



HAL
open science

Caractérisation de biomarqueurs cellulaires pour étudier la plasticité mammaire au cours de la lactation chez la vache laitière.

Magdalena Arevalo Turrubiarte

► To cite this version:

Magdalena Arevalo Turrubiarte. Caractérisation de biomarqueurs cellulaires pour étudier la plasticité mammaire au cours de la lactation chez la vache laitière.. Biologie animale. Agrocampus Ouest, 2016. Français. NNT : 2016NSARB280 . tel-01643218

HAL Id: tel-01643218

<https://theses.hal.science/tel-01643218v1>

Submitted on 21 Nov 2017

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.

AGRO CAMPUS

OUEST

M. AREVALO TURRUBIARTE • 28 septembre 2016

Thèse AGROCAMPUS OUEST
sous le label de l'Université Bretagne Loire
pour obtenir le grade de
DOCTEUR D'AGROCAMPUS OUEST
Spécialité Biologie et Agronomie

ÉCOLE DOCTORALE • Vie - Agro - Santé (VAS)
LABORATOIRE D'ACCUEIL • UMR Physiologie,
environnement et génétique pour l'animal et
les systèmes d'élevage (PEGASE)

**Caractérisation de
biomarqueurs cellulaires
pour étudier
la plasticité mammaire
au cours de la lactation
chez la vache laitière**

Pierre-Guy MARNET

Professeur, AGROCAMPUS OUEST, UP SPA / *président*

Christine DUVAUX-PONTER

Professeure, MoSAR, AgroParisTech, Paris / *rapporteuse*

Fabienne LE PROVOST

Directrice de recherche, UMR GABI, INRA Jouy-en-Josas /
rapporteuse

Christian SALIGAUT

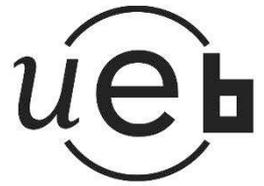
Professeur, Université Rennes1, TREC, IRSET, INSERM /
examineur

Frédéric DESSAUGE

Chargé de recherche, UMR INRA-AO Pegase /
directeur de thèse

Vanessa LOLLIVIER

Maître de conférences, AGROCAMPUS OUEST, UMR PEGASE /
co-encadrante



n° d'ordre : 2016-19

n° de série : B-280

THESE / AGROCAMPUS OUEST

Sous le label de l'Université Européenne de Bretagne

pour obtenir le diplôme de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT SUPERIEUR DES SCIENCES AGRONOMIQUES, AGRO-ALIMENTAIRES, HORTICOLES ET DU PAYSAGE

Spécialité : Biologie et Agronomie

Ecole Doctorale : Vie – Agro – Santé

présentée par :

Magdalena AREVALO TURRUBIARTE

Caractérisation de biomarqueurs cellulaires pour étudier la plasticité mammaire au cours de la lactation chez la vache laitière

Soutenue le 28 septembre 2016 devant la commission d'Examen

Composition du jury :

Pr. Christine DUVAUX-PONTER, MoSAR, AgroParisTech, Paris
Dr. Fabienne LE PROVOST, GABI, INRA, Jouy-en-Josas
Pr. Pierre-Guy MARNET, Agrocampus Ouest, Rennes
Pr. Christian SALIGAUT, TREC, IRSET, INSERM, Rennes
Dr. Vanessa LOLLIVIER, Agrocampus Ouest, Rennes,
Dr. Frédéric DESSAUGE, PEGASE, INRA, Saint Gilles

Rapporteur
Rapporteur
Président du jury
Membre
Co-encadrant
Directeur de thèse



Remerciements

Au Cercle de Feu ; à ceux qui nous ont précédé, à ceux qui sont présents, et
à ceux qui doivent encore venir...

Al Círculo de fuego; los que ya se han ido, los que están presentes y los
que aún tienen que llegar...

Don Miguel Ruiz, Sabiduría Tolteca.

Tout d'abord je voudrais remercier Frédéric Dessauge et Vanessa Lollivier pour me diriger tout au long de ces trois années de thèse. Ils ont été toujours à l'écoute avec beaucoup de patience. Ses conseils sont pour beaucoup m'aider dans le résultat final de ce travail. Je vous remercie beaucoup pour votre temps de relectures et de l'aide aux corrections du manuscrit qui ont été très appréciables. Merci pour votre aide à améliorer ma formation professionnelle et scientifique. Merci pour votre bonne humeur et pour être à l'écoute. Merci pour le beau bracelet que vous m'avez donné, ça va m'aider à me rappeler de vous et des choses que vous m'avez montré pour améliorer dans mes présentations, rédactions, etc. Cette thèse lui doit beaucoup. Pour tout cela merci.

Je remercie de même le Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) et l'ambassade française au Mexique pour avoir financé ma bourse de thèse. Je remercie également l'unité UMR1348 PEGASE pour le soutien financier de la thèse.

Mes sincères remerciements au personnel de la ferme expérimentale à Méjussiaume, Le Rheu. Merci pour votre disposition, pour votre aide et pour le temps investi pendant les prélèvements des échantillons.

Je remercie les rapporteurs et examinatrices de ce travail pour avoir accepté d'être dans mon jury et d'avoir accepté d'assister à la présentation de ma thèse. Leurs évaluations et remarques m'ont beaucoup apporté pour regarder et valoriser mes résultats d'une autre perspective.

J'exprime tous mes remerciements à l'ensemble des membres de mon comité de thèse qui ont contribué avec ses remarques et recommandations : Sandrine Truchet, Marie-Hélène Perruchot, Pierre-Guy Marnet et Frédéric Capel. Un autre merci à ma tutrice Valerie Fessard pour ses remarques et suggestions.

Je remercie tous les personnes qui conforment l'équipe lactation dirigé par Helene Quesnel, pour les bons moments partagés et pour les discussions intéressantes autour des réunions.

Un grand merci à Marie Helene Perruchot, Frédéric Mayeur et Laurence Finot pour les bons moments partagés au tour de la salle de culture. Merci à tous ainsi à Eric Chanut pour vos conseils et pour votre temps à m'aider lors de la préparation de ma soutenance. Je remercie à Marie Hélène Perruchot pour son implication dans le projet, pour son aide et pour les bons conseils sur la problématique de ma thèse. Un grand merci à Sandra Wiart pour votre temps et soutien pendant les expériences en histologie, merci pour ton bon humeur et sympathie, j'ai beaucoup aimé travailler avec toi dans le laboratoire d'histologie, ainsi partagé de la bonne conversation avec Michelle Formal. Une autre merci tout particulièrement à Laurence Finot, merci pour m'avoir formé dans les différentes techniques de laboratoire, j'ai beaucoup apprécié ton enthousiasme et ta sympathie, merci pour tous tes conseils, pour être disponible et de dédier de ton temps à m'aider, merci pour relire le français et pour les bonnes discussions sur mon projet de thèse.

Il m'est impossible d'oublier Clarisse Pien et Florence Dufreneix en tant que stagiaires pour son aide précieuse pour ma recherche et pour leur gentillesse.

J'adresse de sincères remerciements à tous les personnes qui m'ont aidé à corriger mon française : Magalie Nerrou, Cécile Leray, Pierre-Edouard Mercier, Agnes Starck. J'ai beaucoup apprécié votre amitié et pour votre temps pris à m'aider.

Pendant mes trois années de thèse j'ai partagé le bureau avec Sandy Bensoussan et Séverine Parois. Merci pour vos conseils et le courage et motivation que vous m'aviez apporté, ainsi pour les bonnes discussions tous a contribué à travailler dans une ambiance sympathique.

Je tiens évidemment à remercier tout le personnel, administratif, scientifique de l'unité PEGASE et ADNC pour son accueil chaleureux et pour tous ces bons moments passés au laboratoire mais aussi pour la bonne ambiance et des bonnes discussions ont été très précieuses. Merci pour les petits stops que certains d'entre vous aviez fait au milieu de la route pour m'amener à l'unité et m'éviter d'être trempé ou passer froid pendant l'hiver. Merci aussi pour les covoiturages partagés de Rennes ou Saint Gilles-INRA, Clémence, Elodie, Aurianne, etc (j'espère de ne pas oublier quelqu'un...) de tout mon cœur merci pour votre gentillesse.

Merci à l'ensemble de thésards et stagiaires de l'unité PEGASE et ADNC pour les bons moments partagés (Elise, Nicolas, Amélie, Alice, Clémence, Florence...tous), pour les moments de détente et pour les discussions au tour de la cafeteria et à la cantine. Merci pour vôtres conseils et pour votre amitié.

Je tiens à remercier des grandes amies que j'ai trouvé à l'unité et qui sont déjà partis, mais qu'ils restent dans mon entourage. Principalement à Ana Roca, merci pour tes motivations et pour m'écouter en tout moment surtout dans les moments les plus difficiles, même de l'autre côté de l'Atlantique, même aux heures différentes, même qqs heures avant la soutenance..., Gracias amiga!. Merci à mes amies que j'ai trouvé à Rennes, merci pour me montrer votre beaux région et votre beau pays et pour votre accueil en France : Cécile, Magalie, Giuglia, Laurence...Merci les amies brésiliens, espagnols et d'ailleurs principalement de tout mon cœur à Valerio, Paulo Campos, Alessandra, Maëva, Marcolino, Alberto, Rosa, Melissa, Eunice, Ana Sinclair, Marta, Joao, Andreas etc. Je suis heureuse de vous avoir connus et un jour j'espère qu'on se retrouvera quelque part de nouveau ...

Un agradecimiento enorme y de todo corazón a toda mi familia en México, estoy muy contenta de pertenecer a esta gran familia, a mis tíos y tías, mis primas, mis abuelos q.e.p.d. por inculcarme el valor a amar mis raíces y mi gran país lleno de tantas maravillas. A mi madrina por ser tan positiva por tu cariño y por tu buen sentido del humor, por tu alegría que contagia y que me ha enseñado a ver el lado bueno de las cosas. Gracias a mis amigas y amigos en México, por estar al pendiente de mí aunque sea de lejos por sus muestras de cariño, siempre los llevo cerca. Muchas gracias desde siempre y para siempre a mis padres por haberme siempre guiado, por su apoyo incondicional, por acompañarme a emprender esta aventura lejos de casa. A mi padre gracias por tus consejos, por mostrarme el camino de la agronomía, de la veterinaria y de la ciencia que me apasionan tanto. Gracias por ser un guía para mí, por tu buen humor y por tu apoyo incondicional. A mi madre, gracias por escucharme y darme tu apoyo moral e incondicional siempre, por ser mi confidente, gracias por escucharme sobre todo en los momentos más difíciles y tristes, por alentarme a seguir adelante, por tus enseñanzas, por tu alegría, en fin gracias por ser mi mama y ser como eres. A mi hermana, gracias lindíux por escucharme, por hacerme reír, por estar al pendiente de mí y porque siempre estas dispuesta a ayudarme siempre los quiero enormemente a todos.

Publications et communications scientifiques

Articles scientifiques

Arevalo-Turrubiarte M., Perruchot MH., Finot L., Mayeur F., Dessauge F. 2015 Phenotypic and functional characterization of two bovine mammary epithelial cell lines in 2D and 3D models. *American Journal of Physiology, Cell physiology*, 310(5):C348-56.

Perruchot MH., **Arévalo-Turrubiarte M.**, Dufreneix F., Finot L., Lollivier V., Chanat E., Mayeur F., Dessauge F. 2016. Mammary epithelial cells hierarchy in dairy cows throughout lactation. *Stem Cells and Development*, 1; 25(19):1407-18.

Affiche en congrès

Arevalo-Turrubiarte M., Perruchot MH., Lollivier V., Finot L., Mayeur F., Pien C., Dessauge F. 2014 Methodological applications to determine mammary cell fate in lactating cows by cell phenotyping. Gordon Research Conferences, Mammary gland biology 2014, July 6-13, Lucca (Barga), Italy.

Arevalo-Turrubiarte M., Perruchot MH., Lollivier V., Dessauge F. 2016. Identification de biomarqueurs pour étudier la plasticité mammaire et pour prédire l'efficacité de production de vaches laitières. Journée des doctorants. 19 avril 2016, UMR PEGASE, INRA , Saint Gilles.

Liste des abréviations

2D : Deux dimensions

3D : Trois dimensions

α -SMA : Alpha Smooth Muscle Actin

ADN : Acide désoxyribonucléique

ALDH : Aldéhyde déshydrogénase

APAF1 : Apoptotic Peptidase Activating Factor 1

APC : Allophycocyanin

ARN : Acide ribonucléique

BME-UV1: Bovine Mammary Epithelial cell line

BrDU : Bromodéoxyuridine

CALLA : Common Acute Lymphoblastic Leukemia Antigen

CD : Cluster de Différenciation

CDH-1 : Cadhérine 1

CEM : Cellule épithéliale mammaire

CFU : Colony Forming Unit

CK : Cytokératine

EHS : Engelbreth-Holm-Swarm

EMT : Transition épithélio-mésenchymateuse

EpCAM : Molécule d'adhésion de la cellule épithéliale

ER : Récepteur aux œstrogènes

FITC : Fluorescein isothiocyanate

FMO : Fluorescence Minus One

FSC : Forward- scatter

GH : Growth Hormone (hormone de croissance)

IDH1: Isocitrate dehydrogenase 1

IGF: Insulin-like Growth Factor

IGF-1: Insulin-like Growth Factor 1

IGFBP: Insulin-like Growth Factor Binding Protein

JAM : Molécules d'adhésion des jonctions

Ki67 : Nuclear protein (proliferation cellulaire)

MAC-T: Bovine mammary alveolar cell line

MaSC : Mammary stem cell

MY : Milk yield

MMP : Métalloprotéines

Nocht 1: Notch homolog 1, translocation-associated

p53 : Protéine suppresseur de tumeur

PCR : Polymerase Chain Reaction

PL : Production laitière

PR : Récepteur de progestérone

Prl : Prolactine

PMT : Photomultiplier tubes

RE : Réticulum endoplasmique

RT-PCR : Reverse Transcription Polymerase chain reaction

Sca 1 : Stem cells antigen-1

SSC : Side-scatter

STAT5: Signal Transducer and Activator of Transcription 5

SV40 : Simian vacuolating virus 40

TB : Taux butyreux

TP : Taux protéique

TGF- β : Facteur de croissance transformant beta

ULA : Ultra-low Attachment

Liste des figures et des tables

Synthèse bibliographique

Chapitre 1 : La lactation chez la vache laitière

Figure 1 Cycle biologique de la vache laitière (race Holstein).	3
Figure 2 Courbe de lactation.	6
Figure 3 Représentation graphique de la persistance de la lactation.....	7

Chapitre 2 : La glande mammaire

Figure 4 Représentation de la glande mammaire bovine.	10
Figure 5 Plasticité de la glande mammaire au cours de la vie de l'individu.....	13
Tableau 1 Composition du lait chez différentes espèces.	15
Figure 6 La cellule épithéliale mammaire mature pendant la lactation.	16
Figure 7 Evolution de la composition du lait de vache au cours de la lactation.	17
Figure 8 Représentation des principales hormones au moment de la mise-bas et au début de la lactation chez la vache.	21

Chapitre 3 : Les cellules épithéliales mammaires

Figure 9 Organisation de l'épithélium mammaire.	30
Tableau 2 Principaux marqueurs de surface identifiés dans la glande mammaire des mammiphères.	32
Figure 10 Organisation cellulaire dans les canaux et alvéole dans la glande mammaire.	34
Figure 11 Hiérarchisation des cellules dans la glande mammaire de la génisse.....	39

Chapitre 4 : Méthodologies et outils pour l'étude et l'identification des cellules de la glande mammaire

Figure 12 Méthodologies pour l'étude du tissu mammaire de vache et l'obtention de cellules mammaires.....	41
Figure 13 Lignées cellulaires de la glande mammaire bovine.	46
Figure 14 Marquage et analyse de cellules avec du fluorochrome dans la cytométrie en flux.	53
Figure 15 Représentation de la taille (FSC) et granulosité (SSC) de cellules par la cytométrie en flux.	54
Figure 16 Représentation de marquage et isotype par histogramme et graphique à points dot pot.	56
Tableau 3 Choix de biomarqueurs d'après la littérature pour phénotyper les cellules composant la glande mammaire.....	58

Figure 17 Clusters of differentiation(CD) ou marqueurs de surface dans la cellule.	59
------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Objectifs et stratégie expérimentale :

Figure 18 Démarche expérimentale de l'étude pour caractériser les différents types de cellules dans la glande mammaire bovine dans un cycle de lactation.	64
Figure 19 Mise au point méthodologique de la dissociation de tissu.....	67

Discussion générale

Figure 20 Proposed cell hierarchisation schema in the mammary gland of dairy cows throughtout lactation.	119
Figure 21 Proposed representation of luminal bi-potent progenitor cells, mature luminal (ductal and alveolar) cells throughtout a lactation cycle.....	122

Résultats expérimentaux

Publication 2 : Hiérarchisation de cellules épithéliales mammaires de vaches laitières durant la lactation.

Table : 1 List of antibodies used in flow cytometry analysis	93
Figure: 1 Representative Booxplots of milk yield during the lactation cycle.	94
Table : 2 Milk yield, fat and protein contents and somatic ell count (SCC) during lactation....	95
Figure: 2 Follow-up of mammary secretory tissue organization by histology during lactation.	96
Figure: 3 Representative Booxplots of relative CK19 gene expression during the lactation cycle.	96
Figure: 4 In situ localization of cell surface markers in lactating mammary gland.	97
Table : 3 Flow cytometry analysis of isolated cells dissociated from mammary biopsies using monostaining.....	98
Figure: 5 Gating strategy used in flow cytometry to analyze stained cell populations.....	99
Table : 4 Cell hierarchy and lineage in bovine mammary gland during a lactation period.	100
Figure: 6 Analysis of correlation between proportions of cell population and milk yield (MY).....	102

Sommaire

Synthèse bibliographique.....	2
Chapitre 1 : La lactation chez la vache laitière	3
1. Cycle biologique de la femelle bovine laitière	3
1.1. De la naissance à la mise à la reproduction	3
1.2. Vie productive	5
1.2.1. Gestation.....	5
1.2.2. Lactation et persistance de la lactation.....	6
1.1.1. Tarissement	9
Chapitre 2 : La glande mammaire.....	10
1. Anatomie et développement de la glande	10
1.1. De l'embryogenèse à la puberté	11
1.2. La dynamique de la glande mammaire.....	12
2. Synthèse du lait.....	15
2.1. La cellule épithéliale mammaire mature	15
2.2. Activités de synthèse et de sécrétion	17
3. Régulations hormonales de la lactation	20
3.1. Initiation de la lactation : la lactogénèse	20
3.2. Entretien de la lactation : la galactopoïèse	22
3.3. Fin de la lactation : le tarissement	25
4. Mécanismes biologiques déterminant la quantité de lait produite au cours d'une lactation	26
4.1. Turnover cellulaire	26
4.2. Remodelage tissulaire.....	27
Chapitre 3 : Les cellules épithéliales mammaires	30
1. Les différents types de cellules épithéliales mammaires différenciées	30
1.1. Les cellules épithéliales mammaires alvéolaires	30
1.2. Les cellules épithéliales mammaires ductales	33
1.3. Les cellules myoépithéliales mammaires	33
2. Les cellules épithéliales progénitrices et souches	35
Chapitre 4 : Méthodologies et outils pour l'étude et l'identification des cellules de la glande mammaire.....	41
1. Méthodologies pour l'obtention et la culture des cellules de la glande mammaire.....	41
1.1. Méthodes de prélèvement du tissu mammaire	41

1.2.	Digestion des biopsies	42
1.3.	Filtration	43
1.4.	Traitement de la suspension monocellulaire	43
1.5.	Culture cellulaire	44
1.5.1.	Support de culture	44
1.5.2.	Milieu de culture	45
2.	Types cellulaires disponibles pour l'étude in vitro de la glande mammaire.....	45
2.1.	L'utilisation des lignées cellulaires de la glande mammaire bovine	45
2.2.	Avantages et inconvénients de l'utilisation des lignées cellulaires comme modèles in vitro	48
3.	Les techniques moléculaires et histologiques	48
3.1.	L'immunohistologie	48
3.2.	Le western blot	49
3.3.	La PCR (polymerase chain reaction)	50
3.4.	La cytométrie en flux.....	52
3.4.1.	Principe de la méthodologie	52
3.4.2.	Choix des marqueurs de surface et des contrôles isotypiques	57
	Objectifs	62
	Stratégie expérimentale	64
1.	Choix des modèles expérimentaux	65
1.1.	Modèle expérimental in vitro : lignées mammaires bovines.....	65
1.2.	Modèle expérimental in vivo : vaches primipares Holstein.....	66
2.	Mise au point méthodologique.....	67
	Publication 1	71
	Caractérisation phénotypique et fonctionnelle de deux lignées de cellules épithéliales mammaires bovines dans des modèles 2D et 3D	71
	Conclusions sur la publication 1	82
	Publication 2	83
	Hiérarchisation de cellules épithéliales mammaires de vaches laitières durant la lactation	83
	Discussion Générale	110
1.	The biomarkers CD49f, CD24, CD10 and EpCAM allow us to identify cell types and cell populations within the mammary gland of lactating cows.....	111
1.1.	C49f identifies mammary epithelial cells in the bovine mammary gland	111
1.2.	CD10 identifies myoepithelial cells in the bovine mammary gland	112

1.3. The identification of biomarkers in stem/progenitor cells in the mammary gland bovine.....	113
1.4. The immortal BME-UV1 and MAC-T cells possess a different epithelial phenotype	113
2.2. Cell types in and mammary gland plasticity throughout lactation in the cow	120
Conclusion générale	125
Références bibliographiques	130
Annexe 1	148
Annexe 2	149
Annexe 3	150

Synthèse bibliographique

L'Europe avec ses 28 pays constitue l'un des premiers producteurs de lait (159 milliards de litres) au monde (OECD-FAO, 2015). La France assure environ 4% de la production laitière mondiale et 16,1 % de la production laitière européenne. Elle occupe le second rang des pays européens derrière l'Allemagne. 67 400 exploitations laitières livrent du lait de vache en France (Enquête Annuelle Laitière, 2013). La Bretagne est l'une des régions qui produit la plus grande quantité de lait (21% de la production totale en France) (Eurostat, 2015).

Le lait de vache en France représente 97% du lait total collecté (les 3% restant proviennent de chèvre et de brebis) (Agreste Info, 2015). Une vache, en France, produit 6600 kg du lait par an, donc autour de 24kg de lait par jour (Chatellier et al., 2013).

La filière lait est soumise à un certain nombre d'enjeux à la fois socio-économique et réglementaire tels que le changement climatique, les attentes sociétales (en terme de sécurité alimentaire ou de bien-être animal), les crises économiques et financières, les politiques foncières et d'aménagement du territoire ou encore plus spécifiquement à des problématiques sur l'environnement (rejet de méthane), le lien filière/territoire et la concurrence avec les productions végétales (intensification des élevages, concentration géographique des élevages).

La recherche dans le domaine de la fonction de lactation est donc cruciale et l'équipe Physiologie de la lactation et synthèse du lait de l'UMR INRA AGROCAMPUS OUEST PEGASE s'attache à produire de nouvelles connaissances sur les mécanismes biologiques de production du lait, pour que celle-ci s'adapte le mieux possible aux différentes contraintes. Un accent particulier est donné à l'étude de la plasticité de la glande mammaire en réponse aux pratiques d'élevage afin de mieux comprendre les mécanismes d'adaptation et d'adaptabilité des femelles en lactation à des systèmes de production très changeants. C'est dans ce contexte que s'est inscrite ma thèse.

Chapitre 1 : La lactation chez la vache laitière

1. Cycle biologique de la femelle bovine laitière

1.1. De la naissance à la mise à la reproduction

A partir de la naissance, la femelle bovine laitière suivra une succession d'étapes avant d'arriver à la production de lait. Les étapes successives de ce cycle biologique sont présentées dans la **Figure 1**.

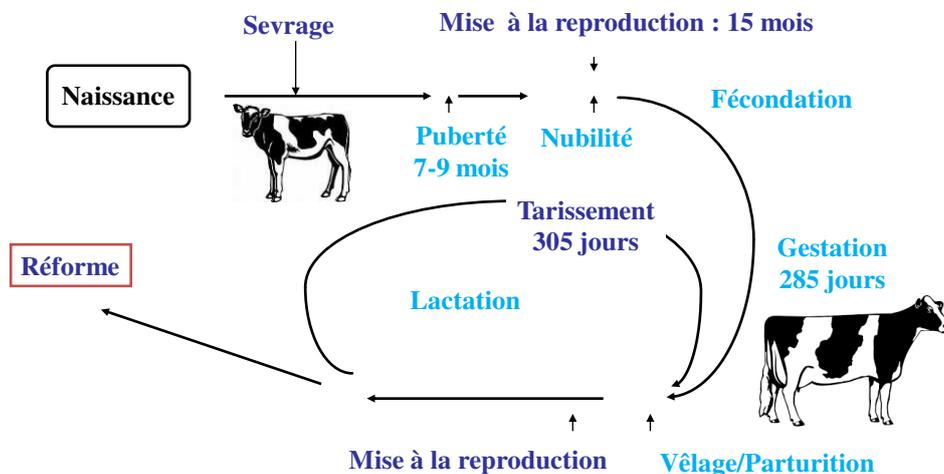


Figure 1 Cycle biologique de la vache laitière (race Holstein).

De la naissance à la puberté. La vache est mise à la reproduction autours de 15 mois. Après la fécondation, la gestation a une durée de 285 jours. Après la parturition, un cycle de lactation qui a une durée de 305 jours débute. Après quelques années de production la vache qui est considérée comme moins productive, est mise à la réforme (*Cours d'introduction à la zootechnie, Agrocampus ouest*).

Durant les premiers jours après le vêlage, la glande mammaire sécrète un fluide de couleur jaunâtre, le colostrum, qui apporte des nutriments et assure l'immunité au veau qui vient de naître. Le type de placenta (épithéliochorial et cotylédonnaire) chez la vache ne permet pas le passage des immunoglobulines au veau pendant la gestation. Pour cette raison, il est crucial que le veau ingère du colostrum rapidement après le vêlage (car l'absorption par l'intestin est maximale aux premières heures de vie, puis elle diminue). Le veau doit être

nourri au colostrum durant ses deux ou trois premiers jours de vie. Par la suite, il est nourri au lait de vache deux fois par jour (lait entier qui provient de la traite de la vache ou aliment d'allaitement commercial). Ensuite, pour permettre le développement du rumen, une alimentation à base de fourrages doit être administrée. Le sevrage, ou la fin de l'alimentation lactée, est recommandé quand le veau consomme au minimum 2kg de concentré. En Bretagne, le sevrage est à 2.5 mois (Guernion, 2013). Une alimentation élevée avant le sevrage (28% de protéine et 25% de matière gras) influence positivement le développement de la glande mammaire chez les génisses (Geiger et al., 2016). Ainsi, un gain moyen quotidien élevé aux 10 premiers jours de vie de la génisse augmenterait le parenchyme mammaire (Meyer et al., 2006). Dans les 4 mois de vie, le veau peut commencer à sortir au pâturage (Paulson et al., 2015). Avant ses 6 mois, une alimentation avec de la paille, du foin et du maïs est recommandée. La complémentation de l'alimentation de la génisse est importante pour sa croissance. Pendant le printemps, il est possible d'avoir un gain du poids de la génisse de 900 g par jour, alors que pendant l'été il est de 750 g par jour (Guernion, 2013).

La Puberté

La puberté de la génisse commence avec le cycle œstral (**Figure 1**) influencé par des facteurs propres à l'animal comme sa taille et son poids. La durée du cycle œstral est de 20 jours chez la génisse, 21 jours chez la vache et l'œstrus dure 12 à 24 heures (Robinson, 1977). L'ovulation se produit après l'œstrus. Les facteurs comme l'alimentation, la température, la saison de l'année et le type d'élevage influencent l'âge de la puberté chez la génisse (Le Cozler et al., 2008). Une génisse commence sa puberté entre 9 et 11 mois. Le poids vif et l'âge de l'animal sont des indicateurs de l'état reproductif de la génisse. La puberté dépend de la race : une vache de race Holstein peut atteindre sa puberté à 260 kg de poids vif à l'âge de 12 mois (D'Hour et al., 1995). En élevage laitier, l'objectif est qu'une génisse ait son premier vêlage dans ses premiers 24 mois de vie. Cela suppose qu'une génisse dès l'âge de 15 mois peut se reproduire ayant atteint une croissance corporelle le permettant. A ce stade, le parenchyme de la glande mammaire avec ses structures canaliculaires sont déjà quasiment formés (Akers, 2002). Une mise à la reproduction précoce (14 mois) peut affecter la production de lait par une diminution jusqu'à 90kg du lait produit aux 305 jours de lactation (Mohd Nor et al., 2013). Parfois, les signes de la première ovulation d'une génisse ne sont pas manifestes ou perceptibles. Pour cette raison, il est recommandé d'attendre les prochains cycles œstraux pour bien les connaître et pour augmenter le potentiel de fertilité des génisses.

Si une génisse est inséminée pendant sa première ovulation, la possibilité qu'elle soit gestante est de 57% contre 78% si elle est inséminée dans sa troisième ovulation (Wathes et al., 2014).

La saison de l'année et ainsi le nombre d'heures de lumière par jour (photopériode) a une influence sur la cyclicité des œstrus. Les génisses exposées à des jours longs arrivent plus rapidement à la puberté que celles exposées aux jours courts (Dahl et al., 2000). Les génisses qui naissent pendant le printemps et l'été, qui sont plus exposées à la lumière et à des températures élevées, arrivent plus précocement à la puberté, par rapport aux génisses qui naissent pendant l'automne et l'hiver. Ainsi, une génisse qui est exposé à une température de 27°C arrivera plus rapidement à la puberté que celle exposée à une température de 10°C (Schillo et al., 1992).

