overexpression on cells proliferation.

Figure 63 Immunostaining of controls and transfected cells with Bodipy 493/503. *The white bar corresponds to 100 µm.*

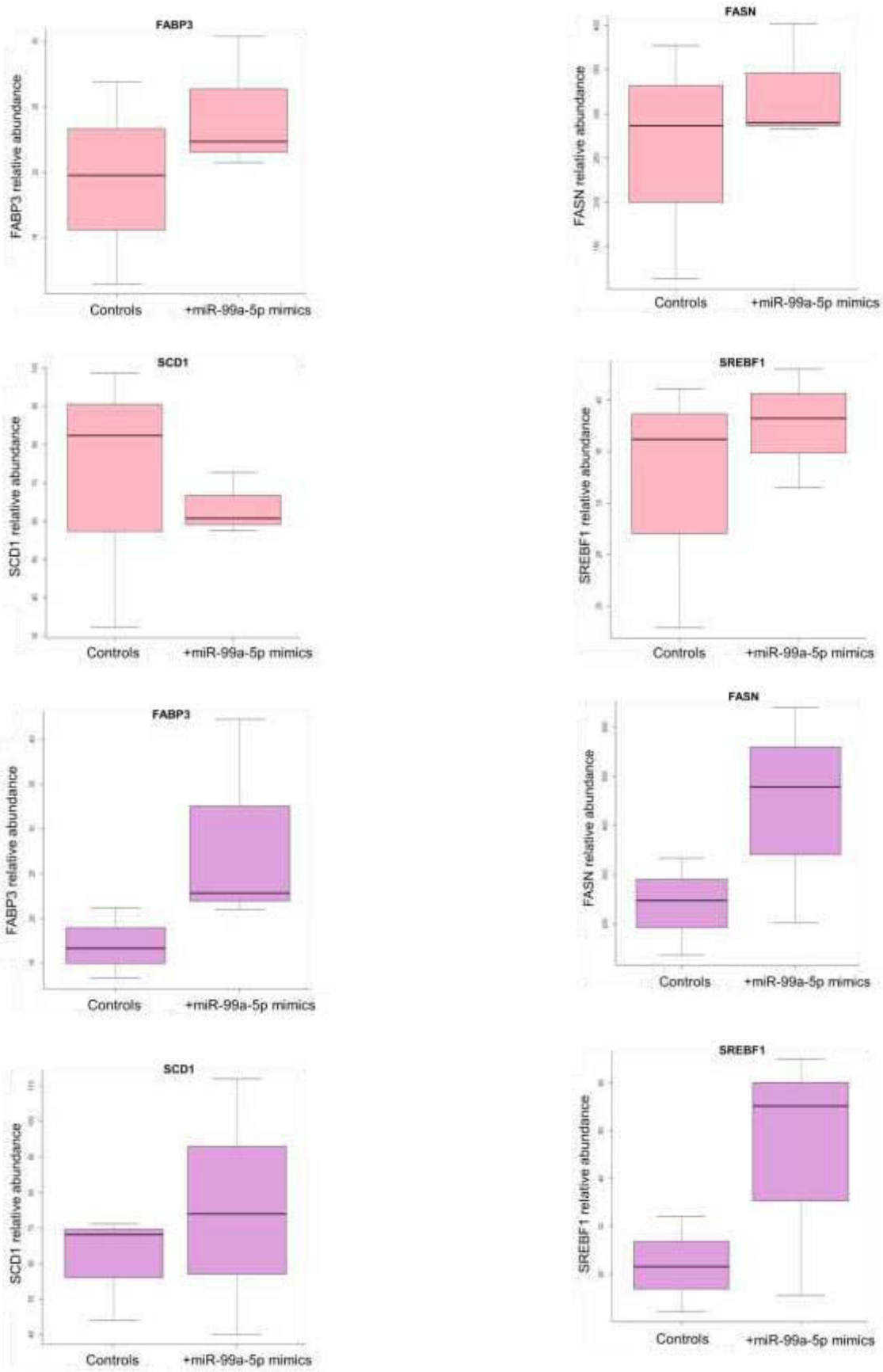


It would be interesting to evaluate the impact of *miR-140-3p* and *miR-99a-5p* on their targets involved in cell proliferation and death. Thus the expression of *CDK6* and *STAT3* as well as *IGF1R* and *mTOR, miR-140-3p* and *miR-99a-5p* predicted targets respectively, would be quantified using RT-qPCR in controls and transfected cells.

Impact of miRNA on cell lipid metabolism

In addition to its role in proliferation, *miR-99a-5p* directly target *mTOR* known to have crucial role in cell metabolism (Maya-Monteiro and Bozza, 2008, Yang *et al.,* 2014). Moreover, *miR-99a-5p* is predicted to target *VLDLR* (Very Low Density Lipoprotein Receptor) and could have a major role in regulating fatty acid uptake in mammary cells. Otherwise, *miR-222-3p* is an intergenic miRNA clustered with *mir-221* in numerous species including bovine. The expression of *miR-222-3p* is influenced by conjugated linoleic acid supplementation in mouse adipose tissue and its expression is highly correlated with those of adipocytes markers as *Adiponectin* and *PPARγ* (Parra *et al.,* 2010). In breast cancer cells line, *miR-222-3p* directly target *ADIPOR1* 3' UTR, an Adiponectin Receptor (Hwang *et al.,* 2013). Among its predicted target, *FABP3* (Fatty Acids Binding Protein 3) or *SCD5* (Steroyl-CoA Desaturase 5) were found. Therefore, both miRNA could impact lipid metabolism in BME-UV1. The influence of *miR-99a-5p* and *miR-222-3p* overexpression on lipid metabolism was studied through two approaches; a staining of lipid droplets and a quantification of candidate genes involved in milk lipid metabolism. First, in controls and transfected cells, lipid droplets were marked using Bodipy. Actually Bodipy is a bright green-fluorescent dye with similar excitation and emission to fluorescein (FITC) which is used to mark fatty acids, phospholipids and cholesterol (Listenberg and Brown, 2007). In both categories of cells, Bodipy staining has shown numerous lipid droplets, especially in scattered cells (Figure 63). However, no clear phenotype was detectable on lipid droplets number or size after *miR-99a-5p* or *miR-222-3p* transfection. Maybe the regulation of lipid droplets need more time to be regulated and 48 h

Figure 64 Relative levels of genes involved in lipid metabolism in controls and transfected cells with *miR-99a-5p* mimics. In pink and purple, results for the first and the second transfection assays, respectively. *Gene's expressions were normalized with EIF3K, RPLP0 and UXT2 values, n=3.*

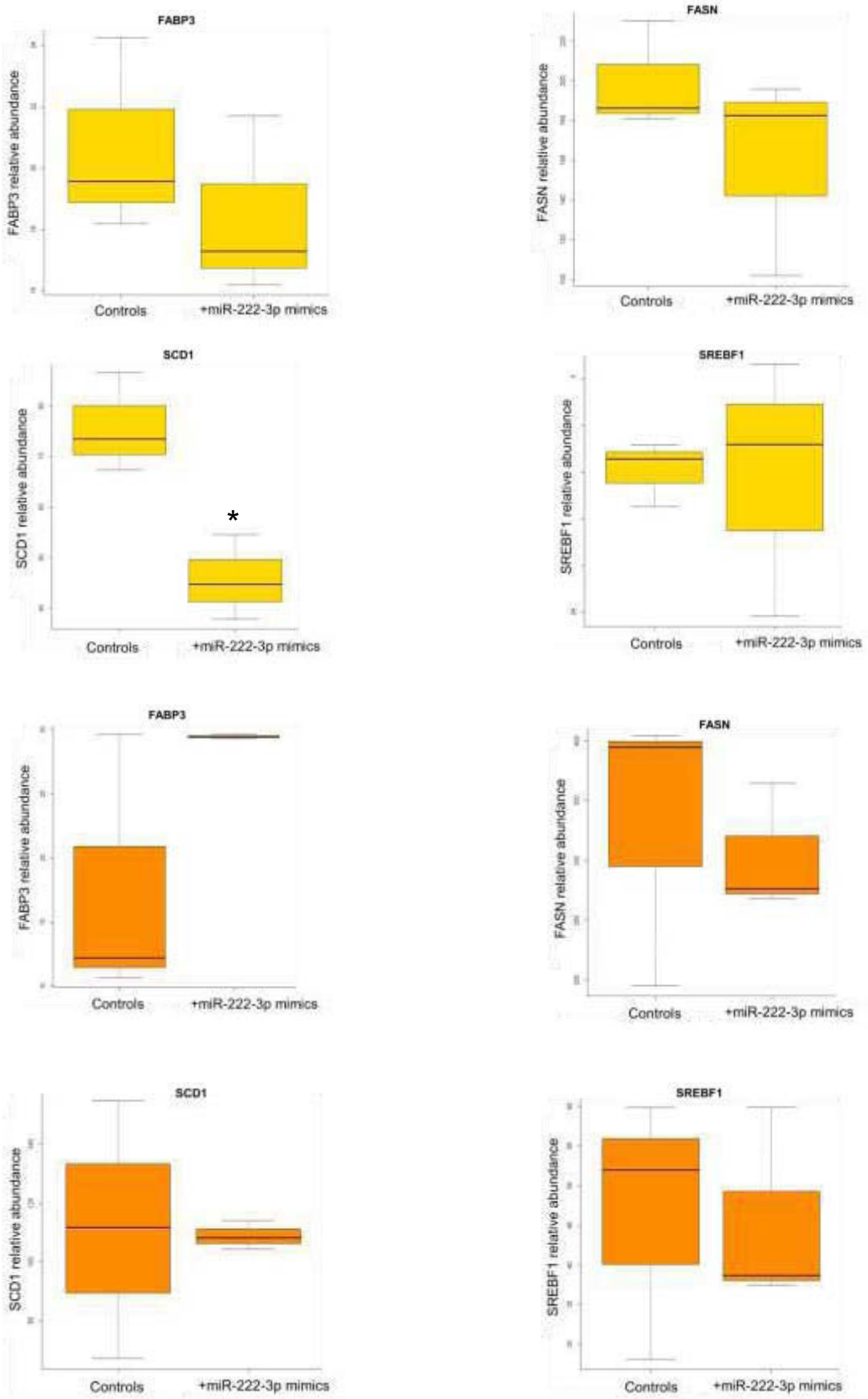


of transfection may be insufficient. Although Chu and colleagues (2015) identified an effect of *miR-181a* mimics on lipid accumulation after 48 h of transfection in mouse embryonic fibroblast cell, using Red Nile staining for marking lipid droplets (Chu *et al.,* 2015). In addition, the interaction of lipofectamine and mimics forms liposomes for mimics transfection, it is possible that Bodipy also mark intra-cellular liposomes, which could contribute to cover the effect of miRNA overexpression.

However, we hypothesized that the gene expression effects could be detected before the phenotype so the second approach consists on the quantification of genes encoded lipogenic enzymes and responsible for milk lipid synthesis in controls and transfected cells. Candidate genes were chosen for their function (Figure 64 and 65). Thus, the fatty acid transporter *FABP3*, the enzyme responsible for *de novo* synthesis of fatty acid, *FASN*, the fatty acid desaturase *SCD* and the transcription factor *SREBF1* were chosen. Transfection assays were performed twice. For both assays, any gene was significantly deregulated by the overexpression of *miR-99a-5p* (Figure 64). In addition, the overexpression of *miR-222-3p* led to a significant decrease of *SCD1* expression in the first assay (Figure 65). Unfortunately, this result could not be reproducible because the results for the second transfection assay didn't show difference between controls and transfected cells. These results suggest that *miR-99a-5p* and *miR-222-3p* may not have a strong impact on fatty acid transport, *de novo* synthesis, desaturation nor on the transcriptional regulation of lipogenic enzyme through those genes. Those miRNA may act on other ways involved in lipid synthesis and additional studies must be performed to identify their targets.

To conclude our study was not able to reveal a role of *miR-140-3p* or *miR-99a-5p* on cell proliferation in BME-UV1 cells. This first study will be completed with the quantification of the expression of genes targeted by *miR-140-3p* and *miR-99a-5p* and involved in proliferation and cell death as *CDK6, STAT3* or *mTOR* in controls and transfected cells. The

Figure 65 Relative levels of genes involved in lipid metabolism in controls and transfected cells with *miR-222-3p* mimics. In yellow and orange, results for the first and second transfection assays, respectively. *Gene's expressions were normalized with EIF3K, RPLP0 and UXT2 values, n=3, *:p=0.05.*



visualization of lipids droplets and the quantification of genes involved in lipid metabolism could not identify a function of *miR-99a-5p* and *miR-222-3p* in lipid synthesis. Further investigations are required to decipher the functions of *miR-99a-5p, miR-140-3p* and *miR-222-3p* in the mammary gland.

Acknowledgement: Authors are very grateful to Dr Frédéric Dessauge from the French National Institute for Agronomic Research, UMR 1348 for providing BME-UV1 cell lines.

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'IDENTIFICATION DES MIARN DANS LA GLANDE MAMMAIRE

UNE METHODOLOGIE DE CHOIX

Comme vu dans l'introduction, les données sur les miARN chez les ruminants sont bien plus fragmentaires que chez l'homme ou les rongeurs, notamment chez la chèvre où il n'existait pas de miARN répertoriés dans les bases de données au début de ma thèse. Il nous a paru nécessaire d'établir des listes des miARN présents dans la glande mammaire et d'identifier de nouveaux miARN chez ces espèces.

Nous avons choisi le séquençage haut débit des miARN présents dans la glande mammaire des différentes espèces étudiées. Cette approche sans *a priori* permet d'obtenir des millions de séquences qui peuvent ensuite être annotées et quantifiées. De plus, l'amélioration croissante de cette technique permet la caractérisation de plus en plus de séquences et notamment la découverte de nouveaux miARN.

Néanmoins, le séquençage haut débit génère un très grand nombre de données entrainant des traitements bioinformatiques lourds. La première étape de cette analyse a été la vérification de la propreté de nos données de séquençage, qui conditionne largement la suite de l'analyse. En vérifiant, la longueur des séquences majoritaires dans le jeu de donnée issu de la glande mammaire de chèvre, un pic de séquences d'environ 22 nucléotides correspondant aux miARN était visible mais nous observions aussi un pic de séquences d'environ 33 nucléotides correspondant à des ARNt. En effet, en fonction de la préparation des échantillons, les plateformes de séquençage effectuent ou non une étape préliminaire d'isolation des petits ARN. Dans le cadre du séquençage des miARN issus de la glande mammaire de chèvre, cette étape n'avait pas été effectuée. Cela a entrainé beaucoup de bruits de fond dans les données. Nous avons ensuite aligné l'ensemble des séquences contre les données de la base RFAM (Burge *et al.,* 2013), composées de tous les petits ARN et contre une banque d'ADNc, afin d'identifier les séquences correspondant à la dégradation d'ARNm. La propreté des données de séquençage est donc un point important à vérifier, qui peut demander des étapes supplémentaires d'analyses. Le choix de la technologie utilisée influence

également les résultats (Quail *et al.,* 2012, Toelding *et al.,* 2012, Frey *et al.,* 2014). Ainsi, nous avons pu comparer les résultats de séquençage de deux échantillons identiques d'ARN bovins sur deux plateformes différentes utilisant la technologie Solexa d'Illumina. Les analyses avaient des résultats différents et difficilement corrélables. En particulier, un des biais majeurs décrits pour la méthode de séquençage est l'étape de ligation des adaptateurs qui est influencée par l'enzyme de ligation ainsi que par les séquences des adaptateurs et du miARN, pouvant favoriser la détection d'une séquence par rapport à d'autres (Hafner *et al.,* 2011, Van Dijk *et al.,* 2014).

Après cette étape d'acquisition de données et de « nettoyage », vient l'étape d'analyse. Avec l'utilisation grandissante du séquençage haut débit, des algorithmes bioinformatiques d'analyse ont été développés par plusieurs auteurs. Parmi ceux-ci, nous avons choisi miRDeep2, qui est composé de plusieurs modules permettant la prédiction, la quantification et l'annotation des miARN ainsi que l'identification de nouveaux miARN avec une grande précision (Friedlander *et al.,* 2008, Metpally *et al.,* 2013). Pour utiliser cet outil, il est nécessaire de disposer d'un génome et d'une liste de miARN de référence (miRBase). Aussi, au moment des analyses des données de séquençage chez la chèvre, nous nous sommes interrogés sur la qualité du génome récemment disponible chez cette espèce et surtout sur les miARN de référence à utiliser. Quelques équipes avaient commencé à dresser des listes des miARN exprimés dans différents tissus caprins (peau, muscle et organes reproducteurs, principalement) laissant présager l'arrivée des miARN chèvres dans miRBase. Aussi, à la dernière mise à jour de la base de données en 2014, environ 400 miARN caprins ont été entrés dans miRBase. Pour analyser le plus précisément les données de miARN chez la chèvre, nous avons donc voulu comparer plusieurs approches, en particulier l'utilisation de miARN (i) d'une espèce phylogénétiquement très éloignée de la chèvre permettant une prédiction *de novo* des miARN, (ii) d'une espèce proche et ayant un grand nombre de miARN répertoriés (espèce bovine), (iii) de l'espèce caprine, données récemment répertoriées dans miRBase. La première étape de cette analyse est la prédiction et consiste à positionner les miARN sur le génome de l'espèce et exciser des précurseurs résultant de cet alignement. Les résultats de prédiction par l'approche *de novo* se sont avérés être similaires aux deux autres approches. Cette méthode peut par conséquent être utilisée pour prédire des miARN chez des espèces où aucun miARN n'est encore décrit. Par ailleurs, cette étape de prédiction nécessite d'utiliser un génome de bonne qualité pour identifier un maximum de miARN. L'utilisation des miARN bovins connus dans miRBase a permis de souligner certains défauts d'assemblage du génome

caprin. En effet, environ 80 miARN bovins étaient quantifiés dans notre jeu de données sans pour autant avoir de localisation génomique caprine. Le génome de la vache et de la chèvre étant très similaire, il était donc étonnant de ne pas retrouver ces miARN. L'utilisation des miARN d'une espèce dont le génome est bien annoté a donc permis l'identification d'environ 80 miARN supplémentaires et de nous informer sur la qualité du génome de la chèvre.

Ensuite, miRDeep2 attribue un score à chacun des précurseurs excisé à cette étape de prédiction afin d'estimer leur probabilité d'être de réels précurseurs. Ce score se base sur des critères de stabilité de repliement en tige-boucle, des sites de fixation de l'enzyme Dicer et s'étend de 10 à -10. Nous avons donc dû faire un choix sur le seuil à utiliser pour cette étape de prédiction. Ce choix a été difficile car nous voulions être le plus exhaustif possible afin de favoriser la découverte de nouveaux miARN, sans enrichir nos jeux de données en faux-positifs. Certains miARN, connus dans miRBase et retrouvés dans nos jeux de données par miRDeep2, possédaient des scores inférieurs à 0. Ainsi, un faible score miRDeep2 ne correpond pas nécessairement à un faux-positif. Néanmoins dans la littérature, les auteurs utilisant miRDeep2 utilisent des scores allant de 0 à 5 (Dhahbi *et al.,* 2013, Macchiaroli *et al.,* 2015). Dans le cadre de nos études, nous voulions pouvoir établir une liste complète des miARN exprimés, aussi nous avons choisi un score de 0. Il est possible que ce score ait entrainé l'annotation de faux-positifs mais il a permis d'annoter un grand nombre de miARN. Pour un score de 0, nous avons retrouvé 93% des miARN connus chez la chèvre présents dans miRBase, ce qui a conforté notre choix. Les 7% restant correspondaient peut-être à des miARN non exprimés dans le tissu glande mammaire ou à ce stade de lactation. Ce score de 0 a aussi permis d'annoter environ 200 miARN connus supplémentaires chez la chèvre et plusieurs centaines de nouveaux miARN.

En plus du score de prédiction, un autre point de l'analyse des données de séquençage délicat est le filtre sur l'expression des miARN. En effet, la profondeur d'exploration obtenue par cette technique permet d'isoler des miARN présents en une ou deux copies dans un échantillon biologique, et donc très faiblement représentés. Nous pouvons donc nous interroger sur la nature de ces séquences et leur impact biologique. En effet, ces séquences ont des caractéristiques de miARN et pourraient agir de la même façon. Elles peuvent aussi constituer des produits de dégradation tout en ayant une fonction, notamment dans la régulation de l'expression des gènes (Jackowiak *et al.,* 2011). Par exemple, les fragments dérivés des ARNt pourraient avoir un rôle similaire aux miARN avec lesquels ils possèdent des homologies de structure (Shigematsu et Kirino, 2015). Compte tenu de la proportion de

ces produits de dégradation dans un tissu, ces séquences faiblement exprimées pourraient être indicatrices d'un état ou d'un stade physiologique. Aussi en fonction des problématiques de chacune de nos études, des choix différents ont été opérés concernant le filtre sur l'expression des miARN. Dans l'article 1 dans lequel les miRNomes mammaires de souris et de vache ont été comparés, un filtre de 1000 comptages par million de séquences a été effectué (Mullokandov *et al.,* 2012). Selon ces travaux, en dessous de 1000 comptages par million les miARN ne seraient pas fonctionnels dans une cellule. L'objectif de notre étude était principalement d'identifier la conservation des miARN chez ces deux espèces et les miARN importants pour la lactation et de ce fait, fonctionnels. Dans le cadre de l'article 2, nous souhaitions principalement établir une liste des miARN exprimés dans la glande mammaire de chèvre. Notre objectif était d'établir une liste servant de référence pour les études caprines à venir et donc être exhaustive. Nous avons donc décidé de conserver l'ensemble des séquences. Pour être intégré dans la base de données miRBase, le miARN doit posséder au moins 10 comptages sur son précurseur. Parmi, les miARN les moins exprimés de ce miRNome mammaire caprin se trouvaient des miARN connus. Nous avons donc utilisé le filtre minimum de soumission dans miRBase afin de conserver le maximum de miARN connus.

Enfin, lors de nos analyses nous n'avons pas pris en compte les isomiR, qui correspondent à des variants de séquence d'un miARN. Les modules de miRDeep2 nous fournissent des informations quant aux variations de séquence de chaque miARN quantifié. Il serait donc intéressant d'analyser la proportion des différents isomiR de chaque miARN. De surcroit, il a été récemment montré que ces isomiR pouvaient intégrer les protéines Argonautes et être fonctionnels dans la cellule (Tan *et al.,* 2014, Tan *et al.,* 2015). Ils joueraient également un rôle important dans l'évolution notamment parce que certains 5'isomiR ont remplacé le miARN canonique (Tan *et al.,* 2014).

Bien que très lourd en termes d'analyse, le séquençage haut débit a été indispensable pour la caractérisation des miRNomes mammaires dans les espèces étudiées. Les autres approches d'études des miARN sont les puces et la qPCR. Chez le bovin, il existe peu de puces commerciales disponibles et aucune chez la chèvre. La plupart des études ayant utilisé cette approche chez les espèces de ruminants, ont eu recours à des puces en systèmes hétérologues principalement des puces désignées chez l'homme. Bien que la conservation des miARN entre l'homme et le bovin permettent la quantification d'un grand nombre de séquences, les miARN spécifiques des ruminants ne se trouvent pas sur ces puces. De plus, la nomenclature

des miARN entre l'homme et le bovin est parfois différente, ce qui ajoute une étape de vérification supplémentaire lors de l'analyse des résultats. Cette approche n'est donc pas une stratégie de choix chez les espèces de ruminants.

Il existe également les plaques TLDA® (TaqMan Low Density Array) permettant de quantifier simultanément l'expression d'un grand nombre de miARN par qPCR. Cette technologie n'est malheureusement pas encore disponible pour les espèces de ruminants.

La méthode de quantification par qPCR des miARN est la plus couramment utilisée. Nous l'avons ainsi utilisée après les analyses de séquençage haut débit. Il existe deux approches différant principalement par l'étape de transcription inverse. Pour la première approche, la transcription inverse est réalisée grâce à une amorce tige-boucle spécifique de chaque miARN. Chaque miRNA subit donc une transcription inverse de façon individuelle. Pour la seconde approche, une queue poly-A est ajoutée à l'ensemble des miARN d'un échantillon et la transcription inverse se fait à partir d'une amorce poly-T. Nous avons choisi d'utiliser la première méthode car celle-ci est plus spécifique, particulièrement utile pour les miARN avec des expressions moyennes (Redshaw *et al.,* 2013). L'amplification est plus efficace et les résultats sont plus reproductibles que ceux obtenus par la seconde méthode. Néanmoins, cette approche est plus onéreuse. De plus, pour les nouveaux miARN, une étape de « design » est obligatoire à la fois pour les amorces permettant la transcription inverse et pour celles nécessaires pour la qPCR. Nous avons utilisé ce « design » d'amorces pour amplifier *miR-6119-5p*, un miARN spécifique des ruminants, fortement exprimé dans la glande mammaire et dont l'expression était modifiée par la privation alimentaire chez la chèvre. A l'inverse des données de séquençage, l'analyse en qPCR a révélé une expression faible de *miR-6119-5p* dans le tissu mammaire des chèvres, suggérant une mauvaise efficacité des amorces générées par ce « design ». La seconde approche permet de réaliser une transcription inverse commune pour tous les miARN étudiés et est donc plus rapide. Elle permet également une quantification de tous les miARN cibles et du témoin interne à partir de la même transcription inverse. Par ailleurs, une étape majeure de l'analyse d'expression des miARN par qPCR est le choix d'un miARN stable permettant de normaliser les données. Cette normalisation est couramment réalisée grâce à des snoARN, *U6,* étant le plus couramment utilisé. Certains auteurs conseillent l'utilisation de plusieurs miARN normalisateurs et de tester des miARN stables dans les conditions expérimentales. Aussi, nous avons sélectionné un miARN dont l'expression était stable par séquençage haut débit. Malheureusement, son expression fluctuait en qPCR selon les conditions expérimentales et il n'a pas pu être utilisé pour la normalisation.

Nous avons donc fait le choix de normaliser nos données avec *U6*, qui s'est révélé être stable dans toutes nos conditions expérimentales.

Nous avons aussi comparé les résultats obtenus par qPCR avec ceux de séquençage haut débit pour plusieurs miARN. Cette comparaison a montré une cohérence entre ces données, en particulier du changement d'expression, en accord avec la littérature (Lee *et al.,* 2014). Pour l'analyse de l'effet de la privation alimentaire chez la chèvre en lactation, seul *miR-204-5p*, le miARN dont l'expression était la plus affectée par le challenge nutritionnel, a montré une différence significative en qPCR. Dû aux différences de sensibilité et de normalisation de ces approches, la comparaison des données n'est pas simple (Gaj *et al.,* 2008), notamment pour visualiser l'effet de régulations fines. De plus, les données apportées par la qPCR validaient les données de séquençage en termes de sens de régulation. La qPCR, nous a donc servi d'approche complémentaire permettant de conforter les données de séquençage.

UTILISATION DES MIRNOMES MAMMAIRES

L'approche par séquençage haut débit a permis de dresser des miRNomes de référence chez les différentes espèces étudiées. La souris est un modèle couramment utilisé pour étudier la fonction d'un gène notamment grâce à la technique de transgénèse. La meilleure connaissance des miARN chez cette espèce permettra dans le futur de caractériser le rôle des miARN dans le développement de la glande mammaire et la biologie de la lactation. La vache et la chèvre sont deux espèces d'intérêts agronomiques, chez lesquelles il existe peu d'études de caractérisation des miARN exprimés dans la glande mammaire et leur fonction dans ce tissu est encore moins connue. Une meilleure connaissance des miARN dans la glande mammaire de ces espèces offre l'opportunité d'identifier notamment leur implication dans la production et la composition du lait. Nous sommes partis de l'hypothèse que les miARN importants pour la lactation sont conservés dans la glande mammaire entre espèces. Aussi, nous avons comparé les miRNomes issus des tissus mammaires de vache et de souris en lactation, qui a souligné quelques miARN conservés, exprimés fortement dans les tissus épithéliaux et prédits pour réguler des gènes importants pour le développement du tissu mammaire. De surcroit, la conservation de l'expression de ces miARN chez des espèces différentes suggère qu'il serait pertinent d'utiliser le modèle murin pour étudier la fonction des miARN bovins. Par ailleurs, nous avons aussi montré qu'une vingtaine de miARN

représentait 70% du miRNome en terme d'expression, donc la grande majorité des séquences étaient moyennement voir faiblement exprimées dans la glande mammaire. Ces observations soulèvent des questionnements quant à l'impact biologique de ces miARN.

Nos données de séquençage ont également été exploitées pour réaliser le miRNome mammaire chez la chèvre. Le génome de cette espèce a été récemment assemblé et seuls les gènes codant pour des protéines ont été annotés. A partir des données de séquençage, nous avons pu obtenir les localisations génomiques de chaque précurseur miARN. Ces données vont permettre d'implémenter les données d'annotation du génome caprin. Nous avons approfondi cette analyse par l'identification des clusters de miARN et de leur position intragénique, indicatives des régulations de l'expression des miARN. Cette dernière analyse a été limitée par le manque d'annotation du génome de la chèvre. En effet, nous avons utilisé les coordonnées des gènes codant pour les protéines qui ne contiennent actuellement pas d'information sur les régions introniques et exoniques. Il aurait été intéressant d'obtenir cette information notamment parce qu'en fonction de la position intronique ou exonique, les miARN peuvent être régulés différemment par rapport à leur gène hôte. En plus d'implémenter les données d'annotation du génome, ces données vont également être saisies dans miRBase pour des études futures.

AUTRE APPLICATION: IMPLICATIONS DES MIARN DANS DES CARACTERES DE PRODUCTION LAITIERE

Avec l'alimentation, le facteur génétique est un levier de modulation de la production et de la composition du lait. Un des objectifs majeurs des études de QTL est de trouver des gènes/marqueurs pour implémenter les programmes de sélection génomique des animaux d'élevage. Chez la vache laitière, par exemple, de très nombreux QTL ont été associés à la production et la composition du lait, sans que toutes les mutations causales n'aient été identifiées. La présence des miARN à proximité des QTL laitiers a été déjà décrite (Orgoresc *et al.,* 2009). Nous avons également identifié 114 miARN exprimés dans la glande mammaire de vaches en lactation localisés dans des QTL laitiers dont certains comme *miR-409-3p* et *miR-494-3p* sont nutrirégulés.

La présence de polymorphismes dans la séquence des miARN représente un grand intérêt pour la recherche chez l'homme, permettant de lier des SNP à des pathologies de type cancer.

Des bases de données ont même été créées afin de répertorier les SNP localisés dans les miARN, par exemple, Patrocles (http://www.patrocles.org/), polymiRT (http://compbio.uthsc.edu/miRSNP/) ou mirSNP (http://omictools.com/mirsnp) mais ces bases concernent essentiellement les recherches sur l'homme. Récemment, une autre base de données a été créée, miRNA SNiPer (http://www.integratomics-time.com/miRNA-SNiPer/) répertoriant des SNP localisés dans la séquence de miARN ou de leur précurseur et inclut des espèces de ruminants telles que le bovin et le mouton. Néanmoins, cette base n'est pas exhaustive et ne concerne que quelques exemples de miARN. Grâce aux analyses de séquençage haut débit, nous possédions les positions génomiques de chaque miARN sur le génome caprin ou bovin. Il nous a donc paru intéressant de rechercher la présence de SNP dans la séquence des miARN.

Chez les chèvres, nous possédions l'ensemble des coordonnées des miARN sur le génome caprin. Les données concernant les SNP chez la chèvre ne sont pas encore publiques. Récemment, une puce a été créée par une équipe de l'INRA de Toulouse à partir de 16 chèvres de race laitière (Alpine, Créole et Saanen), permettant d'identifier 52 000 SNP. Nous avons donc initié une collaboration avec cette équipe GenROC (UMR GenPHYSE, INRA). Les données de localisation des SNP ont été croisées avec les localisations génomiques des précurseurs de miARN chez la chèvre. Après croisement des données, 360 SNP ont été trouvés dans 230 miARN, dont 191 nouveaux. L'exploitation de ces données est en cours, notamment pour identifier l'effet du SNP sur la fonction du miARN. Pour ce faire, nous allons considérer plusieurs critères selon la localisation du SNP. En effet, il peut être situé dans la région tige-boucle du précurseur et donc ne pas avoir d'impact au niveau de la maturation ou de la fonction des miARN. Il peut également se trouver dans une zone de reconnaissance de l'enzyme Dicer et affecter la maturation des miARN. Enfin, le SNP peut être inclus dans la séquence du miARN mature et en particulier dans sa région « seed » provoquant une altération de la reconnaissance du miARN avec sa cible et donc moduler fortement l'activité de ce miARN. Nous souhaiterions ensuite relier ces données de polymorphismes aux données phénotypiques de production et de composition du lait.

Nous aimerions réaliser un travail similaire chez le bovin. A partir des données de SNP issus de 1000 génomes de taureaux de race laitière et de l'ensemble des précurseurs issus du miRNome mammaire bovin, un criblage pourra être fait afin de déterminer si un ou des SNP pourraient se situer dans les précurseurs et/ou dans les régions régulatrices de l'expression des miARN. Les coordonnées fournies correspondront à celles des précurseurs, concordants avec

une forme du miARN déjà clivé. La longueur des pri-miARN (la forme transcrite du miARN) n'est pas connue et varie beaucoup entre miARN. Donc, un premier choix d'intervalle pourra être fait, par exemple en conservant une distance de 10 kb en amont et en aval du précurseur du miARN et pourra être définie comme région régulatrice du miARN. Ces analyses seront réalisées en collaboration avec l'équipe Génétique et Génomique Bovine (UMR GABI, INRA). Une fois identifié, il sera intéressant de faire des validations par PCR de l'expression des miARN à partir des bovins présentant le polymorphisme d'intérêt. Comme chez la chèvre, nous souhaiterions relier ces polymorphismes à des différences phénotypiques au niveau de la production et de la composition du lait.

Ces études, encore très préliminaires, nous fourniront des indications sur l'implication des miARN dans des caractères de productions laitières. Les miARN pourraient, dans le futur, servir de marqueurs génétiques pour la sélection des animaux agronomiques.

LA REGULATION NUTRITIONNELLE DES MIARN

L'alimentation représente un levier important pour la modulation de la production et de la composition du lait, en particulier elle modifie les proportions des différents acides gras, conditionnant sa qualité nutritionnelle pour le consommateur. Les études de nutrigénomique par approches ciblées (quantification de gènes candidats) ou globale (quantification de tous les transcrits) ont mis en évidence la régulation nutritionnelle de l'expression de certains gènes dans la glande mammaire. Les mécanismes de régulation de l'expression de ces gènes ne sont que partiellement connus. Les miARN nous offraient des pistes d'investigation pour comprendre les mécanismes de régulation de ces gènes en réponse à l'alimentation. Au début de mes travaux, aucune étude de régulation nutritionnelle des miARN n'avait été décrite dans ce tissu. Par conséquent, un modèle dit « extrême » en nutrition a été utilisé en premier lieu afin d'identifier une régulation potentielle de l'expression des miARN dans la glande mammaire par l'alimentation. La privation alimentaire de 48h chez des chèvres en lactation a entrainé une modification de l'expression de 30 miARN (correction statistique Benjamini-Hocherg 10%), parmi lesquels des miARN connus et nouveaux. Ce modèle étant un modèle « extrême », le nombre de miARN dérégulés peut paraitre faible, notamment par rapport au nombre d'ARNm (161, correction statistique Bonferroni 0.01%) dont l'expression était

modifiée dans les mêmes échantillons. L'effet d'une privation alimentaire chez le modèle ruminant est différent de l'effet plus drastique qu'elle pourrait avoir chez un monogastrique. En effet, la digestion est beaucoup plus longue chez les ruminants que chez les monogastriques et les microorganismes présents dans le rumen peuvent synthétiser des acides gras et des protéines. La privation peut ainsi s'apparenter à une forte restriction. Nous avons donc comparé le nombre de miARN dérégulés par la privation alimentaire avec les quelques exemples de restrictions caloriques effectuées dans d'autres tissus et espèces. Par exemple, seuls 15 miARN voient leur expression modulée par une restriction calorique de plusieurs années dans le muscle de singe (Mercken *et al.,* 2013). Néanmoins, peu de littérature existe autour de la régulation de l'expression des miARN par le niveau alimentaire ce qui rend difficile la comparaison du nombre de miARN dérégulés dans notre modèle. De surcroit, nous travaillons sur un stade physiologique particulier (début d'involution), spécifique du tissu mammaire, ce qui rend d'autant plus compliqué la comparaison des résultats de la privation avec d'autres études.

Dans ce modèle de privation, l'effet du niveau alimentaire peut être confondu avec l'effet du stress. Chez les ruminants, en cas de stress la glande mammaire est un organe priorisé par rapport aux autres tissus, pour qu'il puisse continuer à synthétiser et sécréter le lait. L'effet du stress est donc moindre sur ce tissu. Parmi les 30 miARN dérégulés, l'expression de cinq d'entre eux a déjà été décrite comme modifiée par une restriction alimentaire dans des tissus autres que la glande mammaire et chez différentes espèces non ruminants. Ces modèles de restriction sont moins forts que la privation appliquée dans notre étude et génère moins de stress chez l'animal. Ces études apportent des éléments en faveur du fait que la modification de l'expression de ces cinq miARN serait bien due à un changement du niveau de l'alimentation. Pour les autres miARN nutrirégulés et connus, l'expression de la plupart avait déjà été décrite comme modulée par des supplémentations en macro- ou micronutriments et seuls les miARN *miR-6119-5p*, *mir-99* et les nouveaux miARN n'avaient jamais été associés à des études nutritionnelles. La privation entrainant une modification de l'apport des nutriments à la glande mammaire, ces observations sont cohérentes avec la modification de l'expression de ces miARN chez les chèvres privées. Afin de conforter la régulation nutritionnelle des miARN par le niveau de l'alimentation, l'expression de certains des 30 miARN va être quantifiée dans la glande mammaire de ruminants ayant subi une restriction moins forte que la privation notamment grâce à une dilution de leur ration avec de la paille.

Ainsi, l'effet du niveau alimentaire et celui du stress pourront être découplés, car l'effet stress sera réduit.

En plus de ce modèle extrême en nutrition, nous avons voulu identifier la régulation nutritionnelle des miARN dans un modèle proche de l'élevage. Nous avons de ce fait étudié l'effet d'une supplémentation lipidique sur l'expression des miARN dans la glande mammaire de vache en lactation. Pour ce modèle de supplémentation, une approche transcriptomique globale, effectuée avant le début de ma thèse, avait permis d'identifier des gènes dont l'expression était significativement affectée par l'ajout d'huile de tournesol dans la glande mammaire des vaches en lactation. Ce modèle nous paraissait tout à fait adapté pour l'étude de la régulation nutritionnelle des miARN et de leur effet sur l'expression des gènes. De ce fait une analyse exploratoire a été réalisée sur deux pools d'ARN issus de vaches contrôles ou supplémentées. Nous avons fait séquencer ces pools lors de l'étude des miRNomes bovin et murin, nous permettant d'optimiser le coût de séquençage, qui était important. Cette analyse a mis en valeur des tendances de régulation de plusieurs miARN. Les miARN ayant la différence d'expression la plus importante entre les pools contrôles et supplémentés ont été identifiés et une recherche bibliographique de leur fonction ainsi que la prédiction *in silico* de leurs cibles a permis de choisir huit d'entre eux. L'expression de ces huit miARN a ensuite été évaluée par qPCR sur un plus grand nombre d'animaux (11 dans chaque régime) et analysés individuellement. L'expression de *miR-20a-5p* et *miR-142-5p* a été identifiée comme étant modulée par la supplémentation lipidique. Ce modèle de supplémentation entraine des mécanismes de régulation plus fins que le modèle de privation, ce qui peut être perçu à travers le changement dans la production et la composition du lait mais également dans la modification de l'expression des ARNm en réponse à ce régime, qui sont moins forts que dans le cas de la privation. Aussi seulement deux des miARN sélectionnés ont été dérégulés. Pour compléter cette étude, il serait intéressant de quantifier l'expression de miARN supplémentaires pour avoir un meilleur aperçu de l'impact de l'huile de tournesol sur l'expression des miARN dans la glande mammaire des vaches et peut-être avec des doses d'huile de tournesol croissante.

A travers, ces deux modèles 32 miARN ont été identifiés comme nutrirégulés dans la glande mammaire des ruminants. Ces études constituaient la première preuve de la régulation nutritionnelle des miARN dans ce tissu. De plus, la nutrition entraine des mécanismes fins de régulation des gènes, perceptible à travers les faibles changements d'expression entre les différentes conditions expérimentales. Bien que ces changements soient faibles, s'ils régulent

un gène codant pour une enzyme limitante impliquée dans la synthèse du lait, ils auront un effet dans la cellule.

Enfin, l'étude de l'effet d'autres modèles nutritionnels sur le miRNome mammaire permettra aussi de mettre en évidence la régulation nutritionnelle des miARN identifiés par nos deux études et/ou de nouveaux miARN et d'éclaircir l'impact de la nutrition sur l'expression des miARN dans le tissu mammaire ainsi que de mettre en exergue leur rôle fonctionnel.

Les miARN sont stables dans les fluides corporels et de plus en plus d'études s'intéressent aux miARN présents dans le lait ainsi qu'à leur transfert au consommateur et/ou au nouveau-né. Bien que ce transfert soit encore sujet de controverse, la nutrition pourrait entrainer une modification du profil des miARN dans le lait et avoir un impact sur la santé du consommateur et/ou du jeune. Nous pourrons ainsi analyser les variations d'expressions des miARN dans le lait des animaux issus des protocoles utilisés pendant ma thèse. L'une des voies de sortie des miARN vers le lait est leur empaquetage dans les globules gras. Aussi, les miARN nutrirégulés servent de référence pour une étude en cours, traitant de l'effet d'une restriction alimentaire chez la vache sur l'expression des miARN dans les globules gras du lait.

FONCTIONS DES MIARN NUTRIREGULES

FONCTIONS PREDITES

Pour identifier le rôle des miARN nutrirégulés, leurs gènes cibles ont été identifiés. Cette analyse a nécessité l'utilisation d'algorithmes bioinformatiques permettant de prédire les cibles des miARN. Une des difficultés de cette analyse est que ces logiciels sont principalement développés pour des études chez l'homme et les rongeurs. Aussi, les homologies de séquence ont dû être vérifiées entre les ruminants et l'homme. De plus, la plupart de ces logiciels se basent sur le nom du miARN, ce qui a rendu difficile la recherche de cibles pour les nouveaux miARN. Nous avons donc fait le choix d'utiliser des logiciels différents pour les miARN connus et les nouveaux. Pour les nouveaux, le logiciel Custom Target Scan a été utilisé permettant de prédire les cibles uniquement à partir de la région « seed ». Pour les miARN connus, la prédiction des cibles a été faite avec le logiciel DIANA-

microT, qui permet en particulier de visualiser la conservation de la liaison miARN/ARNm entre plusieurs espèces, dont le bovin. Ce logiciel est aussi plus régulièrement mis à jour par rapport aux autres logiciels de prédiction et permet de mettre un filtre sur les prédictions pour éviter les faux-positifs. L'utilisation de ce filtre a donc restreint la liste de cibles prédites par rapport à d'autres logiciels. Lors de la prédiction des cibles, il est conseillé d'utiliser plusieurs logiciels et de conserver les cibles communes aux analyses. Le logiciel DIANA-microT indique également si les cibles prédites sont retrouvées par d'autres logiciels. L'utilisation de ces logiciels de prédiction est très utile pour identifier les gènes ciblés par un ou plusieurs miARN mais les listes fournies sont souvent très importantes et nécessitent une étape de tri. Aussi avec toutes ces informations, les miARN étudiés peuvent être impliqués dans la majorité des processus cellulaires. Pour relier cette analyse à notre problématique, nous avons choisi de nous intéresser principalement aux gènes impliqués dans le métabolisme des lipides, mais aussi plus généralement dans la biosynthèse et la sécrétion des constituants du lait. Parmi les cibles, nous avons identifié de nombreux gènes codant pour les enzymes responsables de la synthèse des acides gras, mais aussi dans leur transport ou dans leur sécrétion. Notamment parmi ces gènes, certains sont ciblés par plusieurs miARN soulignant un rôle coopératif de ces derniers dans la régulation de leur cible.

LIEN ENTRE MIARN ET DEG

Pour nos deux modèles nutritionnels, nous possédions les données de transcriptomique générées dans les mêmes échantillons avant ma thèse. Ainsi, en plus de l'identification du rôle potentiel des miARN nutrirégulés, la recherche de cibles a aussi permis de confronter ces listes avec celle des gènes différentiellement exprimés (DEG) par les deux challenges nutritionnels. La privation alimentaire de 48h a entrainé 161 DEG dans la glande mammaire des chèvres, parmi lesquels seuls 19 (12%) étaient des cibles potentielles des 30 miARN nutrirégulés. La supplémentation lipidique a entrainé une modification de l'expression de 49 DEG dont 9 (18%) sont des cibles potentielles de *miR-20a-5p* et *miR-142-5p*. Ces pourcentages paraissent faibles par rapport au nombre de cibles prédites pour ces miARN. Néanmoins, ce nombre est dépendant du logiciel de prédiction de cible utilisé et nous avons fait le choix d'être assez restrictif sur cette analyse afin que ces prédictions soient au plus proche de la réalité biologique. De plus, les pourcentages de DEG ciblés par les miARN

nutrirégulés sont cohérents avec la littérature qui montrent des pourcentages compris entre 10 et 36% selon les études (Szeto *et al.,* 2014, Yin *et al.,* 2014, Yang et Zeng, 2015).

En analysant la fonction des DEG pouvant être ciblés par les miARN nutrirégulés, la majorité était impliquée dans des fonctions cellulaires ubiquitaires et ne représentaient pas des gènes candidats. Cette observation a été renforcée par l'analyse statistique Sparse-PLS, qui a montré l'anti-corrélation des expressions de 4 DEG et de *miR-409-3p*. Ces 4 DEG sont impliqués principalement dans l'endocytose, la dégradation des protéines ou la régulation de l'ARN. Les seuls gènes candidats identifiés qui pourraient être pertinent en regard de notre problématique sont *ESR1* pour le challenge de privation et *ELOVL6* pour le challenge de supplémentation lipidique. *ESR1* peut contribuer à expliquer le phénotype d'involution suggéré par les études de transcriptomique et est ciblé par 3 miARN dont *miR-222-3p.* Pour ce dernier, sa liaison dans la région 3'UTR d'*ESR1* a été confirmée *in vitro* dans des cellules de cancer de sein (Zhao *et al.,* 2008). Il sera intéressant de valider cette liaison dans un modèle cellulaire mammaire. Ce gène représente un intérêt particulier car il a été identifié comme étant le centre de réseaux de régulations dans d'autres études de nutrigénomique mammaire.

Pour ce qui concerne*, ELOVL6*, codant pour une enzyme impliquée dans l'élongation des acides gras, il est ciblé par *miR-20a-5p* et *miR-142-5p*. Malheureusement, nous ne sommes pas parvenus à valider cette régulation *in vitro* mais il serait intéressant de poursuive l'étude fonctionnelle pour confirmer ou infirmer une interaction directe entre ces miARN et *ELOVL6*.

Ainsi selon nos résultats, les miARN réguleraient seulement l'expression de quelques DEG dont la majorité est impliquée dans des fonctions cellulaires générales. Cette observation a également été faite dans le cadre d'une étude comparant l'expression des miARN et des ARNm dont l'expression était modifiée par l'efficacité alimentaire dans le muscle de porc (Jing *et al.,* 2015). Bien que certains miARN différentiels puissent cibler quelques gènes candidats pour l'étude, la plupart était prédit pour cibler des gènes impliqués dans des fonctions cellulaires générales. Cependant notre étude doit être revue car pour le modèle de privation alimentaire, les données de séquençage et de transcriptomique n'avaient pas eu la même correction statistique. Aussi après application de la correction Benjamini-Hocheberg 10% (utilisée en séquençage) sur les données de transcriptomique, 958 DEG ont été identifiés. Il sera intéressant d'identifier les cibles des miARN dans cette nouvelle liste de DEG. Une fois encore, l'étude d'autres modèles nutritionnels pourra permettre d'avoir une vision plus large des gènes régulés par les miARN en réponse à l'alimentation. Enfin, nous avons basé

nos études sur l'effet des miARN sur les ARNm sans s'intéresser aux protéines dans chacun de nos modèles. Il sera important de prendre en compte le niveau protéique dans les analyses futures et ainsi vérifier cette fois les effets de la régulation des miARN sur la stabilité des protéines de leur ARNm cibles.

L'ETUDE FONCTIONNELLE DES MIARN

ETUDE DE LA SUREXPRESSION DES MIARN NUTRIREGULES

Pour mieux caractériser la fonction des 3 miARN nutrirégulés qui ont été sélectionnés pour l'étude fonctionnelle, nous avons souhaité déréguler leur expression dans les cellules BME-UV1. Nous avons choisi de les surexprimer pour amplifier leur fonction biologique, car de nombreux miARN nutrirégulés appartiennent à des familles. Les membres d'une même famille de miARN sont susceptibles d'agir sur des cibles similaires car ils possèdent des régions « seed » communes. Ainsi, l'inactivation d'un miARN peut entrainer aucun phénotype du fait que son action est médiée par d'autres miARN ou par les membres de sa famille. Par ailleurs pour obtenir cette surexpression, nous avons fait le choix d'utiliser la technologie des mimics. La technologie des mimics n'avait jamais été utilisée dans le laboratoire et donc a dû faire l'objet de mises au point (temps de transfection, concentration). La surexpression des miARN peut aussi se faire grâce à la transfection de vecteurs d'expression viraux (majoritairement adénovirus ou lentivirus) (Osório *et al.,* 2014). Mais, bien que cette technologie permette maintenant d'insérer des précurseurs de miARN de toutes espèces, cette approche est aussi plus lourde que l'utilisation des mimics car elle demande notamment une étape d'amplification bactérienne et de sélection avant la transfection dans des cellules d'intérêts. Les mimics consistent en des duplex d'ARN synthétiques et sont de plus en plus utilisés notamment puisque leur transfection est simple et possible dans tous les types cellulaires. En revanche, cette transfection est transitoire et diluée par les divisions cellulaires. De plus, des expériences de précipitation du complexe RISC dans des cellules de cancer de sein ont montré que la plupart des mimics transfectés n'étaient pas liés aux protéines Argonautes et donc non fonctionnels (Thomson *et al.,* 2013). Les miARN transfectés par des agents lipidiques comme la lipofectamine s'agrègent dans des vésicules cellulaires de type lysosome et autres que les organites associés à la fonction des miARN. La forte expression des miARN détectés par qPCR dans les cellules peut être due à ces miARN agrégés et ne pas refléter la quantité de miARN effectivement actifs dans la cellule (Thomson

et al., 2013). Afin de pallier ce biais, nous avons transfecté dans les mêmes conditions que nos mimics d'intérêt, *miR-1,* un miARN très conservé à travers les espèces et qui entrainait une diminution de sa cible *TWF1* dans chaque expérience de transfection que nous avons réalisé, suggérant que les mimics étaient fonctionnels dans les cellules.

CHOIX DU MODELE CELLULAIRE

La seconde étape de l'étude fonctionnelle a été le choix d'un modèle cellulaire. Afin de rester au plus proche des modèles nutritionnels, nous avons voulu réaliser l'étude fonctionnelle dans des cellules bovines mammaires. Après une recherche bibliographique des différents modèles *in vitro* existants, la lignée BME-UV1 nous a paru adaptée aux problématiques de notre étude. En effet, cette lignée a été établie à partir de glande mammaire de vache Holstein gestante et en lactation (Zavizion *et al.,* 1996). Ce modèle cellulaire a principalement été utilisé pour l'effet des facteurs de croissance (IGF1 et EGF) sur la prolifération et l'apoptose cellulaire (Kozlowski *et al.,* 2011). En particulier, la croissance de ces cellules est sensible à l'EGF (Epidermal Growth Factor, Zazivion *et al.,* 1996), un modulateur majeur de la croissance du tissu mammaire. Ces cellules ont également servi de modèle pour l'étude du métabolisme des lipides. Par exemple, elles ont permis l'étude de l'activation de *ABCG1* et *FASN*, deux acteurs majeurs de la synthèse des lipides du lait, par le récepteur nucléaire LXRα (MacFadden *et al.,* 2010). Bien que peu caractérisée et non utilisée par le laboratoire, nous avons décidé de réaliser l'étude fonctionnelle sur cette lignée. Aussi en amont de cette étude, nous nous sommes assurés que ces cellules pouvaient être transfectées, à l'aide d'un siARN portant un fluorophore, puis avec l'un mimics d'intérêt. Ces cellules ont montré une bonne capacité de transfection et à chaque expérience environ 70% des cellules présentaient de la fluorescence, signe de la présence du siARN. De plus, pour s'assurer que cette lignée pouvait produire des gouttelettes lipides, nous avons stimulé ces cellules avec de l'acide oléique et marqué les gouttelettes avec du Bodipy, un marqueur de lipides. Les cellules ont bien présenté des gouttelettes, en nombre croissant en fonction de la concentration en acide oléique. Les ARNm des gènes candidats du métabolisme des lipides (*ACACA, FASN, SCD1, SREBF1*) ont également été quantifiés dans des cellules BME-UV1 en culture, afin de s'assurer que la machinerie de synthèse des lipides était présente dans ces cellules. Les cellules ont montré une expression forte de ces quatre gènes, suggérant qu'elles pourraient être adaptées pour une étude sur le métabolisme des lipides. Au moment de ces

tests préliminaires, nous n'avions pas fait un choix définitif sur les miARN nutrirégulés à étudier et nous n'avons donc pas quantifié l'expression de gènes cibles.

Néanmoins, malgré tous ces tests préliminaires et de très fortes surexpressions des miARN après transfection des mimics, aucun phénotype sur la prolifération ou le métabolisme des lipides n'a pu être observé. Les trois miARN sélectionnés avaient été décrits dans la littérature comme étant impliqués dans ces voies cellulaires, dans d'autres tissus et espèces. Par ailleurs, l'expression de plusieurs gènes cibles des miARN transfectés n'a pu être détectée par RT-qPCR. Ces gènes tels que *CD36* ou *ESR1* sont des gènes fortement exprimés dans les cellules épithéliales mammaires *in vivo* au pic de lactation. De surcroit, ces cellules n'expriment aucun gène codant pour les protéines majeures du lait (caséines), ni les gènes responsables de la sécrétion des acides gras. Nous nous sommes, par conséquent, interrogés sur la nature de ces cellules qui présentaient, toutefois en culture, un phénotype d'épithélium avec des cellules de forme pavimenteuse. Afin d'avoir une meilleure connaissance des gènes exprimés par les BME-UV1 cultivées en routine, le transcriptome de ces cellules par RNA-seq a été réalisé en collaboration avec l'équipe G2B de l'UMR GABI de Jouy-en-Josas. L'analyse des données de séquençage est en cours d'exploitation et sera essentielle pour de futures études impliquant ce modèle cellulaire. Les premiers résultats ont tout de même validé nos données de RT-qPCR, confirmant que ces cellules n'expriment pas certains gènes indispensables pour la biosynthèse et la sécrétion des constituants du lait.

De nombreux auteurs travaillant sur la glande mammaire *in vitro* sont confrontés à ce genre de problème car il n'existe pas de lignées cellulaires reflétant exactement le fonctionnement d'une cellule épithéliale mammaire. Aucune de ces lignées n'a la capacité de sécrétion des constituants du lait et certaines ne synthétisent même pas les protéines majeures du lait comme les caséines.

Au vu de nos résultats, nous pouvons considérer qu'il aurait fallu faire les études fonctionnelles dans des modèles cellulaires mieux adaptés à chaque problématique et faire abstraction de l'espèce. Pour l'étude de l'effet de la surexpression des miARN sur la prolifération cellulaire, nous aurions pu choisir une lignée mieux caractérisée au laboratoire, par exemple la lignée de cellules épithéliales mammaires murines, HC11 (Ball *et al.,* 1988). Comme vu dans l'article 1, les miARN sont conservés entre le bovin et la souris, ce qui rend envisageable l'utilisation de cette espèce pour l'étude de miARN bovins. Les séquences de *miR-140-3p*, *miR-99a-5p* et *miR-222-3p* sont conservées entre le bovin et la souris, et ces miARN sont donc susceptibles de réguler des gènes identiques. Pour l'étude de l'effet de la

surexpression des miARN sur le métabolisme des lipides, nous aurions pu utiliser une lignée murine de pré-adipocytes, les 3T3-L1 (Green et Kehinde, 1975), qui est utilisée pour les études du métabolisme.

IDENTIFICATION DE LA FONCTION DES MIARN NUTRIREGULES

Nous avons donc utilisé la technologie des mimics afin d'identifier l'effet de la surexpression de *miR-140-3p* et *miR-99a-5p* sur la prolifération des cellules BME-UV1. Après le marquage des cellules en prolifération avec un anticorps anti-Ki-67, nous n'avons pas pu mettre en évidence de différence entre les cellules contrôles et les cellules transfectées. Nous avons pris en compte le temps de doublement (22-24h) des cellules qui étaient transfectées à 80% de confluence. Un temps de transfection supérieure à 48h dans le milieu de transfection aurait pu entrainer de la mort cellulaire. La prolifération cellulaire semble un point difficile à estimer *in vitro*. Par exemple, si le nombre de cellules dans les puits contrôles ou transfectés est différent avant l'étape de transfection, cela peut entrainer un biais sur la prolifération. De plus, nous travaillions avec des cellules dont les cycles cellulaires n'étaient pas synchronisés et il est donc possible que les proportions des cellules pour un stade du cycle cellulaire aient été différentes dans les puits contrôles ou transfectés. Il aurait été intéressant d'évaluer la prolifération à plusieurs points dans le temps, par exemple 24h, 48h et 72h post-transfection. Malgré le fait de n'avoir pas de phénotype marqué, nous allons compléter notre étude par une analyse de l'expression des gènes cibles de ces deux miARN, *CDK6*, *IGF1R*, *mTOR* et *STAT3*, qui s'expriment bien dans les BME-UV1. En effet, 48h n'a peut-être pas été suffisant pour obtenir un phénotype mais nous pouvons penser raisonnablement que ce temps sera suffisant pour voir une diminution de l'expression des ARNm cibles.