1.2. Vie productive

1.2.1. Gestation

Après 80 jours postpartum, la vache doit être de nouveau en gestation pour avoir une périodicité dans son cycle reproductif. Le temps de gestation d'une vache est de 285 à 300 jours. La baisse (2 à 5 jours) ou l'augmentation (3 à 5 jours) de la période de gestation affecte négativement la production de lait, ainsi que la concentration en matières protéiques et grasses dans le lait (Jenkins et al., 2016). Pendant la gestation, le développement de la glande mammaire continue. A partir de 5 mois de gestation, la formation d'un système rudimentaire de la glande est observable (Akers, 1990). Entre le 5^{ème} et le 8^{ème} mois de gestation, la glande mammaire augmente en densité de masse. Au cours du 9^{ème} mois de gestation, les cellules qui synthétisent du lait dans la glande mammaire ont une morphologie élargie et sont déjà actives (Tucker, 1969).

Quand la vache est gestante, la concentration de progestérone, une hormone produite par les ovaires et le placenta, augmente aux premiers jours de gestation et diminue après 14 jours puis reste à des niveaux constants. La concentration de progestérone dans le sang est élevée pendant toute la gestation pour empêcher d'autres cycles œstraux. Au moment de la parturition, la concentration de progestérone diminue rapidement. L'œstradiol, une autre hormone produite par les ovaires et le placenta, augmente au 250^{ème} jour de gestation avec des pics à 20 jours avant la parturition et 8 heures avant le vêlage. L'œstradiol baisse fortement jusqu'à être indétectable les jours suivants la parturition (Catchpole, 1977). A l'approche de la

parturition, des hormones comme la prolactine (Prl), l'hormone de croissance (GH) et les glucocorticoïdes permettent la lactation.

1.2.2. Lactation et persistance de la lactation

La production laitière (PL) d'une vache au cours d'un cycle de lactation peut être représentée graphiquement par une courbe (**Figure 2**).

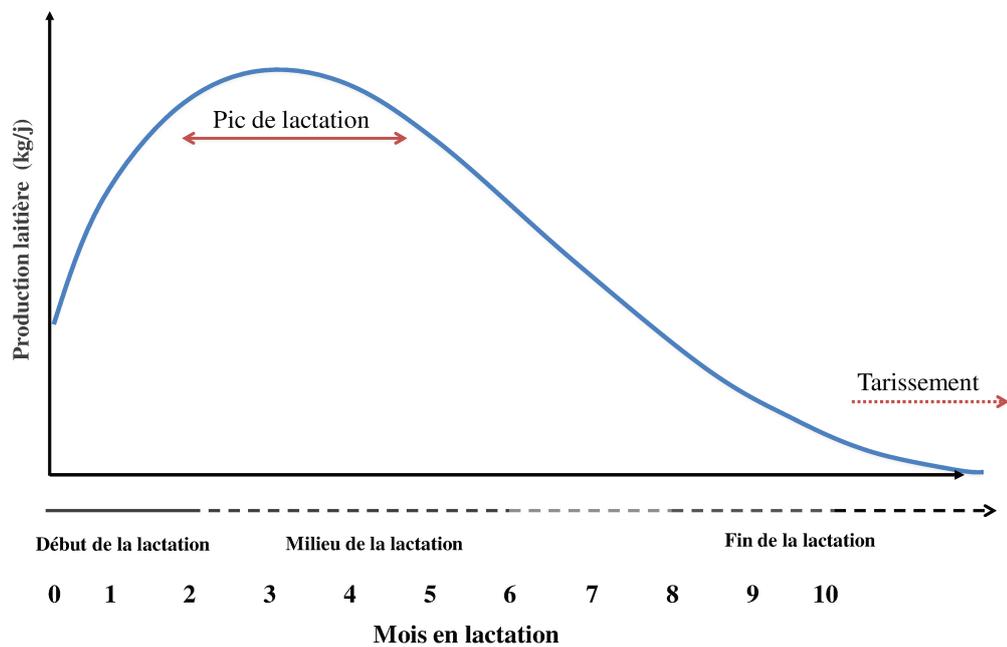


Figure 2 Courbe de lactation.

Trois phases principales décrivent cette courbe. La première phase consiste en une forte augmentation de la PL jusqu'à la formation d'un pic marquant le maximum de production. La deuxième phase consiste en une décroissance de la courbe (Knight et Peaker, 1984). La vitesse de décroissance de la courbe (pente) correspond à la persistance de la lactation (Akers, 2002).

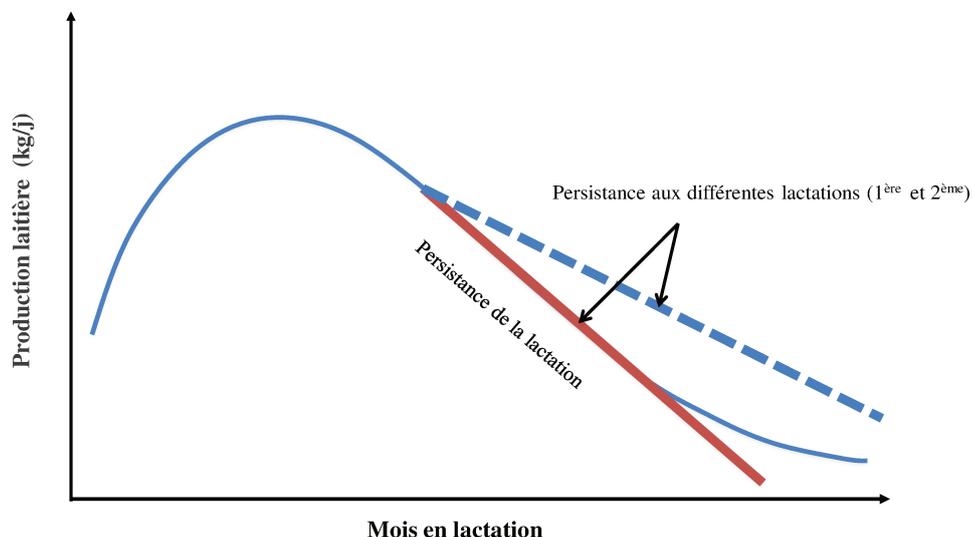


Figure 3 Représentation graphique de la persistance de la lactation.

Représentation graphique de la persistance de la lactation. La persistance de la lactation est représentée par la vitesse de décroissance de la courbe (la pente) de lactation après le pic. La persistance peut être modifiée lors de lactations : 1^{ère} (ligne continue) et 2^{ème} (la courbe en pointillé) (D'après Jamrozik et al, 1997).

La troisième phase est une diminution drastique de la production laitière correspondant à la fin de lactation et au tarissement. La durée de lactation (phase de production entretenue par les traites) est notamment dépendante de l'éleveur qui entretient la production laitière par les traites. D'une manière générale, un cycle de lactation a une durée moyenne de 10 mois (Akers, 2002).

La persistance de la lactation peut être liée à la race et à la parité de l'animal. Une étude a montré que le pic de lactation est plus élevé chez les vaches de race Holstein que chez les vaches de race Jersey (26 contre 18 Kg/jour du lait) quand elles ont traites deux fois par jour (Hickson et al., 2006). La persistance de lactation n'est donc pas liée au niveau de PL, mais à la capacité de la vache à maintenir une PL stable. Le principe est le même en ce qui concerne la parité. Lors d'une première lactation, les structures sécrétrices dans la glande mammaire ne sont pas encore complètement matures. Lors des lactations suivantes, la production de lait au pic de lactation augmente et la persistance qui suit le pic diminue moins

qu'en première lactation (**Figure 3**). Chez la vache, on considère que la persistance de lactation est stable à partir de la 3^{ème} lactation (Schutz et al., 1990; Hickson et al., 2006). Plusieurs facteurs physiologiques et environnementaux permettent de moduler la persistance de la lactation en agissant notamment au niveau mammaire. Certains facteurs tels que l'alimentation, la fréquence de traite, le stade de gestation, ou le statut sanitaire de l'animal sont directement liés aux pratiques d'élevage (Stefanon et al., 2002).

De nombreuses études ont montré que la photopériode avait une influence sur la PL. Il est possible d'utiliser l'effet de la photopériode soit par l'application d'un traitement lumineux (Morrissey et al., 2008), soit en programmant les mises-bas en hiver. De cette manière, le début de lactation a lieu pendant la phase descendante de la photopériode et la phase de déclin de la PL a lieu en photopériode ascendante, permettant ainsi de limiter la baisse de sécrétion de Prl. Sorensen et Knight (2002) ont étudié l'effet de la saison des mises-bas (vêlages en hiver ou au printemps) sur la persistance de la lactation et sur les concentrations plasmatiques en GH, IGF-1 et Prl. Bien qu'ils n'aient pas observé d'effet de la saison des mises-bas sur la concentration en IGF-1, ils ont pu mettre en évidence que les vaches ayant vêlé en hiver avaient des concentrations en GH supérieures à celles ayant vêlé au printemps et qu'elles présentaient des niveaux de Prl plus stables au cours de la lactation. Ces différences dans les profils de sécrétion des hormones galactopoïétiques étaient associées à une meilleure persistance de la lactation chez les vaches ayant vêlées en hiver.

En élevage laitier, la PL peut être modulée à court-terme par la fréquence de traite et l'alimentation et avoir des répercussions sur la persistance de la lactation. Plusieurs études ont montré que ces deux facteurs d'élevage avaient des répercussions importantes et très rapides sur la quantité de lait produite par la mamelle. Une augmentation de la fréquence de traite (3 ou 4 traites par jour) induit une augmentation de la production et de la même manière, une baisse de la fréquence de traite (1 traite par jour) induit une baisse du niveau de production. Chez la vache laitière, ces variations de PL se répercutent sur la persistance de la lactation après un retour à 2 traites par jour (Hale et al., 2003). Une restriction alimentaire altère également de manière importante la PL. Ainsi, des vaches soumises à un régime alimentaire restrictif (-20 % en énergie nette) présentent une PL quotidienne inférieure de 9,8 kg (Norgaard et al., 2008) ou de 13 kg (Dessaige et al., 2011) par rapport à des vaches bénéficiant d'un régime alimentaire de base.

1.1.1. Tarissement

Le tarissement ou période sèche est l'arrêt de la traite à la fin de la lactation. En fonction du système d'élevage, la durée de la période sèche peut être de 6 à 10 semaines (Sérieys, 1997). La durée du tarissement a un effet positif sur la quantité de lait et le pic de lactation sur la lactation suivante. Le tarissement est essentiel pour la régénérescence du tissu sécrétoire mammaire (Capuco et al., 1997 ; Andersen et al., 2005). Durant cette phase, le tissu mammaire subit des remaniements intenses.

Ce qu'il faut retenir :

En élevage laitier, les phases d'élevage du jeune (de la naissance à la puberté) et la gestation sont importantes pour le développement de l'animal et de sa glande mammaire, organe producteur du lait.

Un cycle de lactation chez la vache laitière a une durée approximative de 10 mois. La production laitière d'un individu peut être schématisée graphiquement par une courbe. La courbe de lactation peut-être décrite par trois phases : première phase de forte augmentation de la PL, jusqu'à la formation d'un pic. La deuxième phase est la décroissance de la production de lait, la vitesse de décroissance est appelée persistance de la lactation. La troisième phase est la diminution drastique correspondant à la fin de la lactation ou tarissement.

La production de lait et la persistance de la lactation diffèrent entre les lactations (première ou deuxième). Ces différences sont notamment dues aux modifications du tissu mammaire. Pour cette raison, pour bien comprendre la PL chez la vache il est nécessaire d'étudier la glande mammaire, sa composition et sa fonction pendant le cycle de la lactation.

Chapitre 2 : La glande mammaire

Ce chapitre est, en majeure partie, issu de la synthèse bibliographique de la thèse de Lucile Yart (soutenue en 2012)

1. Anatomie et développement de la glande

La glande mammaire est l'organe qui produit le lait. Chez la vache, la mamelle est localisée en région inguinale et est subdivisée en quatre glandes contenant chacune des structures sécrétrices. Le tissu sécréteur de la glande mammaire est composé d'alvéoles regroupées en lobules (**Figure 4**).

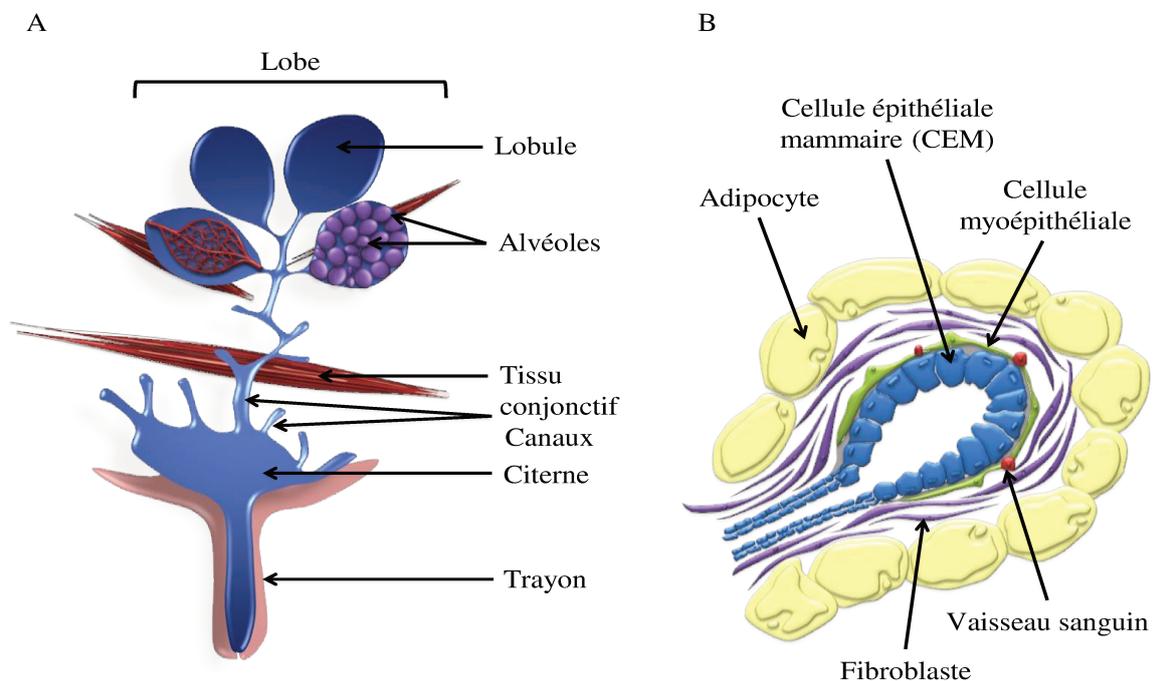


Figure 4 Représentation de la glande mammaire bovine.

(A) Représentation des principales structures de la glande mammaire bovine : lobe et lobules, alvéoles (unités sécrétrices du lait), citerne (stockage du lait) et trayon (permet l'éjection du lait à l'extérieur). (B) Structure d'un acinus ou alvéole mammaire. L'alvéole est composée principalement par les adipocytes, fibroblastes, les cellules myoépithéliales, les vaisseaux sanguins et les cellules épithéliales mammaires qui synthétisent du lait (*D'après Delouis et Richard, 1991*).

Le tissu sécréteur est localisé dans la région la plus distale de la mamelle. Il est composé d'alvéoles regroupées en lobules (**Figure 4**). Ce tissu sécréteur est drainé par un

réseau de canaux galactophores qui débouchent, chez les ruminants, sur une citerne. C'est dans cette citerne qu'est stocké le lait avant d'être évacué par le canal du trayon lors de la traite ou de la tétée (**Figure 4**). Les alvéoles constituent les unités fonctionnelles de la glande mammaire. Elles sont constituées d'une couche de cellules épithéliales mammaires (CEM) polarisées. A leur pôle apical, ces cellules débouchent sur la lumière alvéolaire où est sécrété le lait. A leur pôle basal, elles entretiennent une relation étroite avec un tissu stromal composé de cellules myoépithéliales contractiles, de fibroblastes, d'adipocytes et de vaisseaux lymphatiques et sanguins. Ces derniers permettent l'apport des nutriments nécessaires à la synthèse du lait.

1.1. De l'embryogenèse à la puberté

La glande mammaire commence son développement durant l'embryogenèse par invagination de structures ectodermiques pour former les principaux canaux galactophores et le canal du trayon. La mise en place de ces premiers canaux se fait essentiellement sous le contrôle des glucocorticoïdes, de la Prl et de la GH (Veltmaat et al., 2003). Les stéroïdes sexuels ne semblent pas impliqués dans la mammogenèse embryonnaire. Il a été montré, chez l'embryon de souris, que la glande mammaire se développait normalement en absence de ces hormones (Kratochwil, 1971). Cependant, elles interviennent durant le dimorphisme sexuel : étape durant laquelle la testostérone a pour effet d'induire la régression et la nécrose des structures épithéliales dans la glande mammaire du mâle. Ce processus impliquant des récepteurs aux androgènes situés dans le stroma conduit à une séparation irréversible entre le canal du trayon et les autres canaux (Brisken et O'Malley, 2010). La glande mammaire suit un développement isométrique, en parallèle du reste de l'organisme avant de reprendre une croissance allométrique positive quelques temps avant la puberté (Sinha et Tucker, 1969).

La reprise du développement allométrique positif de la glande mammaire a lieu vers l'âge de 2-3 mois chez la génisse (Sinha et Tucker, 1969), et vers l'âge de 1 à 2 mois chez la chevrete (Dessauge et al., 2009 ; Yart et al., 2012). Chez ces espèces, la masse de parenchyme mammaire est localisée au-dessus de chacun des trayons et se développe au sein du tissu adipeux. Lors de la reprise du développement allométrique, des canaux se ramifient à partir d'arborescences épithéliales et progressent dans le stroma. Dans un second temps, les structures lobulo-alvéolaires se développent aux extrémités distales des canaux. Dans la glande mammaire en développement, les canaux et les structures lobulo-alvéolaires sont formés d'un épithélium pluristratifié entouré d'un tissu conjonctif dense (Akers et al., 2005).

Les facteurs intervenant dans le développement de la glande mammaire ont, à l'échelle d'un organisme, des actions locales mais également systémiques. Les interactions entre ces hormones et leurs voies de signalisation sont complexes. Il est donc difficile de déterminer si leurs actions sur la glande mammaire sont directes ou résultent d'une stimulation d'autres organes. En revanche, ce qui est maintenant connu, c'est que le stroma et le tissu adipeux (formant ensemble le coussin graisseux de la glande mammaire) ne forment pas uniquement une matrice inerte, mais jouent un rôle important dans la mise en place des structures épithéliales. La présence des tissus adipeux et conjonctif ainsi que les réseaux sanguins et lymphatiques, forment un tapis important pour la différenciation et la prolifération cellulaires (Neville et al., 1998 ; Watson et Khaled, 2008). Le parenchyme qui compose la glande mammaire est régulé par les hormones tandis que le coussin adipeux mammaire est influencé par la nutrition des génisses (Meyer et al., 2006). Les premières études qui ont mis en évidence l'importance de ce coussin adipeux mammaire concernaient la transplantation d'explants d'épithéliums mammaires murins dans différents organes (Deome et al., 1959).

1.2. La dynamique de la glande mammaire

Le développement de la glande mammaire chez l'adulte est un processus fascinant dans le sens où, au cours de la vie de l'animal, la glande mammaire va subir de nombreux changements en termes de taille, de structure, de composition et d'activité. La glande mammaire est un organe cyclique et particulièrement plastique. La **Figure 5** illustre cette plasticité.

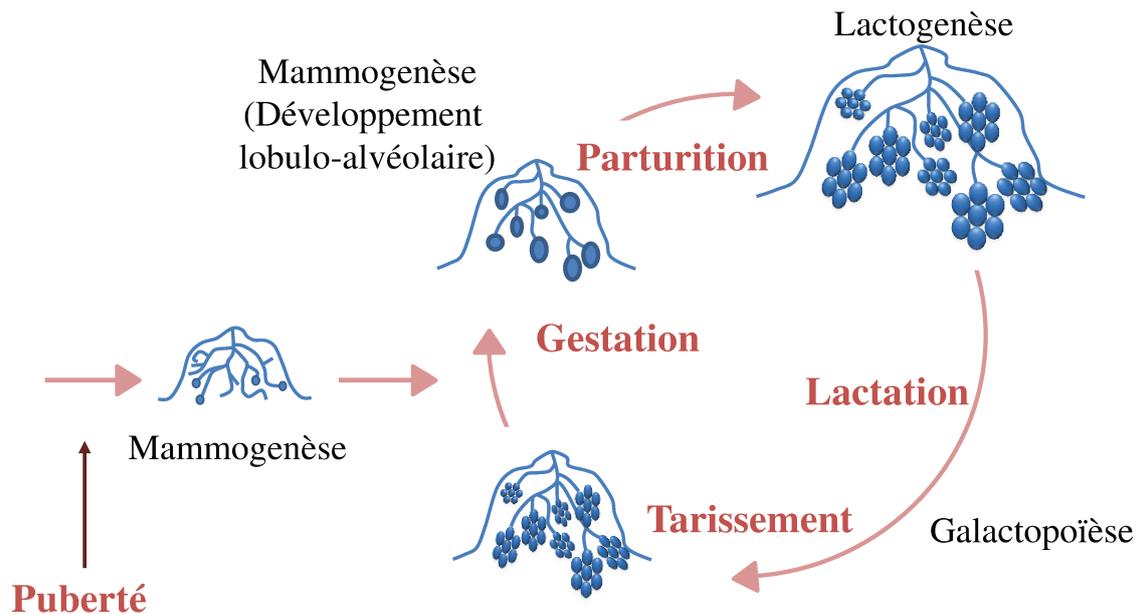


Figure 5 Plasticité de la glande mammaire au cours de la vie de l'individu

La glande mammaire est un organe plastique qui subit des modifications (taille, structure etc.) au cours de son développement principalement à partir de la puberté. Pendant la mammogénèse il y a la mise en place des structures et de canaux mammaires. Ensuite, au début de la gestation, il y a le développement des structures lobulo-alvéolaires. Après la parturition et durant la lactogénèse, les structures sont quasiment formées. Pendant la lactation ou galactopoïèse la glande mammaire est particulièrement plastique.

Les cycles de développement sont directement calqués sur les cycles de reproduction. Un cycle de développement, initié par une gestation, est divisé en 4 phases en partie recouvrantes : mammogénèse terminale (croissance lobulo-alvéolaire), lactogénèse, galactopoïèse et involution.

Bien que la mammogénèse chez le jeune soit déterminante pour les lactations futures, cette phase concerne essentiellement la mise en place du réseau de canaux mammaires. La grande majorité du développement lobulo-alvéolaire a lieu pendant la première gestation et représente la mise en place de 60 à 94% du tissu sécréteur selon l'espèce considérée (Knight et Peaker, 1982). En parallèle de la mise en place des structures lobulo-alvéolaires, le réseau de canaux poursuit son développement en augmentant en taille et en complexité. Pendant la gestation, la croissance de la glande mammaire conduit à une augmentation de la proportion de parenchyme aux dépens du coussin graisseux, et ce, jusqu'à ce que la densité alvéolaire

soit telle que les lobes et les lobules ne soient plus séparés que par des septums de tissu conjonctif. Cette phase de mammogénèse se fait sous l'action des stéroïdes sexuels (œstrogènes et progestérone) sécrétés par les ovaires et par le système fœto-placentaire, combinée à celle des hormones hypophysaires (Prl et GH). Les implications des différentes glandes endocrines dans le développement de la glande mammaire au cours de la gestation ont été mises en évidence relativement précocement par l'ablation de ces glandes. Chez la ratte et la souris, une ovariectomie ou une fœtectomy n'altèrent pas non plus la mammogénèse, alors que le retrait du placenta au cours de la gestation entraîne un arrêt de ce processus (Desjardins et al., 1968).

A la fin de la gestation, l'augmentation du volume mammaire est essentiellement due à une hypertrophie des CEM (cellule épithéliale mammaire) en place et à une expansion des alvéoles. Les CEM subissent une différenciation physique et biochimique et acquièrent la capacité à synthétiser les différents constituants du lait sous l'action des hormones galactopoïétiques hypophysaires : la Prl et la GH.

Un cycle de lactation s'achève par l'involution de la glande mammaire. Cette phase correspond à la régression graduelle du tissu sécréteur pour retourner à un état de développement légèrement plus avancé qu'avant le début de la première gestation. L'involution débute suite au sevrage du jeune ou à l'arrêt de la traite qui induisent une réduction de la sécrétion des hormones galactopoïétiques ainsi que l'accumulation du lait dans la mamelle, ou stase lactée (Lamote et al., 2004). Chez la vache comme chez la chèvre, la phase la plus précoce d'involution est réversible. L'involution de la glande mammaire est caractérisée par l'apoptose cellulaire et la dédifférenciation des CEM. La dédifférenciation est un processus où les cellules perdent leur spécialisation de CEM sécrétrices. La dédifférenciation consiste en une diminution d'expression de gènes liés à la différenciation et prolifération cellulaire (p53, c_myc et TGF- β 1), diminution de l'expression de STAT5 et de gènes liés aux protéines du lait (Strange et al., 1992 ; Faraldo et al., 2002). A un stade plus avancé de l'involution, le phénomène de mort cellulaire programmée (ou apoptose) s'amplifie et la matrice extracellulaire est dégradée par les métalloprotéases pour aboutir à une perte de la quasi-totalité des CEM (Stefanon et al., 2002).

Cette phase d'involution est nécessaire avant de débiter une nouvelle lactation. En effet, chez la vache, sans cette phase d'involution, la PL est nettement inférieure à la normale lors de la lactation suivante (Capuco et al., 2003), ce qui suggère que les CEM ont une durée

de vie limitée et que la glande mammaire possède une forte capacité à se régénérer. Cette mammogenèse de novo est primordiale pour son bon fonctionnement. La régénération du tissu sécréteur lors de chaque nouvelle gestation se fait par le recrutement de cellules souches pluripotentes présentes dans la glande mammaire.

2. Synthèse du lait

Le lait est une sécrétion de couleur blanche produite par la glande mammaire. La fonction principale du lait est de nourrir le jeune jusqu'à qu'il soit capable d'ingérer d'autres aliments et de permettre sa croissance. Le lait est composé principalement d'eau, de carbohydrates, de protéines, de lipides et de minéraux, la proportion de chacun de ces constituants variant d'une espèce à l'autre (**Tableau 1**) (Akers, 2002).

Tableau 1 Composition du lait chez différentes espèces.

	Lipides (%)	Protéine (%)	Glucides (%)	Minéraux (%)
Vache	3,9	3,2	4,6	0,7
Ratte	9,3	8,2	3,7	1,4
Chèvre	4,5	3,2	4,3	0,8
Brebis	7,2	4,6	4,8	0,9
Femme	4,5	0,9	7,1	0,2

Les valeurs sont données en pourcentages de masse (*D'après Jenness, 1986*).

2.1. La cellule épithéliale mammaire mature

Les différents constituants du lait sont synthétisés par un type cellulaire spécialisé : les CEM (**Figure 6**).

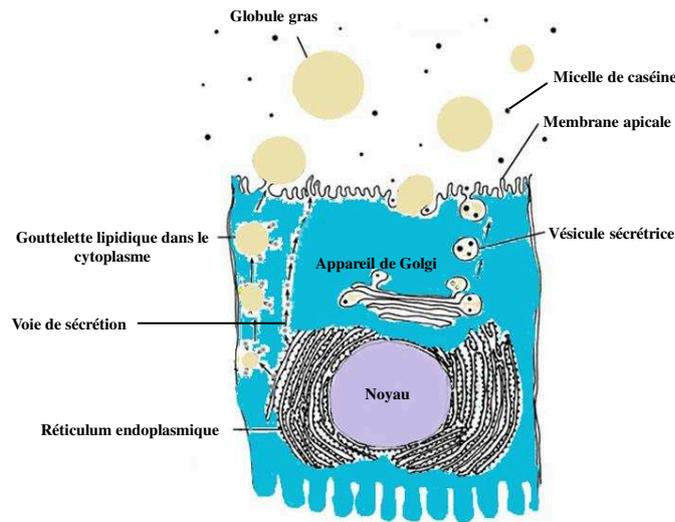


Figure 6 La cellule épithéliale mammaire mature pendant la lactation.

Les principales structures qui permettent la synthèse des composants du lait dans la CEM sont le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi (*D'après Bauman et al., 2006*).

Ces cellules sont organisées en épithélium monostratifié qui tapisse les alvéoles de la glande mammaire. Chacune des cellules synthétise tous les constituants du lait. Ce sont des cellules polarisées qui acquièrent, au cours de la gestation, la capacité à synthétiser du lait, via des transformations physiques et biochimiques.

En début de gestation, les CEM s'organisent autour de la lumière alvéolaire, leur pôle basal étant ancré à la membrane basale formée par la matrice extracellulaire. A ce stade, le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi sont peu réticulés, les mitochondries sont rares, et les vésicules de sécrétions exceptionnelles ; signes d'inactivité des CEM. Au fur et à mesure que la gestation progresse, les CEM se dotent d'une organisation caractéristique de cellules sécrétrices : le cytoplasme augmente en volume, les mitochondries sont nombreuses, l'appareil de Golgi se rapproche du noyau et devient de plus en plus réticulé, des vésicules de sécrétion protéique et des gouttelettes lipidiques font leur apparition. Au moment de la parturition, la quasi-totalité des CEM sont matures et fonctionnelles. Le noyau qui était jusque-là dans la partie médiane de la cellule migre vers le pôle basal afin de laisser la place aux nombreuses citernes du réticulum endoplasmique et aux mitochondries abondantes. Le cytoplasme atteint alors son volume maximal et contient de nombreuses vésicules de

sécrétions et gouttelettes lipidiques prêtes à passer dans la lumière alvéolaire située du côté apical des CEM (Martinet et Houdebine, 1993).

2.2. Activités de synthèse et de sécrétion

Le lait est composé essentiellement d'eau, de protéines, de sucres, de lipides, de sels minéraux et de vitamines. La majeure partie des constituants du lait est directement synthétisée par les CEM à partir d'éléments apportés par la circulation sanguine, mais certains constituants tels que l'eau, les vitamines, les sels minéraux et quelques protéines (e.g. les immunoglobulines) passent directement dans le lait, sans être modifiés.