Par ailleurs, nous avons également souhaité évaluer l'effet de la surexpression de *miR-99a-5p* et *miR-222-3p* sur le métabolisme lipidique via deux approches: la visualisation des gouttelettes lipidiques et la quantification de gènes impliqués dans le transport et la synthèse des acides gras. Le marquage des cellules avec le marqueur Bodipy a permis de visualiser de nombreuses gouttelettes lipidiques dans les cellules contrôles et transfectées sans que nous puissions identifier de différences dans le nombre ou la taille de celles-ci entre les différentes conditions. Il est possible que les liposomes formés entre la lipofectamine et les mimics aient perturbé cette analyse. En effet, la lipofectamine est un agent lipidique qui englobe les mimics formant des vésicules qui fusionnent avec la membrane plasmique pour délivrer le miARN mimics dans le cytoplasme de la cellule. Il est donc possible que le Bodipy, qui est marqueur

de lipides, ait également intégré des liposomes entrainant une confusion entre les gouttelettes lipidiques et les liposomes. De plus, nous avons quantifié l'expression de *FASN* et *SREBF1* dans des cellules BME-UV1 dans un milieu sans ou avec lipofectamine. L'expression de ces deux gènes était diminuée dans les cellules dont le milieu avait contenu de la lipofectamine. De surcroit, la comparaison de la taille des gouttelettes lipidiques marquées au Bodipy dans les cellules cultivées dans un milieu avec ou sans lipofectamine a montré que les gouttelettes étaient en nombre supérieur avec une taille plus importante, suggérant que la lipofectamine pourrait avoir un effet sur le métabolisme des cellules. Il existe d'autres mécanismes de transfection (par exemple l'électroporation) qui pourraient être testés pour la transfection des mimics dans les BME-UV1. De plus, nous avons quantifié l'expression des gènes impliqués dans le transport, la synthèse et la désaturation des acides gras. La liste de gènes candidats contenait des cibles de *miR-99a-5p* et *miR-222-3p* (*CD36, ESR1, FASN* et *ESR1*), mais seul *FASN* est exprimé dans les cellules BME-UV1. Nous n'avons pas pu mettre en évidence de rôle pour ces deux miARN sur le métabolisme des lipides. Une autre approche pourrait consister à quantifier les différentes classes d'acides gras dans les cellules contrôles et transfectées. En effet, la proportion d'acides gras à chaine courte et longue permettrait d'avoir une indication sur l'implication des miARN dans la synthèse *de novo* ou dans l'importation des acides gras à chaine longue. La proportion des acides gras saturés ou insaturés indiquerait si les miARN peuvent être impliqués dans la régulation de la voie de désaturation des lipides. Il sera intéressant aussi d'étudier la fonction de *miR-99a-5p* et *miR-222-3p* dans un autre modèle cellulaire plus adapté à l'étude du métabolisme des lipides (comme expliqué précédemment).

Pour conclure, cette étude fonctionnelle était une première analyse exploratoire de la fonction des miARN avec de nouveaux outils. Cette première étude a mis en évidence des points techniques à optimiser pour les études futures. De plus, si nous parvenons à montrer l'implication des miARN nutrirégulés dans la prolifération des cellules épithéliales mammaires ou la synthèse des lipides du lait, il serait intéressant de valider ces observations *in vivo*, en particulier à l'aide de l'outil transgénèse chez le modèle murin.

L'ensemble de ces travaux a permis d'obtenir une meilleure connaissance des miARN exprimés dans la glande mammaire des ruminants. Ils représentent également la première preuve d'une régulation nutritionnelle des miARN dans le tissu mammaire et ouvrent de larges perspectives pour la compréhension des effets de l'aliment sur le fonctionnement de la

glande mammaire. Pour leur rôle de régulateur de l'expression des gènes et pour leur implication dans tous les processus cellulaires, les miARN ont été à l'origine de nos travaux. Des études futures permettront de clarifier leur régulation par le facteur nutritionnel mais aussi leur fonction dans les voies de signalisation du tissu mammaire et leur implication dans la synthèse et la sécrétion du lait. Il sera également important de comprendre les mécanismes de sécrétion des miARN dans le lait et leur transfert potentiel au consommateur/nouveau-né.

Les miARN représentent une classe de petits ARN non-codants. Mais d'autres ARN non-codants pourraient avoir une fonction importante pour la biologie de la glande mammaire. En particulier, il a été récemment montré que la délétion génétique de *Neat1*, un ARN long-non-codant, entrainait un défaut dans le développement lobulo-alvéolaire altérant la morphogenèse mammaire ainsi que la lactation chez les souris déficientes en *Neat1* (Standaert *et al.,* 2014). De plus, chez le bovin, les ARN longs non-codants commencent à être mieux caractériser notamment grâce à leur séquençage récent dans le muscle (Billerey *et al.,* 2014). De plus, les piARN (24-31 nucléotides) sont des petits ARN non codants qui s'associent aux protéines PIWI pour réprimer les transposons mais également l'expression de certains gènes (Iwasaki *et al.,* 2015). De façon intéressante, ces piARN sont abondamment retrouvés dans le lait bovin, en particulier dans le colostrum (Pfaffl, 2014), mais n'ont pas encore été décrits dans la glande mammaire. Enfin, lors de l'analyse de nos données de séquençage, nous avons identifié la présence d'ARNt dont certaines séquences étaient fortement représentées. Il est maintenant décrit que les fragments dérivés des ARNt (TRFs, 16-24 nucléotides) possèdent des similarités avec les miARN. Leurs séquences comportent une région « seed » et peuvent s'associer aux protéines Argonautes (Karaiskos *et al.,* 2015, Shigematsu et Kirino, 2015). Des cibles putatives des TRFs ont même été identifiées chez la drosophile (Karaiskos *et al.,* 2015), suggérant que ces derniers pourraient cibler et réguler l'expression des gènes. De façon notable, le niveau des 5'ARNt correspondant à des fragment issus de la boucle 5' des ARNt est modulé par une restriction calorique dans le sang de souris (Dhahbi *et al.,* 2013). De ce fait, l'impact de la nutrition sur l'expression des petits ARN non-codants autres que les miARN pourra être évalué, notamment à l'aide de nos jeux de données de séquençage des ARN de la glande mammaire, par exemple pour les ARNt.

Finalement, lors de nos travaux, le levier de l'alimentation a été considéré comme le facteur pouvant moduler l'expression des miARN, en relation avec des modifications de productions laitières. Un autre facteur majeur influence la production et la composition du lait, il s'agit de la génétique. Il serait donc intéressant d'évaluer l'impact de ce facteur sur le

miRNome mammaire, mais également sur les miARN présents dans le lait en comparant, par exemple, les résultats obtenus chez des animaux de différentes races laitières. C'est l'enrichissement de nos connaissances sur ces mécanismes de régulation qui nous permettra de mieux moduler les productions animales selon nos besoins et de prédire les réponses des animaux à différentes situations.

RÉFÉRENCES

A

Abumrad NA, Sfeir Z, Connelly MA, Coburn C. Lipid transporters: membrane transport systems for cholesterol and fatty acids. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2000;3(4):255-62.

Accorsi PA, Pacioni B, Pezzi C, Forni M, Flint DJ, Seren E. Role of prolactin, growth hormone and insulin-like growth factor 1 in mammary gland involution in the dairy cow. J Dairy Sci. 2002;85(3):507-13.

Adai A, Lackner M, Stinson S, O'Brien C, Yu N, Spoerke J, et al. miR-221/222 modulates estrogen receptor status and signaling in breast cancer. 99th AACR Annual Meeting. 2008.

Adams BD, Furneaux H, White BA. The micro-ribonucleic acid (miRNA) miR-206 targets the human estrogen receptor-alpha (ERalpha) and represses ERalpha messenger RNA and protein expression in breast cancer cell lines. Mol Endocrinol. 2007;21(5):1132-47.

Agarwal V, Bell GW, Nam JW, Bartel DP. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. Elife. 2015;12(4):05005.

Ahnadi CE, Beswick N, Delbecchi L, Kennelly JJ, Lacasse P. Addition of fish oil to diets for dairy cows. II. Effects on milk fat and gene expression of mammary lipogenic enzymes. J Dairy Res. 2002;69(4):521-31.

Alim MA, Fan YP, Wu XP, Xie Y, Zhang Y, Zhang SL, et al. Genetic effects of stearoyl-coenzyme A desaturase (SCD) polymorphism on milk production traits in the Chinese dairy population. Mol Biol Rep. 2012;39(9):8733-40.

Ambros V. The functions of animal microRNAs. Nature. 2004;431(7006):350-5.

Ameres SL, Horwich MD, Hung JH, Xu J, Ghildiyal M, Weng Z, et al. Target RNA-directed trimming and tailing of small silencing RNAs. Science. 2010;328(5985):1534-9.

Ameres SL, Martinez J, Schroeder R. Molecular basis for target RNA recognition and cleavage by human RISC. Cell. 2007;130(1):101-12.

Ameres SL, Zamore PD. Diversifying microRNA sequence and function. Nat Rev Mol Cell Biol. 2013;14(8):475-88.

Amico JA, Thomas A, Crowley RS, Burmeister LA. Concentrations of leptin in the serum of pregnant, lactating, and cycling rats and of leptin messenger ribonucleic acid in rat placental tissue. Life Sci. 1998;63(16):1387-95.

Anderson RR. Mammary gland growth in sheep. J Anim Sci. 1975;41(1):118-23.

Anderson SM, Rudolph MC, McManaman JL, Neville MC. Key stages in mammary gland development. Secretory activation in the mammary gland: it's not just about milk protein synthesis! Breast Cancer Res. 2007;9(1):204.

Aravin AA, Lagos-Quintana M, Yalcin A, Zavolan M, Marks D, Snyder B, et al. The small RNA profile during Drosophila melanogaster development. Dev Cell. 2003;5(2):337-50.

Archibald AL, Cockett NE, Dalrymple BP, Faraut T, Kijas JW, Maddox JF, et al. The sheep genome reference sequence: a work in progress. Anim Genet. 2010;41(5):449-53.

Astakhova K. Toward non-enzymatic ultrasensitive indetification of single nucleotide polymorphisms by optical methods. Chemosensors. 2014;2(3):193-203.

Athanasiadis A, Rich A, Maas S. Widespread A-to-I RNA editing of Alu-containing mRNAs in the human transcriptome. PLoS Biol. 2004;2(12):9.

Auyeung VC, Ulitsky I, McGeary SE, Bartel DP. Beyond secondary structure: primary-sequence determinants license pri-miRNA hairpins for processing. Cell. 2013;152(4):844-58.

Avril-Sassen S, Goldstein LD, Stingl J, Blenkiron C, Le Quesne J, Spiteri I, et al. Characterisation of microRNA expression in post-natal mouse mammary gland development. BMC Genomics. 2009;10:548.

B

Baccarini A, Chauhan H, Gardner TJ, Jayaprakash AD, Sachidanandam R, Brown BD. Kinetic analysis reveals the fate of a microRNA following target regulation in mammalian cells. Curr Biol. 2011;21(5):369-76.

Backes S, Shapiro JS, Sabin LR, Pham AM, Reyes I, Moss B, et al. Degradation of host microRNAs by poxvirus poly(A) polymerase reveals terminal RNA methylation as a protective antiviral mechanism. Cell Host Microbe. 2012;12(2):200-10.

Baek D, Villén J, Shin C, Camargo FD, Gygi SP, Bartel DP. The impact of microRNAs on protein output. Nature. 2008;455(7209):64-71.

Baier SR, Nguyen C, Xie F, Wood JR, Zempleni J. MicroRNAs are absorbed in biologically meaningful amounts from nutritionally relevant doses of cow milk and affect gene expression in peripheral blood mononuclear cells, HEK-293 kidney cell cultures, and mouse livers. J Nutr. 2014;144(10):1495-500.

Baik M, Etchebarne BE, Bong J, VandeHaar MJ. Gene expression profiling of liver and mammary tissues of lactating dairy cows. Asian Australas J Anim Sci. 2009;22(6):871-84.

Bail S, Swerdel M, Liu H, Jiao X, Goff LA, Hart RP, et al. Differential regulation of microRNA stability. Rna. 2010;16(5):1032-9.

Ball RK, Friis RR, Schoenenberger CA, Doppler W, Groner B. Prolactin regulation of beta-casein gene expression and of a cytosolic 120-kd protein in a cloned mouse mammary epithelial cell line. Embo J. 1988;7(7):2089-95.

Baltimore D, Boldin MP, O'Connell RM, Rao DS, Taganov KD. MicroRNAs: new regulators of immune cell development and function. Nat Immunol. 2008;9(8):839-45.

Bao H, Kommadath A, Sun X, Meng Y, Arantes AS, Plastow GS, et al. Expansion of ruminant-specific microRNAs shapes target gene expression divergence between ruminant and non-ruminant species. BMC Genomics. 2013;14(609):1471-2164.

Baran-Gale J, Fannin EE, Kurtz CL, Sethupathy P. Beta cell 5'-shifted isomiRs are candidate regulatory hubs in type 2 diabetes. PLoS One. 2013;8(9): e73240.

Barber MC, Clegg RA, Travers MT, Vernon RG. Lipid metabolism in the lactating mammary gland. Biochim Biophys Acta. 1997;16:2-3.

Barnes NA, Stephenson S, Cocco M, Tooze RM, Doody GM. BLIMP-1 and STAT3 counterregulate microRNA-21 during plasma cell differentiation. J Immunol. 2012;189(1):253-60.

Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell. 2004;116(2):281-97.

Basyuk E, Suavet F, Doglio A, Bordonne R, Bertrand E. Human let-7 stem-loop precursors harbor features of RNase III cleavage products. Nucleic Acids Res. 2003;31(22):6593-7.

Bauman DE, Currie WB. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. J Dairy Sci. 1980;63(9):1514-29.

Baumgard LH, Corl BA, Dwyer DA, Saebo A, Bauman DE. Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits milk fat synthesis. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2000;278(1):R179-84.

Baumrucker CR. Cationic amino acid transport by bovine mammary tissue. J Dairy Sci. 1984;67(11):2500-6.

Beauvallet C, Bevilacqua C, Badaoui B, Cebo C, Makhzami S, Pollet S, et al. Accumulation of caseins in the endoplasmic reticulum of mammary epithelial cells due to αs1-casein deficiency, induces a chronic ER stress and a milk protein composition signing a singular secretion mode. Siena Meeting from Genome to Proteome: integration and proteome completion, Siena, Italy. 2008.

Bell RM, Ballas LM, Coleman RA. Lipid topogenesis. Journal of Lipid Research. 1981;22(3):391-403.

Benes V, Castoldi M. Expression profiling of microRNA using real-time quantitative PCR, how to use it and what is available. Methods. 2010;50(4):244-9.

Berezikov E. Evolution of microRNA diversity and regulation in animals. Nat Rev Genet. 2011;12(12):846-60.

Berezikov E, Chung WJ, Willis J, Cuppen E, Lai EC. Mammalian mirtron genes. Mol Cell. 2007;28(2):328-36.

Bernard L, Leroux C, Chilliard Y. Expression and nutritional regulation of lipogenic genes in the ruminant lactating mammary gland. Adv Exp Med Biol. 2008(606):67-108.

Bernard L, Leroux C, Faulconnier Y, Durand D, Shingfield KJ, Chilliard Y. Effect of sunflower-seed oil or linseed oil on milk fatty acid secretion and lipogenic gene expression in goats fed hay-based diets. J Dairy Res. 2009;76(2):241-8.

Bernier-Dodier P, Delbecchi L, Wagner GF, Talbot BG, Lacasse P. Effect of milking frequency on lactation persistency and mammary gland remodeling in mid-lactation cows. J Dairy Sci. 2010;93(2):555-64.

Bernstein E, Kim SY, Carmell MA, Murchison EP, Alcorn H, Li MZ, et al. Dicer is essential for mouse development. Nat Genet. 2003;35(3):215-7.

Bhattacharyya SN, Habermacher R, Martine U, Closs EI, Filipowicz W. Stress-induced reversal of microRNA repression and mRNA P-body localization in human cells. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 2006;71:513-21.

Bian Y, Lei Y, Wang C, Wang J, Wang L, Liu L, et al. Epigenetic Regulation of miR-29s Affects the Lactation Activity of Dairy Cow Mammary Epithelial Cells. J Cell Physiol. 2015;230(9):2152-63.

Billerey C, Boussaha M, Esquerre D, Rebours E, Djari A, Meersseman C, et al. Identification of large intergenic non-coding RNAs in bovine muscle using next-generation transcriptomic sequencing. BMC Genomics. 2014;15(499):1471-2164.

Bionaz M, Loor JJ. Gene networks driving bovine milk fat synthesis during the lactation cycle. BMC Genomics. 2008;9(366):1471-2164.

Bionaz M, Loor JJ. Gene networks driving bovine mammary protein synthesis during the lactation cycle. Bioinform Biol Insights. 2011;5:83-98.

Blow MJ, Grocock RJ, van Dongen S, Enright AJ, Dicks E, Futreal PA, et al. RNA editing of human microRNAs. Genome Biol. 2006;7(4):4.

Boettger T, Wust S, Nolte H, Braun T. The miR-206/133b cluster is dispensable for development, survival and regeneration of skeletal muscle. Skelet Muscle. 2014;4(1):014-0023.

Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. RNA. 2004;10(2):185-91.

Bohnsack MT, Regener K, Schwappach B, Saffrich R, Paraskeva E, Hartmann E, et al. Exp5 exports eEF1A via tRNA from nuclei and synergizes with other transport pathways to confine translation to the cytoplasm. Embo J. 2002;21(22):6205-15.

Boichard D, Grohs C, Bourgeois F, Cerqueira F, Faugeras R, Neau A, et al. Detection of genes influencing economic traits in three French dairy cattle breeds. Genet Sel Evol. 2003;35(1):77-101.

Boisgard R, Chanat E, Lavialle E, Pauloin A, Ollivier-Bousquet M. Roads taken by milk proteins in mammary epithelial cells. Livest Prod Sci. 2001;70:49-61.

Boland A, Tritschler F, Heimstadt S, Izaurralde E, Weichenrieder O. Crystal structure and ligand binding of the MID domain of a eukaryotic Argonaute protein. EMBO Rep. 2010;11(7):522-7.

Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly PA. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. Endocr Rev. 1998;19(3):225-68.

Bonauer A, Carmona G, Iwasaki M, Mione M, Koyanagi M, Fischer A, et al. MicroRNA-92a controls angiogenesis and functional recovery of ischemic tissues in mice. Science. 2009;324(5935):1710-3.

Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. Nat Struct Mol Biol. 2006;13(12):1097-101.

Bouasker S, Simard MJ. The slicing activity of miRNA-specific Argonautes is essential for the miRNA pathway in C. elegans. Nucleic Acids Res. 2012;40(20):10452-62.

Bouichou EH. Contribution à l'évaluation des pratiques frauduleuses dans le lait à la réception. 2009.

Boutinaud M, Guinard-Flamenta J, Jammes H. The number and activity of mammary epithelial cells, determining factors for milk production. Reprod Nutr Dev. 2004;44(5):499-508.

Brandsch C, Nass N, Eder K. A thermally oxidized dietary oil does not lower the activities of lipogenic enzymes in mammary glands of lactating rats but reduces the milk triglyceride concentration. J Nutr. 2004;134(3):631-6.

Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. Principles of microRNA-target recognition. PLoS Biol. 2005;3(3):e85.

Brueckner B, Stresemann C, Kuner R, Mund C, Musch T, Meister M, et al. The human let-7a-3 locus contains an epigenetically regulated microRNA gene with oncogenic function. Cancer Res. 2007;67(4):1419-23.

Bruno RD, Smith GH. Reprogramming non-mammary and cancer cells in the developing mouse mammary gland. Semin Cell Dev Biol. 2012;23(5):591-8.

Burge SW, Daub J, Eberhardt R, Tate J, Barquist L, Nawrocki EP, et al. Rfam 11.0: 10 years of RNA families. Nucleic Acids Res. 2013;41(Database issue):3.

Burgoyne RD, Duncan JS. Secretion of milk proteins. J Mammary Gland Biol Neoplasia. 1998;3(3):275-86.

Bushati N, Cohen SM. microRNA functions. Annu Rev Cell Dev Biol. 2007;23:175-205.

C

Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. Rna. 2004;10(12):1957-66.

Calado A, Treichel N, Muller EC, Otto A, Kutay U. Exportin-5-mediated nuclear export of eukaryotic elongation factor 1A and tRNA. Embo J. 2002;21(22):6216-24.

Callis TE, Pandya K, Seok HY, Tang RH, Tatsuguchi M, Huang ZP, et al. MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice. J Clin Invest. 2009;119(9):2772-86.

Capuco AV, Akers RM. Mammary involution in dairy animals. J Mammary Gland Biol Neoplasia. 1999;4(2):137-44.

Capuco AV, Akers RM, Smith JJ. Mammary growth in Holstein cows during the dry period: quantification of nucleic acids and histology. J Dairy Sci. 1997;80(3):477-87.

Capuco AV, Ellis S. Bovine mammary progenitor cells: current concepts and future directions. J Mammary Gland Biol Neoplasia. 2005;10(1):5-15.

Capuco AV, Wood DL, Baldwin R, McLeod K, Paape MJ. Mammary cell number, proliferation, and apoptosis during a bovine lactation: relation to milk production and effect of bST. J Dairy Sci. 2001;84(10):2177-87.

Carrer M, Liu N, Grueter CE, Williams AH, Frisard MI, Hulver MW, et al. Control of mitochondrial metabolism and systemic energy homeostasis by microRNAs 378 and 378*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012;109(38):15330-5.

Castro-Carrera T, Frutos P, Leroux C, Chilliard Y, Hervas G, Belenguer A, et al. Dietary sunflower oil modulates milk fatty acid composition without major changes in adipose and mammary tissue fatty acid profile or related gene mRNA abundance in sheep. Animal. 2015;9(4):582-91.

Cebo C. Milk Fat Globule Membrane Proteomics: A 'Snapshot' of Mammary Epithelial Cell Biology. Food Technol Biotechnol. 2012;50(3):306-14.

Cebo C, Lopez C, Henry C, Beauvallet C, Menard O, Bevilacqua C, et al. Goat alpha(s1)-casein genotype affects milk fat globule physicochemical properties and the composition of the milk fat globule membrane. J Dairy Sci. 2012;95(11):6215-29.

Chan SP, Slack FJ. And now introducing mammalian mirtrons. Dev Cell. 2007;13(5):605-7.

Chanat E, Martin P, Ollivier-Bousquet M. Alpha(S1)-casein is required for the efficient transport of beta- and kappa-casein from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus of mammary epithelial cells. J Cell Sci. 1999;112(Pt 19):3399-412.

Chatellier V, Lelyon B, Perrot C, You G. Le secteur laitier français à la croisée des chemins. INRA Productions animales. 2013;26(2):77-100.

Chatterjee S, Fasler M, Bussing I, Grosshans H. Target-mediated protection of endogenous microRNAs in C. elegans. Dev Cell. 2011;20(3):388-96.

Chatterjee S, Grosshans H. Active turnover modulates mature microRNA activity in Caenorhabditis elegans. Nature. 2009;461(7263):546-9.

Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. Nucleic Acids Res. 2005;33(20).

Chen CC, Sureshbabul M, Chen HW, Lin YS, Lee JY, Hong QS, et al. Curcumin Suppresses Metastasis via Sp-1, FAK Inhibition, and E-Cadherin Upregulation in Colorectal Cancer. Evid Based Complement Alternat Med. 2013;541695(10):21.

Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. Science. 2004;303(5654):83-6.

Chen L, Liu X, Li Z, Wang H, Liu Y, He H, et al. Expression differences of miRNAs and genes on NF-kappaB pathway between the healthy and the mastitis Chinese Holstein cows. Gene. 2014;545(1):117-25.

Chen X, Gao C, Li H, Huang L, Sun Q, Dong Y, et al. Identification and characterization of microRNAs in raw milk during different periods of lactation, commercial fluid, and powdered milk products. Cell Research. 2010;20:1128-7.

Chen Z, Luo J, Ma L, Wang H, Cao W, Xu H, et al. MiR130b-Regulation of PPARgamma Coactivator- 1alpha Suppresses Fat Metabolism in Goat Mammary Epithelial Cells. PLoS One. 2015;10(11):e0142809.

Chendrimada TP, Finn KJ, Ji X, Baillat D, Gregory RI, Liebhaber SA, et al. MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. Nature. 2007;447(7146):823-8.

Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Nishikura K, et al. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. Nature. 2005;436(7051):740-4.

Cheng AM, Byrom MW, Shelton J, Ford LP. Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. Nucleic Acids Res. 2005;33(4):1290-7.

Cheng HY, Papp JW, Varlamova O, Dziema H, Russell B, Curfman JP, et al. microRNA modulation of circadian-clock period and entrainment. Neuron. 2007;54(5):813-29.

Cherifi I. Impact de la signalisation constitutive du récepteur de la prolactine sur la physiopathologie mammaire. 1-157, Physiopathologie, Université Paris Descartes, 2014.

Chilliard Y, Bocquier F, Doreau M. Digestive and metabolic adaptations of ruminants to undernutrition, and consequences on reproduction. Reprod Nutr Dev. 1998;38(2):131-52.

Chilliard Y, Ferlay A. Dietary lipids and forages interactions on cow and goat milk fatty acid composition and sensory properties. Reprod Nutr Dev. 2004;44(5):467-92.

Chilliard Y, Ferlay A, Doreau M. Effect of different types of forages, animal fat or marine oils in cow's diet on milk fat secretion and composition, especially conjugated linoleic acid (Cla) and polyunsaturated fatty acids. Livestock Production Science. 2001;70:31-48.

Chilliard Y, Ferlay A, Mansbridge RM, Doreau M. Ruminant milk fat plasticity: Nutritional control of saturated, polyunsaturated, trans and conjugated fatty acids. Annales de Zootechnie. 2000;49:181-205.

Chilliard Y, Ferlay A, Rouel J, Lamberet G. A review of nutritional and physiological factors affecting goat milk lipid synthesis and lipolysis. J Dairy Sci. 2003;86(5):1751-70.

Chilliard Y, Glasser F, Ferlay A, Bernard L, Rouel J, Doreau M. Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat. European Journal of Lipid Science and Technology. 2007;109(8):828-55.

Chilliard Y, Rouel J, Ferlay A, Bernard L, Gaborit P, Raynal-Ljutovac K, et al. Optimising goat's milk and cheese fatty acid composition. IN Improving the Fat Content of Foods, C Williams and J Buttriss (Eds), Cambridge, Woodhead Publishing Ltd. 2006a:281-312.

Choudhry H, Catto JW. Epigenetic regulation of microRNA expression in cancer. Methods Mol Biol. 2011;676:165-84.

Christie WW. The effects of diet and other factors on the lipid composition of ruminant tissues and milk. Prog Lipid Res. 1979;17(3):245-77.

Cikaluk DE, Tahbaz N, Hendricks LC, DiMattia GE, Hansen D, Pilgrim D, et al. GERp95, a membrane-associated protein that belongs to a family of proteins involved in stem cell differentiation. Mol Biol Cell. 1999;10(10):3357-72.

Clegg RA, Barber MC, Pooley L, Ernens I, Larondelle Y, Travers MT. Milk fat synthesis and secretion: molecular and cellular aspects. Livest Prod Sci. 2001;70(1):3-14.

Clevenger CV, Gadd SL, Zheng J. New mechanisms for PRLr action in breast cancer. Trends Endocrinol Metab. 2009;20(5):223-9.

Cloonan N, Wani S, Xu Q, Gu J, Lea K, Heater S, et al. MicroRNAs and their isomiRs function cooperatively to target common biological pathways. Genome Biol. 2011;12(12):2011-12.

Clop A, Marcq F, Takeda H, Pirottin D, Tordoir X, Bibe B, et al. A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. Nat Genet. 2006;38(7):813-8.

Corl BA, Baumgard LH, Dwyer DA, Griinari JM, Phillips BS, Bauman DE. The role of Delta(9)-desaturase in the production of cis-9, trans-11 CLA. J Nutr Biochem. 2001;12(11):622-30.

Corl BA, Baumgard LH, Griinari JM, Delmonte P, Morehouse KM, Yurawecz MP, et al. Trans-7,cis-9 CLA is synthesized endogenously by delta9-desaturase in dairy cows. Lipids. 2002;37(7):681-8.

Coutinho LL, Matukumalli LK, Sonstegard TS, Van Tassell CP, Gasbarre LC, Capuco AV, et al. Discovery and profiling of bovine microRNAs from immune-related and embryonic tissues. Physiol Genomics. 2007;29(1):35-43.

Couvreur S, Hurtaud C. Le globule gras du lait: sécrétion, composition, fonctions et facteurs de variation. . INRA Productions animales. 2007;20(5):369-82.