Les lipides représentent de 0 à 50% des constituants du lait selon l'espèce. Les principaux lipides dans le lait sont des triglycérides (98%), le diacylglycerol (2% de la fraction lipidique), le cholestérol (moins de 0.5%), les phospholipides (1%) et 0.1% des acides gras libres. En élevage bovin laitier, la teneur en matière grasse du lait est représentée par le taux butyreux (TB) (compris entre 35 et 40g/L de lait) qui constitue un des paramètres servant à évaluer la qualité du lait. Après le vêlage, le TB est élevé puis diminue au début de la lactation, puis il augmente jusqu'à la fin de la lactation (**Figure 7**) (Connor, 1995).

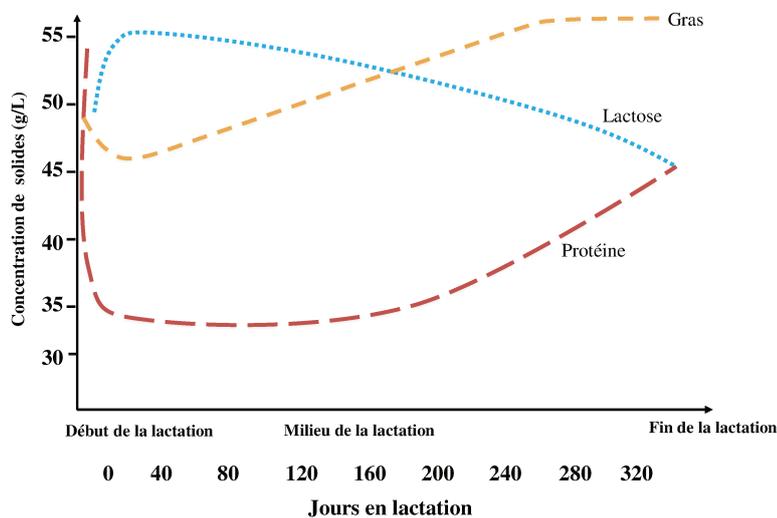


Figure 7 Evolution de la composition du lait de vache au cours de la lactation. (D'après Connor, 1995).

Dans le rumen de la vache, l'acétate, le propionate et le β -hydroxybutyrate sont des acides gras volatiles qui sont produits par les bactéries d'après la fermentation des aliments. La matière gras dans le lait est composée par plus de 400 différents types d'acides gras mais principalement par l'acide acétique et butyrique (Mansson, 2008). Les acides gras du lait ont une double origine : ils proviennent soit d'une synthèse de novo (40 à 60%) dans le cytoplasme des CEM, soit du plasma. Les acides gras sont synthétisés de novo dans la glande mammaire à partir d'acétate et du β -hydroxybutyrate. Cette synthèse donne origine à la formation d'acides gras à chaînes courtes et moyennes (C4 à C16). Les acides gras à chaîne longue (à partir de C18) et une partie des C16 proviennent du captage des acides gras circulant soit sous forme de triglycérides, soit d'un pool d'acides gras non estérifiés qui circulent liés à l'albumine. Ces acides gras longs proviennent principalement de l'alimentation et de la mobilisation des tissus adipeux. L'ensemble de ces acides gras peut être désaturé au niveau du réticulum endoplasmique où ils sont ensuite estérifiés en glycérol pour la synthèse des triglycérides. Les triglycérides sont sécrétés sous forme de gouttelettes lipidiques, de 1 à 10 μm de diamètre, entourés de protéines et de lipides polarisés, qui sont libérés dans le cytoplasme (Ollivier-Bousquet, 2002).

Les protéines du lait sont soit synthétisées par les CEM, soit issues du sang. Les protéines constituent entre le 1 et 20% de l'azote protéique total dans le lait. Le taux protéique (TP) (compris entre 30 et 35g/L de lait pour une vache laitière) est le second paramètre sur lequel est évaluée la qualité du lait. Les protéines les plus abondantes dans le lait de vache sont les caséines, la β -lactoglobuline et la α -lactalbumine, elles sont synthétisées dans les CEM. La majeure partie des protéines dans le lait sont les caséines et elles représentent 80 à 90% des caséines dans la matière azotée totale dans le lait. Les principales caséines dans le lait de vache sont : α s1 (38%), α s2 (10%), la β (40%) et le kappa caséines (12%). Ces caséines sont associées entre elles avec du phosphate de calcium, chaque protéine est en solution sous forme d'agrégats (Qi, 2007). Les micelles permettent de stabiliser d'autres caséines et d'éviter leur précipitation, de plus sa fonction est considérée nutritionnelle car grâce aux micelles cela lui permet de transporter du calcium et de phosphate dans le lait. La plupart de ces protéines sont digérées entre l'estomac et l'intestin. Quand les protéines ne peuvent pas être digérées elles stimulent la réponse systémique immunitaire. Ce problème est largement connu comme l'allergie aux protéines du lait est occasionné couramment par la β -lactoglobuline chez l'homme (Jo et al., 2014).

Les autres protéines sont solubles et constituent les protéines du lactosérum. Ces protéines sont très nombreuses et comprennent notamment des protéines de liaison de fer (lactoferrine et transferrine). La lactoferrine a une activité antimicrobienne et elle est plus synthétisée pendant l'involution mammaire. Des enzymes (galactosyltransférase, lactopéroxydase, lipoprotéine-lipases, ...) et l' α -lactalbumine (lequel est nécessaire pour le CEM pour la synthèse du lactose) sont d'autres protéines dans le lait. Ainsi, la β -lactoglobuline est retrouvée essentiellement chez les ruminants et elle compte plus de 50% des protéines du lactosérum (Akers, 2002). D'autres protéines sont présentes dans le lait en faible quantité c'est le cas des immunoglobulines (IgG, IgA et IgM). Dans le lait de vache et dans le colostrum, quasiment 80% d'immunoglobulines sont de type IgG (Akers, 2002). Les protéines synthétisées par la CEM rejoignent la lumière alvéolaire par exocytose, tandis que les protéines sériques comme les immunoglobulines passent dans la lumière alvéolaire par transcytose au travers des CEM, ou transitent par les espaces intercellulaires.

Du fait de l'absence de glucose-6-phosphatase dans la glande mammaire, cette dernière utilise presque 85% du glucose provenant de la circulation sanguine. Le transport du glucose dans la glande mammaire est fait par des transporteurs spécifiques, comme GLUT1. Dans des études chez la souris, ce transporteur s'exprime plus pendant le pic de lactation (Zhao et Keating, 2007). Parmi les glucides qui se trouvent dans le lait, le lactose est prédominant c'est un disaccharide composé par une molécule de glucose et galactose. Le lactose est synthétisé à partir de l'UDP-galactose et le glucose dans l'appareil de Golgi par l'enzyme lactose synthase. Sa synthèse est régulée par la présence de l' α -lactalbumine dans les CEM, elle débute dans le réticulum endoplasmique et se poursuit dans l'appareil de Golgi via l'action de la galactosyltransférase qui est créé en présence d' α -lactalbumine (Akers, 2002). Le lactose est le principal régulateur de l'incorporation de l'eau dans l'appareil de Golgi et dans les vésicules sécrétoires. L'eau représente 87% du volume de lait. Ainsi, en régulant l'entrée d'eau, la quantité de lactose synthétisée détermine globalement la quantité de lait produite. La supplémentation de glucose induit la synthèse de lactose et augmente la prolifération et la viabilité des CEM in vitro (Lin et al., 2016). Le lactose est transporté à l'extérieur de la cellule par la voie exocytotique (McManaman et Neville, 2003).

Le lait contient également des éléments minéraux tels que le calcium (Ca^{2+}), le phosphore (P^+), le potassium (K^+), le sodium (Na^+), le magnésium (Mg^{2+}) et le chlore (Cl^-).

Une grande partie de phosphore, magnésium et calcium se présente sous forme de complexes avec des micelles de caséine et une autre partie de calcium est unie à l' α -lactalbumine (Gaucheron, 2005). Leur intégration aux micelles réduit la pression osmotique partielle pour ces minéraux et favorise donc leur passage du compartiment sanguin vers le lait (Jenness, 1974). Dans la nutrition humaine, le lait est une source importante de calcium (125mg/dL) par rapport aux autres minéraux comme le magnésium (12mg/dL). Les CEM contiennent une proportion faible de calcium par rapport au calcium extracellulaire et son obtention peut être régulée par la vitamine D et l'hormone parathyroïde. Les CEM maintiennent le gradient de Na^+ K^+ et Cl^- à travers la membrane cellulaire, cela permet d'équilibrer entre l'osmolarité plasmatique (Akers, 2002). Dans le lait, on trouve également des oligoéléments (cuivre, zinc, fer, fluor, iode et molybdène) et des vitamines (A, D, E, K, B2 et B12) (Burns et al., 2000).

Le comptage des cellules somatiques dans le lait permet d'évaluer la qualité et l'état de santé de la mamelle. La concentration en cellules est désignée par la valeur de SCC (Somatic Cell Count) et les valeurs vont de 5×10^4 à 200×10^3 dans la glande mammaire pour des vaches considérées saines, elles sont supérieures à 400×10^3 dans les vaches avec une inflammation de la glande (Akers, 2002). Dans le lait, 22% des cellules sont des CEM, 55% sont des leucocytes et les 19% restants correspondent aux fragments cellulaires. Pendant la traite, quelques cellules épithéliales qui forment l'alvéole peuvent se décrocher (Boutinaud et al., 2002).

3. Régulations hormonales de la lactation

3.1. Initiation de la lactation : la lactogénèse

La lactogénèse est considérée comme le début de la lactation et débute à la fin de la gestation pendant laquelle des premières sécrétions lactées peuvent avoir lieu. Les principales hormones impliquées dans la lactogénèse sont les glucocorticoïdes, la Prl et la GH. Leur sécrétion est maximale autour de la parturition (**Figure 8**) et elles sont essentielles à la transition mammogénèse/lactation dans la glande mammaire. La sécrétion et action de la Prl et la GH sur la glande mammaire sont fortement liées aux changements des profils de sécrétion d'œstradiol et de progestérone qui surviennent au cours du dernier tiers de gestation (**Figure 8**) (Freeman et al., 2000).

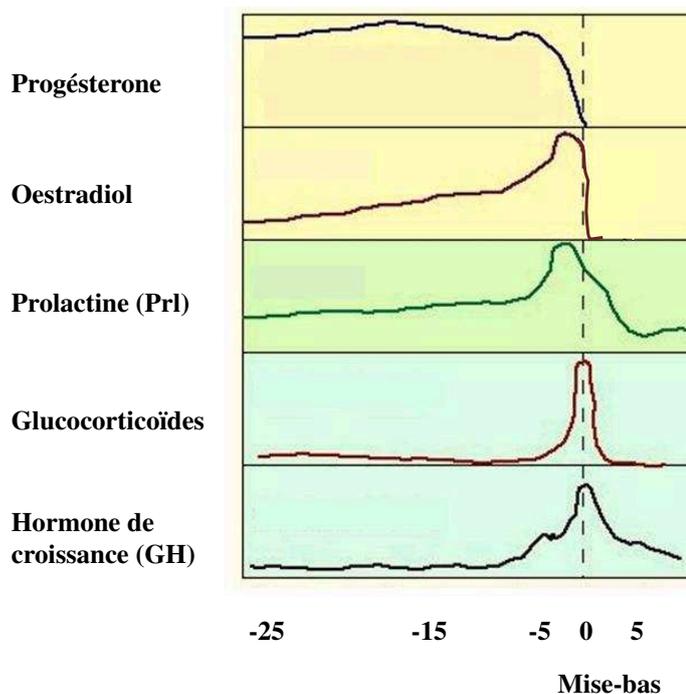


Figure 8 Représentation des principales hormones au moment de la mise-bas et au début de la lactation chez la vache.

La progestérone a une chute importante au moment du vêlage (mise bas). L'oestradiol a un pic au moment de la parturition, puis il diminue rapidement. La prolactine, hormone lactogénique a un pic au moment de la parturition ensuite elle descend. Les glucocorticoïdes ont une augmentation drastique au moment de la parturition puis diminuent rapidement. L'hormone de croissance va augmenter et diminuer lentement (Adaptée de Mustafa, 2001).

La sécrétion de progestérone, soit par le corps jaune chez les rongeurs, soit par le placenta chez la femme et les ruminants, chute progressivement. Cette diminution de la sécrétion de progestérone (**Figure 8**) est indispensable à l'induction de la lactogénèse par la Prl. En effet, il a été montré qu'au cours de la gestation, la progestérone exerçait une action inhibitrice sur la Prl. Cette action inhibitrice est double et s'exerce à la fois sur la décharge hypophysaire de Prl (Vermouth et Deis, 1974) et sur la différenciation des CEM (Loizzi, 1985). En parallèle de la diminution progressive de la sécrétion de progestérone, la sécrétion d'oestradiol augmente au cours de la gestation et chute brutalement après la parturition. L'oestradiol ne semble pas avoir d'effet direct sur la glande mammaire lors de la lactogénèse dans la mesure où c'est à ce moment-là que l'expression de ses récepteurs dans les CEM est la plus faible (Schams et al., 2003). L'action directe de la GH sur les CEM a été peu décrite et semblerait passer majoritairement par une stimulation de la prolifération des CEM en fin de gestation (**Figure 8**) ou sa concentration est importante (Annen et al., 2007), associée à une légère stimulation

de la synthèse de caséines (Trott et al., 2008). La GH ne semble avoir aucun effet sur la différenciation de CEM, ni sur la synthèse des différents constituants du lait (Annen et al., 2007). En revanche, l'action de la Prl sur les CEM en début de lactation a été décrite par Akers et al. en 1981, ils ont observé que l'action de la Prl influence l'activité et la différenciation des CEM plus que sur la prolifération. En 2015 Lollivier et al. en traitant des vaches en lactation avec de la quinagolide (un inhibiteur de la Prl) et de la Prl ont observé que la Prl diminue le nombre de cellules exfoliés. Ils ont suggéré un effet anti-apoptotique de la Prl qui préserverait l'intégrité de l'épithélium mammaire via une augmentation de l'expression de STAT5 dans les cellules mammaires.

Les glucocorticoïdes sécrétés par les glandes surrénales sont également nécessaires à l'initiation des sécrétions lactées. Leur production est contrôlée par l'ACTH, produite par l'antéhypophyse. Les glucocorticoïdes sont faiblement sécrétés pendant la gestation, mais un pic de sécrétion a lieu au moment de la parturition (**Figure 8**). Ces hormones seules n'ont pas d'effet sur les CEM, mais elles sont nécessaires à leur différenciation (Mills et Topper, 1969) et à la synthèse des acides gras, du lactose et des caséines (Goodman et al., 1983) et potentialisent les effets de la Prl. L'hormone placentaire lactogène dont la concentration dans le sang maternel augmente lors de la deuxième moitié de gestation chez la vache participe également à la différenciation des CEM et à l'initiation de leur activité sécrétrice avant la parturition (Akers, 1985).

3.2. Entretien de la lactation : la galactopoïèse

La galactopoïèse est connue comme le maintien de la lactation. Les facteurs galactopoïétiques regroupent l'ensemble des facteurs stimulant la synthèse des différents constituants du lait, des facteurs prolifératifs et des facteurs anti-apoptotiques. Là encore, la Prl et la GH jouent un rôle essentiel.

La Prl a longtemps été considérée comme étant principalement un facteur lactogénique et n'ant que peu d'importance pour la galactopoïèse car son inhibition diminue de 36% le contenu de l'ADN dans la glande mammaire, affecte la concentration d'alpha-lactalbumine dans le lait et le taux de synthèse des acides gras dans la glande mammaire de la vache (Akers et al., 1981). La Prl et la GH ont des effets galactopoïétiques en permettant la survie des CEM et leur prolifération (Lollivier et al., 2015).

Capuco et al. (2001) ont étudié l'effet de l'injection de GH chez des vaches en milieu de lactation. Un marquage immunohistochimique des cellules positives pour le marqueur Ki67 leur a permis de montrer que la GH induisait une augmentation de la prolifération cellulaire dans la glande mammaire bovine en lactation. L'administration de GH au cours de la lactation augmente la PL (Svennersten-Sjaunja et Olsson, 2005). Les actions de la GH sur la glande mammaire passent essentiellement par l'intermédiaire du facteur de croissance IGF-1. En effet, la GH stimule l'expression d'IGF-1 à la fois localement, dans le stroma de la glande mammaire, et au niveau systémique, dans le foie (Herrington et Carter-Su, 2001). Plusieurs études ont montré qu'IGF-1 stimulait la prolifération cellulaire dans la glande mammaire et augmentait la PL (Trott et al., 2008). Il agit également sur les CEM comme un facteur de survie en activant la phosphorylation de la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) qui active à son tour, par phosphorylation, le facteur anti-apoptotique Akt (Green et Streuli, 2004). Les actions prolifératives et anti-apoptotiques de la GH dans la glande mammaire sont suppléées par la Prl qui, en plus de stimuler la synthèse de différents constituants de lait, induit l'expression d'IGF-1 et inhibe l'expression d'IGFBP-5 via l'activation de STAT5 (Signal Transducer and Activator of Transcription) (Hovey et al., 2003). Ainsi, l'inhibition de l'expression d'IGFBP-5 empêche la séquestration d'IGF-1 et potentialise ses effets sur les CEM.

Les hormones stéroïdiennes (œstradiol et progestérone), qu'elles soient d'origine ovarienne ou fœto-placentaire, semblent avoir un effet négatif sur la glande mammaire en lactation. Dans les systèmes laitiers actuels, les vaches sont en lactation et gestantes de manière concomitante. Plusieurs études ont montré que la gestation avait un effet négatif sur la PL (Bachman et al., 1988). Outre un effet évident de compétition énergétique entre la croissance intra-utérine du fœtus et la synthèse du lait, cet effet négatif pourrait être lié aux fortes quantités de progestérone sécrétées pendant les deux premiers tiers de la gestation et qui inhibent la sécrétion (Vermouth et Deis, 1974) et l'action de la Prl (Loizzi, 1985). Cependant, l'œstradiol semble aussi fortement impliqué dans cette baisse de PL. En effet, Bachman et al. (1988) puis Sorensen et Knight (2002) ont remarqué que l'effet négatif de la gestation sur la PL débutait entre 100 et 150 jours de gestation, ce qui coïncide avec le début des sécrétions d'œstrogènes par le système fœto-placentaire (Patel et al., 1999). L'administration d'œstradiol exogène chez des vaches pendant la galactopoïèse induit une forte baisse de la PL (Delbecchi et al., 2005). L'administration de progestérone n'a, quant à elle, aucun effet seule et augmente légèrement l'effet de l'œstradiol lorsque ces deux

hormones sont administrées conjointement (Mollett et al., 1976). Delbecchi et al. (2005) ont également observé que la baisse de PL était associée à une diminution de l'ingestion alimentaire, suggérant que l'œstradiol puisse agir sur le métabolisme général de l'animal, au niveau systémique.

La lactation est une fonction biologique entraînant de grands changements métaboliques à l'échelle de l'organisme. L'entretien de la production de lait se fait grâce aux hormones galactopoïétiques qui agissent localement sur la glande mammaire, mais il passe également par des modulations hormonales au niveau systémique qui contrôlent le métabolisme. La production de lait par la mamelle conduit à une forte augmentation des besoins en eau et en nutriments (glucose, acides aminés et acides gras) nécessaires à la synthèse du lait. Ainsi, au moment du pic de production, les besoins en énergie pour synthétiser le lait représentent environ 80 % de l'énergie emmagasinée, ce qui implique une mobilisation importante des réserves corporelles. Tout ceci est orchestré par le système endocrinien : la GH et le cortisol augmentent la lipolyse dans le tissu adipeux et la néoglucogenèse dans le foie, la Prl et l'insuline favorisent l'absorption intestinale du calcium et d'acides aminés, tandis que la leptine (hormone peptidique régulant les réserves lipidiques dans l'organisme et responsable de la sensation de satiété) agit au niveau central pour réguler l'absorption d'énergie. La GH associée à l'action d'hormones vasoconstrictrices (vasopressine, adrénaline, noradrénaline, angiotensine II) et vasodilatatrices (oxyde nitrique, peptide atrial natriurétique) contribue à augmenter le débit sanguin et l'apport de sang à la glande mammaire (Svennersten-Sjaunja and Olsson, 2005).

Le lait synthétisé est stocké dans le compartiment alvéolaire et dans la citerne chez les ruminants. Une vidange régulière de la mamelle, soit par la traite soit par la tétée du jeune, est essentielle au maintien de la lactation. L'hormone qui permet l'éjection du lait du compartiment alvéolaire est l'ocytocine. L'ocytocine est une petite hormone peptidique produite dans l'hypothalamus et sécrétée par l'hypophyse postérieure (ou neurohypophyse) en réponse à la stimulation par la traite ou la tétée de récepteurs situés dans le trayon. L'ocytocine induit la contraction des cellules myoépithéliales qui entourent les alvéoles, pour permettre le passage du lait des lumières alvéolaires vers la citerne. C'est ce qu'on appelle le réflexe d'éjection du lait. Outre son rôle dans la vidange de la mamelle qui assure le maintien de la PL en empêchant l'accumulation du lait et la formation de stases lactées, l'ocytocine joue un rôle direct dans la galactopoïèse. En effet, Lollivier et al. (2002) ont rapporté que

l'administration d'ocytocine avant la traite permettait d'augmenter la PL de manière dose-dépendante, et que son action était plus efficace lors de la phase descendante de la lactation. Ils ont aussi démontré que dans la glande mammaire de rongeurs, le récepteur à l'ocytocine est exprimé non seulement par les cellules myoépithéliales, mais également par les CEM. L'action de l'ocytocine sur les CEM stimule alors la sécrétion des différents constituants du lait en accélérant les processus d'exocytose. Un traitement à l'ocytocine d'explants mammaires de lapine induit d'abord une accélération du transport intracellulaire de vésicules de sécrétions dans les CEM, puis une contraction des cellules myoépithéliales (Lollivier et al., 2006).

3.3. Fin de la lactation : le tarissement

La PL diminue spontanément après quelques mois de lactation, jusqu'à un arrêt total des sécrétions. La baisse de la PL au fur et à mesure de l'avancement de la lactation est favorisée par des décharges hypophysaires de Prl et de GH de moins en moins élevées. Les décharges de Prl induites par la tétée ou par la traite sont de plus en plus faibles au cours de la lactation (Fuchs et al., 1984). L'arrêt des tétées au sevrage ou l'arrêt de la traite au tarissement engendre un arrêt des sécrétions de Prl et d'ocytocine. Ainsi, ces hormones ne peuvent plus exercer leurs effets galactopoïétiques, que ce soit au niveau de la stimulation de la synthèse et de la sécrétion des différents constituants du lait par la Prl et l'ocytocine, ou par des effets prolifératifs et anti-apoptotiques exercés par la GH et la Prl sur les CEM. La baisse des concentrations plasmatiques de GH induit une diminution de l'expression d'IGF-1 dans le foie et dans le stroma de la glande mammaire. En parallèle, la baisse des niveaux de Prl lève l'inhibition qu'elle exerçait sur l'expression d'IGFBP-5. Il en résulte une augmentation importante du taux d'apoptose dans la glande mammaire, associée à une baisse de l'activité de synthèse des CEM : le tissu sécréteur est en involution.

A cela vient s'ajouter une augmentation importante de l'expression d'ER α dans la glande mammaire en fin de lactation. Plusieurs études ont mis en évidence un rôle de l'œstradiol dans l'involution de la glande mammaire. Une augmentation du nombre de cellules dans le lait, associée à une baisse de la concentration en α -lactalbumine et lactose, ainsi qu'à une augmentation de la concentration en protéines totales (Athie et al., 1996) et plus particulièrement en lactoferrine (Singh et al., 2008) . L'ensemble de ces phénomènes est caractéristique de l'ouverture des jonctions serrées qui a lieu lors de l'involution mammaire.

Peaker et Wilde (1996) ont également suggéré l'existence d'une rétroaction inhibitrice de l'un des constituants du lait sur la synthèse de lait dans la glande mammaire, et qui interviendrait à la suite de l'accumulation de lait dans la mamelle. Cette rétroaction serait due à la présence d'une protéine FIL (Feedback Inhibitor of Lactation), identifiée pour la première fois dans le lait de chèvre (Wilde et al., 1995) et qui, par une action autocrine, inhiberait la synthèse de différents constituants du lait par les CEM. Le FIL accentuerait également les processus apoptotiques en diminuant la réceptivité à la Prl qui ne peut alors plus exercer son action anti-apoptotique sur les CEM (Stefanon et al., 2002).

4. Mécanismes biologiques déterminant la quantité de lait produite au cours d'une lactation

La quantité de lait produite par la glande mammaire à un moment donné dépend du nombre de CEM dans la glande mammaire (Boutinaud et al., 2004). Le nombre de CEM est déterminé par des modulations de la balance prolifération/apoptose. L'intensité du remodelage tissulaire qui permet une réorganisation du tissu sécréteur peut être mesurée au travers de l'activité protéasique d'enzymes dégradant la matrice extracellulaire, les MMP (Matrix Metalloprotease) (Stefanon et al., 2002).

4.1. Turnover cellulaire

Le taux de renouvellement cellulaire ou turnover cellulaire est l'équilibre entre la balance de la prolifération/apoptose qui dépend du nombre de CEM actives (Capuco et al., 2003).

L'équilibre de la balance prolifération/apoptose évolue au cours d'une lactation et il est dépendant de l'état de la glande mammaire (développement, régression ou en stade stable). En début de lactation, le taux de prolifération cellulaire est supérieur au taux d'apoptose : le nombre de CEM et la PL augmentent. Les populations de cellules qui sont vieilles et moins vigoureuses vont être remplacées par des cellules (filles) qui ont une capacité de sécrétion plus active pendant la lactation (Capuco et al., 2001). Après le pic de lactation, l'équilibre de cette balance s'inverse, le taux d'apoptose devient supérieur au taux de prolifération cellulaire : le nombre de CEM et la taille des alvéoles diminuent ; il en résulte une baisse de la PL. Capuco et al. (2001) ont estimé que dans la glande mammaire bovine en lactation, le taux moyen de prolifération était de 0,3% et le taux moyen d'apoptose de 0,56% par jour, ce qui

correspond à un renouvellement d'environ 50% des cellules au cours d'une lactation. Ainsi, sur la totalité de la lactation, c'est le phénomène d'apoptose qui prédomine sur la prolifération cellulaire, ce qui se traduit globalement par une perte de CEM (Capuco et al., 2001).

L'apoptose (mort cellulaire) est un phénomène qui est observé dans la glande mammaire en lactation, mais surtout au cours de son involution. L'apoptose de cellules qui se localisent au milieu de la lumière alvéolaire est nécessaire durant les étapes finales de la formation de l'alvéole (Sobolewska et al., 2011). Une cellule apoptotique subit de nombreuses modifications physiques et biochimiques conduisant à une condensation puis une fragmentation de l'ADN, associées à des changements majeurs au niveau des organites et de la membrane plasmique. Motyl et al. (2006) ont proposé trois niveaux de régulation de l'apoptose dans la glande mammaire : une régulation intrinsèque ou intracellulaire mettant en jeu l'intégrité des mitochondries ; une régulation extrinsèque ou intra-mammaire impliquant des communications autocrine et paracrine via des récepteurs de mort cellulaire ; et enfin une régulation systémique notamment via des sécrétions hormonales (galactopoïétiques).

4.2. Remodelage tissulaire

La réorganisation et la rénovation tissulaire de la glande mammaire pendant la lactation sont nécessaires pour la PL. A la fin de la lactation et au début de l'involution de la glande mammaire, la chute de la PL est associée à une augmentation du remodelage tissulaire (Stefanon et al., 2002). De plus, la régression du tissu mammaire consiste en une dégénération alvéolaire et vasculaire. Les proportions de tissu alvéolaire diminuent jusqu'à 20% tandis que le tissu interstitiel augmente en fin de lactation (30%) dans la glande mammaire chez la chèvre (Safayi et al., 2010). Dans la glande mammaire, les CEM sont séparées du stroma par une membrane basale composée des protéines de la matrice extracellulaire (fibronectine, collagènes I et IV, ...). Le remodelage intensif qui a lieu lors de l'involution nécessite la dégradation de la matrice extracellulaire par les MMP dont l'expression et l'activité protéasique augmentent considérablement dans la glande mammaire bovine après 5 jours d'involution (Rabot et al., 2007). Le remodelage tissulaire dans la glande mammaire est influencé par les stéroïdes ovariennes qui induisent l'expression de protéases MMP (Yart et al., 2012). Pendant l'involution mammaire, les stéroïdes accélèrent l'apoptose des CEM en fin de lactation par l'activation de caspases 3 et 7 (Yart et al., 2013).

La dégradation de la matrice extracellulaire par les MMP influence non seulement l'organisation des structures alvéolaires sécrétrices, mais agit aussi directement sur la survie des CEM (Green et Streuli, 2004). Des études *in vitro* ont permis d'estimer un taux d'apoptose supérieur à 2,5 % dans des cultures primaires de CEM murines lorsque celles-ci sont cultivées sur du collagène I ou sur du plastique. L'apoptose de ces CEM est réduite à un taux de 0,1 % lorsqu'elles sont cultivées sur une membrane basale de synthèse (Pullan et al., 1996).

Ce qu'il faut retenir :

La glande mammaire est structurée en un ensemble de lobules contenant des alvéoles et en un réseau de canaux galactophores menant à une citerne et des trayons. Les alvéoles sont composées de cellules épithéliales mammaires (CEM), unités fonctionnelles de la glande mammaire qui synthétisent les constituants du lait. Elles sont entourées par des cellules myoépithéliales, des fibroblastes, des adipocytes et des cellules lymphatiques et sanguines.

Une caractéristique particulière de la glande mammaire est sa plasticité. La plasticité de la glande mammaire fait référence aux modifications qu'elle subit, en taille, structure, composition et activité, tout au long de son développement et pendant les lactations.

La plasticité de la glande mammaire est en lien avec sa composition cellulaire, principalement avec les CEM. Au cours d'un cycle de lactation, le nombre des CEM est déterminé par l'équilibre entre la prolifération et l'apoptose des cellules. Cet équilibre prolifération/apoptose cellulaire est dépendant de l'état de la glande mammaire. Au début de la lactation, la glande mammaire est déjà composée par du tissu sécréteur et par des CEM matures et fonctionnelles. Au cours de la lactation, la prolifération et l'apoptose des CEM sont influencées par différents facteurs comme les hormones. À la fin de la lactation, la diminution des hormones qui contribuent au maintien de la lactation et l'arrêt de la traite provoquent l'involution de la glande mammaire. Cette involution est caractérisée par l'apoptose et la perte de spécialisation des cellules épithéliales mammaires. L'involution permet la future régénération des structures mammaires pour les lactations suivantes.

La plasticité de la glande mammaire et l'équilibre entre la prolifération et l'apoptose des CEM sont connus au cours d'un cycle de lactation. D'après la littérature, les CEM et les

autres cellules composant la glande mammaire bovine diffèrent pendant la lactation. Cependant, les populations spécifiques en raison de leur classification : phénotype, fonction et état, sont inconnues.

Chapitre 3 : Les cellules épithéliales mammaires

1. Les différents types de cellules épithéliales mammaires différenciées

1.1. Les cellules épithéliales mammaires alvéolaires

Les cellules épithéliales sont nommées selon leur localisation dans l'alvéole. Les CEM de type alvéolaire sont localisées au niveau de l'alvéole et forment une monocouche (Akers, 2002). Les CEM alvéolaires sont polarisées avec la face basale située du côté de la membrane basale et la face luminaire située du côté de la lumière alvéolaire (**Figure 9**) (Faraldo et al., 2005).

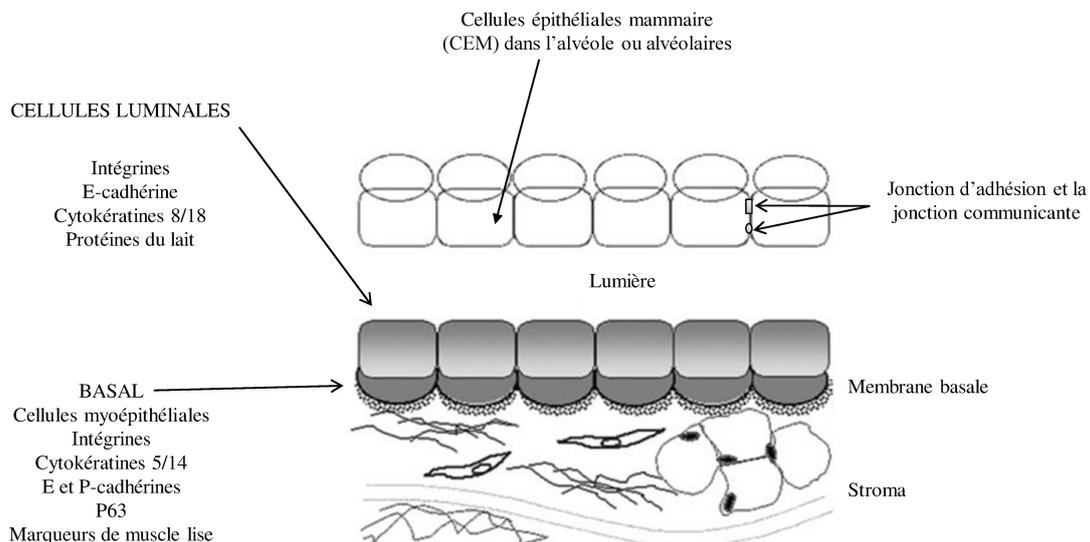


Figure 9 Organisation de l'épithélium mammaire.

Les cellules épithéliales mammaires sont les cellules qui sont dans l'alvéole. En fonction de leur localisation, les cellules dites luminales sont localisées en donnant face à la lumière alvéolaire. Les cellules sont unies les unes avec les autres avec des protéines de jonctions (d'adhésion et de la jonction communicante). Les cellules localisées du côté basal (myoépithéliales) sont en contact avec la membrane basale et le stroma mammaire (*D'après Faraldo et al., 2005*).

Les CEM alvéolaires sont liées entre elles par des jonctions serrées et reposent sur une membrane basale constituée de laminine, de collagène et de glycosaminoglycanes (**Figure 9**) (Sérieys, 1997). Ces structures permettent l'établissement de barrières qui préviennent la fuite des solutés entre elles. Cette barrière est établie après la parturition, et persiste pendant la lactation (Stelwagen et Singh, 2014). Les jonctions serrées sont formées par des protéines des familles des occludines, des claudines et des molécules d'adhésion des jonctions (ou JAM)). Les jonctions d'adhérence permettent l'union de cellules adjacentes et ils sont composés par des protéines des familles des cadhérines et des caténines. Les jonctions communicantes et les desmosomes permettent la communication entre cellules (Ben Chedly et al., 2010). Si la perméabilité cellulaire augmente à cause de l'altération des barrières il y a la perte de l'intégrité de l'épithélium (Fleet et Peaker, 1978).

Les cytokératines (CK) sont des protéines qui forment les filaments intermédiaires dans le cytosquelette cellulaire et sont considérées comme les structures solides qui soutiennent la cellule (Magin et al., 2007). Les cytokératines permettent d'identifier l'état de différenciation des cellules (Mikaelian et al., 2006). En fonction des kératines et de leur localisation au sein de l'épithélium mammaire, il est possible de discriminer les différentes populations épithéliales présentes au sein de la glande mammaire (Dulbecco et al., 1983). Ainsi, les CEM alvéolaires expriment les cytokératines 8, 18 et 19 (Stingl et al., 2001 ; Sun et al., 2010). Chez la souris, les cytokératines 8 et 18 sont également fortement exprimées par les CEM alvéolaires (Mikaelian et al., 2006). En 2011, Colitti et al. ont montré que l'expression de la CK19 dans la glande mammaire de brebis était fortement exprimée dans les CEM de la lumière alvéolaire.

Les protéines de surface ou clusters de différenciation (CD) sont des marqueurs cellulaires qui permettent de phénotyper les cellules, notamment par cytométrie en flux et immunohistologie. Ils servent à identifier l'activité et l'état de la cellule pendant la différenciation cellulaire (Zola et al., 2003). Dans ces protéines de surface, on trouve les intégrines qui se trouvent dans la membrane des CEMs, ce sont des protéines qui régulent la polarité des cellules (Taddei et al., 2003). L'intégrine ou cluster de différenciation CD49f (intégrine α -6) a été utilisé comme biomarqueurs pour identifier les CEMs dans la glande mammaire principalement chez la femme et la souris (Raymond et al., 2012). Le marqueur CD326 ou Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) a quant à lui été identifié par Prpar et al. (2012) dans les cellules luminales (CEM de type alvéolaire) durant la lactation chez la

chèvre. L'utilisation et le couplage de plusieurs marqueurs de surface permet d'identifier les sous-populations cellulaires d'une manière plus précise. En 2012, Rauner et Barash ont caractérisé les cellules luminales dans la glande mammaire chez la génisse : $CD24^{Med}CD49f^{Neg}$. Ils ont montré que ces cellules avaient une faible capacité à proliférer et à former des structures sphériques (mammosphères). Rauner et Barash (2015) ont aussi caractérisé d'autres types cellulaires chez la génisse : ils ont identifié des cellules luminales précoces et des cellules luminales matures. Ces deux populations luminales exprimaient CD49f et CD24 mais la différence entre les deux types cellulaires était liée à l'expression de la protéine d'adhésion E-cadhérine. Les cellules luminales/E-cadhérine négatives étaient les cellules qui n'avaient perdu qu'une partie de sa capacité de prolifération. Les cellules luminales/E-cadhérine positives étaient quant à elles déjà différenciées. Les apports que peuvent donner les études des populations cellulaires de la glande mammaire chez la vache, ont été discutés par Capuco et al. (2012). Ils ont suggéré qu'étudier la composition des cellules dans la glande mammaire après la lactation pourrait contribuer à diminuer le période sèche après la lactation. Un tableau qui résume les principaux marqueurs et molécules utilisées pour identifier les cellules mammaires dans d'autres espèces est présenté (**Tableau 2**).

Tableau 2 Principaux marqueurs de surface identifiés dans la glande mammaire des mammiphères.

Marqueurs	Type de molécule	Vache	Souris	Femme
CD10/CALLA	Métallo- endopeptidase	?	- ou +	+
CD24	Glycoprotéine	+	Moyenne	+
CD29	Intégrine $\beta 1$	+	Haut	+
CD49f	Intégrine $\alpha 6$	+	Haut	Haut
CD326 (EpCAM)	Protéine de jonction	?	+	Bas ou +

CS : cellule souche
N/D : non disponible
? : non étudié dans cette espèce

(D'après Borena et al., 2013)

1.2. Les cellules épithéliales mammaires ductales

Les cellules ductales ou lumino-ductales sont les cellules épithéliales présentes dans la base des alvéoles mammaires. Elles ont une morphologie asymétrique, plus allongée dans leur côté radial (Dulbecco et al., 1983). Ces cellules se trouvent à continuation de l'ouverture de la lumière alvéolaire et forment le canal lobulaire (Sérieys, 1997).

Les cellules ductales expriment la CK6. Cette cytokératine est liée à la prolifération cellulaire pendant la gestation dans la glande mammaire de la souris (Buono et al., 2006). Cependant, chez la génisse, l'expression de CK6 a été observé dans les compartiment basal et dans les cellules stromales (Rauner et Barash, 2012). Chez la femme et la souris, la population ductale est différenciée et a un phénotype CD49^fEpCAM⁺ (Asselin-Labat et al., 2008 ; Shehata et al., 2012).

1.3. Les cellules myoépithéliales mammaires

Les cellules myoépithéliales se trouvent dans l'alvéole et dans le côté basal (**Figure 9**). Ce sont des cellules de forme étoilée avec une morphologie plus large et fine au niveau des canaux (Dulbecco et al., 1983). Les cellules myoépithéliales qui entourent l'alvéole forment des structures en forme de panier. Les cellules myoépithéliales contiennent des filaments d'actine et de myosine comme les cellules musculaires. Cependant, elles ont des propriétés de cellules épithéliales en raison des cytokératines épithéliales qu'elles expriment (Adriance et al., 2005). Les cellules myoépithéliales entourent les CEM (**Figure 10**).

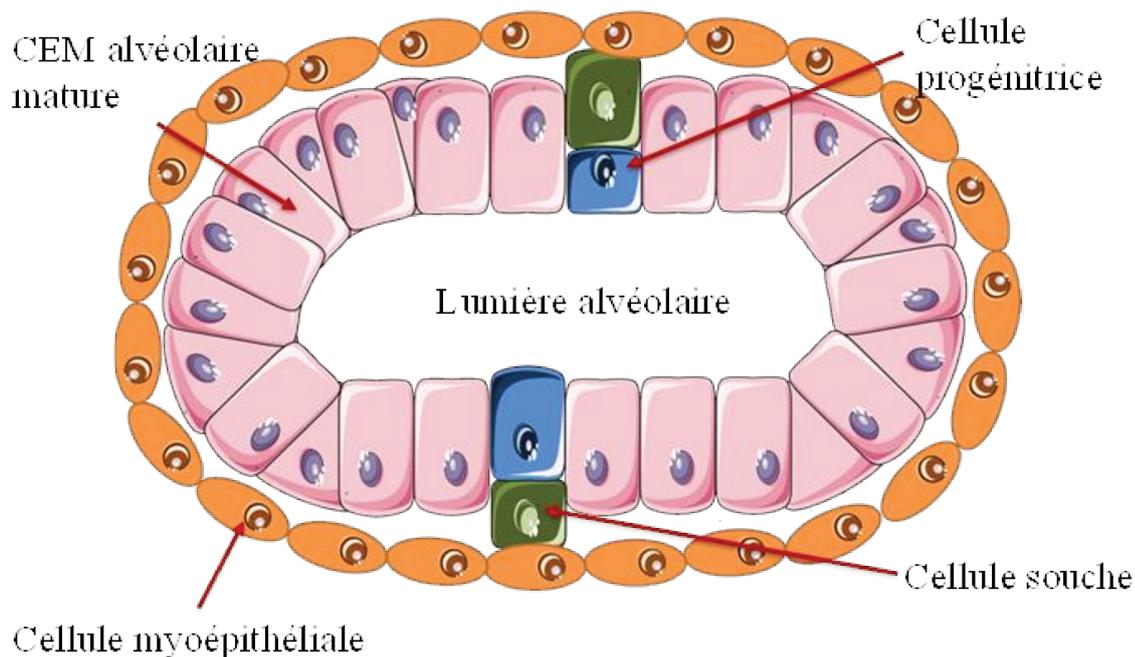


Figure 10 Organisation cellulaire dans les canaux et alvéole dans la glande mammaire.

Localisation des cellules souches, progénitrices et myoépithéliales dans l'alvéole. Les alvéoles contiennent également des cellules souches et des cellules progénitrices qui donnent origine aux CEM matures (différenciées) capables de synthétiser du lait. Les cellules sont entourées par la cellule myoépithéliale (D'après Williams et Daniel 1983 ; Capuco et al., 2002).

Les cellules myoépithéliales sont dans le compartiment basal et sont en contact avec la matrice extracellulaire et le stroma. En lien avec leur localisation, les cellules myoépithéliales sont nommées aussi cellules basales car elles sont proches de la lame basale (Abd El-Rehim et al., 2004 ; Mikaelian et al., 2006). Les cellules myoépithéliales possèdent des récepteurs à l'ocytocine qui, lorsqu'ils fixent l'ocytocine libérée à la traite/tétée, déclenchent la contraction de l'alvéole mammaire et provoque l'éjection du lait (Akers, 2002). Durant le développement, les cellules myoépithéliales synthétisent quelques protéines du cytosquelette pour l'organisation et la formation de la membrane basale tels que le collagène IV, la laminine-1 et 5 et la fibronectine (Adriance et al., 2005).

La contraction de cellules musculaires se fait essentiellement grâce à l'actine présente dans le cytoplasme. L' α -actine du muscle lisse (alfa smooth muscle actine, α -SMA) est une protéine qui a été utilisée comme marqueur pour identifier les cellules myoépithéliales dans la glande mammaire. Deugnier et al. (1995) ont montré que le phénotype des cellules

myoépithéliales était acquis après la naissance et durant le développement de la glande mammaire. Durant la lactation, l'expression de α -SMA a été observée dans les cellules myoépithéliales de l'alvéole et du canal dans la glande mammaire de la ratte (Deugnier et al., 1995). L'identification des cellules myoépithéliales a été aussi faite par rapport à l'expression de molécules liées à la contraction comme la calponine et les molécules d'adhésion tels que la P-cadhérine et la bêta-1 intégrine (β 1) (Adriance et al., 2005).

Les cellules myoépithéliales expriment les CK5, CK14 et la CK17 (Abd El-Rehim et al., 2004). Les cellules myoépithéliales se trouvant dans les canaux galactophores montrent une expression modérée des CK14 et CK17 pendant la gestation, puis plus intense pendant la lactation. En revanche, l'expression de la CK5 est modérée dans les canaux pendant la lactation et l'involution dans la glande mammaire de la souris (Mikaelian et al., 2006).

Parmi les protéines de surface exprimées par les cellules myoépithéliales, on trouve les intégrines α -1, α -2 et α -3. Les cellules myoépithéliales expriment aussi l'intégrine α -6 ou (CD49f) et la β 1 (CD29) (Lambert et al., 2012). CD10 est connu comme l'antigène commun de la leucémie lymphoblastique aigue ou common acute lymphoblastic leukemia antigen (CALLA). Il s'agit d'une glycoprotéine qui participe à la régulation enzymatique dans différents compartiments cellulaires (Maguer-Satta et al., 2011). Chez la génisse, il a été montré que les cellules myoépithéliales co-exprimaient α -SMA et CD10 (Safayi et al., 2012) et que CD10 pouvait être utilisé pour distinguer les cellules myoépithéliales. L'expression de CD10 est localisée à la surface apicale des cellules myoépithéliales tandis qu' α -SMA est exprimé à la surface basale. Shackleton et al. (2006) ont montré, chez la souris des sous-populations cellulaires dans la glande mammaire, cette caractérisation a été confirmée par l'expression de la CK14, une cytokératine spécifique des cellules myoépithéliales. Selon Shehata et al. (2012), les populations myoépithéliales dans la glande mammaire de la souris et de la femme sont $\text{EpCAM}^{\text{Low}}\text{CD49f}^{\text{High}}$.

2. Les cellules épithéliales progénitrices et souches

Les cellules souches sont des cellules qui ont la capacité de différenciation, prolifération et auto-renouvellement pour l'entretien de la population cellulaire tissulaire (Loeffler et Roeder, 2002). Les cellules souches sont classifiées par rapport à leur capacité de développement et de différenciation vers un certain type cellulaire. De nombreuses équipes de recherche ont travaillé sur les cellules souches mammaires (MaSC) (**Figure 10**) bovines parce

que ces cellules sont considérées comme étant des cibles très intéressantes pour manipuler la multiplication cellulaire et la régénération tissulaire et ainsi permettre d'améliorer la productivité des vaches laitières et la santé de la glande mammaire. La glande mammaire bovine n'est pas affectée fréquemment par le cancer. Le taux de cancer chez la vache est faible dû à la courte durée de vie dans l'élevage et à l'influence hormonale de la gestation après chaque cycle de lactation (Prpar et Dovic, 2013).

Les premiers à identifier une population cellulaire à haute capacité proliférative dans la glande mammaire bovine ont été Ellis et Capuco en 2002. Avant euthanasie, du BrdU a été injecté dans la veine jugulaire de génisses et des coupes de glande mammaire ont été réalisées. Ils ont ainsi identifié une population cellulaire faiblement marquée au sein du parenchyme mammaire et ont proposé que ces cellules étaient des putatives (présumées) MaSC. Cette observation était basée sur le fait que ces cellules claires composaient seulement 10% de la population cellulaire du parenchyme mammaire mais représentaient environ 50% des cellules en prolifération. Plus tard, Holland et al. (2003) ont isolé une population cellulaire possédant des caractéristiques de cellules souches à partir d'une monocouche de CEM bovines. L'observation de l'ultrastructure de cette petite population de cellules claires indifférenciées a permis de montrer qu'elles étaient dépourvues de jonctions communicantes fonctionnelles, caractéristique des cellules souches.

Quelques années plus tard, Capuco et al. (2009) ont identifié une population putative de MaSC bovines par leur capacité à retenir du marquage au niveau des brins d'ADN et ont montré que ces cellules exprimaient le marqueur de prolifération nucléaire Ki67 ainsi que les récepteurs à l'œstrogène (ER) et à la progestérone (PR). Du fait que la population cellulaire capable de retenir le marquage à l'ADN contenait à la fois des cellules ER-positives et ER-négatives, Capuco et al. (2009) a suggéré que les cellules ER-négatives représentaient les cellules souches et les cellules ER-positives, les cellules progénitrices. La cellule progénitrice est une cellule qui provient d'une cellule souche, elle se caractérise par le fait d'avoir une différenciation cellulaire plus spécifique vers certains lignages et avec une capacité de différenciation limitée (Seaberg et van der Kooy, 2003). Une étude *in vivo* réalisée par le même groupe de Capuco et al. (2009), consistant à injecter de la xanthosine dans des glandes mammaires de génisses, a été initiée pour évaluer si cette molécule pouvait stimuler la population de MaSC. Ceci était basé sur le fait que la xanthosine était capable de supprimer la fonction de la protéine p53 permettant la division cellulaire symétrique (Capuco et al.,

2009). Leurs résultats ont ainsi mis en évidence que le traitement à la xanthosine avait temporairement augmenter le pourcentage de cellules capables de retenir un marquage au niveau de l'ADN (+0.4%). Par ailleurs, ces résultats ont été confirmés par l'utilisation de la xanthosine in vitro sur des lignées de CEM (Capuco et al., 2009 ; Choudhary et Capuco, 2012).

Plus récemment, quelques équipes se sont focalisées à isoler et à mieux identifier les MaSC bovines à partir de tissus de glande mammaire. Ainsi, Li et al. (2009) ont isolé, cultivé et caractérisé des CEM bovines ayant des caractéristiques de cellules souches en se basant sur la capacité à former des mammosphères en suspension, à se différencier en cellules épithéliales/myoépithéliales ou en cellules sécrétrices et à exprimer des intégrines bêta 1 et alpha 6. Martignani et al. (2010) ont quant à eux utilisé le test de colony forming unit (CFU) pour étudier les capacités d'expansion clonogéniques des MaSC bovines et ils ont trouvé 3 colonies distinctes sur la base de leur morphologie et de leur taille. Un type de colonie avait un phénotype myoépithélial avec une absence d'expression de la cytokératine 18 et une expression de la cytokératine 14 alors que les deux autres colonies se sont révélées avoir des caractéristiques luminales (CK18⁺/CK14⁻). La présence des cellules souches dans la glande mammaire bovine a été étudiée par Li et al. (2009). Les cellules qui forment la mammosphère expriment l'intégrine β 1(CD29) quand elles sont cultivées en suspension 3D (ultra-low attachment, ULA). En plus, ces cellules expriment le CK19 et la beta caséine, raison pour laquelle elles étaient considérées comme différenciées. En 2007, Ginestier et al, ont démontré que l'aldéhyde deshydrogénase (ALDH) était responsable de l'oxydation intracellulaire des aldéhydes permettant l'oxydation de rétinol en acide rétinoïque pendant les étapes précoces de la différenciation cellulaire des cellules souches et permettait de les identifier (cellules souches). L'activité de l'ALDH a été proposée comme un candidat et marqueur de cellules souches car les populations ALDH⁺ sont sensibles au renouvellement, à la prolifération et à la différenciation (après transplantation). Une autre étude a montré par des analyses sur l'activité de l'ALDH dans la glande mammaire de la souris, que les cellules ALDH⁺ ont des caractéristiques luminales (Eirew et al., 2012). Au contraire, les cellules ALDH⁻ produisaient des colonies ayant des caractéristiques myoépithéliales. L'équipe de Motyl (2011) a identifié des MaSC putatives dans une suspension de CEM bovines en utilisant le marqueur fluorescent Hoechst 33342. Ils ont estimé cette population à 0.5% des cellules totales présentes dans la glande mammaire bovine. De plus, ils ont utilisé le marqueur Sca-1. En effet, ce marqueur est utilisé chez d'autres espèces comme chez la souris, où il sert de

biomarqueur pour identifier les cellules souches dans la glande mammaire. Ils ont phénotypé les MaSC en utilisant l'immunohistochimie et la cytométrie en flux à partir de sections de glandes mammaires. Ils ont analysé et comparé la taille des populations cellulaires Sca-1⁺ contre d'autres populations (SP, side population). Ils ont ainsi mis en évidence que les cellules Sca-1⁺ étaient localisées principalement au niveau de la couche épithéliale basale et constituaient environ 2% des cellules totales. Cependant, l'analyse du profil transcriptomique par microarrays a montré que les cellules Sca-1⁺ exprimaient fortement des gènes spécifiques de cellules d'origine hématopoïétiques, suggérant ainsi que ces cellules appartenaient à un type cellulaire non-épithélial. Plus récemment, Rauner et Barash (2012) ont utilisé un kit d'enrichissement des cellules souches mammaires murines afin d'obtenir une population pure de cellules épithéliales bovines. Par la suite, les cellules ont été divisées en 4 populations en se basant sur l'expression de CD24 et de CD49f : CD24^{Med}CD49f^{Pos} (cellules souches putatives), CD24^{High}CD49f^{Neg} (cellules progénitrices putatives), CD24^{Neg}CD49f^{Pos} (cellules basales) et CD24^{Med}CD49f^{Neg} (cellules luminales). Ces 4 populations ont par la suite été caractérisées par rapport à l'expression de différents marquages épithéliaux, à leur capacité à former des CFU et à des différences d'expression de l'ALDH. Sur la base de ces résultats, un modèle de hiérarchisation cellulaire et de lignage a été proposé (**Figure 11**).

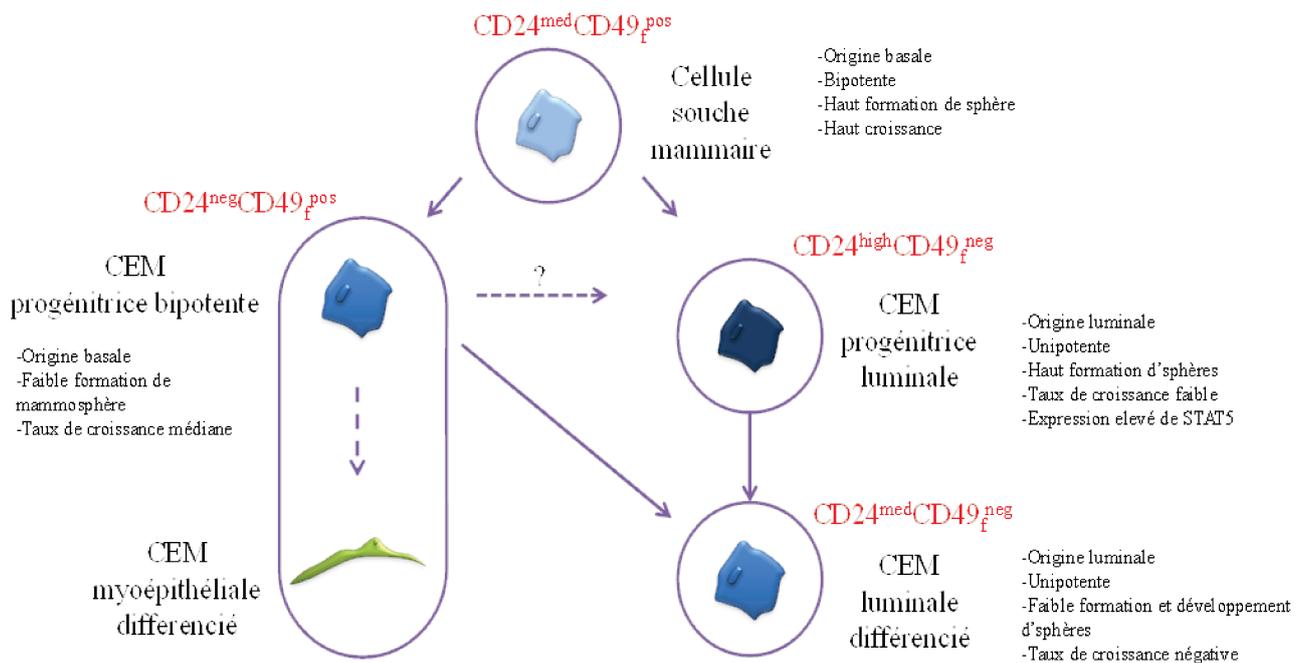


Figure 11 Hiérarchisation des cellules dans la glande mammaire de la génisse.

A partir de l'expression de deux biomarqueurs, Rauner et Barash (2012) ont proposé un modèle de hiérarchisation cellulaire dans la glande mammaire de la génisse. Ils ont proposé qu'une cellule souche donne origine à une CEM progénitrice bipotente qui est connue pour avoir quelques caractéristiques particulières. La cellule progénitrice bipotente donne origine à une cellule progénitrice luminale qui dérive en une cellule luminale différenciée. D'un autre côté, la cellule progénitrice luminale donne origine à une CEM myoépithéliale différenciée.

Dans ce modèle, les cellules souches putatives se retrouvent en haut de la hiérarchie sur la base de leur origine de type basale, de leur caractère bipotent et de leur capacité à former des colonies à fort taux de croissance. La caractéristique de bipotentialité permet aux cellules de donner origine à deux cellules du même lignage (Loeffler et Roeder, 2002). Les cellules progénitrices putatives sont quant à elles unipotentes car elles n'ont la capacité qu'à former des colonies CK18⁺ avec une faible capacité à former des colonies. Elles sont ainsi de type progénitrices lumineales uniquement. Les cellules basales sont bipotentes mais contrairement aux cellules souches putatives, elles ont une faible capacité à former des colonies et ont un niveau de croissance moyen. Il s'agit donc d'un mix de cellules progénitrices bipotentes et de cellules différenciées de type myoépithélial. Enfin, la population luminale forme des colonies désorganisées et fortement CK18⁺. Ainsi ces cellules ont été proposées comme étant des cellules sécrétrices de lait peu prolifératives et placées en fin de hiérarchie.

Ce qu'il faut retenir :

Dans la glande mammaire, les cellules épithéliales sont nommées en fonction de leur localisation dans l'alvéole. Les cellules de type alvéolaire se localisent au niveau de l'alvéole en faisant face à la lumière alvéolaire. Les cellules ductales ou lumino-ductales sont les cellules présentes à la base des alvéoles mammaires.

Les cellules myoépithéliales entourent l'alvéole et sont localisées sur le domaine basal. Elles possèdent des récepteurs à l'ocytocine, hormone libérée à la traite permettant la contraction de l'alvéole et provoquant l'éjection du lait.

Les cellules souches sont des cellules ayant des capacités de différenciation, de prolifération et d'auto-renouvellement pour permettre l'entretien des populations cellulaires du tissu. Les cellules progénitrices sont des cellules provenant des cellules souches. Elles se caractérisent par une différenciation plus spécifique vers certains lignages et avec une capacité de différenciation limitée.

Les marqueurs de surface (clusters de différenciation, CD) sont des protéines exprimées à la surface des cellules qui servent de biomarqueurs cellulaires pour identifier les cellules en cytométrie en flux et en immunohistologie.

D'après la littérature, les principaux clusters de différenciation ou biomarqueurs qui permettent d'étudier la glande mammaire sont : CD49f, une intégrine, utilisée pour identifier les cellules épithéliales mammaires dans d'autres espèces animales principalement chez la souris. Le marqueur CD326 ou Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) a été identifié dans les cellules luminales (cellules épithéliales de type alvéolaire) pendant la lactation chez la chèvre. D'autres biomarqueurs comme CD24 a été utilisé avec d'autres biomarqueurs comme le CD49f pour identifier d'autres populations dans la glande mammaire. Le biomarqueur CD10 (leucémie lymphoblastique aigue ou common acute lymphoblastic leukemia antigen (CALLA), est une glycoprotéine qui participe à la régulation enzymatique dans différents compartiments cellulaires et a été identifié dans les cellules myoépithéliales.