Crepaldi P, Nicoloso L, Coizet B, Milanesi E, Pagnacco G, Fresi P, et al. Associations of acetyl-coenzyme A carboxylase alpha, stearoyl-coenzyme A desaturase, and lipoprotein lipase genes with dairy traits in Alpine goats. J Dairy Sci. 2013;96(3):1856-64.

Cui L, Zhou H, Zhao H, Zhou Y, Xu R, Xu X, et al. MicroRNA-99a induces G1-phase cell cycle arrest and suppresses tumorigenicity in renal cell carcinoma. BMC Cancer. 2012;12(546):1471-2407.

Cui Q, Yu Z, Pan Y, Purisima EO, Wang E. MicroRNAs preferentially target the genes with high transcriptional regulation complexity. Biochem Biophys Res Commun. 2007;352(3):733-8

Cui W, Li Q, Feng L, Ding W. MiR-126-3p regulates progesterone receptors and involves development and lactation of mouse mammary gland. Mol Cell Biochem. 2011;355(1-2):17-25.

D

Dalgleish DG. On the structural models of bovine casein micelles—review and possible improvements. Soft Matter. 2011;7(6):2265-72.

Dalgleish DG, Corredig M. The structure of the casein micelle of milk and its changes during processing. Annu Rev Food Sci Technol. 2012;3:449-67.

Davis BN, Hata A. Regulation of MicroRNA Biogenesis: A miRiad of mechanisms. Cell Commun Signal. 2009;7(18):7-18.

Davis BN, Hilyard AC, Nguyen PH, Lagna G, Hata A. Smad proteins bind a conserved RNA sequence to promote microRNA maturation by Drosha. Mol Cell. 2010;39(3):373-84.

Davis CL, Brown RE. Low-fat milk syndrome. IN Physiology of Digestion and Metabolism in Ruminants, AT Phillipson (Ed), Newcastle Upon. 1970:545-65.

de Kruif CG, Holt C. Casein micelle structure, functions and interactions. IN Advanced Dairy Chemistry 3 Vol 1, Fox PF, McSweeney PLH, editors Kluwer Academic; New York, NY. 2003:233–76.

de Kruif CG, Huppertz T, Urban VS, Petukhov AV. Casein micelles and their internal structure. Adv Colloid Interface Sci. 2012;172:36-52.

DeCastro AJ, Dunphy KA, Hutchinson J, Balboni AL, Cherukuri P, Jerry DJ, et al. MiR203 mediates subversion of stem cell properties during mammary epithelial differentiation via repression of DeltaNP63alpha and promotes mesenchymal-to-epithelial transition. Cell Death Dis. 2013;28(4):37.

Delouis C, Houdebine LM, Richard P. La lactation. IN La Reproduction chez les Mammifères et l'Homme, C Thibault and MC Levasseur, eds (Ellipses). 2001:580-610.

Deng JH, Deng P, Lin SL, Ying SY. Gene silencing in vitro and in vivo using intronic microRNAs. Methods Mol Biol. 2015:1538-5-20.

Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. Nature. 2004;432(7014):231-5.

Dessauge F, Lollivier V, Ponchon B, Bruckmaier R, Finot L, Wiart S, et al. Effects of nutrient restriction on mammary cell turnover and mammary gland remodeling in lactating dairy cows. J Dairy Sci. 2011;94(9):4623-35.

Desvergne B, Michalik L, Wahli W. Transcriptional regulation of metabolism. Physiol Rev. 2006;86(2):465-514.

Dews M, Homayouni A, Yu D, Murphy D, Sevignani C, Wentzel E, et al. Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster. Nat Genet. 2006;38(9):1060-5.

Dhahbi JM, Spindler SR, Atamna H, Yamakawa A, Boffelli D, Mote P, et al. 5' tRNA halves are present as abundant complexes in serum, concentrated in blood cells, and modulated by aging and calorie restriction. BMC Genomics. 2013;14(298):1471-2164.

Dhahbi JM, Spindler SR, Atamna H, Yamakawa A, Guerrero N, Boffelli D, et al. Deep sequencing identifies circulating mouse miRNAs that are functionally implicated in manifestations of aging and responsive to calorie restriction. Aging. 2013;5(2):130-41.

Diederichs S, Haber DA. Dual role for argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression. Cell. 2007;131(6):1097-108.

Dilda F, Gioia G, Pisani L, Restelli L, Lecchi C, Albonico F, et al. Escherichia coli lipopolysaccharides and Staphylococcus aureus enterotoxin B differentially modulate inflammatory microRNAs in bovine monocytes. Vet J. 2012;192(3):514-6.

Ding XC, Weiler J, Grosshans H. Regulating the regulators: mechanisms controlling the maturation of microRNAs. Trends Biotechnol. 2009;27(1):27-36.

DiRenzo J, Signoretti S, Nakamura N, Rivera-Gonzalez R, Sellers W, Loda M, et al. Growth factor requirements and basal phenotype of an immortalized mammary epithelial cell line. Cancer Res. 2002;62(1):89-98.

Dong Y, Xie M, Jiang Y, Xiao N, Du X, Zhang W, et al. Sequencing and automated whole-genome optical mapping of the genome of a domestic goat (Capra hircus). Nat Biotechnol. 2013;31(2):135-41.

Duan R, Pak C, Jin P. Single nucleotide polymorphism associated with mature miR-125a alters the processing of pri-miRNA. Hum Mol Genet. 2007;16(9):1124-31.

Dweep H, Sticht C, Pandey P, Gretz N. miRWalk--database: prediction of possible miRNA binding sites by "walking" the genes of three genomes. J Biomed Inform. 2011;44(5):839-47.

E

Easow G, Teleman AA, Cohen SM. Isolation of microRNA targets by miRNP immunopurification. Rna. 2007;13(8):1198-204.

Ebert MS, Neilson JR, Sharp PA. MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells. Nat Methods. 2007;4(9):721-6.

Ebert MS, Sharp PA. MicroRNA sponges: progress and possibilities. Rna. 2010;16(11):2043-50.

Eichhorn SW, Guo H, McGeary SE, Rodriguez-Mias RA, Shin C, Baek D, et al. mRNA destabilization is the dominant effect of mammalian microRNAs by the time substantial repression ensues. Mol Cell. 2014;56(1):104-15.

Elkayam E, Kuhn CD, Tocilj A, Haase AD, Greene EM, Hannon GJ, et al. The structure of human argonaute-2 in complex with miR-20a. Cell. 2012;150(1):100-10.

Elmen J, Lindow M, Silahtaroglu A, Bak M, Christensen M, Lind-Thomsen A, et al. Antagonism of microRNA-122 in mice by systemically administered LNA-antimiR leads to up-regulation of a large set of predicted target mRNAs in the liver. Nucleic Acids Res. 2008;36(4):1153-62.

Elsarraj HS, Hong Y, Valdez K, Carletti M, Salah SM, Raimo M, et al. A novel role of microRNA146b in promoting mammary alveolar progenitor cell maintenance. J Cell Sci. 2013;126(Pt 11):2446-58.

Elsik CG, Tellam RL, Worley KC, Gibbs RA, Muzny DM, Weinstock GM, et al. The genome sequence of taurine cattle: a window to ruminant biology and evolution. Science. 2009;324(5926):522-8.

Esau C, Davis S, Murray SF, Yu XX, Pandey SK, Pear M, et al. miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. Cell Metab. 2006;3(2):87-98.

Espenshade PJ, Hughes AL. Regulation of sterol synthesis in eukaryotes. Annu Rev Genet. 2007;41:401-27.

Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. Nat Rev Genet. 2011;12(12):861-74.

Eulalio A, Behm-Ansmant I, Schweizer D, Izaurralde E. P-body formation is a consequence, not the cause, of RNA-mediated gene silencing. Mol Cell Biol. 2007;27(11):3970-81.

F

Fabian MR, Sonenberg N, Filipowicz W. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. Annu Rev Biochem. 2010;79:351-79.

Falaleeva M, Stamm S. Processing of snoRNAs as a new source of regulatory non-coding RNAs: snoRNA fragments form a new class of functional RNAs. Bioessays. 2013;35(1):46-54.

Farazi TA, Horlings HM, Ten Hoeve JJ, Mihailovic A, Halfwerk H, Morozov P, et al. MicroRNA sequence and expression analysis in breast tumors by deep sequencing. Cancer Res. 2011;71(13):4443-53.

Fatima A, Morris DG. MicroRNAs in domestic livestock. Physiol Genomics. 2013;45(16):685-96.

Faucon F, Rebours E, Bernard L, Hurtaud C, Miranda G, Menard O, et al. Effet du polymorphisme (AA/GC) au locus DGAT1 sur l'activité transcriptionnelle du tissu mammaire bovin, sur la composition du lait et sur les caractéristiques des globules gras et des micelles de caséines. Rencontre autour des Recherches sur les Ruminants. 2008;435-438.

Faulconnier Y, Roy A, Ferlay A, Chardigny JM, Durand D, Lorenz S, et al. Effect of dietary supply of butters rich either in trans-10-18 : 1 or in trans-11-18 : 1 plus cis-9, trans-11-18 : 2 on rabbit adipose tissue and liver lipogenic activities. Br J Nutr. 2006;96(3):461-8.

Faulkner A, Peaker M. Regulation of mammary glucose metabolism in lactation. IN The Mammary Gland, Development, Regulation and Function, Neville MC, editor Plenum Press, New York. 1987;536-562.

Feldman JD. Fine structure of the cow's udder during gestation and lactation. Lab Invest. 1961;10:238-55.

Feng Y, Manka D, Wagner KU, Khan SA. Estrogen receptor-alpha expression in the mammary epithelium is required for ductal and alveolar morphogenesis in mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104(37):14718-23.

Feng Z, Marti A, Jehn B, Altermatt HJ, Chicaiza G, Jaggi R. Glucocorticoid and progesterone inhibit involution and programmed cell death in the mouse mammary gland. J Cell Biol. 1995;131(4):1095-103.

Fernandez-Hernando C, Ramirez CM, Goedeke L, Suarez Y. MicroRNAs in Metabolic Disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2013;33(2):178-85.

Fernandez-Hernando C, Suarez Y, Rayner KJ, Moore KJ. MicroRNAs in lipid metabolism. Curr Opin Lipidol. 2011;22(2):86-92.

Feuermann Y, Robinson GW, Zhu BM, Kang K, Raviv N, Yamaji D, et al. The miR-17/92 cluster is targeted by STAT5 but dispensable for mammary development. Genesis. 2012;50(9):665-71.

Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? Nat Rev Genet. 2008;9(2):102-14.
Filippov V, Solovyev V, Filippova M, Gill SS. A novel type of RNase III family proteins in eukaryotes. Gene. 2000;245(1):213-21.

Finnegan EF, Pasquinelli AE. MicroRNA biogenesis: regulating the regulators. Crit Rev Biochem Mol Biol. 2013;48(1):51-68.

Finucane KA, McFadden TB, Bond JP, Kennelly JJ, Zhao FQ. Onset of lactation in the bovine mammary gland: gene expression profiling indicates a strong inhibition of gene expression in cell proliferation. Funct Integr Genomics. 2008;8(3):251-64.

Fischer S, Wagner A, Kos A, Aschrafi A, Handrick R, Hannemann J, et al. Breaking limitations of complex culture media: functional non-viral miRNA delivery into pharmaceutical production cell lines. J Biotechnol. 2013;168(4):589-600.

Flint DJ, Knight CH. Interactions of prolactin and growth hormone (GH) in the regulation of mammary gland function and epithelial cell survival. J Mammary Gland Biol Neoplasia. 1997;2(1):41-8.

Forman JJ, Legesse-Miller A, Coller HA. A search for conserved sequences in coding regions reveals that the let-7 microRNA targets Dicer within its coding sequence. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105(39):14879-84.

Forstemann K, Tomari Y, Du T, Vagin VV, Denli AM, Bratu DP, et al. Normal microRNA maturation and germ-line stem cell maintenance requires Loquacious, a double-stranded RNA-binding domain protein. PLoS Biol. 2005;3(7):24.

Fortin KR, Nicholson RH, Nicholson AW. Mouse ribonuclease III. cDNA structure, expression analysis, and chromosomal location. BMC Genomics. 2002;3(1):26.

Fortunato D, Giuffrida MG, Cavaletto M, Garoffo LP, Dellavalle G, Napolitano L, et al. Structural proteome of human colostral fat globule membrane proteins. Proteomics. 2003;3(6):897-905.

Fournier M. Les discours anti-lait, entre éthique et diététique. Essai d'interprétation d'hypermodernes attitudes. Presses Universitaires Blaise Pascal. 2013:372-90.

Franke WW, Luder MR, Kartenbeck J, Zerban H, Keenan TW. Involvement of vesicle coat material in casein secretion and surface regeneration. J Cell Biol. 1976;69(1):173-95.

Frey KG, Herrera-Galeano JE, Redden CL, Luu TV, Servetas SL, Mateczun AJ, et al. Comparison of three next-generation sequencing platforms for metagenomic sequencing and identification of pathogens in blood. BMC Genomics. 2014;15(96):1471-2164.

Friedlander MR, Chen W, Adamidi C, Maaskola J, Einspanier R, Knespel S, et al. Discovering microRNAs from deep sequencing data using miRDeep. Nat Biotechnol. 2008;26(4):407-15.

Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. Genome Res. 2009;19(1):92-105.

Frost RJ, Olson EN. Control of glucose homeostasis and insulin sensitivity by the Let-7 family of microRNAs. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108(52):21075-80.

Furukawa N, Sakurai F, Katayama K, Seki N, Kawabata K, Mizuguchi H. Optimization of a microRNA expression vector for function analysis of microRNA. J Control Release. 2011;150(1):94-101.

G

Gaj S, Eijssen L, Mensink RP, Evelo CT. Validating nutrient-related gene expression changes from microarrays using RT(2) PCR-arrays. Genes Nutr. 2008;3(3-4):153-7.

Galio L, Droineau S, Yeboah P, Boudiaf H, Bouet S, Truchet S, et al. microRNA in the ovine mammary gland during early pregnancy: spatial and temporal expression of miR-21, miR-205 and miR-200. Physiol Genomics. 2012;45(4):151-61.

Gangaraju VK, Lin H. MicroRNAs: key regulators of stem cells. Nat Rev Mol Cell Biol. 2009;10(2):116-25.

Gantier MP, McCoy CE, Rusinova I, Saulep D, Wang D, Xu D, et al. Analysis of microRNA turnover in mammalian cells following Dicer1 ablation. Nucleic Acids Res. 2011;39(13):5692-703.

Gao FB. Context-dependent functions of specific microRNAs in neuronal development. Neural Dev. 2010;5(25):1749-8104.

Georges M, Clop A, Marcq F, Takeda H, Pirottin D, Hiard S, et al. Polymorphic microRNA-target interactions: a novel source of phenotypic variation. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 2006;71:343-50.

Georges M, Coppieters W, Charlier C. Polymorphic miRNA-mediated gene regulation: contribution to phenotypic variation and disease. Curr Opin Genet Dev. 2007;17(3):166-76.

Gerin I, Clerbaux LA, Haumont O, Lanthier N, Das AK, Burant CF, et al. Expression of miR-33 from an SREBP2 intron inhibits cholesterol export and fatty acid oxidation. J Biol Chem. 2010;285(44):33652-61.

German JB, Morand C, Dillard CJ, Xu R. Milk fat composition: Targets for alteration of function and nutrition. IN Milk Composition, Production and Biotechnology , R A S Welch, D J W Burns, S R Davis,A I Popay, and C G Prosser (Eds), New York: CAB International. 1997:39-72.

Gibbings DJ, Ciaudo C, Erhardt M, Voinnet O. Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. Nat Cell Biol. 2009;11(9):1143-9.

Gigli I, Maizon DO. microRNAs and the mammary gland: A new understanding of gene expression. Genet Mol Biol. 2013;36(4):465-74.

Givens DI. Milk and meat in our diet: good or bad for health? Animal. 2010;4(12):1941-52.

Glazov EA, Kongsuwan K, Assavalapsakul W, Horwood PF, Mitter N, Mahony TJ. Repertoire of bovine miRNA and miRNA-like small regulatory RNAs expressed upon viral infection. PLoS One. 2009;4(7):0006349.

Greco SJ, Rameshwar P. MicroRNAs regulate synthesis of the neurotransmitter substance P in human mesenchymal stem cell-derived neuronal cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104(39):15484-9.

Green H, Kehinde O. An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. Cell. 1975;5(1):19-27.

Greene SB, Gunaratne PH, Hammond SM, Rosen JM. A putative role for microRNA-205 in mammary epithelial cell progenitors. J Cell Sci. 2010;123(Pt 4):606-18.

Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, et al. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. Nature. 2004;432(7014):235-40.

Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. Nucleic Acids Res. 2006;34(Database issue):D140-4.

Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ. miRBase: tools for microRNA genomics. Nucleic Acids Res. 2008;36(Database issue):8.

Griinari JM, Corl BA, Lacy SH, Chouinard PY, Nurmela KV, Bauman DE. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by Delta(9)-desaturase. J Nutr. 2000;130(9):2285-91.

Grimson A, Farh KK, Johnston WK, Garrett-Engele P, Lim LP, Bartel DP. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. Mol Cell. 2007;27(1):91-105.

Grisart B, Coppieters W, Farnir F, Karim L, Ford C, Berzi P, et al. Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: identification of a missense mutation in the bovine DGAT1 gene with major effect on milk yield and composition. Genome Res. 2002;12(2):222-31.

Grisart B, Farnir F, Karim L, Cambisano N, Kim JJ, Kvasz A, et al. Genetic and functional confirmation of the causality of the DGAT1 K232A quantitative trait nucleotide in affecting milk yield and composition. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101(8):2398-403.

Grosclaude F, Ricordeau G, Martin P, Remeuf F, Vassal L, Bouillon J. Du gène au fromage: le polymorphisme de la caséine alpha s1 caprine, ses effets, son évolution. INRA Productions animales. 1994;7:3-19.

Gwizdek C, Ossareh-Nazari B, Brownawell AM, Doglio A, Bertrand E, Macara IG, et al. Exportin-5 mediates nuclear export of minihelix-containing RNAs. J Biol Chem. 2003;278(8):5505-8.

H

Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. Nat Rev Mol Cell Biol. 2014;15(8):509-24.

Haase AD, Jaskiewicz L, Zhang H, Laine S, Sack R, Gatignol A, et al. TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing. EMBO Rep. 2005;6(10):961-7.

Hackenberg M, Sturm M, Langenberger D, Falcon-Perez JM, Aransay AM. miRanalyzer: a microRNA detection and analysis tool for next-generation sequencing experiments. Nucleic Acids Res. 2009;37(Web Server issue):11.

Hafner M, Renwick N, Brown M, Mihailovic A, Holoch D, Lin C, et al. RNA-ligase-dependent biases in miRNA representation in deep-sequenced small RNA cDNA libraries. RNA. 2011;17(9):1697-712.

Haley B, Zamore PD. Kinetic analysis of the RNAi enzyme complex. Nat Struct Mol Biol. 2004;11(7):599-606.

Hammond SM, Boettcher S, Caudy AA, Kobayashi R, Hannon GJ. Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. Science. 2001;293(5532):1146-50.

Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK, Jin H, Kim VN. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. Genes Dev. 2004;18(24):3016-27.

Han J, Lee Y, Yeom KH, Nam JW, Heo I, Rhee JK, et al. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. Cell. 2006;125(5):887-901.

Han J, Pedersen JS, Kwon SC, Belair CD, Kim YK, Yeom KH, et al. Posttranscriptional crossregulation between Drosha and DGCR8. Cell. 2009;136(1):75-84.

Harvatine KJ, Bauman DE. SREBP1 and thyroid hormone responsive spot 14 (S14) are involved in the regulation of bovine mammary lipid synthesis during diet-induced milk fat depression and treatment with CLA. J Nutr. 2006;136(10):2468-74.

Hausser J, Zavolan M. Identification and consequences of miRNA-target interactions--beyond repression of gene expression. Nat Rev Genet. 2014;15(9):599-612.

Havens MA, Reich AA, Duelli DM, Hastings ML. Biogenesis of mammalian microRNAs by a non-canonical processing pathway. Nucleic Acids Res. 2012;40(10):4626-40.

He A, Zhu L, Gupta N, Chang Y, Fang F. Overexpression of micro ribonucleic acid 29, highly up-regulated in diabetic rats, leads to insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. Molecular Endocrinology. 2007;21(11):2785-94.

He L, He X, Lowe SW, Hannon GJ. microRNAs join the p53 network--another piece in the tumour-suppression puzzle. Nat Rev Cancer. 2007;7(11):819-22.

He L, Thomson JM, Hemann MT, Hernando-Monge E, Mu D, Goodson S, et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. Nature. 2005;435(7043):828-33.

Henke JI, Goergen D, Zheng J, Song Y, Schuttler CG, Fehr C, et al. microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. Embo J. 2008;27(24):3300-10.

Hennighausen L, Robinson GW. Signaling pathways in mammary gland development. Dev Cell. 2001;1(4):467-75.

Heo I, Joo C, Cho J, Ha M, Han J, Kim VN. Lin28 mediates the terminal uridylation of let-7 precursor MicroRNA. Mol Cell. 2008;32(2):276-84.

Herrera BM, Lockstone HE, Taylor JM, Ria M, Barrett A, Collins S, et al. Global microRNA expression profiles in insulin target tissues in a spontaneous rat model of type 2 diabetes. Diabetologia. 2010;53(6):1099-109.

Hoden A, Coulon JB. Maîtrise de la composition du lait : influence des facteurs nutritionnels sur la quantité et les taux de matières grasses et protéiques. INRA Productions animales. 1991;4(5):361-7.

Hoekstra M, van der Sluis RJ, Kuiper J, Van Berkel TJ. Nonalcoholic fatty liver disease is associated with an altered hepatocyte microRNA profile in LDL receptor knockout mice. J Nutr Biochem. 2012;23(6):622-8.

Holst BD, Hurley WL, Nelson DR. Involution of the bovine mammary gland: histological and ultrastructural changes. J Dairy Sci. 1987;70(5):935-44.

Holt C. The size distribution of bovine casein micelles: A review. Food Microstructure. 1985;4:1-10.

Horie T, Baba O, Kuwabara Y, Yokode M, Kita T, Kimura T, et al. MicroRNAs and Lipoprotein Metabolism. J Atheroscler Thromb. 2014;21(1):17-22.

Horne DS. Casein micelle structure: Models and muddles. Current Opinion in Colloid & Interface Science. 2006;11(2-3):148-53.

Hou J, An X, Song Y, Gao T, Lei Y, Cao B. Two Mutations in the Caprine MTHFR 3'UTR Regulated by MicroRNAs Are Associated with Milk Production Traits. PLoS One. 2015;10(7) :e0133015.

Houdebine LM. Contrôle hormonal du développement et de l'activité de la glande mammaire. Reproduction Nutrition Développement. 1986;26(2B):523-41.

Houdebine LM. Biologie de la lactation. IN Gynécologie/Obstétrique, Elsevier Masson SAS, Paris. 2007:1-22.

Howard KM, Jati Kusuma R, Baier SR, Friemel T, Markham L, Vanamala J, et al. Loss of miRNAs during processing and storage of cow's (Bos taurus) milk. J Agric Food Chem. 2015;63(2):588-92.

Hu W, Sweet TJ, Chamnongpol S, Baker KE, Coller J. Co-translational mRNA decay in Saccharomyces cerevisiae. Nature. 2009;461(7261):225-9.

Hu Y, Zhu Q, Tang L. MiR-99a antitumor activity in human breast cancer cells through targeting of mTOR expression. PLoS One. 2014;9(3):e92099.

Huang J, Ju Z, Li Q, Hou Q, Wang C, Li J, et al. Solexa sequencing of novel and differentially expressed microRNAs in testicular and ovarian tissues in Holstein cattle. Int J Biol Sci. 2011;7(7):1016-26.

Hube F, Francastel C. Mammalian introns: when the junk generates molecular diversity. Int J Mol Sci. 2015;16(3):4429-52.

Humphreys DT, Westman BJ, Martin DI, Preiss T. MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102(47):16961-6.

Husveth F. Chapter 14. Mammary gland and Lactation. IN Physiological and Reproductional Aspects Of Animal Production. 2011.

Huynh HT, Robitaille G, Turner JD. Establishment of bovine mammary epithelial cells (MAC-T): an in vitro model for bovine lactation. Exp Cell Res. 1991;197(2):191-9.

Hwang MS, Yu N, Stinson SY, Yue P, Newman RJ, Allan BB, et al. miR-221/222 Targets Adiponectin Receptor 1 to Promote the Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Breast Cancer. PLoS One. 2013;8(6).

I

Ibarra I, Erlich Y, Muthuswamy SK, Sachidanandam R, Hannon GJ. A role for microRNAs in maintenance of mouse mammary epithelial progenitor cells. Genes Dev. 2007;21(24):3238-43.

Iliopoulos D, Drosatos K, Hiyama Y, Goldberg IJ, Zannis VI. MicroRNA-370 controls the expression of microRNA-122 and Cpt1alpha and affects lipid metabolism. J Lipid Res. 2010;51(6):1513-23.

Imbert A. Analyse des relations entre deux ensembles de variables issues d'approches haut-débit. Statistique, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand 2015.

Ip C, Banni S, Angioni E, Carta G, McGinley J, Thompson HJ, et al. Conjugated linoleic acid-enriched butter fat alters mammary gland morphogenesis and reduces cancer risk in rats. J Nutr. 1999;129(12):2135-42.

Iwasaki YW, Kiga K, Kayo H, Fukuda-Yuzawa Y, Weise J, Inada T, et al. Global microRNA elevation by inducible Exportin 5 regulates cell cycle entry. Rna. 2013;19(4):490-7.

Iwasaki YW, Siomi MC, Siomi H. PIWI-Interacting RNA: Its Biogenesis and Functions. Annu Rev Biochem. 2015;84:405-33.

Izumi H, Kosaka N, Shimizu T, Sekine K, Ochiya T, Takase M. Bovine milk contains microRNA and messenger RNA that are stable under degradative conditions. J Dairy Sci. 2012;95(9):4831-41.

Izzotti A, Cartiglia C, Steele VE, De Flora S. MicroRNAs as targets for dietary and pharmacological inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. Mutation Research. 2012;751(2):287-03.

J

Jabed A, Wagner S, McCracken J, Wells DN, Laible G. Targeted microRNA expression in dairy cattle directs production of β--lactoglobulin-free, high casein milk. Proc Natl Acad Sci USA. 2012;109(42):16811-6.

Jackowiak P, Nowacka M, Strozycki PM, Figlerowicz M. RNA degradome--its biogenesis and functions. Nucleic Acids Res. 2011;39(17):7361-70.

Jammes H, Djiane J. Le développement de la glande mammaire et son contrôle hormonal dans l'espèce bovine. INRA Productions animales. 1988;1(5):299-310.
Janas MM, Khaled M, Schubert S, Bernstein JG, Golan D, Veguilla RA, et al. Feed-forward microprocessing and splicing activities at a microRNA-containing intron. PLoS Genet. 2011;7(10):20.

Jansson MD, Lund AH. MicroRNA and cancer. Mol Oncol. 2012;6(6):590-610.

Jenness R. Proceedings: Biosynthesis and composition of milk. J Invest Dermatol. 1974;63(1):109-18.

Jenness R. Lactational Performance of Various Mammalian Species. J Dairy Sci. 1986;69(3):869-85.

Jensen RG. The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. J Dairy Sci. 2002;85(2):295-350.

Jeon TI, Esquejo RM, Roqueta-Rivera M, Phelan PE, Moon YA, Govindarajan SS, et al. An SREBP-responsive microRNA operon contributes to a regulatory loop for intracellular lipid homeostasis. Cell Metab. 2013;18(1):51-61.

Ji Z, Wang G, Xie Z, Wang J, Zhang C, Dong F, et al. Identification of novel and differentially expressed MicroRNAs of dairy goat mammary gland tissues using solexa sequencing and bioinformatics. PLoS One. 2012;7(11):14.

Ji Z, Wang G, Xie Z, Zhang C, Wang J. Identification and characterization of microRNA in the dairy goat (Capra hircus) mammary gland by solexa deep-sequencing technology. Mol Biol Rep. 2012;39:9361-71.

Jin W, Ibeagha-Awemu EM, Liang G, Beaudoin F, Zhao X, Guan le L. Transcriptome microRNA profiling of bovine mammary epithelial cells challenged with Escherichia coli or Staphylococcus aureus bacteria reveals pathogen directed microRNA expression profiles. BMC Genomics. 2014;15(181):1471-2164.

Jinek M, Doudna JA. A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. Nature. 2009;457(7228):405-12.

Jing L, Hou Y, Wu H, Miao Y, Li X, Cao J, et al. Transcriptome analysis of mRNA and miRNA in skeletal muscle indicates an important network for differential Residual Feed Intake in pigs. Sci Rep. 2015;5(11953).

John B, Enright AJ, Aravin A, Tuschl T, Sander C, Marks DS. Human MicroRNA targets. PLoS Biol. 2004;2(11):5.

Jonas S, Izaurralde E. Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. Nat Rev Genet. 2015;16(7):421-33.

Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Bartel B. MicroRNAS and their regulatory roles in plants. Annu Rev Plant Biol. 2006;57:19-53.

Jopling CL, Schutz S, Sarnow P. Position-dependent function for a tandem microRNA miR-122-binding site located in the hepatitis C virus RNA genome. Cell Host Microbe. 2008;4(1):77-85.

Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, Lemon SM, Sarnow P. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. Science. 2005;309(5740):1577-81.

Jorgensen S, Baker A, Moller S, Nielsen BS. Robust one-day in situ hybridization protocol for detection of microRNAs in paraffin samples using LNA probes. Methods. 2010;52(4):375-81.

Joshi PA, Di Grappa MA, Khokha R. Active allies: hormones, stem cells and the niche in adult mammopoiesis. Trends Endocrinol Metab. 2012;23(6):299-309.

Josson S, Gururajan M, Sung SY, Hu P, Shao C, Zhau HE, et al. Stromal fibroblast-derived miR-409 promotes epithelial-to-mesenchymal transition and prostate tumorigenesis. Oncogene. 2015;34(21):2690-9.

K

Kadegowda AK, Bionaz M, Piperova LS, Erdman RA, Loor JJ. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation and long-chain fatty acids alter lipogenic gene networks in bovine mammary epithelial cells to various extents. J Dairy Sci. 2009;92(9):4276-89.

Kadener S, Rodriguez J, Abruzzi KC, Khodor YL, Sugino K, Marr MT, 2nd, et al. Genome-wide identification of targets of the drosha-pasha/DGCR8 complex. Rna. 2009;15(4):537-45.

Kaipparettu BA, Malik S, Konduri SD, Liu W, Rokavec M, van der Kuip H, et al. Estrogen-mediated downregulation of CD24 in breast cancer cells. Int J Cancer. 2008;123(1):66-72.

Kalkwarf HJ. Hormonal and dietary regulation of changes in bone density during lactation and after weaning in women. J Mammary Gland Biol Neoplasia. 1999;4(3):319-29.

Kansal VK, Sharma R, Rehan G. Characterization of anionic amino acid transport systems in mouse mammary gland. Indian J Exp Biol. 2000;38(11):1097-103.

Karaiskos S, Naqvi AS, Swanson KE, Grigoriev A. Age-driven modulation of tRNA-derived fragments in Drosophila and their potential targets. Biol Direct. 2015;10(1):015-0081.

Karere GM, Glenn JP, VandeBerg JL, Cox LA. Differential microRNA response to a high-cholesterol, high-fat diet in livers of low and high LDL-C baboons. BMC Genomics. 2012;13(320):1471-2164.

Katoh T, Sakaguchi Y, Miyauchi K, Suzuki T, Kashiwabara S, Baba T, et al. Selective stabilization of mammalian microRNAs by 3' adenylation mediated by the cytoplasmic poly(A) polymerase GLD-2. Genes Dev. 2009;23(4):433-8.

Kawahara Y, Megraw M, Kreider E, Iizasa H, Valente L, Hatzigeorgiou AG, et al. Frequency and fate of microRNA editing in human brain. Nucleic Acids Res. 2008;36(16):5270-80.

Kedersha N, Stoecklin G, Ayodele M, Yacono P, Lykke-Andersen J, Fritzler MJ, et al. Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. J Cell Biol. 2005;169(6):871-84.

Keenan TW, Mather IH. Intracellular Origin of Milk Fat Globules and the Nature of the Milk Fat Globule Membrane. IN Advanced Dairy Chemistry Volume 2 Lipids. 2006:137-71.

Kennelly JJ. The fatty acid composition of milk fat as influenced by feeding oilseeds. Animal Feed Science and Technology. 1996;60(3-4):137-52.

Kertesz M, Iovino N, Unnerstall U, Gaul U, Segal E. The role of site accessibility in microRNA target recognition. Nat Genet. 2007;39(10):1278-84.

Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. Cell. 2003;115(2):209-16.

Kida K, Nakajima M, Mohri T, Oda Y, Takagi S, Fukami T, et al. PPARalpha is regulated by miR-21 and miR-27b in human liver. Pharm Res. 2011;28(10):2467-76.

Kim da S, Lee SY, Lee JH, Bae YC, Jung JS. MicroRNA-103a-3p controls proliferation and osteogenic differentiation of human adipose tissue-derived stromal cells. Exp Mol Med. 2015;10(47):39.

Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, King JE, Latek RR, Erdjument-Bromage H, et al. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. Cell. 2002;110(2):163-75.

Kim J, Krichevsky A, Grad Y, Hayes GD, Kosik KS, Church GM, et al. Identification of many microRNAs that copurify with polyribosomes in mammalian neurons. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101(1):360-5.

Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. Nat Rev Mol Cell Biol. 2009;10(2):126-39.

Kim YK, Kim VN. Processing of intronic microRNAs. Embo J. 2007;26(3):775-83.

Kimball SR, Jefferson LS. New functions for amino acids: effects on gene transcription and translation. Am J Clin Nutr. 2006;83(2):500S-7S.

Kinsella JE. Stearic acid metabolism by mammary cells. J Dairy Sci. 1970;53(12):1757-65.

Klein I, Sarkadi B, Varadi A. An inventory of the human ABC proteins. Biochim Biophys Acta. 1999;6(2):237-62.

Kloosterman WP, Wienholds E, de Bruijn E, Kauppinen S, Plasterk RH. In situ detection of miRNAs in animal embryos using LNA-modified oligonucleotide probes. Nat Methods. 2006;3(1):27-9.

Kloosterman WP, Wienholds E, Ketting RF, Plasterk RH. Substrate requirements for let-7 function in the developing zebrafish embryo. Nucleic Acids Res. 2004;32(21):6284-91.

Knight CH, Docherty AH, Peaker M. Milk yield in rats in relation to activity and size of the mammary secretory cell population. J Dairy Res. 1984;51(1):29-35.

Knight CH, Peaker M. Mammary development and regression during lactation in goats in relation to milk secretion. Q J Exp Physiol. 1984;69(2):331-8.

Knudsen J, Neergaard TB, Gaigg B, Jensen MV, Hansen JK. Role of acyl-CoA binding protein in acyl-CoA metabolism and acyl-CoA-mediated cell signaling. J Nutr. 2000;130(2S Suppl):294S-8S.

Kong W, Yang H, He L, Zhao JJ, Coppola D, Dalton WS, et al. MicroRNA-155 is regulated by the transforming growth factor beta/Smad pathway and contributes to epithelial cell plasticity by targeting RhoA. Mol Cell Biol. 2008;28(22):6773-84.

Kontopidis G, Holt C, Sawyer L. The ligand-binding site of bovine beta-lactoglobulin: evidence for a function? J Mol Biol. 2002;318(4):1043-55.

Kontopidis G, Holt C, Sawyer L. Invited review: beta-lactoglobulin: binding properties, structure, and function. J Dairy Sci. 2004;87(4):785-96.

Kosaka N, Izumi H, Sekine K, Ochiya T. microRNA as a new immune-regulatory agent in breast milk. Silence. 2010;1(1):7.

Kowalczyk MS, Higgs DR, Gingeras TR. Molecular biology: RNA discrimination. Nature. 2012;482(7385):310-1.

Kozlowski M, Wilczak J, Motyl T, Gajewska M. Role of extracellular matrix and prolactin in functional differentiation of bovine BME-UV1 mammary epithelial cells. Pol J Vet Sci. 2011;14(3):433-42.

Krek A, Grun D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, Epstein EJ, et al. Combinatorial microRNA target predictions. Nat Genet. 2005;37(5):495-500.

Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. Nat Rev Genet. 2010;11(9):597-610.

Kropp J, Khatib H. Characterization of microRNA in bovine in vitro culture media associated with embryo quality and development. J Dairy Sci. 2015;1(15):00455-5.

Kruger J, Rehmsmeier M. RNAhybrid: microRNA target prediction easy, fast and flexible. Nucleic Acids Res. 2006;34(Web Server issue):W451-4.

Kuhnert F, Mancuso MR, Hampton J, Stankunas K, Asano T, Chen CZ, et al. Attribution of vascular phenotypes of the murine Egfl7 locus to the microRNA miR-126. Development. 2008;135(24):3989-93.

Kusenda B, Mraz M, Mayer J, Pospisilova S. MicroRNA biogenesis, functionality and cancer relevance. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2006;150(2):205-15.

L

Ladewig E, Okamura K, Flynt AS, Westholm JO, Lai EC. Discovery of hundreds of mirtrons in mouse and human small RNA data. Genome Res. 2012;22(9):1634-45.

Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. Science. 2001;294(5543):853-8.

Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. Curr Biol. 2002;12(9):735-9.

Lamote I, Meyer E, Massart-Leen AM, Burvenich C. Sex steroids and growth factors in the regulation of mammary gland proliferation, differentiation, and involution. Steroids. 2004;69(3):145-59.

Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, Sewer A, Iovino N, Aravin A, et al. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. Cell. 2007;129(7):1401-14.

Landthaler M, Yalcin A, Tuschl T. The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and Its D. melanogaster homolog are required for miRNA biogenesis. Curr Biol. 2004;14(23):2162-7.

Lanet E, Delannoy E, Sormani R, Floris M, Brodersen P, Crete P, et al. Biochemical evidence for translational repression by Arabidopsis microRNAs. Plant Cell. 2009;21(6):1762-8.

Laubier J, Castille J, Le Guillou S, Le Provost F. No effect of an elevated miR-30b level in mouse milk on its level in pup tissues. RNA Biol. 2015;12(1):26-9.

Lawless N, Foroushani AB, McCabe MS, O'Farrelly C, Lynn DJ. Next generation sequencing reveals the expression of a unique miRNA profile in response to a gram-positive bacterial infection. PLoS One. 2013;8(3):5.

Le Guillou S, Sdassi N, Laubier J, Passet B, Vilotte M, Castille J, et al. Overexpression of miR-30b in the developing mouse mammary gland causes a lactation defect and delays involution. PLoS One. 2012;7(9):e45727.

Lee IH, Hong X, Mathur SC, Sharma M, Rastogi A, Sharma P, et al. A detailed analysis of next generation sequencing reads of microRNA expression in Barrett's esophagus: absolute versus relative quantification. BMC Res Notes. 2014;7(212):1756-0500.

Lee LW, Zhang S, Etheridge A, Ma L, Martin D, Galas D, et al. Complexity of the microRNA repertoire revealed by next-generation sequencing. Rna. 2010;16(11):2170-80.

Lee MJ, Yoon KS, Cho KW, Kim KS, Jung HS. Expression of miR-206 during the initiation of mammary gland development. Cell Tissue Res. 2013;353(3):425-33.

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. Cell. 1993;75(5):843-54.

Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. Nature. 2003;425(6956):415-9.

Lee Y, Han J, Yeom KH, Jin H, Kim VN. Drosha in primary microRNA processing. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 2006;71:51-7.

Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. Embo J. 2002;21(17):4663-70.

Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. Embo J. 2004;23(20):4051-60.

Lee YS, Nakahara K, Pham JW, Kim K, He Z, Sontheimer EJ, et al. Distinct roles for Drosophila Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. Cell. 2004;117(1):69-81.

Lee YS, Pressman S, Andress AP, Kim K, White JL, Cassidy JJ, et al. Silencing by small RNAs is linked to endosomal trafficking. Nat Cell Biol. 2009;11(9):1150-6.

Lehner R, Kuksis A. Biosynthesis of triacylglycerols. Prog Lipid Res. 1996;35(2):169-201.

Léonil J, Michalski MC, Martin P. Les structures supramoléculaires du lait: structure et impact nutritionnel de la micelle de caséine et du globule gras. . INRA Productions animales. 2013;26(2):129-44.

Leroux C, Bernard L, Faulconnier Y, Rouel J, de la Foye A, Rouel J, Domagalski J, et al. Bovine mammary nutrigenomics and changes in the milk composition due to rapeseed or sunflower oil supplementation of high-forage or high-concentrate diets. Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics. Submitted.

Leung AK, Calabrese JM, Sharp PA. Quantitative analysis of Argonaute protein reveals microRNA-dependent localization to stress granules. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103(48):18125-30.

Leung AK, Sharp PA. Function and localization of microRNAs in mammalian cells. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 2006;71:29-38.

Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets: Cell. 2005 Jan 14;120(1):15-20.; 2005.

Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. Cell. 2003;115(7):787-98.

Li D, Xie X, Wang J, Bian Y, Li Q, Gao X, et al. MiR-486 regulates lactation and targets the PTEN gene in cow mammary glands. PLoS One. 2015;10(3):e0118284.

Li H, Zhang Z, Zhou X, Wang Z, Wang G, Han Z. Effects of microRNA-143 in the differentiation and proliferation of bovine intramuscular preadipocytes. Mol Biol Rep. 2011;38(7):4273-80.

Li HM, Wang CM, Li QZ, Gao XJ. Mir-15a decreases bovine mammary epithelial cell viability and lactation and regulates growth receptor expression. Molecules. 2012;17(10):12037-48.

Li L, Huang J, Zhang X, Ju Z, Qi C, Zhang Y, et al. One SNP in the 3'-UTR of HMGB1 gene affects the binding of target bta-miR-223 and is involved in mastitis in dairy cattle. Immunogenetics. 2012;64(11):817-24.

Li QL, Ju ZH, Huang JM, Li JB, Li RL, Hou MH, et al. Two novel SNPs in HSF1 gene are associated with thermal tolerance traits in Chinese Holstein cattle. DNA Cell Biol. 2011;30(4):247-54.

Li R, Zhang CL, Liao XX, Chen D, Wang WQ, Zhu YH, et al. Transcriptome microRNA profiling of bovine mammary glands infected with Staphylococcus aureus. Int J Mol Sci. 2015;16(3):4997-5013.

Li Z, Lan X, Guo W, Sun J, Huang Y, Wang J, et al. Comparative transcriptome profiling of dairy goat microRNAs from dry period and peak lactation mammary gland tissues. PLoS One. 2012;7(12):e52388.

Li Z, Liu H, Jin X, Lo L, Liu J. Expression profiles of microRNAs from lactating and non-lactating bovine mammary glands and identification of miRNA related to lactation. BMC Genomics. 2012;13:731.

Liao Y, Du X, Lonnerdal B. miR-214 regulates lactoferrin expression and pro-apoptotic function in mammary epithelial cells. J Nutr. 2010;140(9):1552-6.

Lima RT, Busacca S, Almeida GM, Gaudino G, Fennell DA, Vasconcelos MH. MicroRNA regulation of core apoptosis pathways in cancer. Eur J Cancer. 2011;47(2):163-74.

Lin Q, Gao Z, Alarcon RM, Ye J, Yun Z. A role of miR-27 in the regulation of adipogenesis. Febs J. 2009;276(8):2348-58.

Lin S, Gregory RI. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. Nat Rev Cancer. 2015;15(6):321-33.

Lin X, Luo J, Zhang L, Wang W, Gou D. MiR-103 controls milk fat accumulation in goat (Capra hircus) mammary gland during lactation. PLoS One. 2013;8(11):e79258.

Lin XZ, Luo J, Zhang LP, Wang W, Shi HB, Zhu JJ. mir-27a suppresses triglycerides accumulation and affects gene mRNA expression associated with fat metabolism in dairy goat mammary gland epithelial cells. Gene 2013;521(1):15-23.

Lingel A, Simon B, Izaurralde E, Sattler M. Nucleic acid 3'-end recognition by the Argonaute2 PAZ domain. Nat Struct Mol Biol. 2004;11(6):576-7.

Listenberger LL, Brown DA. Fluorescent detection of lipid droplets and associated proteins. Curr Protoc Cell Biol. 2007;Chapter4:Unit 24.2..

Liu CG, Calin GA, Meloon B, Gamliel N, Sevignani C, Ferracin M, et al. An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101(26):9740-4.

Liu J, Rivas FV, Wohlschlegel J, Yates JR, 3rd, Parker R, Hannon GJ. A role for the P-body component GW182 in microRNA function. Nat Cell Biol. 2005;7(12):1261-6.

Liu N, Bezprozvannaya S, Williams AH, Qi X, Richardson JA, Bassel-Duby R, et al. microRNA-133a regulates cardiomyocyte proliferation and suppresses smooth muscle gene expression in the heart. Genes Dev. 2008;22(23):3242-54.

Liu Q, Rand TA, Kalidas S, Du F, Kim HE, Smith DP, et al. R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the Drosophila RNAi pathway. Science. 2003;301(5641):1921-5.

Liu W, Degner SC, Romagnolo DF. Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid inhibits prolactin-induced cytosolic NADP+ -dependent isocitrate dehydrogenase expression in bovine mammary epithelial cells. J Nutr. 2006;136(11):2743-7.

Liu Z, Xiao H, Li H, Zhao Y, Lai S, Yu X, et al. Identification of conserved and novel microRNAs in cashmere goat skin by deep sequencing. PLoS One. 2012;7(12):7.

Llobet-Navas D, Rodriguez-Barrueco R, Castro V, Ugalde AP, Sumazin P, Jacob-Sendler D, et al. The miR-424(322)/503 cluster orchestrates remodeling of the epithelium in the involuting mammary gland. Genes Dev. 2014;28(7):765-82.

Llobet-Navas D, Rodriguez-Barrueco R, de la Iglesia-Vicente J, Olivan M, Castro V, Saucedo-Cuevas L, et al. The microRNA 424/503 cluster reduces CDC25A expression during cell cycle arrest imposed by transforming growth factor beta in mammary epithelial cells. Mol Cell Biol. 2014;34(23):4216-31.

Loher P, Rigoutsos I. Interactive exploration of RNA22 microRNA target predictions. Bioinformatics. 2012;28(24):3322-3.

Long JE, Chen HX. Identification and characteristics of cattle microRNAs by homology searching and small RNA cloning. Biochem Genet. 2009;47(5-6):329-43.

Lu P, Werb Z. Patterning mechanisms of branched organs. Science. 2008;322(5907):1506-9.

Lu Y, Thomson JM, Wong HY, Hammond SM, Hogan BL. Transgenic over-expression of the microRNA miR-17-92 cluster promotes proliferation and inhibits differentiation of lung epithelial progenitor cells. Dev Biol. 2007;310(2):442-53.

Lujambio A, Calin GA, Villanueva A, Ropero S, Sanchez-Cespedes M, Blanco D, et al. A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105(36):13556-61.

Lujambio A, Lowe SW. The microcosmos of cancer. Nature. 2012;482(7385):347-55.

Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. Science. 2004;303(5654):95-8.

Lund LR, Romer J, Thomasset N, Solberg H, Pyke C, Bissell MJ, et al. Two distinct phases of apoptosis in mammary gland involution: proteinase-independent and -dependent pathways. Development. 1996;122(1):181-93.

Lutter D, Marr C, Krumsiek J, Lang EW, Theis FJ. Intronic microRNAs support their host genes by mediating synergistic and antagonistic regulatory effects. BMC Genomics. 2010;11(224):1471-2164.

M

Ma JB, Ye K, Patel DJ. Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain. Nature. 2004;429(6989):318-22.

Macchiaroli N, Cucher M, Zarowiecki M, Maldonado L, Kamenetzky L, Rosenzvit MC. microRNA profiling in the zoonotic parasite Echinococcus canadensis using a high-throughput approach. Parasit Vectors. 2015;8(83):015-0686.

Mao J, Molenaar AJ, Wheeler TT, Seyfert HM. STAT5 binding contributes to lactational stimulation of promoter III expressing the bovine acetyl-CoA carboxylase alpha-encoding gene in the mammary gland. J Mol Endocrinol. 2002;29(1):73-88.

Marchitelli C, Contarini G, De Matteis G, Crisa A, Pariset L, Scata MC, et al. Milk fatty acid variability: effect of some candidate genes involved in lipid synthesis. J Dairy Res. 2013;80(2):165-73.

Maroney PA, Yu Y, Nilsen TW. MicroRNAs, mRNAs, and translation. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 2006;71:531-5.

Marshall MO, Knudsen J. The specificity of 1-acyl-sn-glycerol 3-phosphate acyltransferase in microsomal fractions from lactating cow mammary gland towards short, medium and long chain acyl-CoA esters. Biochim Biophys Acta. 1977;489(2):236-41.

Martinez NJ, Gregory RI. Argonaute2 expression is post-transcriptionally coupled to microRNA abundance. Rna. 2013;19(5):605-12.

Massaro M, Carluccio MA, De Caterina R. Direct vascular antiatherogenic effects of oleic acid: a clue to the cardioprotective effects of the Mediterranean diet. Cardiologia. 1999;44(6):507-13.

Massart-Leen AM, Peeters G. Changes in the fatty acid composition of goat milk fat after a 48-hour fast. Reprod Nutr Dev. 1985;25(5):873-81.

Matitashvili E, Bramley AJ, Zavizion B. An in vitro approach to ruminant mammary gland biology. Biotechnol Adv. 1997;15(1):17-41.

Matranga C, Tomari Y, Shin C, Bartel DP, Zamore PD. Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. Cell. 2005;123(4):607-20.

Maya-Monteiro CM, Bozza PT. Leptin and mTOR: partners in metabolism and inflammation. Cell Cycle. 2008;7(12):1713-7.

Mayorek N, Grinstein I, Bar-Tana J. Triacylglycerol synthesis in cultured rat hepatocytes. The rate-limiting role of diacylglycerol acyltransferase. Eur J Biochem. 1989;182(2):395-400.

McFadden JW, Corl BA. Activation of liver X receptor (LXR) enhances de novo fatty acid synthesis in bovine mammary epithelial cells. J Dairy Sci. 2010;93(10):4651-8.

McMahon DJ, Oommen BS. Supramolecular structure of the casein micelle. J Dairy Sci. 2008;91(5):1709-21.

McManaman JL. Milk lipid secretion: recent biomolecular aspects. Biomol Concepts. 2012;3(6):581-91.

McNeilly AS, Robinson IC, Houston MJ, Howie PW. Release of oxytocin and prolactin in response to suckling. Br Med J. 1983;286(6361):257-9.

Meale SJ, Romao JM, He ML, Chaves AV, McAllister TA, Guan LL. Effect of diet on microRNA expression in ovine subcutaneous and visceral adipose tissues. J Anim Sci. 2014;92(8):3328-37.

Meister G. Argonaute proteins: functional insights and emerging roles. Nat Rev Genet. 2013;14(7):447-59.

Mensink RP, Zock PL, Kester AD, Katan MB. Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. Am J Clin Nutr. 2003;77(5):1146-55.

Mercken EM, Majounie E, Ding J, Guo R, Kim J, Bernier M, et al. Age-associated miRNA alterations in skeletal muscle from rhesus monkeys reversed by caloric restriction. Aging. 2013;5(9):692-703.

Metpally RP, Nasser S, Malenica I, Courtright A, Carlson E, Ghaffari L, et al. Comparison of Analysis Tools for miRNA High Throughput Sequencing Using Nerve Crush as a Model. Front Genet. 2013;4(20).

Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. Nat Rev Genet. 2010;11(1):31-46.

Milenkovic D, Jude B, Morand C. miRNA as molecular target of polyphenols underlying their biological effects. Free Radic Biol Med. 2013;64:40-51.

Mistry DH, Medrano JF. Cloning and localization of the bovine and ovine lysophosphatidic acid acyltransferase (LPAAT) genes that codes for an enzyme involved in triglyceride biosynthesis. J Dairy Sci. 2002;85(1):28-35.

Mondou E, Dufort I, Gohin M, Fournier E, Sirard MA. Analysis of microRNAs and their precursors in bovine early embryonic development. Mol Hum Reprod. 2012;18(9):425-34.

Monteys AM, Spengler RM, Wan J, Tecedor L, Lennox KA, Xing Y, et al. Structure and activity of putative intronic miRNA promoters. Rna. 2010;16(3):495-505.

Montgomery RL, Yu G, Latimer PA, Stack C, Robinson K, Dalby CM, et al. MicroRNA mimicry blocks pulmonary fibrosis. EMBO Mol Med. 2014;6(10):1347-56.

Morlando M, Ballarino M, Gromak N, Pagano F, Bozzoni I, Proudfoot NJ. Primary microRNA transcripts are processed co-transcriptionally. Nat Struct Mol Biol. 2008;15(9):902-9.

Moshel Y, Rhoads RE, Barash I. Role of amino acids in translational mechanisms governing milk protein synthesis in murine and ruminant mammary epithelial cells. J Cell Biochem. 2006;98(3):685-700.

Motyl T, Gajkowska B, Zarzynska J, Gajewska M, Lamparska-Przybysz M. Apoptosis and autophagy in mammary gland remodeling and breast cancer chemotherapy. J Physiol Pharmacol. 2006;7:17-32.

Mullen MP, Berry DP, Howard DJ, Diskin MG, Lynch CO, Berkowicz EW, et al. Associations between novel single nucleotide polymorphisms in the Bos taurus growth hormone gene and performance traits in Holstein-Friesian dairy cattle. J Dairy Sci. 2010;93(12):5959-69.

Mullokandov G, Baccarini A, Ruzo A, Jayaprakash AD, Tung N, Israelow B, et al. High-throughput assessment of microRNA activity and function using microRNA sensor and decoy libraries. Nat Methods. 2012;9(8):840-6.

Mutch DM, Anderle P, Fiaux M, Mansourian R, Vidal K, Wahli W, et al. Regional variations in ABC transporter expression along the mouse intestinal tract. Physiol Genomics. 2004;17(1):11-20.

N

Naeem A, Zhong K, Moisa SJ, Drackley JK, Moyes KM, Loor JJ. Bioinformatics analysis of microRNA and putative target genes in bovine mammary tissue infected with Streptococcus uberis. J Dairy Sci. 2012;95(11):6397-08.

Nagaoka K, Zhang H, Watanabe G, Taya K. Epithelial cell differentiation regulated by MicroRNA-200a in mammary glands. PLoS One. 2013;8(6):e65127.

Nagpal R, Behare P, Rana R, Kumar A, Kumar M, Arora S, et al. Bioactive peptides derived from milk proteins and their health beneficial potentials: an update. Food Funct. 2011;2(1):18-27.

Najafi-Shoushtari SH, Kristo F, Li Y, Shioda T, Cohen DE, Gerszten RE, et al. MicroRNA-33 and the SREBP host genes cooperate to control cholesterol homeostasis. Science. 2010;328(5985):1566-9.

Nakielny S, Dreyfuss G. Transport of proteins and RNAs in and out of the nucleus. Cell. 1999;99(7):677-90.

Neilsen CT, Goodall GJ, Bracken CP. IsomiRs--the overlooked repertoire in the dynamic microRNAome. Trends Genet. 2012;28(11):544-9.

Neville MC, McFadden TB, Forsyth I. Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion. J Mammary Gland Biol Neoplasia. 2002;7(1):49-66.

Neville MC, Picciano MF. Regulation of milk lipid secretion and composition. Annu Rev Nutr. 1997;17:159-83.

Ng R, Wu H, Xiao H, Chen X, Willenbring H, Steer CJ, et al. Inhibition of microRNA-24 expression in liver prevents hepatic lipid accumulation and hyperlipidemia. Hepatology. 2014;60(2):554-64.

Nottrott S, Simard MJ, Richter JD. Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. Nat Struct Mol Biol. 2006;13(12):1108-14.

Novak J, Bienertova-Vasku J, Kara T, Novak M. MicroRNAs Involved in the Lipid Metabolism and Their Possible Implications for Atherosclerosis Development and Treatment: Mediators Inflamm. 2014;2014:275867.

Novina CD, Sharp PA. The RNAi revolution: Nature. 2004;430(6996):161-4.

O

O'Connell RM, Rao DS, Chaudhuri AA, Baltimore D. Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. Nat Rev Immunol. 2010;10(2):111-22.

Ogorevc J, Kunej T, Razpet A, Dovc P. Database of cattle candidate genes and genetic markers for milk production and mastitis. Anim Genet. 2009;40(6):832-51.

Okamura K, Hagen JW, Duan H, Tyler DM, Lai EC. The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in Drosophila. Cell. 2007;130(1):89-100.

Ollier S, Chauvet S, Martin P, Chilliard Y, Leroux C. Goat's alphaS1-casein polymorphism affects gene expression profile of lactating mammary gland. Animal. 2008;2(4):566-73.

Ollier S, Leroux C, de la Foye A, Bernard L, Rouel J, Chilliard Y. Whole intact rapeseeds or sunflower oil in high-forage or high-concentrate diets affects milk yield, milk composition, and mammary gene expression profile in goats. J Dairy Sci. 2009;92(11):5544-60.

Ollier S, Robert-Granié C, Bernard L, Chilliard Y, Leroux C. Mammary trancriptome analysis of food deprived lactating goats highlights genes involved in milk secretion and programmed cell death. J Nutr. 2007;3(137):560-7.

Oneyama C, Ikeda J, Okuzaki D, Suzuki K, Kanou T, Shintani Y, et al. MicroRNA-mediated downregulation of mTOR/FGFR3 controls tumor growth induced by Src-related oncogenic pathways. Oncogene. 2011;30(32):3489-501.

Orom UA, Kauppinen S, Lund AH. LNA-modified oligonucleotides mediate specific inhibition of microRNA function. Gene. 2006;372:137-41.