Chapitre 4 : Méthodologies et outils pour l'étude et l'identification des cellules de la glande mammaire

1. Méthodologies pour l'obtention et la culture des cellules de la glande mammaire

1.1. Méthodes de prélèvement du tissu mammaire

Contrairement à ce qui est possible chez la souris (étude de la glande mammaire dans son intégralité en raison de sa petite taille), il est impossible d'analyser la totalité de la glande mammaire de la vache. En effet, chez une vache, la mamelle en lactation pèse environ 45-50 kg (Nickerson et Akers, 2002). Ceci représente des avantages car le prélèvement du tissu mammaire après euthanasie permet d'obtenir de grandes quantités d'échantillon (**Figure 12**), dans différentes régions de la glande mammaire. Mais un des inconvénients majeur est qu'il n'est pas possible d'étudier l'évolution du tissu mammaire au cours du temps si facilement.

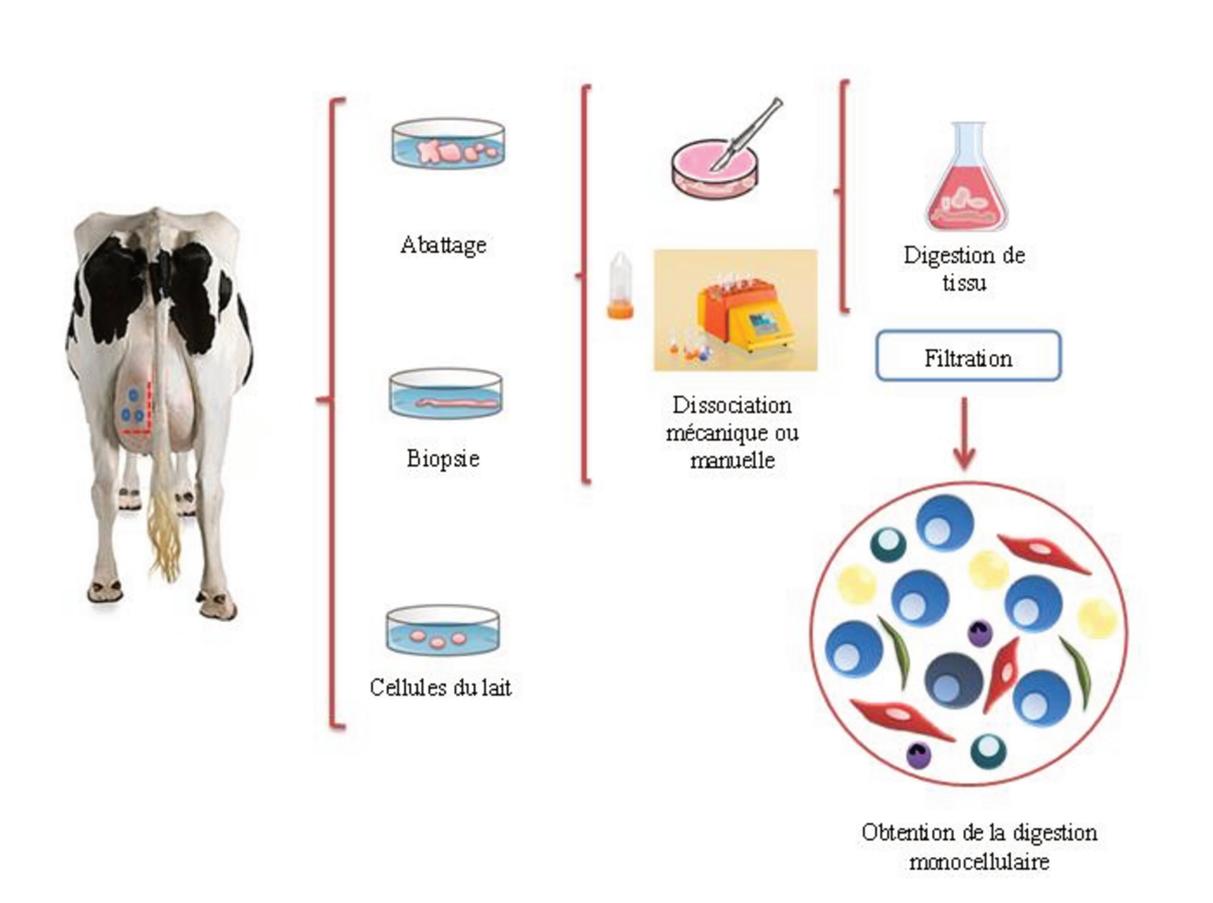


Figure 12 Méthodologies pour l'étude du tissu mammaire de vache et l'obtention de cellules mammaires.

Le tissu mammaire peut être obtenu après abattage de l'animal ou par biopsie. Les cellules mammaires peuvent aussi être obtenues à partir du lait (exfoliation). La dissociation de tissu peut

suivre deux méthodologies : mécanique ou manuelle. La digestion de tissu est faite à l'aide d'enzymes spécifiques ; par la suite la filtration aide à l'obtention d'une suspension monocellulaire contenant les cellules mammaires.

L'équipe de Farr et al. (1996) a donc développé une technique de prélèvement de glande mammaire par biopsie chez la vache en lactation. Ils ont montré que le tissu issu de biopsies était composé notamment de tissu alvéolaire sécrétoire exprimant des protéines du lait comme la caséine type α -S1 et l' α -lactalbumine. Cette technique permet aussi de récupérer une production de lait normale ainsi qu'une composition stable 15 jours après la biopsie. L'avantage du prélèvement par biopsies est que le prélèvement est rapide et ne nécessite qu'une anesthésie locale. De plus, l'incision pour l'obtention d'échantillon est relativement petite et permet de récupérer suffisamment de matériel pour réaliser des analyses moléculaires et cellulaires. Il est aussi possible de réaliser plusieurs prélèvements au cours d'un cycle de lactation pour étudier le tissu en dynamique. L'utilisation des aiguilles est une autre technique pour le prélèvement du tissu mammaire. Cependant, la faible quantité (25 mg) du tissu mammaire récupéré est un inconvénient (Lima et al., 2015).

Il existe une autre méthode d'étude du tissu mammaire : la récupération de cellules épithéliales exfoliées à partir du lait. En effet, dans le lait nous pouvons trouver des cellules épithéliales provenant de l'exfoliation du tissu mammaire liée notamment à la traite des animaux. Les inconvénients de cette méthodologie sont que les CEM récupérées ne représentent qu'une partie des populations cellulaires de la glande et qu'elles sont surtout utilisées pour étudier l'activité de synthèse de la mamelle (Boutinaud et al., 2015).

1.2. Digestion des biopsies

La digestion de biopsies consiste d'abord à couper le tissu en petits morceaux d'environ 2mm³. Ces petits morceaux sont appelés explants. La première étape est la digestion des explants. Elle consiste à mettre dans un erlenmeyer en plastique des explants de glande mammaire dans une solution de digestion enzymatique contenant deux enzymes : la collagénase et la hyaluronidase. L'erlenmeyer est ensuite placé au bain-marie sec pendant trois heures à 37°C et sous agitation (Proia et Kuperwasser, 2006 ; Rauner et Barash, 2012). Il est nécessaire, toutes les heures, de re-suspendre énergiquement la suspension à l'aide d'une pipette.

Une autre méthode de digestion consiste à utiliser un automate (**Figure 12**), le gentleMACS. Les explants à digérer sont placés dans des tubes spécialement conçus pour cet

appareil. En effet, ces tubes présentent des hélices au niveau du bouchon permettant de dilacérer le tissu. Plusieurs programmes peuvent ensuite être utilisés en fonction du temps de digestion souhaité et de la vitesse de dilacération voulue.

L'isolement de cellules est aussi possible grâce à l'utilisation d'enzymes. La sélection d'enzymes est dépendante du type de tissu. Les enzymes les plus utilisées sont les protéolytiques (peptidases, protéases et protéinases), lesquels sont la trypsine, pepsine, dispase, protéase, papaïne, collagénase, élastase, hyaluronidase, catalase et chymotrypsine (Mótyán et al., 2013). Les enzymes les plus utilisées pour la dissociation du tissu sont la collagénase et la dispase. La collagénase dégrade le collagène et d'autres protéines qui composent la matrice extracellulaire des tissus épithéliaux. La dispase agit comme une enzyme complémentaire avec d'autres comme la collagénase ou protéase pour dissocier du tissu. La dispase est plus ciblée pour dissocier les cellules fibroblastiques, et elle sert à la sélection des cellules épithéliales (Stingl et al., 2006).

1.3. Filtration

Après digestion du tissu, l'utilisation de filtres permet d'éliminer des débris et les agrégats cellulaires. Des filtres de différentes tailles permettent d'éliminer les débris (filtration 200 μm) puis de filtrer les cellules en fonction de leurs diamètres (dans notre cas filtration à 70 μm).

Selon la littérature, la taille de filtres pour la première filtration peut être de : 200, 163 μm 70 μm et 60 μm (Baumrucker et al., 1988 ; Daniel et Silberstein, 2000). Au moins deux filtrations sont importantes (70 μm , 40 μm , 30 μm ...)(Stingl et al., 2006 ; Rauner and Barash, 2012). Le choix du filtre est en lien avec la provenance du tissu (espèce et âge de l'animal) et la méthodologie de digestion.

1.4. Traitement de la suspension monocellulaire

La suspension monocellulaire ou « single cells » fait référence à l'obtention de cellules « individuelles » isolées hors du tissu (Hu et al., 2016). Les cellules obtenues peuvent être cultivées *in vitro* pour observer leur morphologie, leur prolifération et leur différenciation. Ainsi, les cellules peuvent être analysées par rapport à leurs propriétés, taille, densité déformabilité et modifications électriques. Ces techniques peuvent être faites par filtration de membrane et diffusion de gradient. D'autres techniques permettent d'étudier des

caractéristiques et propriétés biologiques telles que la cytométrie en flux et le tri-cellulaire (Hu et al., 2016). Cela permet d'utiliser les cellules directement pour une analyse des populations cellulaires fraîchement isolées. Il est préférable d'analyser les différentes populations cellulaires présentes dans l'explant de tissu immédiatement après la digestion et la filtration car leur mise en culture pourrait faire évoluer ou altérer leurs caractéristiques (réorientation du phénotype, perte de marqueurs...) (Masters et Stacey, 2007).

1.5. Culture cellulaire

1.5.1. Support de culture

La cellule épithéliale au sein de l'alvéole mammaire est influencée par des facteurs externes propres à son microenvironnement. Les cellules peuvent être cultivées à même le support plastique (en adhérentes) ou dans un gel permettant une culture en 3D des cellules.

Les supports de culture comme les gels de collagène permettent la formation des structures alvéolaires avec un développement du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi dans la CEM (Emerman et Pitelka, 1977). Les CEM prolifèrent plus et elles ont une concentration en ADN augmentée quand elles sont cultivées dans les supports en 3D sur gel de collagène. Ce support permet aux cellules tumorales de former des projections typiques des arborescences mammaires. Les cellules se polarisent et forment des structures similaires à des canaux (Yang et al., 1979). Un gel couramment utilisé est le Matrigel™. Il s'agit d'un réseau de Laminine-Entactine-Fibronectine provenant de la tumeur Engelbreth-Holm-Swarm (EHS). Ce gel permet aux cellules neurales de former des structures sphériques (Kleinman et Martin, 2005 ; Pastrana et al., 2011). Les CEM possèdent la capacité de former des mammosphères quand elles sont cultivées sur support Matrigel™. Les mammosphères sont des structures hétérogènes composées de différentes populations cellulaires. Chaque mammosphère peut être composée de ~130 cellules. De la même manière, les CEM forment aussi des mammosphères quand elles sont cultivées dans un support plastique hydrophobe ne permettant pas l'adhérence des cellules, ultra-low attachement (ULA) Corning®. Ce support consiste en une couche d'hydrogel liée de façon covalente qui inhibe efficacement la fixation cellulaire (Dontu et al., 2003 ; Kozlowski et al., 2009).

1.5.2. Milieu de culture

Les milieux de culture contiennent des acides aminés, vitamines, sels et les protéines nécessaires pour la croissance cellulaire. Les milieux contiennent aussi du sérum de veau fœtal qui est très riche en protéines et facteurs de croissance. L'absence totale de sérum dans les cultures des CEM de la souris a montré des caractéristiques similaires aux cellules en différenciation (Hahm et al., 1990). Les cellules cultivées sur Matrigel™ et en absence de milieu, exprimaient les caséines du lait (Hahm et al., 1990). La concentration du sérum de veau fœtal dans les cultures de cellules primaires et de lignées immortalisées mammaires est de l'ordre de 5-10% (Zavizion et al., 1995 ; Zavizion et al., 1996 ; German et Barash, 2002). Chaque milieu est adapté au type cellulaire.

2. Types cellulaires disponibles pour l'étude in vitro de la glande mammaire

2.1. L'utilisation des lignées cellulaires de la glande mammaire bovine

Quand on travaille avec des cellules provenant de la digestion de tissu elles sont connues comme cellules primaires. L'avantage de travailler avec des cellules primaires est qu'elles sont des cellules originales provenant directement du tissu d'intérêt. En revanche, les lignes cellulaires immortelles ont une prolifération cellulaire quasi indéfinie et sont plus stables, c'est à dire qu'elles ne sénescent pas rapidement. Une lignée cellulaire peut être immortalisée in vitro par l'addition des virus qui altèrent son cycle cellulaire. Le SV40 est un virus qui appartient à la famille de polyomaviridae utilisé pour la transformation des lignes cellulaires. Le SV40 est conformé par deux types de protéines: le LT (antigène large) et le ST (antigène petit). La présence des deux protéines au même temps est importante pour l'immortalisation mais n'est pas indispensable (Jha et al., 1998).

Les lignées immortelles bovines de la glande mammaire bovine sont connues pour former des structures typiques des CEM quand elles sont mises en culture in vitro. Il y a des lignées de CEM qui sécrètent des caséines (Ahn et al., 1995) et d'autres qui forment des prolongations en culture et qui ressemblent aux cellules myoépithéliales (Schmid et al., 1983).

La lignée cellulaire MAC-T

La cellule alvéolaire mammaire (MAC-T) est une lignée établie à partir de la transfection de l'antigène SV40 (large antigène) du plasmide pBAPSV40TtsA58. Cette lignée a été obtenue à partir du tissu mammaire de vaches en lactation. Les cellules MAC-T sont des

cellules qui montrent des caractéristiques de CEM bovines. Elles forment des structures cuboïdes pavimenteuses (**Figure 13**), quand elles sont mises en culture in vitro et elles synthétisent l'alpha et la beta caséine (Huynh et al., 1991).

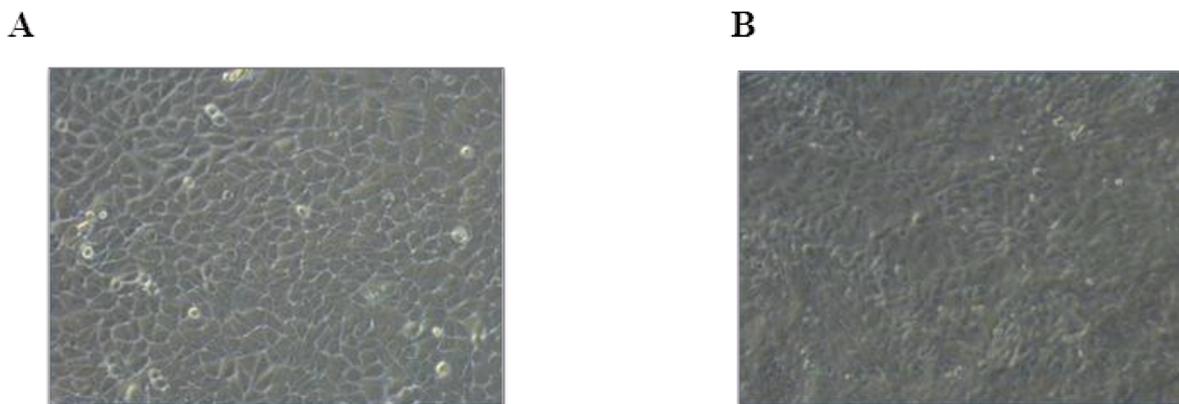


Figure 13 Lignées cellulaires de la glande mammaire bovine.

A gauche, la cellule MAC-T, elles forment un tapis avec des structures cuboïdes pavimenteuses (A). A droite, la cellule BME-UV1 qui forme ainsi des structures cuboïdes caractéristiques des cellules mammaires (B). Les deux lignées dans ces images sont cultivées dans des supports en plastique (2D).

Les hormones liées à la lactogénèse (prolactine et hormone de croissance) ont été ajoutées dans leur culture in vitro (Huynh et al., 1991 ; Johnson et al., 2013). La lignée MAC-T a alors été utilisée comme un modèle cellulaire dans les études de la synthèse du lait (Johnson et al., 2013). En outre, la cellule MAC-T peut être utilisée pour les études métaboliques mais elle n'a pas une forte capacité à répondre à l'effet des hormones (Berry et al., 2003).

La sécrétion d'alpha et beta caséine dans les cultures des cellules MAC-T montre des caractéristiques de cellule épithéliale mammaire différenciée (Huynh et al., 1991). Les MAC-T ont une capacité de catabolisme plus élevée en comparaison avec le tissu mammaire (des vaches proches à la parturition et au pic de lactation) (Hosseini et al., 2013).

Avantages et inconvénients de la lignée MAC-T

Un des avantages de la lignée MAC-T est sa prolifération dans les conditions de cultures typiques (adhérente et collagène). De plus, La lignée MAC-T peut se dupliquer rapidement (17 heures) après sa mise en culture. Les MAC-T sont des cellules qui forment

des structures qui conforment un lumen autour des petits organoïdes quand elles sont cultivées dans des conditions en présence de collagène (Huynh et al, 1991).

Un inconvénient est qu'il semble que la lignée MAC-T soit très hétérogène parce qu'elle peut donner origine à des types cellulaires ou sous-populations différentes (Zavizion et al., 1995). Pour cette raison, son utilisation comme un modèle pour étudier la lactation reste à être vérifiée.

La lignée cellulaire BME-UV1

La sécrétion d'alpha caséine, alpha lactalbumine et kappa caséine dans les cultures des cellules BME-UV1 montre des caractéristiques de cellule épithéliale mammaire différenciée (Zavizion et al., 1996).

L'isocitrate déshydrogénase (IDH1) est une enzyme qui participe au cycle de Krebs dans la régulation d'énergie métabolique au début de la lactation. Les cellules BME-UV1 peuvent être utilisées comme un modèle pour étudier l'expression de IDH1 (Liu et al., 2006).

Dans la formation des acini dans les cultures in vitro, les cellules ont une organisation structurale avec une lumière. La formation de cette lumière est faite par l'apoptose des cellules qui se trouvent dans cette lumière. Quand les BME-UV1 sont cultivées dans le Matrigel™, la lumière est formée autour du 12ème et 16ème jour.

Avantages et inconvénients de la lignée BME-UV1

Un des avantages de la lignée BME-UV1 est qu'elle peut être utilisée comme un modèle in vitro pour des études pendant l'involution de la lactation. Il a été démontré qu'elle répond aux facteurs apoptotiques tel que le facteur de croissance transformant beta 1 (TGF- β 1). Cette lignée peut modifier son cycle cellulaire en augmentant la phase de son cycle de croissance ou de synthèse (G1). De plus, sous quelques conditions de cultures (apoptose) elle exprime des gènes tels que le Bax et les caspase-3 (Kolek et al., 2003). Pour cette raison, la lignée BME-UV1 permet d'étudier l'effet préventif de l'IGF-1 contre l'apoptose cellulaire (Gajewska et Motyl, 2004). Un inconvénient de cette lignée est que la BME-UV1 a une prolifération plus prolongée que la lignée MAC-T, car elle peut arriver à 100% de confluence à ~48 heures après être cultivée in vitro (Zavizion et al., 1996).

2.2. Avantages et inconvénients de l'utilisation des lignées cellulaires comme modèles in vitro

Les cellules obtenues à partir de tissu et cultivées in vitro ont une «période de vie en prolifération» déterminée. Cette période de vie est limitée par la taille des télomères. Les télomères sont des structures qui se trouvent dans l'ADN, plus spécifiquement dans les chromosomes. La taille de ces télomères détermine le temps de vie dans la réplication des cellules. La taille des télomères a aussi une forte relation avec l'âge du donneur de tissu dont elle détermine la sénescence des cellules (Harley et al., 1990). Les cellules immortalisées réactivent l'activité de leurs télomères pour allonger leur taille pour continuer leur activité dans la réplication de l'ADN (Harley et al., 1992). L'établissement des lignées cellulaires a permis de travailler avec des cellules avec une prolifération quasi indéfinie.

3. Les techniques moléculaires et histologiques

3.1. L'immunohistologie

La coloration par l'hématoxyline et l'éosine permet d'observer les alvéoles et leur évolution pendant la lactation avec leur produit de sécrétion, les cellules myoépithéliales et le tissu conjonctif (Gamble et Wilson, 2002). La préparation du tissu permet de le préserver de la dégradation et de minimiser les changements structurels et de sa composition chimique. L'hématoxyline est une substance plutôt basique, qui colore les noyaux en violet et donc met en évidence les acides nucléiques. L'éosine est une substance plutôt acide, qui colore davantage plutôt les cytoplasmes (en rose) donc colore les protéines.

L'immunohistologie est une technique qui permet l'identification des molécules ou des structures dans le tissu. Elle consiste à utiliser des anticorps spécifiques dirigés contre des antigènes d'intérêt. Les anticorps ou immunoglobulines reconnaissent les antigènes, se fixent sur une zone de la molécule d'antigène appelée épitope. Entre les antigènes et les anticorps, il y a une grande affinité spécifique (Brostoff et al., 1997). Cependant, pour rendre visible l'union de ces deux molécules, il faut que les anticorps soient marqués (Liu et al., 2014). Le marquage avec un fluorochrome doit être absorbé par la molécule et excité par une lumière spécifique. Puis elle peut être observée avec un microscope à fluorescence (Carlton, 2002). La plupart des études sur le tissu mammaire utilisent l'immunohistochimie pour identifier les molécules ou structures d'intérêt in situ sur les coupes histologiques. Chez la femme

l'identification des différentes protéines (Ki-67, BCL-2 et p-53) permet de diagnostiquer des pathologies comme le cancer du sein. Les cytokératines ont été utilisées comme marqueurs de cellules mammaires depuis 1983 par Dulbecco et al. Les cytokératines (18 et 19) ont aidé à identifier les CEM par immunohistologie dans le tissu mammaire (Mikaelian et al., 2006 ; Sun et al., 2010). Cependant le choix d'utiliser les cytokératines en immunohistochimie peut entraîner un chevauchement et il est difficile d'identifier les cytokératines principalement aux différentes étapes du développement mammaire (Sun et al., 2010). La CK14 est moins fréquemment utilisée en immunohistochimie du fait de la réactivité croisée avec d'autres structures comme les myofibroblastes dans la détection de cancer chez la femme (Liu et al., 2014). Les marqueurs comme la calponine, la P-cadhérine, la maspine , p75 et le p63 aident à identifier les cellules myoépithéliales dans la glande mammaire en immunohistochimie. Cependant, la protéine Smooth Muscle Actin (SMA) a permis d'identifier des cellules myoépithéliales dans le tissu mammaire dans 100% des études mammaires. En outre, en utilisant le marqueur CD10 permet d'identifier les myofibroblastes dans le stroma mammaire (Dewar et al., 2011). Chez le bovin, Capuco et al. (2007) ont quantifié des cellules avec le marquage (léger ou fort) de l'ADN, celui-ci a permis d'identifier les cellules souches et progénitrices dans la glande mammaire de la génisse par immunohistochimie. De plus, l'identification in situ des protéines ou marqueurs de surface dans les cellules d'intérêt permet de compléter les études par cytométrie en flux (Stingl et al., 2006 ; Rauner et Barash, 2012).

3.2. Le western blot

La technique de western blot permet de détecter des protéines des cellules ou des tissus (Towbin et al., 1979). Il consiste à séparer les protéines d'intérêt par électrophorèse et à les transférer sur une membrane. L'identification des protéines sur la membrane se fait par reconnaissance des liaisons antigènes-anticorps. La présence de bandes dans la membrane montre la présence de la protéine, donne information sur sa quantité et spécificité dans les cellules (Bordeaux et al., 2010).

Dans les études de la glande mammaire, la technique de western blot a été faite pour vérifier la présence de protéines dans les différents types cellulaires telles que les cytokératines (CK8, CK18, CK19...) pour les cellules épithéliales et la vimentine et l'alpha-SMA pour les cellules myoépithéliales. Celui-ci permet de vérifier leur lignage/phénotype (Pechoux et al., 1999 ; Leccia et al., 2012 ; Ontsouka et al., 2016). De plus, la technique de

western blot met en évidence les protéines du lait, des facteurs de transcription (STAT5, ER, PR...).

Les inconvénients avec le western blot sont que la méthode n'est pas rapide, qu'elle requière plusieurs lavages et incubations et n'est pas automatisable. Si les anticorps ne sont pas de bonne qualité, ou si la concentration utilisée n'est pas correcte (protéines du haut poids moléculaire), il y aura un bruit de fond et la présence de bandes ou de taches (Kurien et Scofield, 2006).

La connaissance de l'état des cellules et de leur trajet vers la voie de différenciation cellulaire a été montré par Hughes et al. (2014) en utilisant une analyse de western blot avec l'identification des isophormes de la protéine nestin alpha dans les cellules spécifiques dans des suspensions monocellulaires (single cells). La technique de single cell western blotting a été développée en utilisant des gels de polyacrylamide dans des micro puits de 30 μm (Hughes et al., 2014). La taille des puits permet d'analyser une cellule ou plusieurs cellules et d'analyser largement différentes protéines et cellules obtenues à partir du tissu primaire. Cette technique permet d'utiliser populations de 10^3 cellules par micro système (Kang et al., 2016). Un des inconvénient de cette technique est que parfois les quantités de détection des protéines sont faibles et il faut diminuer le signal non spécifique ainsi la taille du pores du gel peut être augmentée et donner des soucis dans l'interprétation de résultats.

3.3. La PCR (polymerase chain reaction)

L'acide désoxyribonucléique (ADN) est la molécule qui contient l'information génétique pour le développement et les fonctions d'un être vivant. Elle est composée de bases nitrogènes (adénine, guanine, cytosine et par la tymine). L'acide ribonucléique (ARN) est la molécule conformée par l'adénine, la guanine, la cytosine et l'uracile. A partir de l'ADN, elle porte l'information pour la synthèse de protéines. La PCR permet la production de différentes copies d'un fragment d'ADN. L'enzyme ADN polymérase fabrique une chaîne complémentaire d'ADN avec les nucléotides et oligonucléotides (amorces). La réaction de la PCR se déroule en trois phases : dénaturation, hybridation et synthèse d'ADN. L'amplification consiste en la séparation des chaînes qui composent l'ADN, est chauffé à hautes températures (94°C). Pour l'hybridation, la température diminue (64°C) et il y a « l'appariement des amorces ». Les amorces s'unissent à une région spécifique de la chaîne

d'ADN. La synthèse de l'ADN est faite par l'action de l'ADN polymérase (72°C) (Kubista et al., 2006).

En outre, la réaction en chaîne de la polymérase avec transcriptase inverse (RT-PCR) consiste en la conversion d'ARN en molécules d'ADN complémentaire par l'enzyme transcriptase reverse. La partie de la transcription inversée est très importante pour les résultats postérieurs. L'extraction et la qualité d'ARN utilisée doit être bonne et abondante. La RT-PCR est une méthodologie sensible qui permet la génération de copies d'ADN par l'amplification (augmentation dans le numéro de copies d'un fragment de l'ADN). A la fin de la RT-PCR il y aura formation de l'ADN complémentaire, qui est très stable et peut être stocké pour longtemps (Bustin et al., 2005).

Dans les études de la glande mammaire, en utilisant la technique de PCR, Sorensen et al. (2006) ont étudié l'expression génétique des enzymes liées au métabolisme des acides gras, de la GH, de l'insuline et de ses récepteurs (IGF-1, IGFBP-3 et IGFBP-5) pendant la lactation. Ils ont trouvé que l'expression du gène IGF-1 lié à la prolifération cellulaire a été augmentée au début de la lactation. Le rôle de l'IGF-1 sur la prolifération cellulaire coïncide avec l'étude de Capuco et al. (2001) où la quantité d'ADN a été ainsi augmentée dans cette étape. Cependant, en étudiant l'expression d'IGF-1 dans le tissu mammaire Sorensen et al. (2006) ne précisent pas sur quel type cellulaire de la glande mammaire il s'exprime car il y a des gènes qui sont présents aussi dans d'autres types cellulaires comme dans les cellules stromales (Baumrucker et Erondou, 2000).

Plusieurs études ont montré que par l'analyse de l'expression de gènes par la technique de microarrays, il est possible d'analyser l'expression d'une grande quantité de transcrits de manière simultanée (Bionaz et Loor, 2011; Bionaz et al., 2012). Une étude a montré que 40% des gènes exprimés au début de la lactation sont impliqués dans les processus de l'activité cellulaire (Finucane et al., 2008). En outre, Connor et al. (2008) ont montré que 20% de gènes qui participent sur les contrôles de la prolifération, croissance et différenciation cellulaire sont influencés par la modification de la fréquence de la traite de (2x par jour à 4x par jour). Ainsi, dans cette même étude, 16% des gènes liés à la matrice extracellulaire et à la fonction d'adhérence cellulaire sont influencés. En 2013, Choudhary et al. ont étudié l'expression génétique de cellules en relation à leur caractéristique de rétention du 5-bromo-2'deoxyuridine (BrDU). Ils ont étudié 605 gènes par la technique de microarray et PCR. Ils ont étudié l'expression de facteurs de transcription, protéines de transport,

molécules dans le cytosquelette, protéines de filaments, enzymes et marqueurs de différenciation dans le tissu mammaire de la génisse. Ce travail a mené à la conclusion qu'il y a l'expression de gènes qui permet de distinguer des cellules souches de cellules progénitrices. Cependant, l'utilisation de gènes pour bien identifier les types cellulaires a besoin d'être validé par d'autres techniques plus spécifiques comme la cytométrie en flux.