Orom UA, Lim MK, Savage JE, Jin L, A.D. S, Lisanti MP, et al. MicroRNA-203 regulates caveolin-1 in breast tissue during caloric restriction. Cell Cycle. 2012;11(7):1291-5.

Orom UA, Nielsen FC, Lund AH. MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. Mol Cell. 2008;30(4):460-71.

Ortega FJ, Mercader JM, Moreno-Navarrete JM, Rovira O, Guerra E, Esteve E, et al. Profiling of circulating microRNAs reveals common microRNAs linked to type 2 diabetes that change with insulin sensitization. Diabetes Care. 2014;37(5):1375-83.

Osorio L, Gijsbers R, Oliveras-Salva M, Michiels A, Debyser Z, Van den Haute C, et al. Viral vectors expressing a single microRNA-based short-hairpin RNA result in potent gene silencing in vitro and in vivo. J Biotechnol. 2014;169:71-81.

Ota A, Tagawa H, Karnan S, Tsuzuki S, Karpas A, Kira S, et al. Identification and characterization of a novel gene, C13orf25, as a target for 13q31-q32 amplification in malignant lymphoma. Cancer Res. 2004;64(9):3087-95.

Ou Z, Wada T, Gramignoli R, Li S, Strom SC, Huang M, et al. MicroRNA hsa-miR-613 targets the human LXRalpha gene and mediates a feedback loop of LXRalpha autoregulation. Mol Endocrinol. 2011;25(4):584-96.

Ozsolak F, Poling LL, Wang Z, Liu H, Liu XS, Roeder RG, et al. Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. Genes Dev. 2008;22(22):3172-83.

P

Palmquist DL, Beaulieu AD, Barbano DM. Feed and animal factors influencing milk fat composition. J Dairy Sci. 1993;76(6):1753-71.

Pando R, Even-Zohar N, Shtaif B, Edry L, Shomron N, Phillip M, et al. MicroRNAs in the growth plate are responsive to nutritional cues: association between miR-140 and SIRT1. J Nutr Biochem. 2012;23(11):1474-81.

Papadopoulos GL, Reczko M, Simossis VA, Sethupathy P, Hatzigeorgiou AG. The database of experimentally supported targets: a functional update of TarBase. Nucleic Acids Res. 2009;37(Database issue):27.

Papoutsidakis N, Deftereos S, Kaoukis A, Bouras G, Giannopoulos G, Theodorakis A, et al. MicroRNAs and the heart: small things do matter. Curr Top Med Chem. 2013;13(2):216-30.

Paraskevopoulou MD, Georgakilas G, Kostoulas N, Vlachos IS, Vergoulis T, Reczko M, et al. DIANA-microT web server v5.0: service integration into miRNA functional analysis workflows. Nucleic Acids Res. 2013;41(Web Server issue):16.

Pariza MW, Park Y, Cook ME. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. Prog Lipid Res. 2001;40(4):283-98.

Parker JS, Roe SM, Barford D. Structural insights into mRNA recognition from a PIWI domain-siRNA guide complex. Nature. 2005;434(7033):663-6.

Parker R, Sheth U. P bodies and the control of mRNA translation and degradation. Mol Cell. 2007;25(5):635-46.
Parra P, Serra F, Palou A. Expression of adipose microRNAs is sensitive to dietary conjugated linoleic acid treatment in mice. PLoS One. 2010;5(9):e13005.

Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, et al. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. Nature. 2000;408(6808):86-9.

Pauloin A, Ollivier-Bousquet M, Chanat E. [The double-play of PP17/TIP47]. Med Sci. 2004;20(11):1020-5.

Peng J, Zhao JS, Shen YF, Mao HG, Xu NY. MicroRNA expression profiling of lactating mammary gland in divergent phenotype swine breeds. Int J Mol Sci. 2015;16(1):1448-65.

Peng Y, Xiang H, Chen C, Zheng R, Chai J, Peng J, et al. MiR-224 impairs adipocyte early differentiation and regulates fatty acid metabolism. Int J Biochem Cell Biol. 2013;45(8):1585-93.

Peng Y, Yu S, Li H, Xiang H, Peng J, Jiang S. MicroRNAs: Emerging roles in adipogenesis and obesity: Cell Signal. 2014;26(9):1888-96.

Petersen CP, Bordeleau ME, Pelletier J, Sharp PA. Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. Mol Cell. 2006;21(4):533-42.

Peterson DG, Matitashvili EA, Bauman DE. Diet-induced milk fat depression in dairy cows results in increased trans-10, cis-12 CLA in milk fat and coordinate suppression of mRNA abundance for mammary enzymes involved in milk fat synthesis. J Nutr. 2003;133(10):3098-102.

Peterson SM, Thompson JA, Ufkin ML, Sathyanarayana P, Liaw L, Congdon CB. Common features of microRNA target prediction tools. Front Genet. 2014;5(23).

Pfaffl MW. Exosome isolation and holistic expression profiling using RNA-Seq and RT-qPCR. International Symposium on Microgenomics, Paris, 15-16 May. 2014.

Pillai RS, Bhattacharyya SN, Artus CG, Zoller T, Cougot N, Basyuk E, et al. Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. Science. 2005;309(5740):1573-6.

Piperova LS, Teter BB, Bruckental I, Sampugna J, Mills SE, Yurawecz MP, et al. Mammary lipogenic enzyme activity, trans fatty acids and conjugated linoleic acids are altered in lactating dairy cows fed a milk fat-depressing diet. J Nutr. 2000;130(10):2568-74.

Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J, Kuwajima S, Ma X, Macdonald PE, et al. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. Nature. 2004;432(7014):226-30.

Poy MN, Hausser J, Trajkovski M, Braun M, Collins S, Rorsman P, et al. miR-375 maintains normal pancreatic alpha- and beta-cell mass. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106(14):5813-8.

Pritchard CC, Cheng HH, Tewari M. MicroRNA profiling: approaches and considerations. Nat Rev Genet. 2012;13(5):358-69.

Prizant RL, Barash I. Negative effects of the amino acids Lys, His, and Thr on S6K1 phosphorylation in mammary epithelial cells. J Cell Biochem. 2008;105(4):1038-47.

Propper AY, Howard BA, Veltmaat JM. Prenatal morphogenesis of mammary glands in mouse and rabbit. J Mammary Gland Biol Neoplasia. 2013;18(2):93-104.

Q

Quail MA, Smith M, Coupland P, Otto TD, Harris SR, Connor TR, et al. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. BMC Genomics. 2012;13(341):1471-2164.

R

Raggio G, Lemosquet S, Lobley GE, Rulquin H, Lapierre H. Effect of casein and propionate supply on mammary protein metabolism in lactating dairy cows. J Dairy Sci. 2006;89(11):4340-51.

Ramirez CM, Davalos A, Goedeke L, Salerno AG, Warrier N, Cirera-Salinas D, et al. MicroRNA-758 regulates cholesterol efflux through posttranscriptional repression of ATP-binding cassette transporter A1. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2011;31(11):2707-14.

Rana TM. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. Nat Rev Mol Cell Biol. 2007;8(1):23-36.

Rayner KJ, Esau CC, Hussain FN, McDaniel AL, Marshall SM, van Gils JM, et al. Inhibition of miR-33a/b in non-human primates raises plasma HDL and lowers VLDL triglycerides. Nature. 2011;478(7369):404-7.

Rayner KJ, Sheedy FJ, Esau CC, Hussain FN, Temel RE, Parathath S, et al. Antagonism of miR-33 in mice promotes reverse cholesterol transport and regression of atherosclerosis. J Clin Invest. 2011;121(7):2921-31.

Rayner KJ, Suarez Y, Davalos A, Parathath S, Fitzgerald ML, Tamehiro N, et al. MiR-33 contributes to the regulation of cholesterol homeostasis. Science. 2010;328(5985):1570-3.

Rearick D, Prakash A, McSweeny A, Shepard SS, Fedorova L, Fedorov A. Critical association of ncRNA with introns. Nucleic Acids Res. 2011;39(6):2357-66.

Redshaw N, Wilkes T, Whale A, Cowen S, Huggett J, Foy CA. A comparison of miRNA isolation and RT-qPCR technologies and their effects on quantification accuracy and repeatability. Biotechniques. 2013;54(3):155-64.

Rehwinkel J, Behm-Ansmant I, Gatfield D, Izaurralde E. A crucial role for GW182 and the DCP1:DCP2 decapping complex in miRNA-mediated gene silencing. Rna. 2005;11(11):1640-7.

Reinhardt TA, Lippolis JD. Bovine milk fat globule membrane proteome. J Dairy Res. 2006;73(4):406-16.

Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans. Nature. 2000;403(6772):901-6.

Ringseis R, Saal D, Muller A, Steinhart H, Eder K. Dietary conjugated linoleic acids lower the triacylglycerol concentration in the milk of lactating rats and impair the growth and increase the mortality of their suckling pups. J Nutr. 2004;134(12):3327-34.

Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. Genome Res. 2004;14(10A):1902-10.

Rodriguez-Cruz M, Sanchez R, Bernabe-Garcia M, Maldonado J, Del Prado M, Lopez-Alarcon M. Effect of dietary levels of corn oil on maternal arachidonic acid synthesis and fatty acid composition in lactating rats. Nutrition. 2009;25(2):209-15.

Romao JM, Jin W, He M, McAllister T, Guan le L. MicroRNAs in bovine adipogenesis: genomic context, expression and function. BMC Genomics. 2014;15(137):1471-2164.

Romao JM, Jin W, He M, McAllister T, Guan LL. Altered microRNA expression in bovine subcutaneous and visceral adipose tissue from cattle under different diet. PLoS One. 2012;7(7):e40605.

Rome S. Use of miRNAs in biofluids as biomarkers in dietary and lifestyle intervention studies. Genes Nutr. 2015;10(5):483.

Ron D, Adams DR, Baillie GS, Long A, O'Connor R, Kiely PA. RACK(1) to the future - A historical perspective. Cell Communication and Signaling 2013;11:53.

Rosen JM, Li S, Raught B, Hadsell D. The mammary gland as a bioreactor: factors regulating the efficient expression of milk protein-based transgenes. Am J Clin Nutr. 1996;63(4):627S-32S.

Ross SA, Davis CD. MicroRNA, nutrition and cancer prevention. Adv Nutr. 2011;2:472-85.

Rottiers V, Näär AM. MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders. Molecular Cell Biology. 2012;13(4):239-50.

Ruby JG, Jan CH, Bartel DP. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. Nature. 2007;448(7149):83-6.

S

Saito A, Nagasaki M, Doi A, Ueno K, Miyano S. Cell fate simulation model of gustatory neurons with MicroRNAs double-negative feedback loop by hybrid functional Petri net with extension. Genome Inform. 2006;17(1):100-11.

Sassen S, Miska EA, Caldas C. MicroRNA: implications for cancer. Virchows Arch. 2008;452(1):1-10.

Sawh AN, Duchaine TF. Turning Dicer on its head. Nat Struct Mol Biol. 2012;19(4):365-6.

Scadden AD, O'Connell MA. Cleavage of dsRNAs hyper-edited by ADARs occurs at preferred editing sites. Nucleic Acids Res. 2005;33(18):5954-64.

Schams D, Kohlenberg S, Amselgruber W, Berisha B, Pfaffl MW, Sinowatz F. Expression and localisation of oestrogen and progesterone receptors in the bovine mammary gland during development, function and involution. J Endocrinol. 2003;177(2):305-17.

Schennink A, Stoop WM, Visker MH, Heck JM, Bovenhuis H, van der Poel JJ, et al. DGAT1 underlies large genetic variation in milk-fat composition of dairy cows. Anim Genet. 2007;38(5):467-73.

Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. J Cell Physiol. 2000;182(3):311-22.

Sdassi N, Silveri L, Laubier J, Tilly G, Costa J, Layani S, et al. Identification and characterization of new miRNAs cloned from normal mouse mammary gland. BMC Genomics. 2009;10:149.

Selbach M, Schwanhäusser B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, Rajewsky N. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. Nature. 2008;455(7209):58-63.

Shah MS, Davidson LA, Chapkin RS. Mechanistic insights into the role of microRNAs in cancer: influence of nutrient crosstalk. Frontiers in genetics. 2012;3:1-14.

Shen LQ, Xie YZ, Qian XF, Zhuang ZX, Jiao Y, Qi XF. A single nucleotide polymorphism in the promoter region of let-7 family is associated with lung cancer risk in Chinese. Genet Mol Res. 2015;14(2):4505-12.

Shennan DB, Boyd CA. The functional and molecular entities underlying amino acid and peptide transport by the mammary gland under different physiological and pathological conditions. J Mammary Gland Biol Neoplasia. 2014;19(1):19-33.

Shennan DB, McNeillie SA. High affinity (Na(+) + Cl-)-dependent taurine transport by lactating mammary tissue. J Dairy Res. 1994;61(3):335-43.

Shi H, Luo J, Zhu J, Li J, Sun Y, Lin X, et al. PPAR gamma Regulates Genes Involved in Triacylglycerol Synthesis and Secretion in Mammary Gland Epithelial Cells of Dairy Goats. PPAR Res. 2013;310948(10):17.

Shigematsu M, Kirino Y. tRNA-Derived Short Non-coding RNA as Interacting Partners of Argonaute Proteins. Gene Regul Syst Bio. 2015;9:27-33.

Shingfield KJ, Ahvenjarvi S, Toivonen V, Vanhatalo A, Huhtanen P, Griinari JM. Effect of incremental levels of sunflower-seed oil in the diet on ruminal lipid metabolism in lactating cows. Br J Nutr. 2008;99(5):971-83.

Shirasaki T, Honda M, Shimakami T, Horii R, Yamashita T, Sakai Y, et al. MicroRNA-27a regulates lipid metabolism and inhibits hepatitis C virus replication in human hepatoma cells. J Virol. 2013;87(9):5270-86.

Shu DP, Chen BL, Hong J, Liu PP, Hou DX, Huang X, et al. Global transcriptional profiling in porcine mammary glands from late pregnancy to peak lactation. Omics. 2012;16(3):123-37.

Silveri L, Tilly G, Vilotte JL, Le Provost F. MicroRNA involvement in mammary gland development and breast cancer. Reprod Nutr Dev. 2006;5:549-6.

Sinha YN, Tucker HA. Mammary development and pituitary prolactin level of heifers from birth through puberty and during the estrous cycle. J Dairy Sci. 1969;52(4):507-12.

Small EM, Olson EN. Pervasive roles of microRNAs in cardiovascular biology. Nature. 2011;469(7330):336-42.

Sobolewska A, Gajewska M, Zarzynska J, Gajkowska B, Motyl T. IGF-I, EGF, and sex steroids regulate autophagy in bovine mammary epithelial cells via the mTOR pathway. Eur J Cell Biol. 2009;88(2):117-30.

Sohel MM, Hoelker M, Noferesti SS, Salilew-Wondim D, Tholen E, Looft C, et al. Exosomal and Non-Exosomal Transport of Extra-Cellular microRNAs in Follicular Fluid: Implications for Bovine Oocyte Developmental Competence. PLoS One. 2013;8(11).

Song JJ, Liu J, Tolia NH, Schneiderman J, Smith SK, Martienssen RA, et al. The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. Nat Struct Biol. 2003;10(12):1026-32.

Song JJ, Smith SK, Hannon GJ, Joshua-Tor L. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. Science. 2004;305(5689):1434-7.

Song KH, Li T, Owsley E, Chiang JY. A putative role of micro RNA in regulation of cholesterol 7alpha-hydroxylase expression in human hepatocytes. J Lipid Res. 2010;51(8):2223-33.

Song R, Ro S, Yan W. In situ hybridization detection of microRNAs. Methods Mol Biol. 2010;629:287-94.

Souza PF, Williamson DH. Effects of feeding medium-chain triacylglycerols on maternal lipid metabolism and pup growth in lactating rats. Br J Nutr. 1993;69(3):779-87.

Specht B, Bartetzko N, Hohoff C, Kuhl H, Franke R, Borchers T, et al. Mammary derived growth inhibitor is not a distinct protein but a mix of heart-type and adipocyte-type fatty acid-binding protein. J Biol Chem. 1996;271(33):19943-9.

Standaert L, Adriaens C, Radaelli E, Van Keymeulen A, Blanpain C, Hirose T, et al. The long noncoding RNA Neat1 is required for mammary gland development and lactation. RNA. 2014;20(12):1844-9.

Stark A, Brennecke J, Bushati N, Russell RB, Cohen SM. Animal MicroRNAs confer robustness to gene expression and have a significant impact on 3'UTR evolution. Cell. 2005;123(6):1133-46.

Stingl J. Detection and analysis of mammary gland stem cells. J Pathol. 2009;217(2):229-41.

Strozzi F, Mazza R, Malinverni R, Williams JL. Annotation of 390 bovine miRNA genes by sequence similarity with other species. Anim Genet. 2009;40(1):1365-2052.

Strucken EM, Laurenson YC, Brockmann GA. Go with the flow-biology and genetics of the lactation cycle. Front Genet. 2015;6(118).

Sun D, Lee YS, Malhotra A, Kim HK, Matecic M, Evans C, et al. miR-99 family of MicroRNAs suppresses the expression of prostate-specific antigen and prostate cancer cell proliferation. Cancer Res. 2011;71(4):1313-24.

Sun J, Li M, Li Z, Xue J, Lan X, Zhang C, et al. Identification and profiling of conserved and novel microRNAs from Chinese Qinchuan bovine longissimus thoracis. BMC Genomics. 2013;14(42):1471-2164.

Sun J, Sonstegard TS, Li C, Huang Y, Li Z, Lan X, et al. Altered microRNA expression in bovine skeletal muscle with age. Anim Genet. 2015;46(3):227-38.

Surowiak P, Materna V, Gyorffy B, Matkowski R, Wojnar A, Maciejczyk A, et al. Multivariate analysis of oestrogen receptor alpha, pS2, metallothionein and CD24 expression in invasive breast cancers. Br J Cancer. 2006;95(3):339-46.

Suzuki HI, Yamagata K, Sugimoto K, Iwamoto T, Kato S, Miyazono K. Modulation of microRNA processing by p53. Nature. 2009;460(7254):529-33.

Swanson EW, Poffenbarger JI. Mammary gland development of dairy heifers during their first gestation. J Dairy Sci. 1979;62(5):702-14.

Szeto CY, Lin CH, Choi SC, Yip TT, Ngan RK, Tsao GS, et al. Integrated mRNA and microRNA transcriptome sequencing characterizes sequence variants and mRNA-microRNA regulatory network in nasopharyngeal carcinoma model systems. FEBS Open Bio. 2014;4:128-40.

T

Tabara H, Yigit E, Siomi H, Mello CC. The dsRNA binding protein RDE-4 interacts with RDE-1, DCR-1, and a DExH-box helicase to direct RNAi in C. elegans. Cell. 2002;109(7):861-71.

Tabet F, Vickers KC, Cuesta Torres LF, Wiese CB, Shoucri BM, Lambert G, et al. HDL-transferred microRNA-223 regulates ICAM-1 expression in endothelial cells. Nat Commun. 2014;5(3292):.

Taft RJ, Pheasant M, Mattick JS. The relationship between non-protein-coding DNA and eukaryotic complexity. Bioessays. 2007;29(3):288-99.

Tahbaz N, Kolb FA, Zhang H, Jaronczyk K, Filipowicz W, Hobman TC. Characterization of the interactions between mammalian PAZ PIWI domain proteins and Dicer. EMBO Rep. 2004;5(2):189-94.

Takanabe R, Ono K, Abe Y, Takaya T, Horie T, Wada H, et al. Up-regulated expression of microRNA-143 in association with obesity in adipose tissue of mice fed high-fat diet. Biochem Biophys Res Commun. 2008;376(4):728-32.

Tan GC, Chan E, Molnar A, Sarkar R, Alexieva D, Isa IM, et al. 5' isomiR variation is of functional and evolutionary importance. Nucleic Acids Res. 2014;42(14):9424-35.

Tan GC, Dibb N. IsomiRs have functional importance. Malays J Pathol. 2015;37(2):73-81.

Tanaka T, Haneda S, Imakawa K, Sakai S, Nagaoka K. A microRNA, miR-101a, controls mammary gland development by regulating cyclooxygenase-2 expression. Differentiation. 2009;77(2):181-7.

Tarun SZ, Jr., Wells SE, Deardorff JA, Sachs AB. Translation initiation factor eIF4G mediates in vitro poly(A) tail-dependent translation. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997;94(17):9046-51.

Thermann R, Hentze MW. Drosophila miR2 induces pseudo-polysomes and inhibits translation initiation. Nature. 2007;447(7146):875-8.

Thomson DW, Bracken CP, Szubert JM, Goodall GJ. On measuring miRNAs after transient transfection of mimics or antisense inhibitors. PLoS One. 2013;8(1):24.

Title AC, Denzler R, Stoffel M. Uptake and Function Studies of Maternal Milk-derived MicroRNAs. J Biol Chem. 2015;290(39):23680-91.

Toedling J, Servant N, Ciaudo C, Farinelli L, Voinnet O, Heard E, et al. Deep-sequencing protocols influence the results obtained in small-RNA sequencing. PLoS One. 2012;7(2):27.

Tokumaru S, Suzuki M, Yamada H, Nagino M, Takahashi T. let-7 regulates Dicer expression and constitutes a negative feedback loop. Carcinogenesis. 2008;29(11):2073-7.

Tomari Y, Du T, Haley B, Schwarz DS, Bennett R, Cook HA, et al. RISC assembly defects in the Drosophila RNAi mutant armitage. Cell. 2004;116(6):831-41.

Tomaselli S, Bonamassa B, Alisi A, Nobili V, Locatelli F, Gallo A. ADAR enzyme and miRNA story: a nucleotide that can make the difference. Int J Mol Sci. 2013;14(11):22796-816.

Topper YJ, Freeman CS. Multiple hormone interactions in the developmental biology of the mammary gland. Physiol Rev. 1980;60(4):1049-106.

Toral PG, Chilliard Y, Rouel J, Leskinen H, Shingfield KJ, Bernard L. Comparison of the nutritional regulation of milk fat secretion and composition in cows and goats. J Dairy Sci. 2015;98(10):7277-97.

Tsunetsugu-Yokota Y, Yamamoto T. Mammalian MicroRNAs: Post-Transcriptional Gene Regulation in RNA Virus Infection and Therapeutic Applications. Front Microbiol. 2010;1(108).

Tucker HA. Hormones, mammary growth, and lactation: a 41-year perspective. J Dairy Sci. 2000;83(4):874-84.

Turcatel G, Rubin N, El-Hashash A, Warburton D. MIR-99a and MIR-99b modulate TGF-beta induced epithelial to mesenchymal plasticity in normal murine mammary gland cells. PLoS One. 2012;7(1):e31032.

Turner CW. The mammary gland. IN I-The anatomy of the udder of cattle and domestic animals. Lucas Brothers publishers, Colombia, Missouri. 1952.

V

van Amerongen R, Bowman AN, Nusse R. Developmental stage and time dictate the fate of Wnt/beta-catenin-responsive stem cells in the mammary gland. Cell Stem Cell. 2012;11(3):387-400.

van Dijk EL, Jaszczyszyn Y, Thermes C. Library preparation methods for next-generation sequencing: tone down the bias. Exp Cell Res. 2014;322(1):12-20.

Van Keymeulen A, Rocha AS, Ousset M, Beck B, Bouvencourt G, Rock J, et al. Distinct stem cells contribute to mammary gland development and maintenance. Nature. 2011;479(7372):189-93.

Van Nguyen A, Pollard JW. Colony stimulating factor-1 is require to recruit macrophages into the mammary gland to facilitate mammary ductal outgrowth. Dev Biol. 2002;247(1):11-25.

van Rooij E. The art of microRNA research. Circ Res. 2011;108(2):219-34.

van Rooij E, Kauppinen S. Development of microRNA therapeutics is coming of age. EMBO Mol Med. 2014;6(7):851-64.

van Rooij E, Quiat D, Johnson BA, Sutherland LB, Qi X, Richardson JA, et al. A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance. Dev Cell. 2009;17(5):662-73.

van Rooij E, Sutherland LB, Qi X, Richardson JA, Hill J, Olson EN. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. Science. 2007;316(5824):575-9.

Varkonyi-Gasic E, Hellens RP. Quantitative stem-loop RT-PCR for detection of microRNAs. Methods Mol Biol. 2011;744:145-57.

Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. Science. 2007;318(5858):1931-4.

Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. Nat Cell Biol. 2011;13(4):423-33.

Vilotte JL, Whitelaw CBA, Ollivier-Bousquet M, Shennan DB. Biosynthesis of milk proteins. IN Advanced dairy chemistry volume 1: Proteins, 3rd, part B, Fox P F and McSweeney P L H (eds), University College, Cork, Ireland. 2003:699-738.

Visvader JE, Smith GH. Murine mammary epithelial stem cells: discovery, function, and current status. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2011;3(2).

Viturro E, Farke C, Meyer HH, Albrecht C. Identification, sequence analysis and mRNA tissue distribution of the bovine sterol transporters ABCG5 and ABCG8. J Dairy Sci. 2006;89(2):553-61.

W

Wagner J, Riwanto M, Besler C, Knau A, Fichtlscherer S, Roxe T, et al. Characterization of levels and cellular transfer of circulating lipoprotein-bound microRNAs. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2013;33(6):1392-400.

Wahle E, Winkler GS. RNA decay machines: deadenylation by the Ccr4-not and Pan2-Pan3 complexes. Biochim Biophys Acta. 2013;1827(6-7):561-70.

Wahle KW, Heys SD, Rotondo D. Conjugated linoleic acids: are they beneficial or detrimental to health? Prog Lipid Res. 2004;43(6):553-87.

Walstra P, Geurts TJ, Noomen A, Jellena A, S. VBMAJ. Butter. IN Dairy technology Principles of milk properties and processes Dekker Marcel (Ed), New York Basel, USA. 1999:485-515.

Wang CM, Li QZ, Li Y. miR-138 Function and Its Targets on Mouse Mammary Epithelial Cells. Progress in Biochemistry and Biophysics. 2008;35(7):834-8.

Wang J, Bian Y, Wang Z, Li D, Wang C, Li Q, et al. MicroRNA-152 regulates DNA methyltransferase 1 and is involved in the development and lactation of mammary glands in dairy cows. PLoS One. 2014;9(7):e101358.

Wang H, Luo J, Chen Z, Cao WT, Xu HF, Gou DM, et al. MicroRNA-24 can control triacylglycerol synthesis in goat mammary epithelial cells by targeting the fatty acid synthase gene. J Dairy Sci. 2015;14(15):00741-9

Wang S, Aurora AB, Johnson BA, Qi X, McAnally J, Hill JA, et al. The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis. Dev Cell. 2008;15(2):261-71.

Wang Y, Medvid R, Melton C, Jaenisch R, Blelloch R. DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal. Nat Genet. 2007;39(3):380-5.

Wang Y, Zhang C, Fang X, Zhao Y, Chen X, Sun J, et al. Identification and Profiling of microRNAs and Their Target Genes from Developing Caprine Skeletal Muscle. PLoS One. 2014;9(5):e96857.

Ward RJ, Travers MT, Richards SE, Vernon RG, Salter AM, Buttery PJ, et al. Stearoyl-CoA desaturase mRNA is transcribed from a single gene in the ovine genome. Biochim Biophys Acta. 1998;30(2):145-56.

Watanabe T, Imai H, Minami N. Identification and expression analysis of small RNAs during development. Methods Mol Biol. 2008;442:173-85.

Watson CJ, Kreuzaler PA. Remodeling mechanisms of the mammary gland during involution. Int J Dev Biol. 2011;55(7-9):757-62.

Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. Clin Chem. 2010;56(11):1733-41.

Wenguang Z, Jianghong W, Jinquan L, Yashizawa M. A subset of skin-expressed microRNAs with possible roles in goat and sheep hair growth based on expression profiling of mammalian microRNAs. Omics. 2007;11(4):385-96.

Wicik Z, Gajewska M, Majewska A, Walkiewicz D, Osinska E, Motyl T. Characterization of microRNA profile in mammary tissue of dairy and beef breed heifers. J Anim Breed Genet. 2015;8(10):12172.

Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. elegans. Cell. 1993;75(5):855-62.

Wilczynska A, Aigueperse C, Kress M, Dautry F, Weil D. The translational regulator CPEB1 provides a link between dcp1 bodies and stress granules. J Cell Sci. 2005;118(Pt 5):981-92.

Williams C. Dietary fatty acids and human health. Annales de Zootechnie. 2000;49(3):165-80.

Winter A, Kramer W, Werner FA, Kollers S, Kata S, Durstewitz G, et al. Association of a lysine-232/alanine polymorphism in a bovine gene encoding acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase (DGAT1) with variation at a quantitative trait locus for milk fat content. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99(14):9300-5.

Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. Nat Cell Biol. 2009;11(3):228-34.

Witkos TM, Koscianska E, Krzyzosiak WJ. Practical Aspects of microRNA Target Prediction. Curr Mol Med. 2011;11(2):93-109.

Wolf T, Baier SR, Zempleni J. The Intestinal Transport of Bovine Milk Exosomes Is Mediated by Endocytosis in Human Colon Carcinoma Caco-2 Cells and Rat Small Intestinal IEC-6 Cells. J Nutr. 2015;145(10):2201-6.

Woo JA, Roh SE, Lakshmana MK, Kang DE. Pivotal role of RanBP9 in integrin-dependent focal adhesion signaling and assembly. Faseb J. 2012;26(4):1672-81.

Wooding FB. The mechanism of secretion of the milk fat globule. J Cell Sci. 1971;9(3):805-21.

Wooding FB. Milk microsomes, viruses, and the milk fat globule membrane. Experientia. 1972;28(9):1077-9.

Woodside B, Abizaid A, Walker C. Changes in leptin levels during lactation: implications for lactational hyperphagia and anovulation. Horm Behav. 2000;37(4):353-65.

Wu H, Xu H, Miraglia LJ, Crooke ST. Human RNase III is a 160-kDa protein involved in preribosomal RNA processing. J Biol Chem. 2000;275(47):36957-65.

Wu Z, Fu Y, Cao J, Yu M, Tang X, Zhao S. Identification of differentially expressed miRNAs between white and black hair follicles by RNA-sequencing in the goat (Capra hircus). Int J Mol Sci. 2014;15(6):9531-45.

X

Xhemalce B, Robson SC, Kouzarides T. Human RNA methyltransferase BCDIN3D regulates microRNA processing. Cell. 2012;151(2):278-88.

Xie J, Ameres SL, Friedline R, Hung JH, Zhang Y, Xie Q, et al. Long-term, efficient inhibition of microRNA function in mice using rAAV vectors. Nat Methods. 2012;9(4):403-9.

Xie M, Li M, Vilborg A, Lee N, Shu MD, Yartseva V, et al. Mammalian 5'-capped microRNA precursors that generate a single microRNA. Cell. 2013;155(7):1568-80.

Xie T, Li L. Stem cells and their niche: an inseparable relationship. Development. 2007;134(11):2001-6.

Xu X, Chen H, Lin Y, Hu Z, Mao Y, Wu J, et al. MicroRNA-409-3p inhibits migration and invasion of bladder cancer cells via targeting c-Met. Mol Cells. 2013;36(1):62-8.

Y

Yamaji D, Kang K, Robinson GW, Hennighausen L. Sequential activation of genetic programs in mouse mammary epithelium during pregnancy depends on STAT5A/B concentration. Nucleic Acids Res. 2013;41(3):1622-36.

Yamashita A, Chang TC, Yamashita Y, Zhu W, Zhong Z, Chen CY, et al. Concerted action of poly(A) nucleases and decapping enzyme in mammalian mRNA turnover. Nat Struct Mol Biol. 2005;12(12):1054-63.

Yang J, Zeng Y. Identification of miRNA-mRNA crosstalk in pancreatic cancer by integrating transcriptome analysis. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2015;19(5):825-34.

Yang W, Chendrimada TP, Wang Q, Higuchi M, Seeburg PH, Shiekhattar R, et al. Modulation of microRNA processing and expression through RNA editing by ADAR deaminases. Nat Struct Mol Biol. 2006;13(1):13-21.

Yang Z, Han Y, Cheng K, Zhang G, Wang X. miR-99a directly targets the mTOR signalling pathway in breast cancer side population cells. Cell Prolif. 2014;47(6):587-95.

Ye A, Singh H, Taylor MW, Anema S. Characterization of protein components of natural and heat-treated milk fat globule membranes. International Dairy Journal. 2002;12:393-402.

Ye X, Huang N, Liu Y, Paroo Z, Huerta C, Li P, et al. Structure of C3PO and mechanism of human RISC activation. Nat Struct Mol Biol. 2011;18(6):650-7.

Yen YC, Shiah SG, Chu HC, Hsu YM, Hsiao JR, Chang JY, et al. Reciprocal regulation of microRNA-99a and insulin-like growth factor I receptor signaling in oral squamous cell carcinoma cells. Mol Cancer. 2014;13(6):1476-4598.

Yeom KH, Lee Y, Han J, Suh MR, Kim VN. Characterization of DGCR8/Pasha, the essential cofactor for Drosha in primary miRNA processing. Nucleic Acids Res. 2006;34(16):4622-9.

Yi R, Doehle BP, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Overexpression of exportin 5 enhances RNA interference mediated by short hairpin RNAs and microRNAs. RNA. 2005;11(2):220-6.

Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. Genes Dev. 2003;17(24):3011-6.

Yin JQ, Zhao RC, Morris KV. Profiling microRNA expression with microarrays. Trends Biotechnol. 2008;26(2):70-6.

Yin K, Hacia JG, Zhong Z, Paine ML. Genome-wide analysis of miRNA and mRNA transcriptomes during amelogenesis. BMC Genomics. 2014;15(998):1471-2164.

Yoo KH, Kang K, Feuermann Y, Jang SJ, Robinson GW, Hennighausen L. The STAT5-regulated miR-193b locus restrains mammary stem and progenitor cell activity and alveolar differentiation. Dev Biol. 2014;395(2):245-54.

You Y, Moreira BG, Behlke MA, Owczarzy R. Design of LNA probes that improve mismatch discrimination. Nucleic Acids Res. 2006;34(8):e60.

Young WS, 3rd, Shepard E, Amico J, Hennighausen L, Wagner KU, LaMarca ME, et al. Deficiency in mouse oxytocin prevents milk ejection, but not fertility or parturition. J Neuroendocrinol. 1996;8(11):847-53.

Yuan C, Wang X, Geng R, He X, Qu L, Chen Y. Discovery of cashmere goat (Capra hircus) microRNAs in skin and hair follicles by Solexa sequencing. BMC Genomics. 2013;14(511):1471-2164.

Yuan X, Liu C, Yang P, He S, Liao Q, Kang S, et al. Clustered microRNAs' coordination in regulating protein-protein interaction network. BMC Syst Biol. 2009;3(65):1752-0509.

Yuan YR, Pei Y, Ma JB, Kuryavyi V, Zhadina M, Meister G, et al. Crystal structure of A. aeolicus argonaute, a site-specific DNA-guided endoribonuclease, provides insights into RISC-mediated mRNA cleavage. Mol Cell. 2005;19(3):405-19.

Z

Zarzynska J, Gajkowska B, Wojewodzka U, Dymnicki E, Motyl T. Apoptosis and autophagy in involuting bovine mammary gland is accompanied by up-regulation of TGF-beta1 and suppression of somatotropic pathway. Pol J Vet Sci. 2007;10(1):1-9.

Zarzynska J, Motyl T. Apoptosis and autophagy in involuting bovine mammary gland. J Physiol Pharmacol. 2008;9:275-88.

Zavizion B, van Duffelen M, Schaeffer W, Politis I. Establishment and characterization of a bovine mammary epithelial cell line with unique properties. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 1996;32(3):138-48.

Zekri L, Huntzinger E, Heimstadt S, Izaurralde E. The silencing domain of GW182 interacts with PABPC1 to promote translational repression and degradation of microRNA targets and is required for target release. Mol Cell Biol. 2009;29(23):6220-31.

Zeng Y, Cullen BR. Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. Nucleic Acids Res. 2004;32(16):4776-85.

Zeng Y, Yi R, Cullen BR. Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha. Embo J. 2005;24(1):138-48.

Zhang C, Zhao Y, Wang Y, Wu H, Fang X, Chen H. Deep RNA sequencing reveals that microRNAs play a key role in lactation in rats. J Nutr. 2014;144(8):1142-9.

Zhang D, Lu K, Dong Z, Jiang G, Xu W, Liu W. The effect of exposure to a high-fat diet on microRNA expression in the liver of blunt snout bream (Megalobrama amblycephala). PLoS One. 2014;9(5):e96132.

Zhang L, Hou D, Chen X, Li D, Zhu L, Zhang Y, et al. Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA. Cell Res. 2012;22(1):107-26.

Zhang Y, Eades G, Yao Y, Li Q, Zhou Q. Estrogen receptor alpha signaling regulates breast tumor-initiating cells by down-regulating miR-140 which targets the transcription factor SOX2. J Biol Chem. 2012;287(49):41514-22.

Zhang Y, Wang Z, Gemeinhart RA. Progress in microRNA delivery. J Control Release. 2013;172(3):962-74.

Zhao JJ, Lin J, Yang H, Kong W, He L, Ma X, et al. MicroRNA-221/222 negatively regulates estrogen receptor alpha and is associated with tamoxifen resistance in breast cancer. J Biol Chem. 2008;283(45):31079-86.

Zhao Y, Ransom JF, Li A, Vedantham V, von Drehle M, Muth AN, et al. Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2. Cell. 2007;129(2):303-17.

Zheng B, Liang L, Huang S, Zha R, Liu L, Jia D, et al. MicroRNA-409 suppresses tumour cell invasion and metastasis by directly targeting radixin in gastric cancers. Oncogene. 2012;31(42):4509-16.

Zheng L, Lv GC, Sheng J, Yang YD. Effect of miRNA-10b in regulating cellular steatosis level by targeting PPAR-alpha expression, a novel mechanism for the pathogenesis of NAFLD. J Gastroenterol Hepatol. 2010;25(1):156-63.

Zhou H, Cheng L, Azimu W, Hodge S, Edwards GR, Hickford JG. Variation in the bovine FABP4 gene affects milk yield and milk protein content in dairy cows. Sci Rep. 2015;5(10023).

Zhou MM, Wu YM, Liu HY, Zhao K, Liu JX. Effects of tripeptides and lactogenic hormones on oligopeptide transporter 2 in bovine mammary gland. J Anim Physiol Anim Nutr. 2011;95(6):781-9.

Zhu H, Shyh-Chang N, Segre AV, Shinoda G, Shah SP, Einhorn WS, et al. The Lin28/let-7 axis regulates glucose metabolism. Cell. 2011;147(1):81-94.

Zhuang F, Fuchs RT, Sun Z, Zheng Y, Robb GB. Structural bias in T4 RNA ligase-mediated 3'-adapter ligation. Nucleic Acids Res. 2012;40(7):12.

Zidi A, Amills M, Tomás A, Vidal O, Ramirez O, Carrizosa J, et al. Short communication: Genetic variability in the predicted microRNA target sites of caprine casein genes. J Dairy Sci. 2009;93:1749-3.

Zimin AV, Delcher AL, Florea L, Kelley DR, Schatz MC, Puiu D, et al. A whole-genome assembly of the domestic cow, Bos taurus. Genome Biol. 2009;10(4):2009-10.

Annexes

16ème séminaire des thésards du département Génétique Animale de l'INRA, 2-3/04/13, Amboise, France

Impact of miRNA on lactation and their nutritional regulation in the mammary gland

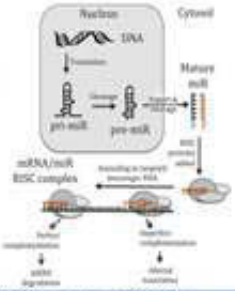
Lenha MOBUCHON
UMR Herbivores, Site de Theix, 63122 Saint Genès Champanelle
UMR Génétique Animale et Biologie Intégrative (GABI), 78350 Jouy-en-Josas

Context and objectives

MicroRNAs (miRNA) are small non-coding RNA of 18-25 nt in length which are involved in post-transcriptional regulation of their mRNA targets by binding 3'UTR region and play a key role in many biological processes. Otherwise, few data assess miRNA involvement in the mammary gland biology but overexpression of some of them in mice induces a severe lactation defect (Le Guillou et al., 2012).

The role of miRNA in the regulation of lipid metabolism through direct effects on lipogenic gene expression or through a regulation of their transcription factor, such as PPARγ or SREBPs, have been newly reported in liver, pancreas, muscle and adipose tissue (Esau et al., 2006, 2004, Gerin et al., 2010, Lu et al., 2010, Romao et al., 2012).

Recent studies show that miRNA expression can be regulate by nutrition in different tissues and species (Romao et al., 2012, Milenkovic et al., 2012).



(From Catto et al., 2011)

This thesis aims to determine the impact of nutritional regulation on miRNA expression in the mammary gland and their function on milk components synthesis.

Nutritional regulation of mammary miRNA expression in ruminants

Mammary miRNA atlas (Le Guillou et al., in préparation)

Diets :
- Ad libitum vs Food deprived
- Supplemented diets

→ *High-throughput sequencing (Next Generation Sequencing, NGS)*
→ *qPCR (~10 miRNA)*

Identification of miRNA regulated by the nutrition

Functional study of miRNA expression in mouse (~2 miRNA)

→ *Bioinformatics*
→ *Transgenesis*

Determination of some miRNA functions in mouse

Relevance in bovine of the miRNA functions highlighted in mouse

Education

✓**2010**: Bachelor's degree of Cellular and Molecular Biology- Rennes 1

✓**2012**: Master's degree of applied Biology specialized in Animal Health and Science-Rennes 1/Agrocampus Ouest

Internship (M1): "Effect of different levels of protein intake on the expression of genes involved in milk components synthesis, in the cow mammary epithelial cells", UMR Production du Lait, INRA of Rennes, Saint Gilles

Internship (M2): "Effect of intra-uterine environment on muscle and adipose tissue development in the pig fetus", UMR PEGASE, INRA of Rennes, Saint Gilles

Thesis grants : 50% Apis Gene-50% INRA (GA-PHASE)

NutriMiRNa: ApisGene ; ANR MamMiRNA submitted

■ 16e Séminaire des thésards du Département de Génétique Animale ■ Amboise, 2 & 3 avril 2013

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
UMR Herbivores • Tél : +33(0)4 7362 4622
UMR GABI • Tél : +33(0)1 34 65 25 69
Courriel : lenha.mobuchon@clermont.inra.fr

INRA SCIENCE & IMPACT · APIS-GENE · AgroParisTech

Nutritional regulation of microRNAs in the lactating goat mammary gland

Lenha Mobuchon [1,2,3], Sylvain Marthey[1], Sandrine Le Guillou[1], Denis Laloë[1], Christine Leroux[2,3] and Fabienne Le Provost[1]

[1]INRA, UMR1313 Génétique Animale et Biologie Intégrative, F-78350, Jouy-en-Josas,
[2]INRA, UMR1213 Herbivores, F-63122, Saint Genès Champanelle
[3]Clermont Université, VetAgro Sup, UMR Herbivores, BP 10448, F-63000, Clermont-Ferrand
Contact: lenha.mobuchon@clermont.inra.fr

Introduction

MicroRNAs (miRNA) are non-coding RNA of 18-25 nt in length, and have critical roles in most of the biological processes [1].

Otherwise, animal nutrition considerably affects milk composition, influencing its nutritional quality. Milk components synthesis and secretion involved numerous genes, the expression of some of them can be modified by the nutrition [2, 3]. Especially, a 48h food deprivation (48-h FD) given to lactating goats decreases or increases 141 and 20 genes, respectively, including genes coding for major milk proteins, and genes coding for lipogenic enzymes related to milk components synthesis and secretion [4].

Although, recent studies have shown that miRNA expression can be modulated by nutrition in different tissues and species [5, 6], it has not yet been established in the mammary gland.

The mechanisms of regulation of genes differently expressed after a 48-h FD remain unsolved, miRNA could provide new perspectives to decipher these regulations.

Thus, this study aims to determine the impact of the feeding level on the expression of miRNA in the lactating goat mammary gland.

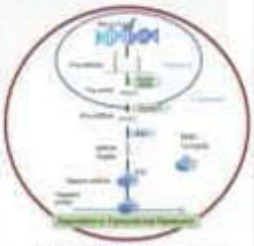
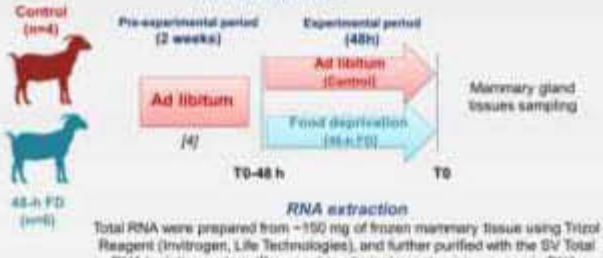


Figure 1: miRNA synthesis and the mechanism of regulation of miRNA expression [7]

Materials and Methods

Animals and diets



RNA extraction

Total RNA were prepared from ~150 mg of frozen mammary tissue using Trizol Reagent (Invitrogen, Life Technologies), and further purified with the SV Total RNA isolation system (Promega) to eliminate contaminating genomic DNA.

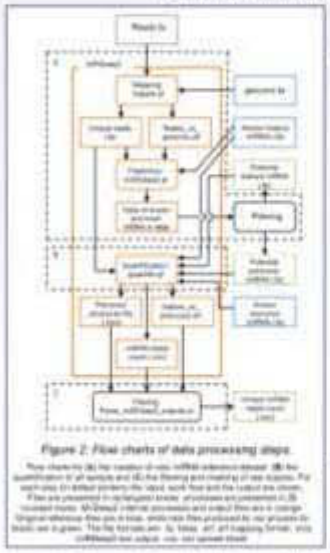


Figure 2: Flow charts of data processing steps.

Sequencing

Libraries were prepared using Illumina TruSeq® Small RNA kit and sequenced by IGBMC (Strasbourg) on a HiSeq 2500 according to the Solexa's sequencing method.

NGS data analysis

After removing the sequencing adapters and sizing the reads (17-28 nt), data analysis was processed using mostly the softwares miRdeep2 [8], (figure 2).

Reads were mapped to the goat reference genome (v1.0, [9]). Seeing that no goat miRNA are reported in miRBase, bovine miRNA from miRBase v20.0 were used as reference known mature and precursor miRNA for the annotations of the unique sequences obtained.

Statistical analysis

Statistical analysis to determine differential expression was performed with the R v3.0.1 (http://R-project.org) using the Bioconductor package DESeq2 v1.0.17 and p-values were adjusted with the Benjamini Hochberg correction [10]. Significance was set at p ≤ 0.10.

miRNA targeted pathways analysis

Prediction of potential target was based on sequence comparison using the computational application DIANA miRPath v2.0 [11]. miRNA targets were predicted with high accuracy based on DIANA-microT-CDS [11]. Only pathways with p<0.01 after correction for the False Discovery rate (FDR) [12] were considered to be enriched. The analysis has been carried out simultaneously for all differently expressed and annotated miRNA.

[1] Bartel et al., 2004, [2] Bernard et al., 2008, [3] Sundrum and Grimm, 2003, [4] Oliver et al., 2013, [5] Rosoux et al., 2013, [6] Milenkovic et al., 2012, [7] Vickers et al., 2010, [8] Friedländer et al., 2012, [9] Dong et al., 2013, [10] Benjamini and Hochberg, 1995, [11] Vlachos et al., 2012, [12] Mavrakis et al., 2008, [13] Wei et al., 2013, [14] Mercken et al., 2013, [15] Dhahbi et al., 2013, [16] Pandey et al., 2012, [17] Charoenpanitch et al., 2012

Results

Characteristics of the mammary miRNome in goats

	Mean of the libraries (n=18)
Raw reads	10,554,323
Cleaned and sized reads [1]	7,899,726
Reads mapped [2]	4,759,056
% of cleaned and sized reads	60.4 %
Unique sequences [3]	73,048

[1]Adapters removed and 17-28 nt size filtering.
[2]Reads with at least one and at most the reported alignments.
[3] Corresponding to mapped reads.
[4]Sum of the normalized mean read counts for all miRNA (6.10[4])

Table 1: Characteristics of the sequencing results

Figure 3: Number of miRNA according to their annotation and their expression level.

After cleaning, selecting on the size and mapping reads on the goat genome (table 1), 73,048 unique sequences, in average, were identified in samples, corresponding to three categories:

i) 465 miRNA identified in the bovine species, corresponding to 98.4 % of total reads[4],
ii) 218 miRNA identified in others species, which represent 1.2 % of total reads[4],
iii) 1,200 predicted novel miRNA, representing 0.4 % of total reads[4]

Most represented families:

-mir-2284, 52 members, described as ruminants specific [13]
-mir-154, 32 members
} Only reported in cow and sheep

Nutritional regulation of miRNA in the mammary gland

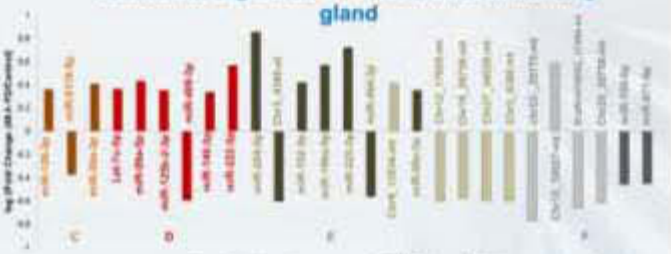


Figure 4: Differently expressed miRNA after a 48-h FD.

This study is the first to report nutriregulated miRNA in the lactating goat mammary gland. The differential analysis shown a significant change in the expression of 28 miRNA after the food deprivation, 17 miRNA known in species (in dark), and 10 putatives news (in light) (figure 4, colors corresponding to categories from figure 3).

MiR-223-3p, miR409-3p and miR-140-3p, have already been described to be affected by caloric restriction in others species and tissues [14, 15, 16]. On contrary, the expression of several miRNA has already been shown to be modulated by supplementations such as dietary polyphenols [6] or fat [17].

It is the first time that miR-6119-5p, miR-99a-5p and miR-99e-3p are found to be regulated by nutrition.

Putative targeted pathways

Figure 5: The 20 most significantly targeted KEGG pathways

Among the predicted target genes:

1. PRLR (Prolactin receptor) or GHR (GH receptor) are involved in the regulation of the development of the mammary gland.
2. CSNK1A1 (Casein kinase 1, alpha 1) could play a key role in major milk protein synthesis.
3. Some predicted genes as ACSL3 and ACSL4 (Acyl-CoA synthetase long chain member 3 and 4), ADIPOR2 (Adiponectin receptor 2), or LEPR (Leptin receptor) could be involved in the mammary lipid metabolism.

Conclusion

Our study is the first to provide an exhaustive list of goat mammary miRNA mapped on its genome and to report the nutriregulation of miRNA in the lactating ruminant mammary gland. Three of them are found to be nutriregulated for the first time.

The targeted pathways of the nutriregulated miRNA reveal their potential role in the mammary gland biology.

To decipher their function, the expression of some of them will be deregulated using cell culture model, allowing us to have a better understanding of the nutritional regulation of mammary genes related to milk synthesis and secretion.

« Non-Coding Genome », International Course, 17-21/02/14, Institut Curie, Paris, France

Poster

Nutritional regulation of microRNAs in the lactating goat mammary gland.

Lenha Mobuchon [1,2,3], Sylvain Marthey[1], Sandrine Le Guillou[1], Denis Laloë[1], Christine Leroux[2,3] and Fabienne Le Provost[1]
[1]INRA, UMR1313 Génétique Animale et Biologie Intégrative, F-78350, Jouy-en-Josas,
[2]INRA, UMR1213 Herbivores, F-63122, Saint Genès Champanelle
[3]Clermont Université, VetAgro Sup, UMR Herbivores, BP 10448, F-63000, Clermont-Ferrand
Contact: lenha.mobuchon@clermont.inra.fr

MicroRNA (miRNA) are small non-codant RNA, involved in many biological process, although their role on the mammary gland biology have not yet been established. Thus, this study aims to determine the impact of the nutritional regulation on miRNA expression in the mammary gland and their function on milk components synthesis. This study will allow us to have a better understanding of the transcriptional regulation of the nutriregulated mammary genes involved in milk components synthesis. The first step of the current work was to identify the exhaustive list of expressed miRNA in the lactating bovine and murine mammary gland (article submitted), allowing us to compare and identify species specific or common miRNA, and giving us reference lists of mammary expressed miRNA to further studies. The nutriregulation of miRNA is presently studied through two nutritional model in two important species for the dairy industry; a lipid supplementation in the lactating mammary cow and a food-deprivation in the lactating goat. After deep sequencing of miRNA extracted from the cow mammary gland and validation using qPCR, the lipid supplementation resulted in a significant decrease of two miRNA expression. After deep sequencing of miRNA from the goat mammary gland, the second model is being analyzed. Finally, the function of the nutriregulated miRNA identified through our two nutritional models will be study in transgenic mice models, and this will tell us whether these miRNA impact the synthesis of milk constituents.

Effect of a 48h food deprivation on the expression of the lactating goat mammary miRNome obtained by deep sequencing

Lenha Mobuchon[1,2,3], Sylvain Marthey[1], Sandrine Le Guillou[1], Denis Laloë[1], Fabienne Le Provost[1] and Christine Leroux[2,3]

[1]INRA, UMR1313 Génétique Animale et Biologie Intégrative, F-78350, Jouy-en-Josas, [2]INRA, UMR1213 Herbivores, F-63122, Saint Genès Champanelle,[3]Clermont Université, VetAgro Sup, UMR Herbivores, BP 10448, F-63000, Clermont-Ferrand

Contact: lenha.mobuchon@clermont.inra.fr

INTRODUCTION

Animal nutrition considerably affects milk composition, influencing its nutritional quality. It also implies a change in the expression of genes involved in milk components synthesis and secretion *[1, 2]*. Especially, a 48h food deprivation (48-h FD) given to lactating goats modified the expression of 161 genes, including genes coding for major milk proteins, and genes coding for lipogenic enzymes related to milk components synthesis and secretion *[3]*. The mechanisms of the regulation of genes differently expressed after a 48-h FD remain unsolved.

MicroRNAs (miRNA) are non-coding RNA of 18-25 nt in length, and have critical roles in most of the biological processes *[4]*. MiRNA expression has recently been shown to be modulated by nutrition in different tissues and species *[5, 6]*, although it has not yet been established in the mammary gland. MiRNA could provide new perspectives to decipher the genes expression regulations reported in mammary gland due to a 48-h FD. Moreover, despite the availability of the goat genome in 2013 (http://goat.kiz.ac.cn/GGD/), its annotation regarding microRNA is still uncompleted.

This study aims to determine the impact of 48-h FD on the expression of miRNA in the lactating goat mammary gland, providing an enrichment of the annotation of goat genome for furthers studies.

MATERIALS AND METHODS

Animal and diets

Ten Alpine goats at the peak of lactation were fed ad libitum during two weeks (pre-experimental period). Forty eight hours before slaughtering, four goats were still fed ad libitum (Control), the six others were food deprived (48h-FD) *[3]*.

RNA extraction and sequencing

Total RNA were prepared from ~150 mg of frozen mammary tissue using Trizol Reagent (Invitrogen, Life Technologies). Libraries were prepared using Illumina TruSeq® Small RNA kit and sequenced by IGBMC (Strasbourg) on a HiSeq 2500 according to the Solexa's sequencing method.

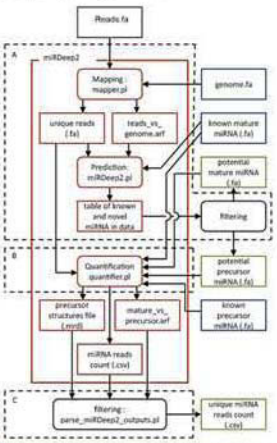


Figure 1: Flow charts of data processing steps.

Flow charts for (A) the creation of new miRNA reference dataset, (B) the quantification of all sample and (C) the filtering and cleaning of raw outputs. For each step (in dotted borders) the input, work flow and the output are shown. Files are presented in rectangular boxes, processes are presented in 24 rounded boxes. MiDeep2 internal processes and output files are in orange. Original reference files are in blue, while new files produced by our process (in black) are in green. The file formats are: .fa, fasta; .arf, arf mapping format; .mrd, miRDeep2 text output; .csv, csv spread-sheet.

NGS data analysis

Data analysis was processed using mostly the software miRdeep2 *[8]*, (figure 2), using to the goat genome as reference genome (CHIR1.0, *[9]*). Seeing that no goat miRNA are reported in databases, bovine miRNA from miRBase v20.0 were used as reference known mature and precursor miRNA for the annotations of the unique sequences obtained.

Statistical analysis

Differential analysis was performed with the R v3.0.1 (http://.R-project.org) using the Bioconductor package DESeq2 v1.0.17 and p-values were adjusted with the Benjamini Hocheberg correction *[10]*. Significance was set at $p \leq 0.10$.

miRNA targeted pathways analysis

Putative targeted pathways were identified using DIANA miRPath v2.0 *[11]*, simultaneously for differently expressed and annotated miRNA. Only pathways with p<0.01 after correction for the False Discovery rate (FDR) *[12]* were considered to be enrichied.

CONCLUSION

Our study is the first to provide an exhaustive list of goat mammary miRNA mapped on its genome and to report the nutriregulation of miRNA in the lactating ruminant mammary gland. Three of them are found to be nutriregulated for the first time. The targeted pathways of the nutriregulated miRNA reveal their potential role in the mammary gland biology.

The annotation of miRNA genes in the goat genome will be used as references for studies to understand their impact in the mammary gland.

Thus, to decipher the function of nutriregulated miRNA, their expression will be deregulated using cell culture model.