Les avantages de la méthode de PCR sont qu'elle est très rapide, et très sensible, donc elle permet d'analyser des gènes à partir de peu de matériel biologique. Cependant, parfois, la quantité d'ARN (utilisée aussi dans cette méthodologie) n'est pas suffisante et/ou est dégradée et donc la réaction n'est pas possible. Il y a aussi risque de contamination de l'échantillon par l'environnement ou la manipulation. Il est important aussi que l'analyse de PCR soit bien précisée en relation à l'utilisation de gènes de référence pour éviter des erreurs liées à la quantité d'ARN et l'interprétation erronée de résultats (Finot et al., 2011).

3.4. La cytométrie en flux

3.4.1. Principe de la méthodologie

Depuis les années 1960 la cytométrie en flux a été utilisée pour identifier les cellules immunitaires telles que les cellules B et T. Cependant, elle est devenue une méthodologie pour étudier des cellules épithéliales (Terstappen et al., 1998). Cependant, l'utilisation de différents biomarqueurs par cytométrie en flux a permis d'identifier, sélectionner et reconstituer une glande mammaire en utilisant un coussin adipeux dans différentes études dans la souris (Shackleton et al., 2006 ; Stingl et al., 2006).

La cytométrie en flux est une méthodologie qui permet d'analyser, de caractériser et de définir les populations cellulaires. Elle consiste à faire passer les cellules marquées avec des fluorochromes à travers le faisceau d'un laser (**Figure 14**).

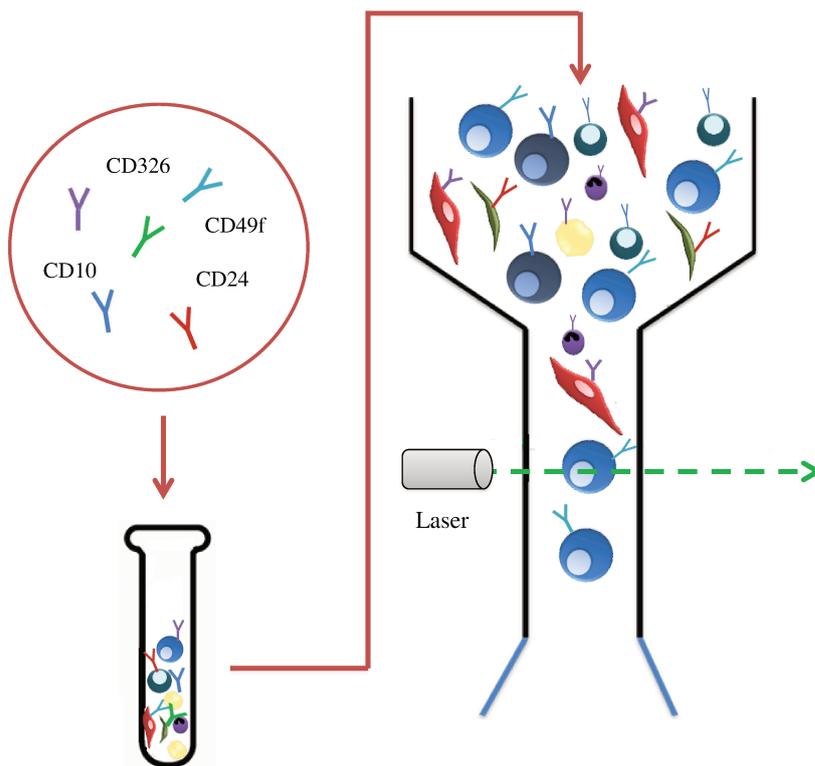


Figure 14 Marquage et analyse de cellules avec du fluorochrome dans la cytométrie en flux.

Les biomarqueurs sont ajoutés aux cellules d'intérêt. Ensuite, les cellules sont analysées dans le cytomètre en défilant à grande vitesse une par une dans le faisceau d'un laser en les comptant et en les analysant.

L'excitation du fluorochrome émet un rayon qui est converti et enregistré (Macey, 2007). Quand les cellules sont détectées par la lumière, elle est dispersée et détectée dans deux dimensions. Cette information permet de déterminer les caractéristiques de chaque cellule en relation avec leur taille et granulosité. La lumière qui va vers la cellule est dispersée en avant et connue comme forward- scatter (FSC) (**Figure 15**).

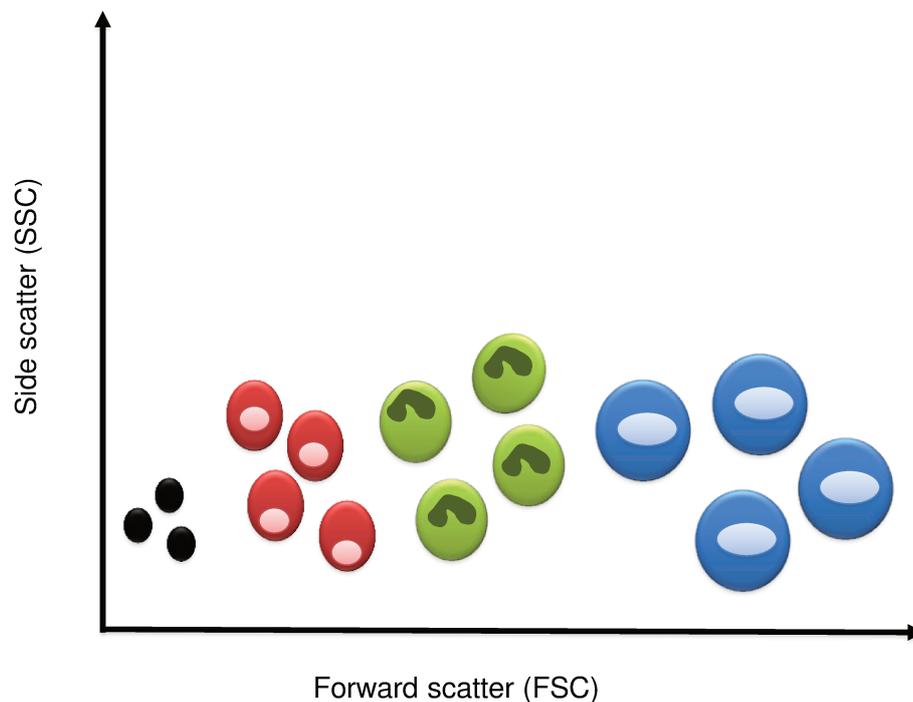


Figure 15 Représentation de la taille (FSC) et granulosité (SSC) de cellules par la cytométrie en flux.

Les cellules sont analysées par rapport à leur taille et à leur granulosité. Les particules comme les débris sont en couleur noire et sont placés à gauche de l’histogramme d’analyse.

Elle est diffusée jusqu’aux petits angles. Elle est proportionnelle à la taille de la cellule. La diffusion de la lumière aux grands angles collectés à 90° est la side-scatter (SSC) (**Figure 15**). Elle fait référence à la granulosité et à la structure interne de la cellule (Shapiro, 2003).

Le cytomètre est composé de détecteurs optiques (multiplier tubes, PMT) qui lisent la fluorescence. Ces détecteurs servent pour convertir la lumière provenant des différents longueurs d’ondes (émises par les cellules) en différents pulses électriques. Les PMT seront ajustées afin d’optimiser la sensibilité de détection de la fluorescence. Ces paramètres sont ajustés en visualisant les histogrammes. Ils consistent à identifier les cellules d’intérêt et à tracer une région autour d’elles, afin de déterminer les autres histogrammes sur cette région (Jacob et al., 2006). Les modifications de voltages doivent être faites pour optimiser l’analyse cependant il faut faire attention quand on utilise des fluorochromes avec une longueur d’onde plus large comme APC, Cy7, Alexa 700 car il y a des cellules que émettent une auto fluorescence faible et elles (les cellules) ne seront pas facilement identifiées (Maecker et Trotter, 2006).

Les contrôles sont essentiels en cytométrie en flux, car ils fournissent le contexte dans lequel on peut interpréter les échantillons de l'essai. Toute expérience peut et devrait probablement contenir au moins trois types de contrôles: setup (ou instrument), les contrôles de spécificité (gating) et les contrôles de comparaison biologique (Maecker et Trotter, 2006). Les contrôles de setup sont ceux qui sont utilisés pour configurer correctement l'instrument (ou au moins vérifier la configuration). Les contrôles de spécificité (ou gating) sont ceux utilisés pour aider à distinguer le marquage spécifique de la liaison non spécifique. Ils sont souvent utilisés pour définir l'emplacement des régions graphiques utilisées pour classer les cellules. D'autres avantages des cytomètres en flux sont qu'ils possèdent une plage de détection largement précise qui permet de contrôler des soucis par rapport à l'auto fluorescence et à un débordement spectral au moment de l'analyse (Bendall et al., 2012). En d'autres termes, ils sont utilisés pour déterminer la positivité ou la négativité des marqueurs spécifiques. Les contrôles de comparaison biologiques sont ceux qui fournissent des conditions de comparaison biologiquement pertinentes, par exemple, des échantillons non stimulés ou échantillons de donneurs sains.

Le réglage consiste à éliminer les débris avec les paramètres de déclencheur (trigger) et le seuil ou discriminateur (threshold). Le déclencheur est un paramètre (taille) choisi pour que l'appareil effectue une mesure. Le seuil est une limite qui va permettre de distinguer une particule qui émet un signal de fluorescence des particules qui sont le bruit du fond (Mayol et Grunwald, 2006). De plus, l'utilisation d'iodure de propidium (IP), permet de discriminer et d'éliminer de l'analyse les cellules mortes (Jacob et al., 2006). Les cellules d'intérêt sont identifiées avec le marqueur de surface d'intérêt ou cluster de différenciation (CD) décrit au chapitre 3 (cf. chapitre 3, 1,1.1). L'utilisation d'isotypes permet d'éliminer les interactions et les liaisons non spécifiques par le marquage des populations cellulaires. De plus, les isotypes permettent aussi d'éliminer le bruit de fond et de définir le seuil de positivité du marquage (**Figure 16**).

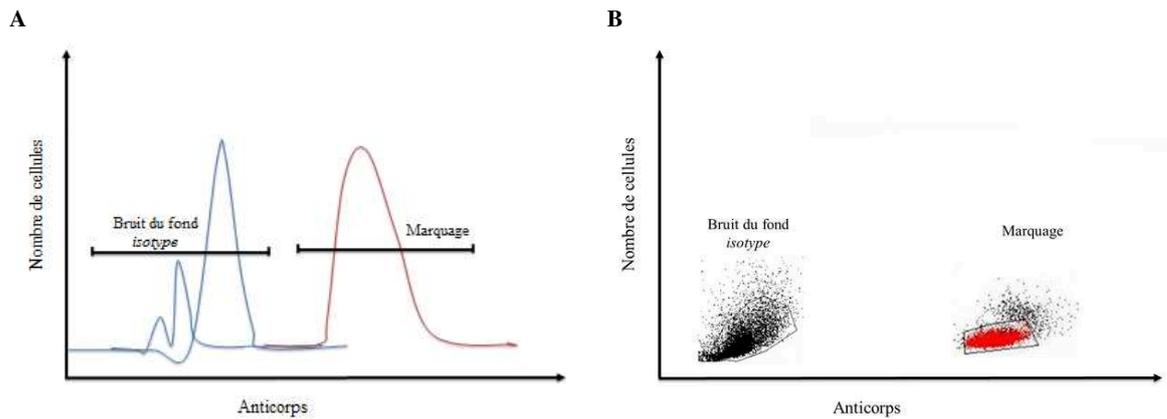


Figure 16 Représentation de marquage et isotype par histogramme et graphique à points dot pot.

A gauche (A), la représentation par histogrammes de l'analyse de cytométrie en flux avec le bruit de fond (isotype) et l'exclusion du marquage. A droite (B), représentation et graphique à points (dot plot). Les cellules sont visualisées ainsi avec cette représentation qui permet également de faire l'exclusion ou de sélectionner les cellules d'intérêt.

Quand la viabilité de cellules est faible, l'isotype aide à augmenter la spécificité de l'analyse car il est plus facile de reconnaître les cellules des débris (O'Gorman et Thomas, 1999).

Dans le cas de marquages multiples, l'un des problèmes fréquemment rencontré est la fuite de fluorescence et perte de signal des fluorochromes d'intérêt. Pour cette raison, l'utilisation des contrôles FMO est une technique devenue à la fois courante et prudente (Hulspas et al., 2009). Les contrôles FMO sont des échantillons qui contiennent tous de l'anticorps conjugué présent dans les échantillons d'essai, à l'exception d'un. Le canal dans lequel l'anticorps conjugué est manquant est celui pour lequel la FMO fournit un contrôle de gating lequel permet de déterminer la positivité et établir les régions de plusieurs échantillons analysés.

Les données générées par l'analyse sont observées par des histogrammes ou graphiques à points (dot plot) (**Figure 16**). Dans les graphiques, les régions de cellules se délimitent par rapport à la fluorescence afin de créer sous-groupes. La création de ces fenêtres (gating) permet d'analyser les populations cellulaires. L'analyse se fait par des logiciels où nous pouvons observer le numéro d'événements collectés par échantillon (populations cellulaires et les isotypes) (Graham, 2006). De plus, les isotypes permettent aussi d'éliminer le bruit de fond et de définir le seuil de positivité du marquage (**Figure 16**).

3.4.2. Choix des marqueurs de surface et des contrôles isotypiques

Pendant la sélection des anticorps et leurs isotypes en cytométrie en flux, il faut considérer que la plupart des anticorps utilisés sont monoclonaux (produits par une seule cellule immunologique). Les anticorps monoclonaux sont en effet connus pour avoir une spécificité plus élevée que les anticorps polyclonaux. L'isotype à utiliser doit provenir de la même espèce animale, la même immunoglobuline et le même fluorochrome que l'anticorps correspondant. L'utilisation d'anticorps déjà couplés au fluorochrome (immunofluorescence directe) est plus rapide et pratique. En général, la plupart des anticorps monoclonaux sont obtenus chez la souris et le rat (Jacob et al., 2006). L'isotype idéal correspond à l'anticorps spécifique correspondant à la chaîne lourde des immunoglobulines (Hulspas et al., 2009).

Dans le laboratoire, la sélection de fluorochromes couplés aux marqueurs de surface dépend du laser et du filtre optique de l'appareil. Les cytomètres ont un filtre qui permet un passage plus large, ce qui permet d'augmenter le signal de 20 à 100% (Baumgarth et Roederer, 2000). De plus, la combinaison et la sélection adéquates de fluorochromes est importante pour diminuer le «débordement» de lumière par l'émission et l'excitation au moment de l'analyse. En effet, il y a des fluorochromes qui ont des caractéristiques d'émission et d'excitation qui peuvent se chevaucher avec d'autres fluorochromes (Baumgarth et Roederer, 2000). Le choix du fluorochrome à utiliser doit être pris en compte quand il y a l'utilisation de plusieurs couleurs parce qu'ils sont analysés dans le même lecteur. Apparemment entre les détecteurs, l'APC reçoit plus d'émission, c'est pour cette raison que l'utilisation de FMO est conseillée (Roederer, 2001). La spécificité du fluorochrome va déterminer s'il est capable de se fixer aux organites et aux cellules. Les différents types de fluorochromes sont les FITC, Cyanines, Texas Red entre autres (Boumendjel et al., 2006).

Le choix de marqueurs de surface qui permettent l'identification de populations et de sous-populations cellulaires provient de la littérature. La difficulté est que dans les études sur la glande mammaire bovine, les marqueurs de surface et les isotypes proviennent d'études en rapport avec d'autres espèces. Pour cette raison, le choix de marqueurs consiste dans un premier temps à les sélectionner d'après la littérature (**Tableau 3**).

Tableau 3 Choix de biomarqueurs d'après la littérature pour phénotyper les cellules composant la glande mammaire.

Marqueurs	Type de molécule	Type de cellules
CD49f	Intégrine α -6	Cellules épithéliales
CD10	Metallo-endopeptidase	Cellules basales/myoépithéliales
CD24	Glycoprotéine	Cellules avec capacité de repopulation.
CD326 (EpCAM)	Protéine de jonction	Cellules luminales/basales (faible)

(Sleeman et al., 2006 ; Lambert et al., 2012 ; Safayi et al., 2012 ; Prpar et al., 2012).

Comme décrit au chapitre 3 (cf. chapitre 3, 1,1.1), un des biomarqueurs tel que CD49f une intégrine, a été utilisé pour identifier les cellules épithéliales et myoépithéliales dans la glande mammaire de la souris, la femme, la chienne et la jument (Raymond et al., 2012 ; Borena et al., 2013). Le CD24 qui est une glycoprotéine dans les cellules est elle connue comme l'antigène stable à la chaleur (CD24 heat stable antigen, HSA) dans les cellules avec une capacité de renouvellement (Sleeman et al., 2006). EpCAM a été identifié dans le compartiment luminal chez la chèvre (Prpar et al., 2012). CD10 est une metallo-endopeptidase exprimée dans les cellules myoépithéliales dans la glande mammaire chez la génisse (Safayi et al., 2012).

D'autres biomarqueurs comme l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH) a permis d'identifier des cellules souches et progénitrices dans le tissu mammaire. La manière dont elle fonctionne est que le produit commercialement connu comme ALDEFLUOR s'accumule dans les cellules souches. L'activité de l'enzyme ALDH a la capacité de réagir au substrat BAAA (BODIPY-amino acétaldéhyde), qui est diffusé dans les cellules, puis transformé en BAA (BODIPY-amino acétate). Celui-là reste dans les cellules et puis les cellules ALDH « brillantes » sont identifiées par le cytomètre (Deng et al., 2010).

Les choix de marqueurs à utiliser sont testés sur la dose, le type de clone et le choix de fournisseur. Ces tests sont accompagnés par d'autres analyses complémentaires telles que l'histologie, l'identification de protéines et l'expression génétique (Borena et al., 2013). Il est important de remarquer que les anticorps en cytométrie ont une affinité pour leur objectif (target) en dépendant de la disponibilité de ces targets ou marqueurs de surface dans la cellule

(Shapiro, 2003). Une cellule possède plusieurs protéines (marqueurs) dans sa surface (**Figure 17**). Pour cette raison l'utilisation de mono et multimarquage aide à avoir une interprétation plus précise est conseillée pour trouver le phénotype cellulaire.

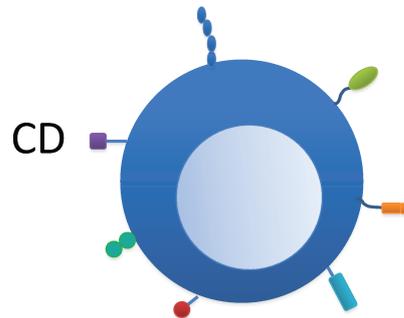


Figure 17 Clusters of differentiation(CD) ou marqueurs de surface dans la cellule.

Ce qu'il faut retenir :

Différentes méthodologies et outils de prélèvement permettent d'étudier la glande mammaire bovine. Compte tenu de la taille de la glande mammaire bovine (45-50 kg) il est impossible de l'analyser complètement, en comparaison avec celle de la souris. La biopsie est une technique bien développée consistant à prélever une portion de tissu mammaire. Les avantages de cette technique sont : qu'elle permet de récupérer du tissu mammaire représentatif en faisant une petite incision sans douleur (en utilisant une anesthésie locale), la récupération est rapide (15 jours) et il est possible d'étudier l'évolution du tissu mammaire au cours du temps.

La digestion du tissu mammaire consiste à dissocier les cellules qui le constituent pour récupérer la fraction cellulaire. La digestion de tissu peut-être faite en suivant une méthodologie classique (digestion en bain-marie) ou en utilisant un automate (gentleMACS).

La culture de cellules aujourd'hui permet de sélectionner différents supports de culture (collagène, adhérent, Matrigel, ULA) qui permettent d'étudier les cellules dans les conditions qui miment leur environnement tissulaire.

Les lignées mammaires bovines MAC-T et BME-UV1 sont des modèles *in vitro* pour étudier la glande mammaire. Les deux lignées ont été établies à partir de tissu mammaire des

vaches en lactation. En raison de leurs caractéristiques et de leur stabilité en culture in vitro, les cellules MAC-T et BME-UV1 sont les lignées les plus utilisées pour étudier la glande mammaire bovine.

Différentes méthodologies et techniques permettent d'étudier la glande mammaire bovine comme l'immunohistologie, le western blot, le qPCR et la cytométrie en flux. La cytométrie en flux est une technologie qui permet d'identifier et de caractériser quantitativement et qualitativement des populations cellulaires. La cytométrie en flux consiste à utiliser différents biomarqueurs qui combinés permettent une identification plus fine et rapide des différents types cellulaires de la glande mammaire.

Objectifs et stratégie expérimentale

Objectifs

La glande mammaire est organisée en alvéoles qui sont les unités fonctionnelles. Ces alvéoles contiennent différents types cellulaires comme les cellules épithéliales, myoépithéliales, adipeuses et les fibroblastes. La cellule épithéliale mammaire mature qui se trouve dans les alvéoles (cellule épithéliale mammaire alvéolaire) est responsable de la synthèse du lait. La modulation de la production de lait, au cours d'un cycle de lactation, est le reflet de modifications du nombre, notamment lié à la balance prolifération/apoptose, et de l'activité de synthèse des CEM. La production laitière au cours d'un cycle de lactation est décrite par une courbe caractérisée par une phase d'augmentation de la production jusque l'atteinte d'un pic (maximum de production) suivi d'une diminution.

Récemment, des études réalisées chez la souris et la femme ont montré que la glande mammaire contenait aussi des cellules souches et des cellules progénitrices. Ces études ont aussi montré que les marqueurs de surface étaient des biomarqueurs pertinents pour phénotyper les différents types cellulaires dans la glande mammaire d'une manière plus précise. En revanche, jusqu'à aujourd'hui, les populations cellulaires spécifiques qui se trouvent dans la glande mammaire de vache en lactation restent inconnues et l'utilisation de biomarqueurs pour caractériser les populations cellulaires de la glande mammaire bovine n'a encore jamais été validée.

L'objectif de ce travail de thèse a été de valider l'utilisation de biomarqueurs dans des modèles de lignées cellulaires bovines (MAC-T et BME-UV1) pour, par la suite, l'objectif global a été d'étudier l'évolution et la plasticité des populations cellulaires au cours d'un cycle de lactation chez la vache laitière. Pour cela nous avons deux axes de travail :

1) Le premier objectif de cette thèse a été l'obtention d'un panel de biomarqueurs pertinents pour étudier la glande mammaire bovine en lactation.

Nous avons d'abord sélectionné des biomarqueurs CD49f, CD24, CD10 et EpCAM décrits dans la littérature et pouvant caractériser les populations de CEM chez la souris, la chèvre, la jument et la femme. Pour valider l'utilisation de ces biomarqueurs, nous avons travaillé avec deux lignées de cellules immortalisées mammaires bovines (la cellule alvéolaire mammaire bovine (MAC-T) et la cellule épithéliale mammaire bovine (BME-UV1)). Nous avons évalué leurs caractéristiques phénotypiques et morphologiques, leur capacité à former des mammosphères et leur capacité de prolifération, dans différentes conditions de cultures :

en 2 dimensions (2D) et en 3 dimensions (3D) (non-adhérente et adhérente). Ce premier travail nous a permis de valider l'utilisation de biomarqueurs CD49f, CD24, CD10 et EpCAM dans les lignées immortalisées MAC-T et BME-UV1 et de déterminer leurs phénotypes cellulaires.

2) Le deuxième objectif de cette thèse a été de caractériser et hiérarchiser la composition et la dynamique cellulaire de la glande mammaire de la vache laitière au cours d'un cycle de lactation.

Après l'obtention d'un panel des biomarqueurs dans le tissu mammaire, des biopsies de glande mammaire ont été prélevées quatre fois au cours d'un cycle de lactation (début, pic, milieu et fin de lactation). Après digestion des biopsies et obtention d'une suspension monocellulaire, les cellules ont été phénotypées par les biomarqueurs CD49f, CD24, CD10 et EpCAM à chaque étape de la lactation. Des coupes histologiques ont été réalisées afin de localiser in situ ces biomarqueurs dans le tissu mammaire. Cet objectif a permis d'identifier les différents types cellulaires qui se trouvent dans la glande mammaire et de déterminer la hiérarchisation cellulaire pendant la lactation chez la vache laitière.

Stratégie expérimentale

Pour cette thèse, nous avons suivi une stratégie expérimentale représentée dans la

Figure 18.

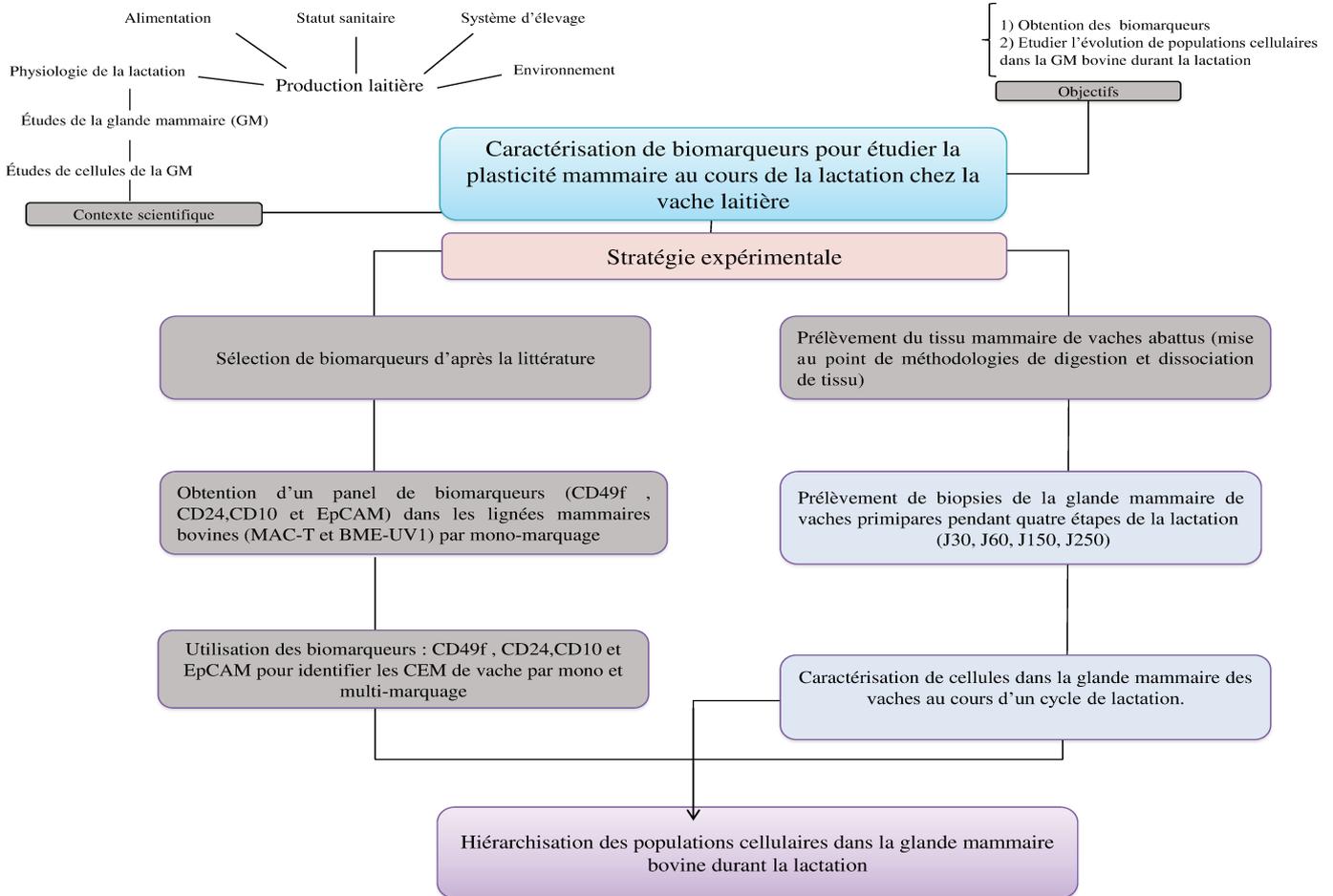


Figure 18 Démarche expérimentale de l'étude pour caractériser les différents types de cellules dans la glande mammaire bovine dans un cycle de lactation.

Cette stratégie consiste dans un premier temps à étudier (d'après la synthèse bibliographique) les facteurs qui influencent la lactation chez la vache laitière. Ensuite, nous avons ciblé la composition cellulaire de la glande mammaire bovine en raison de l'importance de leur rôle (cellules mammaires) dans la synthèse du lait.

1. Choix des modèles expérimentaux

1.1. Modèle expérimental in vitro : lignées mammaires bovines

Il y a différentes lignées mammaires bovines qui ont été utilisées comme modèles in vitro pour étudier la glande mammaire bovine. Il y a par exemple la lignée cellulaire PS-BME-C1 lignée qui montre la formation des structures cuboïdes pavimenteuses quand elle est cultivée in vitro. Cependant, cette lignée est dépendante de l'addition des hormones lactogéniques pour proliférer comme CEM (Gibson et al., 1991). En outre, les cellules épithéliales mammaires bovines (BMEC) secrètent des caséines en culture in vitro. Cependant, l'expression de l'alpha ($\alpha 1$) caséine est faible (Ahn et al., 1995). Une autre lignée cellulaire mammaire bovine, la BMEG+HM forme des structures anormales, quand elle est mise en culture. Un inconvénient de cette lignée est qu'elle se comporte comme une cellule non épithéliale (Schmid et al., 1983).