RESULTS

Annotation of the goat genome

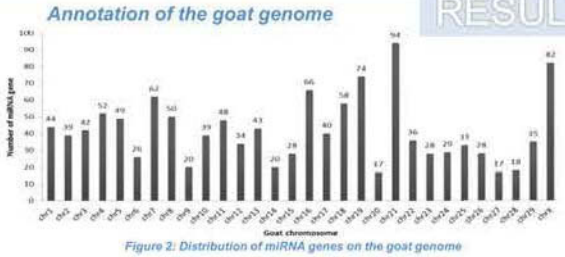


Figure 2: Distribution of miRNA genes on the goat genome

We identified 1,292 miRNA genes, distributed on all chromosomes, allowing a significant upgrading of the annotation of the goat genome.

Characteristics of the mammary miRNome in goat

	Mean of the libraries (n=10)
Raw reads	15,554,323
Cleaned and sized reads [a]	7,899,726
Reads mapped [b]	6,756,056
% of cleaned and sized reads	85.4 %
Unique sequences [c]	73,048

[a]Adapters removed and 17-28 nt size filtering
[b]Reads with at least one and at most five reported alignements
[c] Corresponding to mapped reads
[d]Sum of the normalized mean read counts for all miRNA (6.10[6])

Table 1: Characteristics of the sequencing results

Figure 3: Number of miRNA according to their annotation and their expression level.

We identified 1,883 matures expressed miRNA, corresponding to three categories:

i) 465 miRNA identified in the bovine species, corresponding to 98.4 % of total reads[d].
ii) 218 miRNA identified in others species, which represent 1.2 % of total reads[d].
iii) 1,200 predicted novel miRNA, representing 0.4 % of total reads[d].

They result in a significant enrichment of the repertoire of goat miRNA, can serve as reference to understand their impact in the mammary gland.

Nutritional regulation of miRNA in the mammary gland

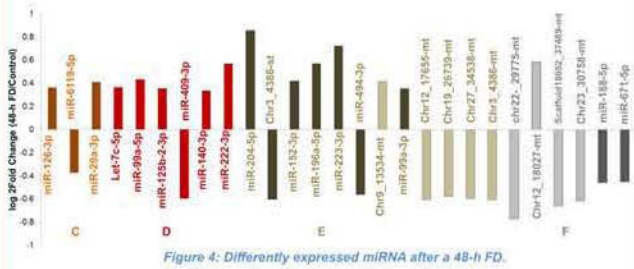


Figure 4: Differently expressed miRNA after a 48-h FD.

The expression of 28 miRNA was modified after the food deprivation; 17 miRNA known in species (in dark), and 10 putatives news (in light) (colors corresponding to categories from figure 3).

Some annotated miRNA have already been described to be affected by caloric restriction, in different species and tissues *[13, 14, 15, 16]*, others annotated miRNA (miR-6119-5p, miR-99a-5p and miR-99a-3) are found to be regulated by nutrition for the first time.

Putative targeted pathways

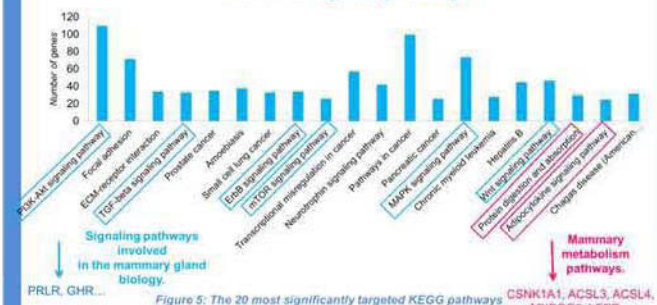


Figure 5: The 20 most significantly targeted KEGG pathways

Computational application DIANA miRPath pinpoints putative targeted pathways by annotated and differently expressed miRNA, whom severals are known to be involved in the mammary gland biology.

[1]: Bernard et al., 2008, *[2]*: Bauman and Grinari, 2003, *[3]*: Ollier et al., 2007, *[4]*: Bartel et al., 2004, *[5]*: Romao et al., 2012, *[6]*: Milenkovic et al., 2012, *[7]*: Vickers et al., 2014, *[8]* : Friedander et al., 2012, *[9]*: Dong et al., 2013, *[10]*: Benjamini and Hochberg, 1995, *[11]*: Vlachos et al., 2012, *[12]*: Maragkakis et al., 2009, *[13]*: Mercken et al., 2013, *[14]*: Dhabi et al., 2013, *[15]*: Pando et al., 2012, *[16]*: Chartoumpekis et al., 2012

Gordon Research Conference: *Seminar and Conference-Mammary Gland Biology, 07-13/06/14, Barga, Italy*

Oral communication & Poster

Effect of a 48h food deprivation on the expression of the lactating goat mammary miRNome obtained by deep sequencing.

Mobuchon L[1,2,3], Marthey S[2], Le Guillou S[2], Laloë D[2], Le Provost F[2] and Leroux C[1,3]

[1]INRA, UMR1213 Herbivores, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France
[2]INRA, UMR1313 Génétique Animale et Biologie Intégrative, F-78150 Jouy-en-Josas, France
[3]Clermont Université, VetAgro Sup, UMR1213 Herbivores, BP 10448, F-63000, Clermont-Ferrand, France

MicroRNAs (miRNA) are small non coding RNAs that regulate gene expressions at a post-transcriptional level, conferring a crucial role in most of the biological processes. Otherwise, animal nutrition considerably affects milk composition, influencing its nutritional quality for consumers. Milk components synthesis and secretion involve numerous genes. Especially, a 48h food deprivation applied to lactating goats modifies the expression of 161 genes, including genes coding for major milk proteins and for lipogenic enzymes related to milk components synthesis and secretion (Ollier *et al.,* 2007). However, the mechanism of their regulation remains unsolved. MiRNA could provide new possibilities to decipher these regulations.

Thus this study aims to identify miRNA, which expression is regulated by food deprivation and could control the genes differentially expressed.

Here, we established the exhaustive list of miRNA (the miRNome) expressed in the lactating mammary gland of goat receiving an ad libitum diet *versus* 48h food deprived goat, using Solexa (Illumina) sequencing. A differential analysis showed significant changes in the expression of 27 miRNA, 17 miRNA annotated in the bovine species and 10 putative news miRNA. It is the first study reporting miRNA whose expressions are affected by nutrition in the mammary gland. Three of them, are notified to be nutriregulated for the first time. The identification of the putative targeted pathways of the 27 miRNA, using computational applications, indicates that among the predicted targets some could play a crucial role in the mammary development such as the genes coding for the prolactin receptor or the growth hormone receptor, or an important role in the lipid metabolism such as the genes coding for the leptin receptor, or the adiponectin receptor.

To decipher the function of some of those nutriregulated and determine their targets, their expressions will be deregulated in mammary epithelial cells.

Effect of a 48h food deprivation on the lactating goat mammary miRNome obtained by deep sequencing

Lenha Mobuchon[1,2], Sylvain Marthey[1], Sandrine Le Guillou[1], Denis Laloë[1], Fabienne Le Provost[1] and Christine Leroux[1,2]
[1]INRA, UMR1313 Genétique Animale et Biologie Intégrative, F-78352 Jouy-en-Josas
[2]INRA, UMR1213 Herbivores, F-63122 Saint Genès Champanelle
[3]Clermont Université, VetAgro Sup, UMR Herbivores, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand
Contact: lenha.mobuchon@clermont.inra.fr

Background & Objectives

Animal nutrition considerably affects milk composition along with expression of genes involved in milk synthesis and secretion. A 48h food deprivation (FD) in lactating goats led to a decrease in milk yield and components (Lactose, Proteins and Fat) as well as 161 differentially expressed genes (DEG), including genes encoding major milk proteins and lipogenic enzymes [1]. The mechanism of regulation of these genes remains unsolved.

MicroRNAs (miRNA) are non-coding small RNA which have critical roles in most of the biological processes [2]. miRNA have already been described to be nutriregulated in several tissues [3,4], but not yet in mammary gland. miRNA could provide new insights to decipher the genes expression regulations reported in mammary gland due to FD.

The current study aims to identify the impact of FD on the expression of miRNA in lactating goat mammary gland, and to decipher their functions.

Result (1) : Lactating goat mammary miRNomes

Table1: Mammary miRNome in Control and FD goats

	Control[a]	FD[a]
Raw reads	14,214,146	16,415,279
Cleaned reads[b]	13,787,000	15,681,089
% of raw reads	97%	95%
Sized reads[c]	6,838,797	8,464,633
% of raw reads	48%	51%
Reads mapped[d]	5,784,949	7,278,339
% of raw reads	40%	44%
Unique sequences corresponding to mapped reads	67,971	75,474

[a]means of data for the 4 Control goats, [b]means of data for the 6 FD goats, [c]sequencing adaptors removed, [c]>26 in size filter, [d]reads with at least one and at most five reported alignments on goat genome

67,971 and 75,474 unique sequences were identified in Control and FD goats, respectively, leading to the prediction and annotation of 1,804 miRNA divided in 539 known and 1,295 putative miRNA, not yet described in others species.

Results (2): Mammary nutriregulated miRNA

30 miRNA (19 known and 11 putative) were found affected in FD goat compare with Control miRNome. Five nutriregulated miRNA have already been described in restriction challenge in differents species and tissues (miR-126-3p, miR-140-3p, miR-223-3p, miR-409-3p, miR-451-5p) [12, 13, 14].

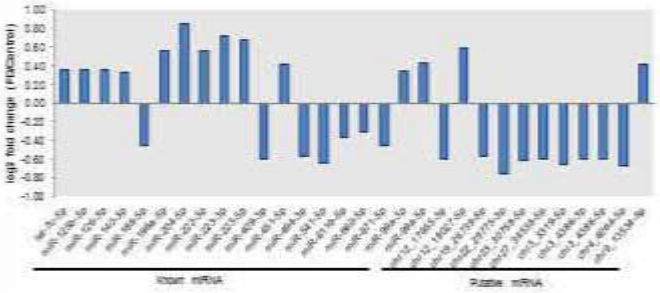


Figure 2: miRNA whose expression are significantly affected by FD

Putative targets of nutriregulated miRNA were predicted along with targeted pathways using computational applications and it reveals several ways involved in mammary gland development (blue) as well as in mammary metabolism (red), suggesting a potential role of nutriregulated miRNA in the mammary gland physiology.

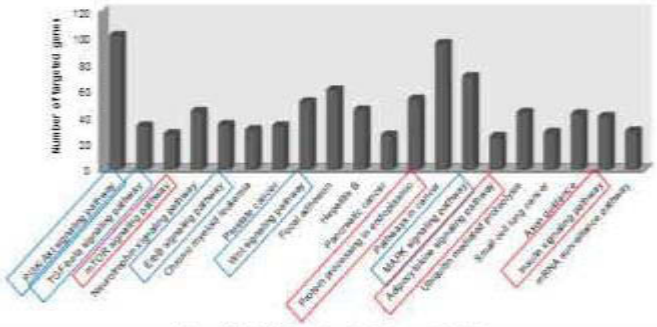


Figure 3: The 20 most putative targeted pathways.

Research design

Total RNA were isolated from 12 Alpine goats mammary gland at the peak of lactation, 4 were fed ad libitum (Control) whereas the 6 others were food deprived (FD) during 48h.

Libraries were prepared and sequenced (IGBMC, Strasbourg, France) on a HiSeq 2500, according to the Solexa's sequencing method (Illumina). Sequencing analyses were performed using mostly the miRDeep2 software (Figure 1), using goat genome (CHIR 1.0) [5,6] and available miRNA in miRBase v21 for mapping and annotation, respectively. Effect of nutrition was analysed using the R packages HTSFilter [7] and DESeq2 [8] (n=6, p<0.1) and p-values were adjusted with the Benjamini-Hochberg correction [9].

PCR validation of 8 nutriregulated miRNA were performed using TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription and Taqman® Small RNA Assays (Applied Biosystem).

Putative targeted pathways were analyzed using DIANA microTS 5.0 [10], Custom TargetScan v5.2 [11]. Regulatory networks were analysed using IPA software (Ingenuity Systems Inc., Redwood City, CA).

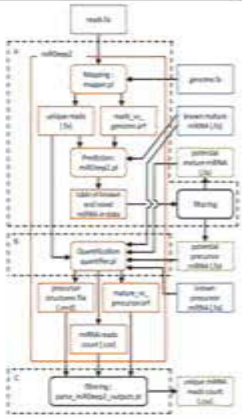


Figure 1: Flow chart of processing steps

Flow chart of processing steps. (A) the creation of new miRNA reference classes, (B) the quantification of all samples and (C) the filtering and cleaning of raw outputs. In dotted borders, the input, each box and the output are shown. Files are presented in rectangular boxes, processes are presented in rounded boxes. miRDeep2 internal processes and output files are in orange. Original reference files are in blue, while new files produced by our process (in black) are in green.

Results (3): Link between nutriregulated miRNA and DEG

Among putative targets of nutriregulated miRNA, 47 DEG previously identified by microarray in the same samples [4] were detected. Analysis of the functions of those potentially targeted DEG (Table 2) suggest their involvment in cell growth and proliferation in mammary gland.

Table 2: Biological pathways for the 47 DEG potentially targeted by nutriregulated miRNA

Name	p-value	Number of DEG	DEG
Cell cycle	4.93E-02	10	CDS4,EFHC1, ESR1, GNB3L1, RAD54, PLAGL2, RAD54, TEX3, UBE2C3, NPEPPS, EFHC1
Cellular growth and proliferation	4.93E-02	20	ABCC3, CCT8, CD24, DCUN1D5, DPAGT1, ESR1, GNB3L1, HSD11B1, INSIG1, LEPREL2, PA2G4, PLAGL2, RAD54, RND1, SLC35A3,TEX3, TPR, TMEM175,TSPAN31, UBE2C3
Cellular movement	4.73E-02	11	CD24,DPAGT1,ESR1,GNB3L1,PA2G4,RAD54,TEX3, EFHC1, TPR3, STS, TPR
Lipid metabolism	4.93E-02	7	DPAGT1, ESR1,HSD11B1,INSIG1,PLAGL2,SLC35A3,TPR
Molecular transport	4.93E-02	9	ABCC3, CHGA3, ESR1, HSD11B1, INSIG1, PLAGL2, SLC35A3, TPR

Above, example of a downregulated DEG (Figure 4), ESR1 which is potentially targeted by 3 upregulated miRNA (miR-222-5p, miR-125b-3p and chr9_13534-5p) and 1 downregulated miRNA (miR-188-5p) by FD.

Interestingly, miR-222-3p has been shown to directly target ESR1 in mammary epithelial cells lines [15]. ESR1 controls the genetic program of the cell cycle progression and growth in the mammary gland [16]. miRNA might explain partly the downregulation of DEG in FD goats.

Figure 4: Predicted binding sites of nutriregulated miRNA on ESR1 trancript

Conclusion and Future plans

The expression of 30 miRNA were significantly affected by the food deprivation. It constitutes the first evidence of the impact of nutrition on miRNA expression in mammary gland of ruminants. Among previously identified DEG, 47 were found targeted by nutriregulated miRNA. Investigation of DEG and miRNA functions revealed involvement in cell growth and proliferation, suggesting that miRNA may give insights to explain the slowdown observed in FD goat mammary gland.

A functionnal study will be performed on selected nutriregulated to study their deregulation in mammary epithelial cells *in vitro* and to identify direct miRNA target as well as their functions in milk components synthesis ans secretion.

Having a better knowledge of the regulation of nutriregulated genes in the mammary gland may facilitate the comprehension of nutrition impact in this organ, to apply diet in breeding modulating milk composition for consumer.

References
[1] Chilliard et al., 2007, [2] Bartel et al., 2004, [3] Mathieu et al., 2012, [4] Zhang et al., 2012, [5] Friedländer et al., 2012, [6] Zang et al., 2012, [7] Rau et al., 2011, [8] Love et al., 2014, [9] Benjamini and Hochberg, 1995, [10] Vlachos et al., 2012, [11] Lewis et al., 2005, [12] Pena et al., 2012, [13] Gerlach et al., 2012, [14] Chen et al., 2012, [15] Chen et al., 2009, [16] Feng et al., 2007

11th International Symposium on Milk Genomics and Human Health, 06-08/10/14, Aarhus, Denmark

Oral communication & Poster

Effect of a 48h food deprivation on the lactating goat mammary miRNome obtained by deep sequencing.

Mobuchon L[1,2,3], Marthey S[2], Le Guillou S[2], Laloë D[2], Le Provost F[2] and Leroux C[1,3]

[1]INRA, UMR1213 Herbivores, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France
[2]INRA, UMR1313 Génétique Animale et Biologie Intégrative, F-78150 Jouy-en-Josas, France
[3]Clermont Université, VetAgro Sup, UMR1213 Herbivores, BP 10448, F-63000, Clermont-Ferrand, France

Animal nutrition considerably affects milk composition, influencing its nutritional quality for consumers. Milk components synthesis and secretion involve numerous genes some of which are nutriregulated. Especially, a 48h food deprivation applied to lactating goats modifies the expression of 161 genes, including genes coding for major milk proteins and for lipogenic enzymes related to milk components synthesis and secretion (Ollier *et al.,* 2007). However, the mechanism of their regulation remains unsolved. MicroRNA (miRNA) are small non coding RNA that regulate genes expression at a post-transcriptional level, conferring a crucial role in most of the biological processes. Due to their pleiotropic role, miRNA could provide new possibilities to decipher these regulations. Thus this study aims to identify miRNA which expression is regulated by food deprivation and could control differentially expressed genes (DEG).

Here, we established the exhaustive list of miRNA expressed (the miRNome) of the lactating mammary gland from goat receiving an ad libitum diet and from goat 48h food deprived, using Solexa (Illumina) sequencing. The mammary miRNA were localized and clustered on the caprine chromosomes allowing an enrichment of the annotation of goat genome. The intragenic location of some miRNA genes was showed to be conserved in different species. Then, a differential analysis between the 2 nutritional trials was performed and showed significant changes in the expression of 30 miRNA, 19 miRNA already annotated in others species and 11 putative miRNA. It is the first study reporting miRNomes whose profiles are affected by nutrition in the mammary gland. Links between the nutriregulated miRNA and DEG identified using transcriptomic mentioned above were analyzed, revealing 47 DEG potentially targeted by nutriregulated miRNA.

To decipher the function of some of those nutriregulated miRNA and to determine their targets, their expression will be deregulated in mammary epithelial cells.

Food deprivation affects the goat mammary miRNome

Mobuchon L.[1,2], Marthey S.[1], Le Guillou S.[1], Laloë D.[1], Le Provost F.[1] and Leroux C.[2]

[1]INRA, UMR1313 Génétique Animale et Biologie Intégrative, F-78350, Jouy-en-Josas, France
[2]INRA, UMR1213 Herbivores, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France / Contact: christine.leroux@clermont.inra.fr

Hypothesis:

Nutrition affects milk composition thus influencing its nutritional properties. Nutrition also modifies the expression of mammary genes[1], whose regulation is not fully understood. MicroRNAs (miRNA) are small non coding RNA which are important post-transcriptional regulators of gene expression by targeting messenger RNAs. MiRNA are thought to regulate at least ~60% of genes and are involved in all cellular processes[2]. However, few studies have reported the role of miRNA in the development of the mammary gland (MG), and in the lactation function in particular in the ruminant species. Very recently, annotation of the goat genome using next generation sequencing of microRNA expressed by the lactating MG was reported[3] .

Here our goal was to characterize miRNA whose expression is regulated by nutrition in the lactating goat MG, which may provide clues to deciphering regulations of the biosynthesis and secretion of milk components.

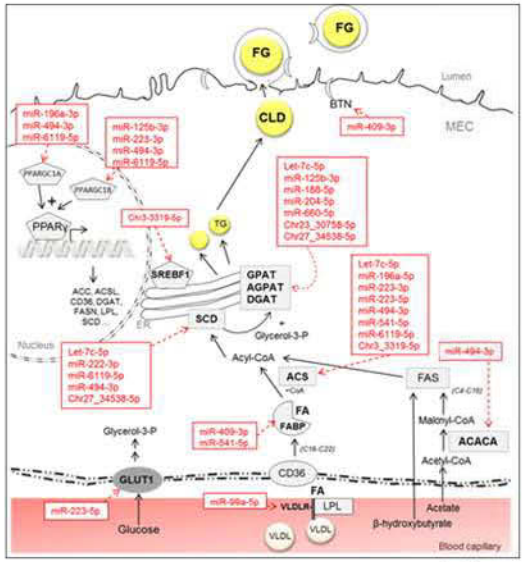
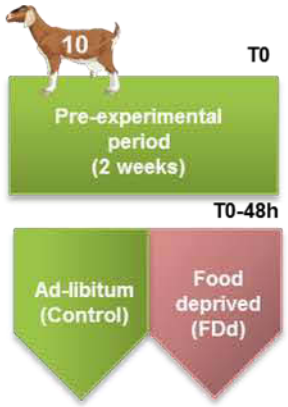


Fig. 1: Potentiel involvement of nutriregulated miRNA in milk fat synthesis

Materials & Methods:



Mammary gland RNA:

- ✓ RNA extraction
- ✓ Next Generation Sequencing (Illumina, Solexa)

Sequencing data treatment:

- ✓ Remove sequencing adapters
- ✓ Size filter -> 17-28 nt in lenght
- ✓ Mapping, annotation and quantification: **miRDeep2** software

Differential analysis: **HTSFilter** and **DESeq2** R packages

Validation: Stem-loop RT-qPCR

Bioinformatic analysis:
Computational applications (TargetScan, DIANA and IPA)

Results & Discussion:

Food deprivation modulated the expression of 30 miRNA (padj<0.1); 16 were down-regulated and 14 were up-regulated. Diana-microT predictive tools suggested a potential role for several nutriregulated miRNA in lipid metabolism (Fig. 1).

Among the putative targets, 47 were previously identified as differently expressed genes (DEG)[1] by microarray. When the way of variations in DEG and nutriregulated miRNA was taken account, 19 DEG were found to be potentially targeted by nutriregulated miRNA. The functions of these 19 DEG revealed, notably, their involvement in tissue remodeling. In particular, three nutriregulated miRNA potentially target mRNA of *ESR1* which is a transcription factor known to regulate cell cycle and growth in the MG[4] (Fig. 2).

Moreover, some nutriregulated miRNA (such as miR-671, miR-494, miR-541 and miR-409a) were located within QTL region associated with milk trait.

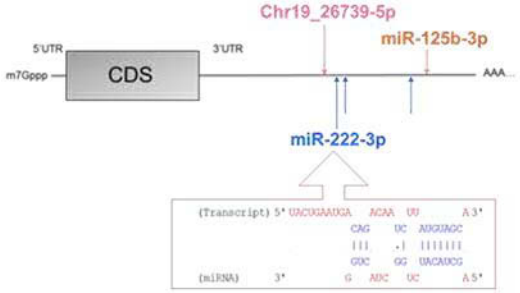


Fig. 2: Predicted nutriregulated miRNA binding site on ESR1 mRNA

Conclusions:

This study offers the evidence of nutriregulated miRNA in the ruminant MG. Characterization of these 30 miRNA could contribute to a clearer understanding of gene regulation in the MG in response to nutrition.

References

1: Ollier et al. (2007) J Nutr 137: 560-567, 2: Bartel DP (2004) Cell 116: 281-297, 3: Mobuchon et al. (in press) BMC Genomics, 4: Feng et al. (2007) Proc Natl Acad Sci USA 104: 14718-14723.

INRA SCIENCE & IMPACT

***9th Congress of the International Society of Nutrigenetics/Nutrigenomics (ISNN)**, 17-19/05/15, University of North Carolina (Chapel Hill), USA*

Poster

Food deprivation affects the goat mammary miRNome.

Mobuchon Lenha[1,2], Marthey Sylvain[1], Le Guillou Sandrine[1], Laloë Denis[1], Le Provost Fabienne[1] and Leroux Christine[2]

[1]INRA, UMR1313 Génétique Animale et Biologie Intégrative, F-78350, Jouy-en-Josas, France
[2]INRA, UMR1213 Herbivores, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France

Objective: Nutrition affects milk composition thus influencing its nutritional properties. Nutrition also modifies the expression of mammary genes, whose regulation is not fully understood. MicroRNAs (miRNA) are small non coding RNA which are important post-transcriptional regulators of gene expression by targeting messenger RNAs. Our goal was to characterize miRNA whose expression is regulated by nutrition in the lactating goat mammary gland (MG), which may provide clues to deciphering regulations of the biosynthesis and secretion of milk components.

Methods: RNA samples from MG of Alpine goats at peak lactation (48±2 days) were used to construct ten libraries from the MG of four Control and six food-deprived goats using the Illumina/Solexa technology. After cleaning, reads were filtered according to their size (17-28 nt). Data analyses were processed using mostly miRDeep2 software as described by Le Guillou *et al.* (2014). The cleaned sequences were clustered into unique reads and then mapped to the reference Goat genome. The quantification results produced by the quantifier.pl module were then filtered with a custom perl script parse_miRDeep2_outputs.pl. RNA sequencing data were deposited in the Gene Expression Omnibus (GEO): GSE61025. Statistical analysis to determine differential expression was performed using the Bioconductor package DESeq2.

Results: Food deprivation modulated the expression of 30 miRNA (padj<0.1); 16 were down-regulated and 14 were up-regulated. Diana-microT predictive tools suggested a potential role for several nutriregulated miRNA in lipid metabolism. Among the putative targets, 19 were previously identified as differently expressed genes (DEG). The functions of these 19 DEG revealed, notably, their involvement in tissue remodelling. Some nutriregulated miRNA were located within QTL region associated with milk trait.

Conclusions: This study offers the evidence of nutriregulated miRNA in the ruminant MG. Characterization of these 30 miRNA could contribute to a clearer understanding of gene regulation in the MG in response to nutrition.

RESUME

Le facteur nutritionnel affecte de façon significative la sécrétion et la composition des constituants du lait qui conditionnent sa qualité nutritionnelle. Dans la glande mammaire, ces processus font intervenir de nombreux gènes dont l'expression est modulée par l'alimentation, cependant les mécanismes de régulation sous-jacents ne sont pas connus. Les microARNs (miARN) sont des petits ARN non codants qui se lient sur leurs ARNm cibles pour en réguler l'expression. Ils ouvrent donc des pistes d'investigation pour la compréhension de ces mécanismes. La première partie de mon travail de thèse a consisté à obtenir une meilleure connaissance des miARN exprimés dans la glande mammaire, notamment en dressant les miRNomes de référence par séquençage haut débit chez la souris, la vache et la chèvre. Ensuite, pour la première fois, l'impact de la nutrition sur l'expression des miARN mammaires a été étudié. Deux modèles ruminants, un modèle dit « extrême » et un modèle de supplémentation lipidique proche des conditions d'élevage, ont permis d'identifier 30 et 2 miARN, respectivement, dont l'expression est nutrirégulée. L'analyse *in silico* des cibles des miARN nutrirégulés a révélé un rôle potentiel de ceux-ci dans le métabolisme des lipides. Certaines des cibles sont effectivement différentiellement exprimées dans ces modèles, parmi celles-ci certains gènes sont essentiels pour la lactation tels que *ESR1*. Enfin, une étude pilote de la fonction de trois miARN nutrigulés a été initiée *in vitro* dans des cellules épithéliales mammaires bovines. Ces travaux permettent donc d'apporter des premiers éléments pour la compréhension de la régulation de l'expression des gènes en réponse à la nutrition et de l'impact des miARN sur la lactation.

Mots clés : miARN, glande mammaire, nutrition, lactation, ruminant, séquençage haut débit

ABSTRACT

Nutrition significantly affects the secretion and the composition of milk which determine its nutritional quality. In the mammary gland, regulation of these processes involves numerous genes which expression can be affected by nutrition. However, their regulations remain unclear. MicroRNAs (miRNA) are small non coding RNA which can bind mRNAs and regulate their expression of target genes. Consequently, they offer opportunities to understand the regulation of gene expression in response to nutrition. The first step of my PhD aimed to obtain a better knowledge of miRNA expressed in the mammary gland. Mammary miRNome were established from the lactating mouse, cow and goat using high-throughput sequencing. Later, the effect of nutrition on the expression of miRNA in the mammary gland was analyzed for the first time. Two models in ruminants, a food deprivation ("extreme" model) and a lipid supplementation (model similar to breeding conditions) highlighted 30 and 2 nutriregulated miRNA, respectively. The analysis of nutriregulated miRNA's predicted targets, *in silico*, revealed their potential role in lipid metabolism. Some of those target genes have been previously identified as differently expressed in the same conditions and could thus be involved in the regulation of the expression of genes essential for the mammary gland function, such as *ESR1*. Finally, three nutriregulated miRNA were selected and used in a preliminary study of their functions *in vitro* in bovine mammary epithelial cells. These works bring first evidences in understanding the nutritional regulation of gene expression in the mammary gland as well as the role of miRNA in lactation.

Key words: miRNA, mammary gland, nutrition, lactation, ruminant, high-throughput sequencing

LABORATOIRES D'ACCUEIL: Equipe **A**limentation **G**énomique et **L**actation, UMR1213 Herbivores, Inra de Theix, F-63122 Saint Genès Champanelle, Equipe **G**énomique **F**onctionnelle et **P**hysiologie de la **G**lande **M**ammaire, UMR1313 Génétique Animale et Biologie Intégrative, Inra de Jouy-en-Josas, F-78350 Jouy-en-Josas.