Dans notre étude, nous avons décidé d'utiliser des lignées MAC-T et BME-UV1. Ces lignées ont une morphologie similaire à celle des CEM quand elle sont cultivées in vitro (Huynh et al., 1991 ; Zavizion et al., 1995). De plus, elles ont été largement utilisées comme modèles pour étudier la glande mammaire bovine (Berry et al., 2003 ; Motyl et al., 2006 ; Sobolewska et al., 2011). En outre, nous avons ainsi décidé de travailler avec MAC-T et BME-UV1 parce qu'elles sont stables. La lignée BME-UV1 peut subir plus de 300 doublages de sa population sans montrer des modifications morphologiques anormales (Zavizion et al., 1996). Tandis que la lignée MAC-T peut être cultivée et être doublée en 350 passages avant de devenir sénescence (Huynh et al., 1991). Depuis l'établissement des lignées MAC-T et BME-UV1, les cellules ont été cultivées dans des milieux supplémentés avec des hormones tels que la prolactine, l'hormone de croissance et la progestérone (Huynh et al., 1991 ; Zavizion et al., 1995 ; Zhou et al., 2008 ; Johnson et al., 2013). Afin de connaître leur phénotype dans des conditions proches de la nature des lignées mammaires bovines, nous avons décidé de cultiver les cellules sans l'influence des hormones. Nous avons choisi de cultiver les cellules dans des conditions en 2D et 3D pour observer leur comportement. Les cellules ont été cultivées sur un support adhérent, condition classique de culture où les

cellules forment un tapis quand elles prolifèrent (Huynh et al., 1991). Les cellules ont été cultivées dans des conditions ultra-low attachment surface (ULA) ce qui permet aux cellules épithéliales de former des mammosphères. Ce type de support consiste en une surface hydrophilique chargée avec des unions neutralement covalentes. De plus, ce type de culture permet d'identifier et de caractériser des cellules avec une capacité de renouvellement et de différenciation cellulaire (Dontu et al., 2003). Un autre type de culture est le Matrigel qui permet également aux cellules de former des mammosphères et ainsi de mimer les structures alvéolaires similaires dans le tissu mammaire et de montrer des caractéristiques de renouvellement et de différenciation (Kozlowsky et al., 2009).

1.2. Modèle expérimental in vivo : vaches primipares Holstein

Nous avons utilisé cinq vaches primipares en lactation de race Holstein provenant de l'Installation Expérimentale Production Laitière (IEPL), située à Le Rheu et appartenant à l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA, UMR1348 PEGASE). Nous avons réalisé des études sur la race Holstein puis qu'elle est largement utilisée dans les systèmes de production laitière grâce à sa grande capacité de PL (Akers, 2002). En outre, nous avons décidé de travailler avec des vaches primipares afin d'étudier la glande mammaire sur des animaux qui n'ont pas subi de modifications morphologiques et cellulaires post-lactation. Il est connu que l'activité sécrétoire de la mamelle subit des modifications au cours des lactations (entre la première et deuxième lactation) (Boutinaud et al., 2004). De plus, en sélectionnant des vaches primipares contre des vaches multipares, nous évitons les modifications de la glande mammaire dues à la traite (Kushner et al., 1973).

Pendant l'expérience, les vaches ont été traitées deux fois par jour. Au début de l'expérience nous avons utilisé 8 vaches, les vaches ayant mis bas à une période différente des autres ont été écartées de l'analyse pour diminuer le biais. Les vaches ont été alimentées et hébergées en étable durant l'hiver et pendant l'été, au pâturage. Nous avons prélevé des biopsies dans le quartier gauche et droit de la mamelle à quatre temps (J30, J90, J150 et J250) pendant un cycle de lactation. Les vaches utilisées dans cette expérience ont eu un suivi post-biopsies pour vérifier leur état sanitaire. Les biopsies n'ont pas affecté le niveau de production laitière des vaches. Une partie du tissu des biopsies a été coupée (trois coupes de chaque côté : droite et gauche, par vache et par étape pendant la lactation) pour vérifier que nous n'avons prélevé que de tissu mammaire. Des coupes histologiques du tissu mammaire ont été colorées à l'hématoxyline et éosine puis scannées avec le NanoZoomer Digital Pathology technology

(Hamamatsu, Kitsa, Sweden). Nous avons analysé la taille de tissu mammaire sécrétoire. Nous n'avons pas trouvé des différences significatives et des effets négatifs dans le tissu mammaire. Les modifications morphologiques dans le tissu mammaire correspondaient aux différentes étapes classiques durant la lactation.

Les prélèvements réalisés sur la vache ont été menés en accord avec l'approbation du comité d'éthique régional avec le numéro de registre : 00943.02 selon la réglementation française (Décret N. 2001-464, May 29, 2001).

2. Mise au point méthodologique

Pour assurer l'obtention d'un grand nombre de cellules vivantes après la digestion du tissu, nous avons testé différentes méthodologies de digestion (mise au point) sur du tissu mammaire prélevé sur des vaches abattues. Différentes méthodes de digestion sont décrites dans la littérature pour l'obtention des cellules à partir de la glande mammaire de souris (Smith et Medina, 1988). Mais il s'agit d'une technologie longue. Récemment, des nouvelles enzymes et des appareils sont apparus sur le marché, par exemple le Gentle Macs (Miltenyi Biotec). Celui-ci permet de réaliser des digestions qui ne seront plus qu'enzymatiques mais également mécaniques. Cet investissement a été effectué dans l'objectif de gagner du temps tout en ayant d'aussi bons résultats qu'avec la méthode classique car la digestion avec le Gentle Macs ne dure que trente minutes contre trois heures en méthode de digestion classique (**Figure 19**).



Figure 19 Mise au point méthodologique de la dissociation de tissu.

Digestion classique et digestion avec l'appareil Gentle Macs. La dissociation de tissu peut être faite par une digestion classique qui consiste à couper manuellement le tissu par l'aide de bistouris ou de ciseaux. Ensuite le tissu est mis en agitation avec les enzymes pendant ~3 heures à température élevée (37 centigrades). La dissociation ou digestion avec l'appareil Gentle Macs est faite automatiquement en suivant des protocoles de digestions aux vitesses différentes. Le tissu est mis en agitation avec un rotor automatique. La digestion par le Gentle Macs dure quelques minutes.

Une partie de cellules obtenues après la digestion ont été cultivées in vitro pour observer leur prolifération dans les cultures in vitro. Après les tests méthodologiques, nous avons décidé de suivre la méthodologie décrite dans la publication numéro deux. Cette décision a été prise du fait que cette méthode nous a permis d'obtenir plus de populations après la digestion de tissu mammaire bovine.

Finalement, les cellules sont mises en culture dans des flasks T25 contenant le milieu de culture : DMEM-F12, antibiotique (Gibco, 15240-062) 1X, EGF (Sigma, E-4269) à 10ng.mL⁻¹, IGF-1 (Sigma, I3769-5OUG) à 10 ng.mL⁻¹, hydrocortisone à 5 ng.mL⁻¹, SVF 10% et Insuline transferrin selenium (ITS, Sigma, I31465ML) 0.25X. Les flasks sont mises dans une étuve à 37°C et 5% de CO₂. Cultiver les cellules après la digestion et dissociation des biopsies, nous a permis d'observer le comportement de cellules dans le milieu de culture in vitro et si les cellules proliféraient comme des CEM.

Nous avons également choisi les principaux biomarqueurs (~30) décrits dans la littérature qui servent pour identifier des populations cellulaires dans la glande mammaire (Borena et al., 2013). Ces marqueurs ont été identifiés d'après la littérature chez la souris, la chèvre, la jument et la femme et sont donc à tester pour la vache laitière afin de savoir si les cellules de la glande mammaire bovine expriment les même biomarqueurs. Nous avons testé des biomarqueurs par rapport aux fournisseurs, concentrations, clones, isotypes et fluorochromes à utiliser (FITC, APC, Vioblue, PE...) sur des cellules mammaires bovines de vaches abattues. Suite aux tests, nous avons repris les cellules dans un tampon FACS Buffer (Rinsing solution, BSA 5%) puis les avons réparties dans des tubes. Elles ont été incubées 20 minutes dans la glace à l'abri de la lumière, avec les anticorps suivants : antiCD336 (EpCAM) couplé Vioblue (Miltenyi Biotec, 130-097-324), IgG1 couplé Vioblue (Miltenyi Biotec, 130-099-089), anti-CD49f couplé FITC (Miltenyi Biotec, 130-097-245), rat IgG2a couplé FITC (Miltenyi Biotec, 130-102-653), anti-CD24 couplé APC (Miltenyi Biotec, 130-102-733), rat IgG2b couplé APC (Miltenyi Biotec, 130-102-664), anti-CD10 couplé PE-Vio770 (Miltenyi Biotec, 130-100421), IgG1 couplé PE-vio770 (Miltenyi Biotec, 130-096-654). Après

l'incubation, les cellules ont été analysées par cytométrie en flux pour identifier les populations cellulaires auxquelles elles appartenaient. L'analyse des résultats de cytométrie se fait par le logiciel MACS Quant (Miltenyi Biotec). Après exclusion des doublets de cellules, des cellules mortes, nous avons sélectionné les populations d'intérêt. L'analyse cytométrique a été effectuée sur 30 000 évènements, évènements correspondant à des cellules. Nous avons analysé les biospies de chaque quartier de la mammelle (droite et gauche) et ce à chacun des temps de la lactation. Pour chaque échantillon, notre stratégie d'analyse nous génère 4 profils cytométriques pour les FMO (Fluorescence Minus One) correspondant à des contrôles et 1 pour notre échantillon. Nous avons donc obtenu ~200 échantillons (5 x 40 échantillons) à partir du cytomètre et près de 8 000 données générées. Les résultats sont exprimés en pourcentage de chaque population de cellules marquées. Les analyses statistiques (dans la publication 2) nous ont permis de déterminer les différences significatives par temps et par populations cellulaires. De plus, nous avons analysé les corrélations entre l'expression de biomarqueurs (les populations de cellules) et la production laitière. Dans notre corrélation nous avons corrigé les résiduels et nous avons équilibré les individus aberrants dans l'analyse statistique.

Résultats expérimentaux

Publication 1

Caractérisation phénotypique et fonctionnelle de deux lignées de cellules épithéliales mammaires bovines dans des modèles 2D et 3D

La caractérisation de cellules épithéliales dans la glande mammaire est possible grâce aux clusters de différenciation qui sont des marqueurs cellulaires. Ils servent à identifier l'activité et l'état de la cellule aux différentes étapes du développement de la glande mammaire. Cependant, les marqueurs de surface sont limités dans les études de la glande mammaire bovine. Les objectifs de cette étude sont de valider l'utilisation de ces marqueurs dans les cellules épithéliales bovines pendant la lactation en utilisant des lignées immortelles *in vitro*.

Les lignées mammaires bovines BME-UV1 et MAC-T ont été utilisées comme modèles *in vitro* pour étudier la glande mammaire bovine. Cependant, leur phénotype et leur performance en tant que cellules épithéliales mammaire bovines est inconnu. C'est pour cette raison que l'étude de leur phénotype permettra l'utilisation d'un panel de biomarqueurs dans la glande mammaire bovine.

Les cellules BME-UV1 et MAC-T ont été cultivées dans des supports en 2D (adhérente) et 3D, Matrigel (adhérente) et ULA (non-adhérente) pendant six jours. Au cours de l'étude les modifications morphologiques des cellules comme la formation de mammosphères dans les cultures en 3D ont été observées et la taille des cellules a été mesurée. Après culture en 2D et 3D, les cellules ont été récupérées et analysées par cytométrie en flux. Les cellules ont été analysées avec les principaux biomarqueurs décrits dans la littérature pour identifier les cellules épithéliales dans la glande mammaire comme le CD49f, CD24, CD326 (EpCAM) et le CD10. L'analyse de l'aldéhyde déshydrogénase a permis d'identifier la présence de cellules souches et progénitrices dans les lignées MAC-T et BME-UV1. L'analyse de l'ADN a permis de mesurer la prolifération cellulaire dans les supports en 3D. Les cellules ont été analysées par rapport à leur taux de croissance dans les supports en 2D.

De plus, l'expression des cytokératines CK14 et CK19 a permis de vérifier les résultats obtenus après cytométrie en flux. L'expression de STAT5 et des protéines occludine et cadhérine 1 et fibronectine ont été ainsi mesurées par western blot. L'expression du marqueur CD49f a été d'environ 99% dans les cellules BME-UV1 et MAC-T. Nos résultats montrent que le CD49f est très exprimé dans les cellules MAC-T alors que son expression est moyenne dans les cellules BME-UV1. L'expression de CD49f a été plus élevée (83.01%) dans la cellule BME-UV1 ($P < 0.001$). L'expression de CD10 dans les MAC-T a été négative dans les deux types de supports en 3D. Cependant, l'expression de CD10 dans les cellules BME-UV1 a été positive et différente dans les trois supports en 2D et 3D ($P < 0.05$). La cellule MAC-T forme des structures aberrantes après 3 jours de culture. La taille des mammosphères a été plus élevée dans les cellules BME-UV1 que dans les MAC-T ($600-400\mu\text{m}^2$) respectivement ($P < 0.05$). La capacité de prolifération cellulaire (concentration d'ADN) a été plus élevée dans les cellules BME-UV1 dans les supports en 3D. L'expression du marqueur EpCAM a été différente dans les supports en 2D et 3D et légèrement plus élevée dans les cellules BME-UV1. L'analyse de western blot montre que la cellule BME-UV1 exprime STAT5 et CK19 par rapport à MAC-T qui n'a pas d'expression. La cellule MAC-T a une expression de CK14, tandis que la cellule BME-UV1 est négative. La cellule MAC-T a une expression plus forte de fibronectine en comparaison avec BME-UV1.

En conclusion, la cellule BME-UV1 a une capacité à former la mammosphère dans les supports en 3D. Son expression d'ALDH montre que la cellule BME-UV1 a une capacité de cellule souche/progénitrice. L'expression d'EpCAM, STAT5 et l'expression de CK19 dans la cellule BME-UV1 montre son phénotype de cellule luminaire. La cellule MAC-T a une expression négative de STAT5 et par son expression de la cytokératine 14 et son expression de CD49f la cellule MAC-T a un phénotype de cellule ductale/myoépithéliale. Nos résultats diffèrent de ce qui est décrit dans la littérature sur les cellules MAC-T, cependant ils permettent de montrer pour la première fois les caractéristiques de deux lignées (MAC-T et BME-UV1) quand il n'y a pas l'influence d'hormones lactogéniques ajoutées dans le milieu et d'étudier leur phénotype.

Cette étude de biomarqueurs dans ces deux lignées cellulaires révèle qu'ils sont intéressants pour étudier les populations cellulaires de la glande mammaire bovine en lactation.

Phenotypic and functional characterization of two bovine mammary epithelial cell lines in 2D and 3D models

Magdalena Arévalo Turrubiarte,^{1,2} Marie-Hélène Perruchot,^{1,2} Laurence Finot,^{1,2} Frédérique Mayeur,^{1,2} and Frédéric Dessauge^{1,2}¹Institut National de la Recherche Agronomique, UMR1348 Pegase, Saint-Gilles, France; and ²Agrocampus Ouest, UMR1348 Pegase, Rennes, France

Submitted 8 September 2015; accepted in final form 30 November 2015

Arévalo Turrubiarte M, Perruchot M, Finot L, Mayeur F, Dessauge F. Phenotypic and functional characterization of two bovine mammary epithelial cell lines in 2D and 3D models. *Am J Physiol Cell Physiol* 310: C348–C356, 2016. First published December 9, 2015; doi:10.1152/ajpcell.00261.2015.—Immortalized bovine mammary epithelial cells (BME-UV1) and immortalized bovine mammary alveolar cells (MAC-T) have been extensively used as in vitro cell models to understand milk production in dairy cows. Precise knowledge about their phenotype and performance remains, however, unknown. This study aims to characterize MAC-T and BME-UV1 profiles when cultured in two-dimensional adherent, three-dimensional adherent (Matrigel), and three-dimensional non-adherent [ultralow attachment (ULA)] supports. MAC-T and BME-UV1 were compared according to their proliferation capacities and to specific cell surface markers CD24, CD326 [epithelial cell adhesion molecule (EpCAM)], CD10, and integrin CD49f (α -6). Cytokeratin (CK14 and CK19), signal transducer and activator of transcription 5, and other proteins (occludin and cadherin-1) were analyzed. BME-UV1 in ULA support expressed higher CD49f marker. A different intensity of CD49 staining allowed the discrimination between the two cell lines in adherent condition. CD10, EpCAM, and CK19 expressions show that BME-UV1 cells have luminal capacity, while MAC-T has a myoepithelial profile with a high expression of CK14. BME-UV1 cells possess a closer committed progenitor profile due to their higher expression in aldehyde dehydrogenase and EpCAM. We observed that BME-UV1 cells have a better capacity to form spherical structures, mammospheres, in Matrigel than MAC-T, which was confirmed by the higher mammosphere area. In the ULA condition, BME-UV1 proliferated over the 6 days of culture. Taken together, our results clearly confirm the BME-UV1 luminal profile and MAC-T ductal/myoepithelial-like phenotype.

mammary epithelial cell; bovine mammary alveolar cell; bovine mammary epithelial; CD49f; ALDH

THE DIFFERENTIATED BOVINE mammary gland is composed of alveoli, which conform the secretory tissue embedded by a layer of polarized mammary epithelial cells (MEC) considered as the main functional units for milk production (1). At their apical pole, these cells lead to the alveolar lumen, which contains secreted milk. At their basal pole, they directly interact with contractile myoepithelial cells and stromal tissue (6, 20). The existence of stem cells among other different cell types (27) within the alveoli allows mammary tissue to be

regenerated after lactation and involution. Cellular fate through differentiation into a luminal or myoepithelial phenotype depends on autocrine and paracrine regulation, predominantly by the lactogenic hormones (31). All of these cell types are immersed in the stroma or conjunctive tissue, where the extracellular matrix (ECM) makes it possible to link cells to structure and organize mammary tissue. The ECM is a key regulator of MEC function. MECs adhere to the basement membrane via ECM receptors, such as the integrins, a family of glycoproteins that play a central role in the regulation of the matrix microenvironment. Cell surface markers have allowed us to distinguish between cell populations in the mammary gland by flow cytometry (5). To date, only certain cell surface markers have been identified within the mammary gland. The integrins CD29 (β 1) and CD49f (α -6) are expressed in luminal and myoepithelial cells (16, 23). However, their rate of expression varies between mammalian species (5). MEC populations retain specific cell surface markers, depending on the mammary gland development stage. Morphological changes in the mammary gland through lactation, known as plasticity of the mammary gland, imply cellular renewal and the presence of stem cell populations with a repopulating capacity. These repopulating cellular populations have been identified by expression of the CD24 cell surface marker (26). Within murine alveolar compartments, the repopulating capacity and the presence of MEC with stem cell properties have been identified by a higher aldehyde dehydrogenase (ALDH) expression (25). During the lactation period, alveoli luminal populations express cell surface marker CD326 [epithelial cell adhesion molecule (EpCAM)], which serves as an important marker for lactating cells (21). The cell surface marker, neutral endopeptidase (CD10), also known as common acute lymphoblastic leukemia antigen (CALLA), has been implicated in cell growth and mammary gland development. It has also served as a marker for cells in the basal layer of ducts and used to evaluate in vitro MEC performance, such as sphere-forming ability, in relationship with their basement membrane (18). The expression of CD24 and CD29 ($\text{Lin}^- \text{CD29}^{\text{hi}} \text{CD24}^+$) populations represents stem cell populations with a repopulating capacity, as was observed in murine fat pads (28). To identify cell populations, diverse rate expressions in EpCAM, CD24, and CD49f populations have made it possible to discriminate between mature and progenitor luminal/basal cells in human mammary cells (8, 14). In contrast to these results, identification of CD24 and CD49f populations, depending on their rate expression, could determine

Address for reprint requests and other correspondence: F. Dessauge, INRA, UMR1348 Pegase, Domaine de la Prise, 35590 Saint-Gilles, France (e-mail: frederic.dessauge@rennes.inra.fr).

the cellular potent capacity of basal and luminal cells in the bovine mammary gland (22). However, to date, mammary gland cell populations have been studied mostly in humans and mice; therefore, further studies in respect to bovine mammary gland cell populations are necessary.

Currently, the use of immortalized cells as *in vitro* models is necessary to study mammary glands due to their resemblance to original tissue. In the case of bovine mammary gland studies, a variety of immortal bovine MEC have been established and characterized to understand physiology, growth, and lactation features (9, 11, 12, 24, 33). However, among these immortal cell lines, the bovine mammary epithelial (BME-UV1) and the bovine mammary alveolar cell (MAC-T) have been widely used as *in vitro* models due to their similarity with bovine lactating MECs. The BME-UV1 cells are responsive to epidermal growth factor and the insulin-like growth factor I, which are related to mammary growth and development (3). BME-UV1 have been used as a bovine MEC model to study involution and apoptotic events because of its significant response to growth factors and apoptotic peptides (32). The MAC-T cells have the ability to synthesize caseins- α and - β during cellular differentiation pathways implicated in lactation (33). The MAC-T cells have been used to study hormone signaling because of its receptivity to hormonal stimuli (13, 20). In general, these studies provide a wide perspective about the differences between the BME-UV1 and MAC-T cells performance. In fact, it should be taken into account that BME-UV1 and MAC-T cells may behave differently as they were obtained from different animals and established from different research groups. Nonetheless, they were established from MECs. The BME-UV1 cells were obtained from pregnant lactating cows and were also transfected with the SV40 large T-antigen; the BME-UV1 cells show a dome-like morphology typical of epithelial cells (34). The MAC-T cells were obtained from lactating cows and transfected with SV40 large T-antigen, as MAC-T cells have the particularity of possessing cobblestone morphology when cultured in plastic supports (12).

To understand bovine mammary cellular heterogeneity through *in vitro* models, the aim of the present study was to identify the proliferation activity and phenotype of the BME-UV1 and MAC-T cells when cultured in adherent (ADH), Corning ultralow attachment (ULA) surface and Matrigel supports. With the objective of providing accurate knowledge about the BME-UV1 and MAC-T cells' origin, phenotype analysis by cell surface markers, CD24, CD326, (EpCAM), CD10, and integrin CD49f (α -6), served to identify the BME-UV1 and MAC-T cells profile and performance in two-dimensional (2D) (ADH) and three-dimensional (3D) (ULA and Matrigel) supports. We also analyzed cytokeratins (CK14 and CK19). The signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5), related to lactogenesis and occludin transmembrane tight junction protein (7), were analyzed by the effect of the three supports. In addition, expression of cadherin (CDH)-1 was also evaluated, due to its importance and presence in epithelial cells' architecture (2). This study should greatly help to define specific biomarkers of MEC populations and to phenotype primary mammary cells within the dairy mammary gland.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and cell culture reagents. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/F-12, RPMI-1640, NCTC 135, DMEM \times 1, fetal bovine serum, and antibiotic-antimycotic solution were obtained from Gibco (Illkirch, France). Matrigel was obtained from BD Biosciences. Hydrocortisone, α -lactose, glutathione, bovine insulin, ovine prolactin, bovine holo-transferrin, hydrocortisone, L-ascorbic acid, penicillin streptomycin, fungizone, and 0.25% trypsin/EDTA reagents were obtained from Sigma Aldrich Chimie (St. Quentin Fallavier, France).

Cell culture. The original bovine MEC line (MAC-T) was purchased at Nexia Biotechnologies (Quebec, Canada). MAC-T cells were grown in high-glucose DMEM (Dominique Dutscher, Brumath), supplemented with 10% inactivated fetal calf serum (A15-101, PAA, Les Mureaux, France), 100 U/ml of penicillin-streptomycin-fungizone (Dominique Dutscher), and 5 μ g/ml of bovine insulin (Dominique Dutscher). Cells were maintained at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ and passaged twice a week (cells reached confluency within 2–3 days). The bovine mammary epithelial BME-UV1 cell line was established by Professor Boris Zavizion (Department of Animal and Food Sciences, University of Vermont, USA). BME-UV1 cells used in this study came in the original strain purchased at the Istituto Zooprofilattico Sperimentale Della Lombardia E Dell'Emilia Romagna (Brescia, Italy) and were kindly provided by Professor Antonella Baldi (Animal Nutrition Institute, Faculty of Veterinary Medicine, University of Milan, Milan, Italy). Cells were cultured in routine culture medium (mixture of DMEM/F-12, RPMI-1640, and NCTC 135 in proportions of 5:3:2 by volume) enriched with α -lactose (0.1%), glutathione (1.2 mM), bovine insulin (5 μ g/ml), bovine holo-transferrin (5 μ g/ml), hydrocortisone (1 μ g/ml), L-ascorbic acid (10 μ g/ml), 10% (vol/vol) heat-inactivated fetal calf serum, and penicillin-streptomycin (50 IU/ml) in atmosphere of 5% CO₂/95% humidified air at 37°C.

MAC-T and BME-UV1 cell lines (*passage 2* from the original strain) were defrosted and cultivated until confluence in their specific medium during 2 wk before starting the experiment (after four to five passages). Then cells were observed on the microscope to verify their confluence and typical shape, and then harvested with 0.25% trypsin-EDTA at *days 0, 1, 3, and 6* for cell viability and proliferation. All of the cells used throughout the experiments had the same treatment before the experiment was started. Cells were harvested with 0.25% trypsin-EDTA at *day 6* for flow cytometry and Western blot analysis. For the DNA extraction, cells were plated in a 24-well ADH support at density of 50,000 cells/well. To measure cell viability, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide cells were plated at 3,000 cells/well in monolayer on ADH 96-well microplate. Cells were cultivated in monolayer on ADH 6-well plastic at a density of 200,000 cells/well and were used for qPCR, Western blotting, and flow cytometry analysis. Media were replaced every second day. MAC-T or BME-UV1 cells in plates were trypsinized using 0.25% trypsin-EDTA. Both cell lines are mycoplasma free.

3D cultures. For the 3D study, cells were cultured both on six-well plates coated with Matrigel and on ULA six-well plates (Corning). BME-UV1 and MAC-T cells were seeded at a density of 100,000 cells/well. Matrigel plates were coated with 400 μ l/well of Matrigel and were left to solidify for 30 min at 37°C. Cells grown in monolayer were trypsinized and resuspended in growth medium with 2% of Matrigel. The cells cultured in ULA plates were cultured at density of 300,000 cells/well. After the 6 days in culture, cells were collected with total medium, centrifuged at 400 g for 5 min (4°C), and washed with cold PBS. The medium of cells seeded in Matrigel-coated plates was recovered, and cells were scrapped in 2 ml of cold PBS, centrifuged at 800 g for 5 min (4°C), and washed with cold PBS.

Protein extraction and Western blot analysis. Proteins were extracted from pelleted cells using the RIPA extraction reagent (Fisher Scientific, Illkirch, France). The soluble protein fraction was collected after centrifugation at 13,000 g for 10 min (4°C), and protein con-

Table 1. Percentage expression of CD49f, CD24, EpCAM, and CD10 in BME-UV1 and MAC-T cells cultured in ADH, Matrigel, and ULA supports

	BME-UV1 Cells			MAC-T Cells		
	ADH	ULA	Matrigel	ADH	ULA	Matrigel
CD49f (α-6)	99.0 ^a	97.9 ^a	98.9 ^a	99.2 ^a	52.0 ^b	98.5 ^a
CD24	0.6 ^a	0.0 ^b	0.0 ^b	0.2 ^a	0.0 ^b	0.6 ^c
CD10	25.3 ^a	11.2 ^b	17.9 ^c	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a
EpCAM	3.0 ^a	2.0 ^b	1.6 ^c	0.8 ^a	0.4 ^b	1.6 ^c

Values are in percent. Cells were cultured during 6 days and then obtained to be analyzed by flow cytometry. BME-UV1, bovine mammary epithelial cells; MAC-T, bovine mammary alveolar cells; ADH, adherent; ULA, ultralow attachment; EpCAM, epithelial cell adhesion molecule. ^{a,b,c} Significant difference ($P < 0.05$).

concentrations were determined using the BCA Protein Assay kit (Fisher Scientific, Illkirch, France), according to the manufacturer's instructions. Lysates were combined with sample buffer [50 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 0.1% bromophenol blue, 20% glycerol, and 0.1 M dithiothreitol], boiled for 5 min at 95°C, and resolved using SDS-PAGE. Equal amounts of protein (10 µg) were separated on 4–12% NuPage gradient gels (Fisher Scientific, Illkirch, France) via SDS-PAGE and transferred electrophoretically to polyvinylidene difluoride membranes (Amersham, Courtaboeuf, France) at 110 V for 80 min. A set of prestained molecular mass standards (protein ladder) was run into each gel. The membranes were incubated with blocking solution (5% blotting grade blocker; Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) dissolved in Tris-buffered saline-Tween buffer [50 mM Tris-HCl (pH 8.6), 150 mM NaCl, and 0.1% Tween] for 30 min. These membranes were incubated overnight at 4°C with primary antibodies: rabbit STAT5 (C-17 clone) (SC-835, Santa Cruz Biotechnology), mouse CDH-1 (NCH-38 clone) (M-3612, Dako Agilent Technologies), rabbit occludin (71–1500, Zymed Thermofisher), goat CK14 (SC-17104, Santa Cruz Biotechnology), mouse CK19 (NCL-CK19 Novocastra Leica Biosystems), and β-actin (A5441, Sigma). They were also incubated with the appropriate secondary antibody coupled to horseradish peroxidase used at 1:2,500. The horseradish peroxidase chemiluminescence was visualized using an ECL kit and the ImageQuant LAS4000 Biomolecular Imager digital imaging system (GE Healthcare, Velizy-Villacoublay, France). Images generated as gel files were analyzed using the corresponding ImageQuant TL software (GE Healthcare).

DNA concentration by Hoechst 33258 staining. Cellular pellets obtained from the MAC-T and BME-UV1 cells in Matrigel, and ULA culture conditions were dissociated with 1 ml of buffered 0.05 M phosphate, 2 M NaCl, and 2 mM EDTA. Cells were sonicated for 30 s at 4°C and centrifuged at 4,000 g at 20°C for 30 min. Hoechst (Sigma Aldrich) solution was prepared at 1 mg/ml and then diluted to 200 µg/ml with free-nuclease sterile water (Thermo Scientific). Calibration curve of 0, 1, 2, 4, 5, 6, 8, and 10 µg/ml was prepared in amber tubes (Axygen, Corning) with DNA solution (100 µg/ml) (Sigma Aldrich), buffered 0.05 M phosphate, and diluted Hoechst (200 µg/ml). DNA samples were analyzed in 96-well black flat bottom using Mithras LB 940 Multimode Microplate Reader (Berthold Technologies). DNA concentration was calculated based on a regression calibration curve from the DNA dilutions.

BME-UV1 and MAC-T morphology and mammosphere measurement. Cells were observed at ×10 magnification using phase-contrast microscope equipped with an Axiocam MRc (Axio vert. A1, Zeiss). The analysis of mammosphere size and parameter was performed at 0, 3, 6, 8, and 10 days of culture. Image acquisition (0.3 µm/pixel) area was measured at 50-µm scale using the Zen blue software (Zeiss, 2012). Mammosphere area was determined using three representative images of each independent experiment and day.

Flow cytometry analysis. The BME-UV1 and MAC-T cells were obtained at day 6 of culture and dissociated for further flow cytometry analysis. BME-UV1 and MAC-T ADH cells were trypsinized, washed with PBS, and centrifuged at 400 g for 5 min. Cells were counted with TC20 automated cell counter (Bio-Rad) and suspended to further flow cytometry analysis. Matrigel BME-UV1 and MAC-T cells were recovered at 4°C for 1 h with cell recovery solution (BD Bioscience), according to the manufacturer's protocol. Then cells were dissociated with 1 ml of ReLeSR (Stem Cell Technologies) and incubated at 25°C for 5 min. Cells were sieved twice with PBS and their respective medium through a 30-µm cell strainer (Miltenyi Biotec). Following PBS washing, cells were counted with the TC20 and prepared for cytometry analysis. Cells cultivated in ULA supports were obtained by dissociating them with 1 ml of ReLeSR (Stem Cell Technologies, Grenoble, France) and incubated at 25°C for 5–7 min. Then cells were sieved twice with PBS and medium and prepared for the cell sorting, as described above. Cells obtained from ADH, Matrigel, and ULA supports were prepared for flow cytometry analysis with MACS buffer (autoMACS with 2% BSA) (Miltenyi Biotec). Cells were dispensed at 100,000 cells/ml concentration in each respective tube. Cells were incubated in darkness at 4°C for 30 min with antibodies FITC anti-rat IgG1 CD49f (α-6 integrin), allophycocyanin anti-rat IgG2bk CD24 (heat stable antigen), phycoerythrin anti-mouse IgG1 CD29 (β₁-integrin), Vioblue anti-mouse IgG1 CD326 (EpCam) (Miltenyi Biotec), and anti-mouse IgG1 PE-VIO700 CD10 (CALLA) (Miltenyi Biotec). Antibodies were used against each corresponding isotype control. Then cells were centrifuged at 400 g and resuspended

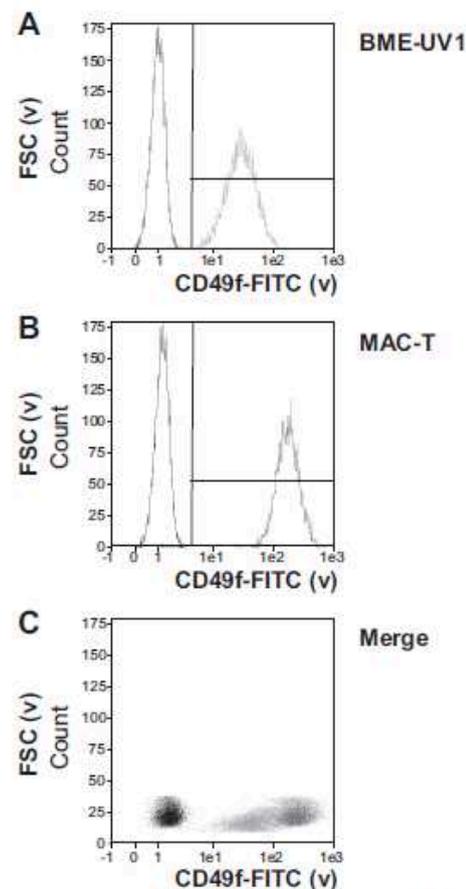


Fig. 1. Bovine mammary epithelial cells (BME-UV1; A) and mammary alveolar cells (MAC-T; B) CD49f expression by histogram graphic measuring forward scatter (FSC) vs. CD49f-FITC staining intensity (volt). C: dot-plot graphic representation merge of CD49f in BME-UV1 (light gray) and MAC-T (dark gray) populations against unstained (black).

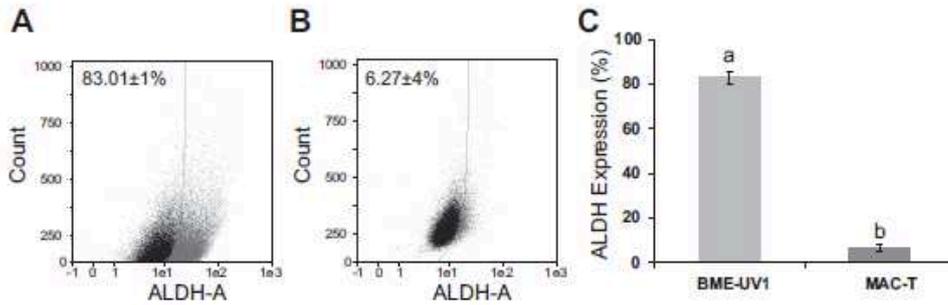


Fig. 2. Characterization of aldehyde dehydrogenase (ALDH) expression for BME-UV1 (A) and MAC-T (B) cells in ADH culture supports. Data acquisition was made by gating FSC vs. ALDH-positive expression. C: data represent percentage of expression means \pm SE. ALDH expression is shown in percentages of three experiments. ^{a,b}Superscripted letters are significantly different from each other ($P < 0.001$).

in 0.3 ml of MACS buffer. Multistaining was performed to determine specific populations. For each particular cell surface marker, the use of propidium iodide made it possible to identify the authentic live cellular population (stained cells). Then acquisition of this stained population was gated to forward-scattered light and side-scattered light, to exclude dead population and delimit cell granularity and size, as well as doublets by adjustments in height and photomultiplier voltage. The isotype of each target antigen served as a control to discriminate nonspecific background during the analysis. Samples were analyzed to collect a data set of 10,000 events. Flow cytometry analysis was performed using a MACSQuant Analyzer 10 cytometer (Miltenyi Biotec). Data were analyzed using MACSQuantify analysis software (Miltenyi Biotec). Obtained results were expressed in percentages by excluding the isotype from the cell surface marker by dot plot analysis.

ALDH detection. The BME-UV1 and MAC-T cells line were obtained from ADH cultures and analyzed at different concentrations (100,000, 200,000, 500,000, 1,000,000, and 2,000,000 cells/ml) in ADH supports at 37°C in 5% CO₂. Cells were then removed by trypsin digestion and incubated for 45 min at 37°C with Aldefluor (Stem Cell Technologies), according to the manufacturer's recommendations. Next, cells were centrifuged (250 g) and suspended in Aldefluor assay buffer (Stem Cell Technologies). Cell suspension was

analyzed by flow cytometer following the same methodology as described before by MACsQuant Analyzer 10 (Miltenyi Biotec).

Statistical analysis. Experiments were repeated three to four times. The data are expressed as means \pm SE. Flow cytometry and DNA concentration data were analyzed by the analysis of variance (ANOVA one-way) using the following model: $y_{ij} = \mu + \text{culture support}_i + \varepsilon_{ij}$ (where y is flow cytometry data or DNA concentrations, μ is mean; i is culture support modalities, j is time, and ε is residuals). Post hoc Tukey pairwise tests were used. Significant differences were considered at $P < 0.05$. ALDH, cell viability, mammosphere area, and gene expression are presented as means \pm SE. Data were subjected to a Student's t -test to compare the mean values. Effects were considered statistically significant at $P < 0.05$. All statistical analyses were performed using the R software.

RESULTS

BME-UV1 and MAC-T cells possess different phenotypes in their cell surface markers profile. We decided to use flow cytometry by monostaining and multistaining protocols to characterize BME-UV1 and MAC-T cellular phenotypes. BME-UV1 and MAC-T cells cultured in ADH supports both expressed high levels of CD49f (~99%), considered as an important epithelial cell surface marker. Subsequently, and to study CD49f expression in mammospheres, BME-UV1 and MAC-T cells were cultured in 3D supports (Matrigel and ULA). Our results showed that CD49f expression decreased only in MAC-T cells cultured in ULA (Table 1).

In the mammary gland, cell subpopulations can be discriminated through the intensity of CD49f staining: CD49f^{low}, CD49f^{medium}, and CD49f^{high}. If we look at CD49f intensity staining in ADH support, histograms (Fig. 1) show that BME-UV1 and MAC-T CD49f expression is different with respect to their staining intensity. Merging the BME-UV1 (light gray) and MAC-T (dark gray) CD49f stainings allowed us to confirm this difference of CD49f staining (respectively, CD49f^{medium} vs. CD49f^{high}).

CD10, CD24, and EpCAM cell surface markers are usually analyzed to phenotype mammary cell populations. BME-UV1 cells expressed CD10 in ADH conditions (25.3%), and MAC-T cells showed no expression (Table 1). CD10 expression decreased when BME-UV1 cells formed mammospheres in ULA and Matrigel support. MAC-T cells did not express CD10, whatever cell culture support. Very low CD24 expression was observed in both BME-UV1 and MAC-T cells cultured in all conditions (Table 1). Furthermore, significant differences in EpCAM expression were observed. BME-UV1 cells had a higher expression (3%), whereas MAC-T cells showed a lower expression (0.8%) in ADH supports (Table 1). EpCAM expression decreased when BME-UV1 are cultured in 3D sup-

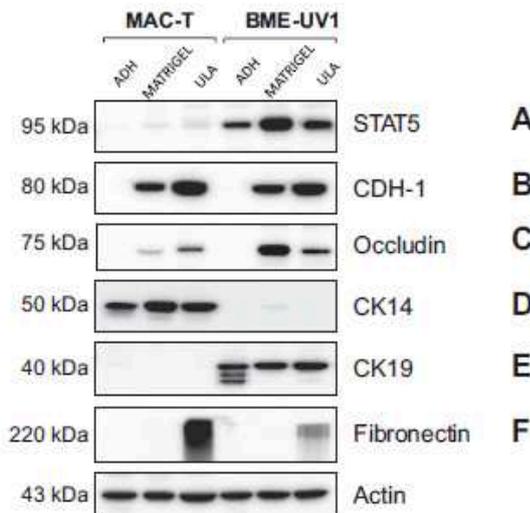


Fig. 3. Western blotting detection of signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5; A), cadherin (CDH)-1 (B), occludin (C), cytokeratin (CK) 14 (D), CK19 (E), and actin (control; F). MAC-T and BME-UV1 cells were cultured in two-dimensional (2D) ADH support and in three-dimensional (3D) nonadherent support [ultralow attachment (ULA)] and 3D adherent support (Matrigel) during 6 days. Cells lysates were harvested at day 6, and ~10 μ g protein were separated on polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred to PVDF membranes. Protein size is expressed in kDa on the left of the gels. The experiment was independently repeated three times.

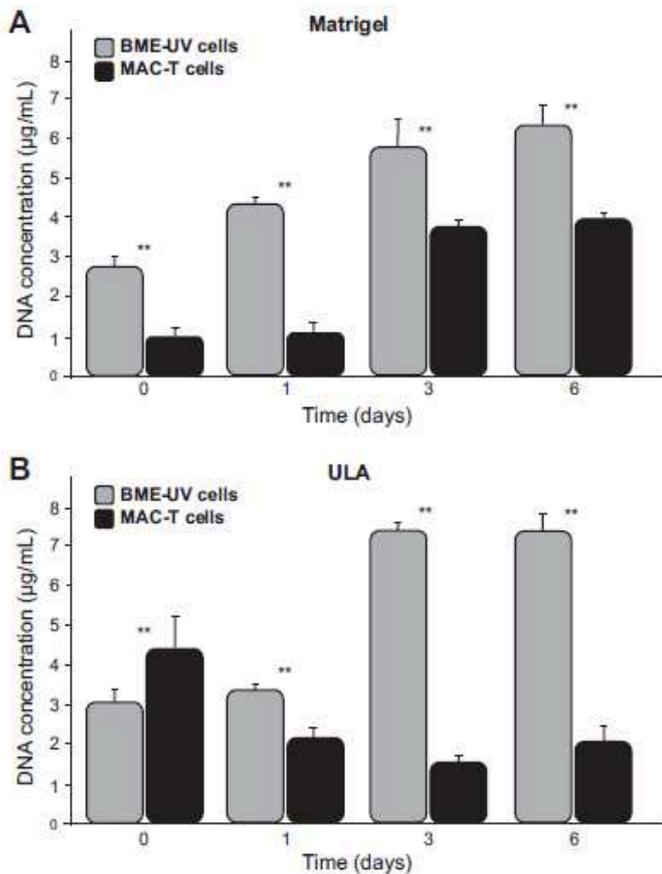


Fig. 4. BME-UV1 and MAC-T cells were cultured for 6 days. Histograms bars show DNA concentration (µg/ml) in Matrigel (A) and ULA supports (B). Gray color representing BME-UV1 cells; black color representing MAC-T cells. Values are means ± SE at each concentration. Significance is represented by ** $P < 0.01$.

ports. Interestingly, EpCAM expression was increased when MAC-T cells were cultured in Matrigel.

BME-UV1 cells possess progenitor and stem-cell-like phenotypes. Expression of ALDH was assessed to determine the presence of stem and progenitor cell-specific activity in MAC-T and BME-UV1 cells. The dot plot shows BME-UV1 (Fig. 2A) and MAC-T (Fig. 2B) cell-positive populations and unstained cells (black). Interestingly, we observed (Fig. 2C) a high ALDH⁺ cell population in BME-UV1 cells (83.01%). In contrast, ALDH⁺ cell population was slightly represented in MAC-T cells (6.27%).

BME-UV1 and MAC-T cells express their own adhesion proteins and cellular signaling in response to a specific culture support. The analyses of different proteins (STAT5, CDH-1, occludin, CK14, CK19) were evaluated at day 6 by Western blot to determine how culture supports can influence their expression. STAT5 expression in MAC-T cells showed a slightly and almost unapparent presence in ADH, Matrigel, and ULA supports (Fig. 3A). BME-UV1 cells presented high and stable expression of STAT5 for ADH, Matrigel, and ULA supports (Fig. 3A). The absence of CDH-1 expression in both MAC-T and BME-UV1 cells was observed when cultured on ADH, but increased in ULA and Matrigel supports (Fig. 3B). As CDH-1, occludin protein was only expressed in Matrigel and ULA supports in both cell lines

(Fig. 3C). CK14 was only expressed in MAC-T cells, while CK19 was only expressed in BME-UV1 at 2D and 3D culture conditions (Fig. 3, D and E). Interestingly, we observed a high expression of fibronectin when cells were cultured in ULA, and the expression was substantially higher in MAC-T cells (Fig. 3F).

MAC-T and BME-UV1 cell proliferation differs between cellular 2D and 3D supports. To evaluate the influence of 2D and 3D supports on proliferation, DNA concentration was measured in different cell culture conditions. Our results clearly showed higher BME-UV1 cell proliferation activity in Matrigel by its increase in DNA concentration rate from day 1 to day 6 (Fig. 4A) compared with MAC-T cells proliferation. In the same way, BME-UV1 showed higher proliferation ability in ULA; while MAC-T cells DNA concentration was decreased throughout the days (Fig. 4B). These results suggested that ULA had a negative effect on MAC-T cells' proliferation activity. Concerning proliferation in ADH, we classically observed a higher proliferation of MAC-T cells compared with BME-UV1 cells (Fig. 5).

Performance of MAC-T and BME-UV1 cells in 2D and 3D supports regarding mammosphere formation. In Matrigel coating supports, the profile of 3D spherical shapes was more clearly defined for both cell lines. In ULA supports, MAC-T cells formed little round spheres with some cell clusters; whereas BME-UV1 cells presented bigger sphere-shaped cells, typical of the mammospheres described by Kozłowski et al. (15) (Fig. 6). In 3D (ULA and Matrigel) supports, cells underwent an apparent morphological change. Here, we observed that MAC-T cells did not evolve as BME-UV1 cells from day 3 to day 10 in ULA. MAC-T cells form aberrant structures in ULA. Conversely, BME-UV1 cells showed a cluster of 3D sphere-like cells (Fig. 6). Mammosphere area was measured by Zen blue software. The analysis showed that, after day 3, mammosphere size constantly increased until day 10 in 3D Matrigel in both cell lines. The mammosphere surface area formed by BME-UV1 cells almost reached 600 µm², whereas MAC-T cells were ~400 µm² in Matrigel support ($P < 0.05$) (Fig. 7).

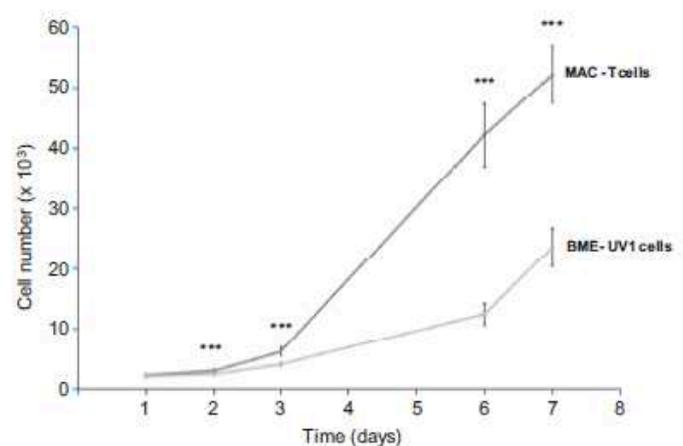


Fig. 5. Cellular growth rate of MAC-T and BME-UV1 cells in ADH 2D supports. Cells were cultured on ADH supports during 6 days, and their proliferation was determined using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assays. Values are means ± SE. Proliferation was higher (***) $P < 0.001$ in MAC-T cells compared with BME-UV1 cells. The experiment was independently repeated three times.

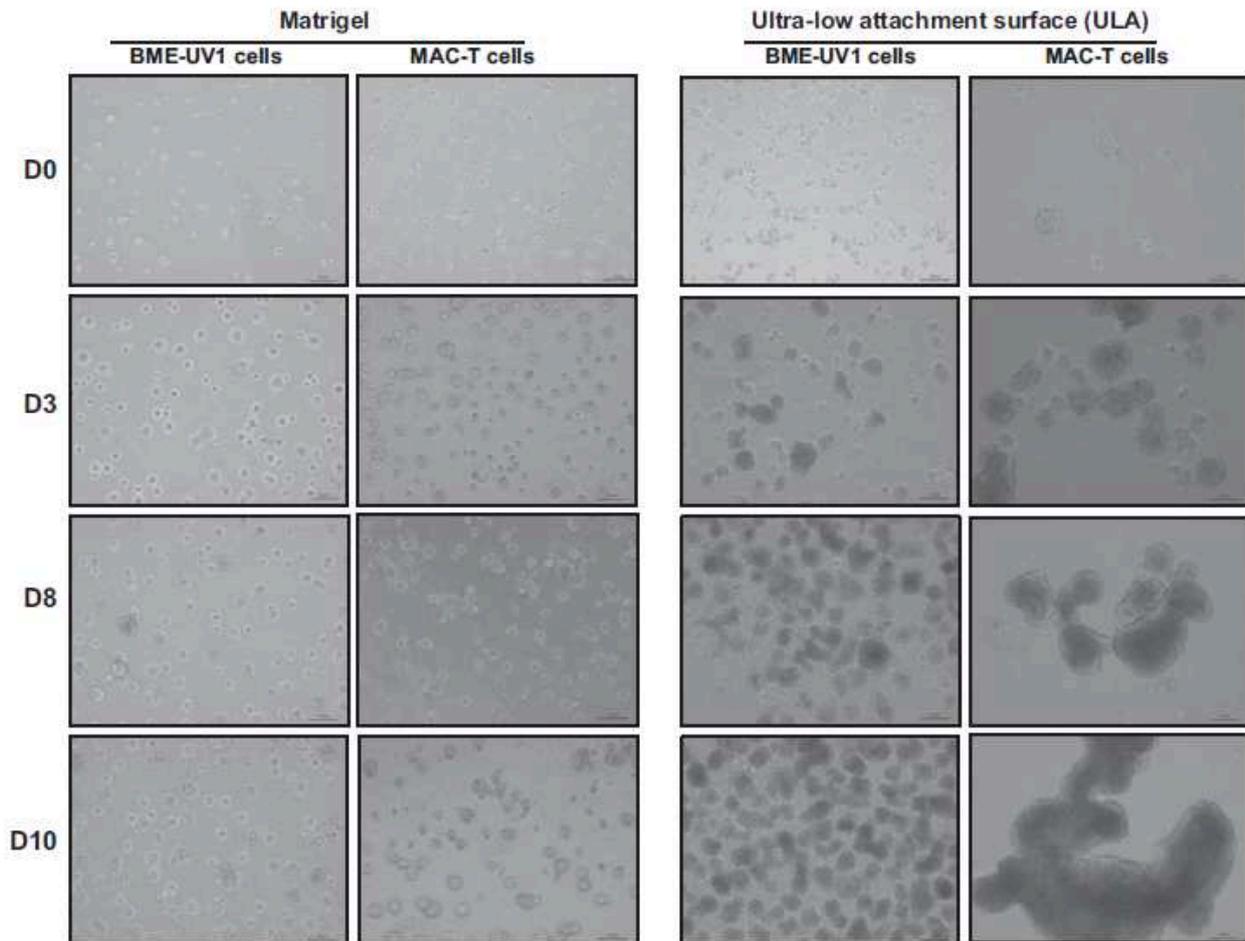


Fig. 6. Phase-contrast microscopy of MAC-T and BME-UV1 cell morphology performance in 3D nonadherent (ULA) and 3D adherent (Matrigel) supports. *Right:* MAC-T and BME-UV1 cells cultured on ULA during 10 days. MAC-T cells shows aberrant aggregates in ULA supports throughout the days of culture, while BME-UV1 cells formed small round shapes (mammospheres) after 8 days of culture when plated in ULA. *Left:* MAC-T and BME-UV1 cells cultured in Matrigel supports. MAC-T cells form small mammospheres, while BME-UV1 cells demonstrated more well-defined mammosphere cells. Bars represented 50 μ m. The experiment was independently repeated three times. D0–D10, days 0–10, respectively.

DISCUSSION

To study bovine mammary gland plasticity, immortalized cells are powerful tools. Therefore, *in vitro* models and cell lines need to be fully characterized. For the first time, this study clearly elucidated BME-UV1 and MAC-T phenotypes by the use of antibodies against specific cell surface markers CD10, CD24, CD326 (EpCAM), integrin CD49f (α -6), and ALDH⁺ cell population determination using flow cytometry. We confirmed BME-UV1 and MAC-T cell differences with respect to their cellular population CD49f⁺, EpCAM⁺, and CD10⁺ and their ability to form mammospheres in 3D supports. We demonstrated that differences between BME-UV1 and MAC-T cells in their phenotype and performance corresponded to different cytokeratins (CK14 and CK19) and proteins (STAT5, occludin, and CDH-1) expressions.

The combination between specific cell surface markers and ALDH activity allows now characterizing specific cell populations like mammary epithelial stem/progenitor cells. In human normal breast tissue, high expression of ALDH can serve as a biomarker to identify stem/progenitor MECs. Moreover, MECs with high ALDH activity have often high self-renewing capacities and mammosphere-forming abilities (25). Interest-

ingly, in our study, high ALDH activity was observed in BME-UV1 cells compared with MAC-T cells. Furthermore, we observed that MAC-T cells possess a higher capacity to proliferate in ADH supports than BME-UV1 cells. In contrast, MAC-T cell proliferation seems to be diminished in ULA and Matrigel compared with BME-UV1 cells. In 3D culture supports, MAC-T cells exhibited low ability to form mammospheres and showed aberrant and not well-structured mammospheres. The higher ability of these cells to proliferate on plastic is not related to their low ability to form mammospheres in Matrigel and ULA. On the other hand, BME-UV1 cells showed higher ability to form spherical colonies in ULA and larger mammospheres. Dontu et al. (6) demonstrated that non-ADH mammospheres were enriched in early progenitor/stem cells and able to differentiate along all mammary epithelial lineages and to clonally generate complex functional structures in reconstituted 3D culture systems. Thus behavior of BME-UV1 cells cultured on 3D using non-ADH support ULA suggested that these cells would possess progenitor/stem cell characteristic.

Cell-to-cell adhesion and cellular communications are crucial in mammary gland development for regulation and

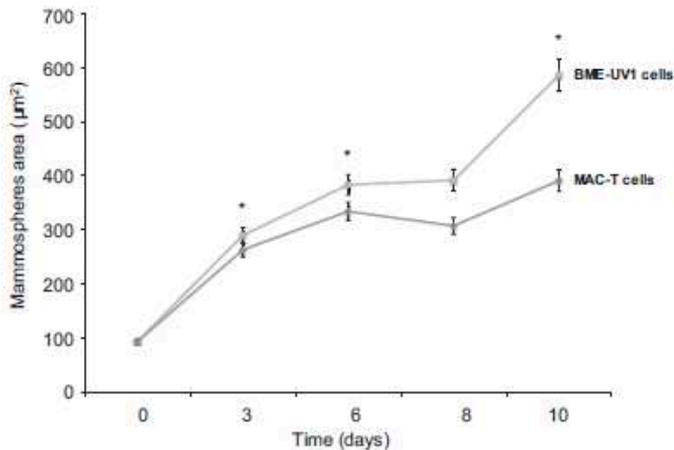


Fig. 7. Comparison of MAC-T and BME-UV1 cell mammosphere area. The measurement of the area was made in a 50- μm scale with Axio A1, Zeiss microscope; means are reported in μm^2 . Values are means \pm SE from the two cell lines, MAC-T and BME-UV1. Significant differences in the mammosphere area between the two cell lines are represented by * $P < 0.05$. BME-UV1 cells show a higher mammosphere area than MAC-T cells when cultured in Matrigel supports.

differentiation of alveolar epithelial cells in late pregnancy and at the beginning of lactation. CDH-1 is one of these crucial proteins required for cell attachment to the stroma and cell motility (10). CDH-1 is a marker of polarization essential for the organization of MEC in 3D (29). As expected, MAC-T cells and BME-UV1 cells did not express CDH-1 in ADH supports and were unable to form adherent junctions and thus to polarize. In contrast, BME-UV1 and MAC-T cells expressed CDH-1 when cultured in Matrigel and ULA supports. Like Kozłowski et al. (15), we observed CDH-1 expression after 6 days of culture in Matrigel and ULA support. Moreover, a well-known tight junction protein, occludin, was highly expressed in BME-UV1 cells cultured in Matrigel and ULA supports. In contrast, lower expression of occludin was found in MAC-T cells. The lower presence of occludin in MAC-T cells could also explain the aberrant structures observed in ULA support, as well as their higher and specific expression of fibronectin. Epithelial cell's ability to transit into mesenchymal cells (EMT) is a particularity of epithelial plasticity. During EMT, epithelial cells lose their junctions and apical-basal polarity, reorganize their cytoskeleton, undergo a change in the signaling programs that define cell shape, and reprogram gene expression (17). They demonstrated that the dissolution of tight junctions during EMT is accompanied by decreased claudin and occludin expression, and the diffusion of zonula occludens 1 from cell-cell contacts. We can hypothesize that MAC-T cells cultured in 3D on non-ADH support like ULA are able to undergo EMT and switch to mesenchymal cells.

BME-UV1 and MAC-T cells were obtained at different time of mammary development. BME-UV1 cells were obtained from pregnant lactating Holstein cows at a slaughter house (34), while MAC-T cells were obtained from biopsies apparently from lactating Holstein cows (12). Furthermore, dairy animals' mammary glands have a great capacity for cellular population shift (mammary gland plasticity) during mammaryogenesis and throughout lactations. Luminal progenitor cells are

present during puberty and lactation, whereas myoepithelial cells were highly detected at the involution period (21). According to Borena et al. (5), the most common markers to identify luminal epithelial cells are CK8, CK18, CK19, and mucin-1, whereas CK5, CK14, smooth muscle actin, and vimentin are the most frequently used markers to detect basal myoepithelial cells (5). The strong expression of CK14 and the absence of CK19, whatever the cell culture conditions, suggest that MAC-T cells come predominantly from ductal/myoepithelial origin. In contrast, BME-UV1 cells strongly express CK19 but not CK14. Moreover, STAT5 is expressed constitutively in BME-UV1 cells, whereas its expression is undetectable in MAC-T cells. The overexpression of STAT5 in BME-UV1 cells in 3D cultures corresponds to the gene analysis of Kozłowski et al. (15), where they found the activation of genes involved in milk synthesis. The present study revealed that BME-UV1 and MAC-T cells have different phenotypes and different signaling pathways. This confirms results obtained by Zarzyńska et al. (32), where they demonstrated that BME-UV1 and MAC-T cells have opposite responses to hormones. They concluded that BME-UV1 cells are more reactive to hormones of the somatotrophic axis and epidermal growth factor, whereas MAC-T cells are more reactive to sex steroids. In 2003, Berry et al. (4) used MAC-T cells to measure the mitogenic activity of extracts from heifer mammary tissue. They concluded that the proliferative responses of MAC-T cells mimic the response of primary MEC but are refractory to estrogen. Differences between BME-UV1 and MAC-T cells seem to come from the physiological status of the dairy cow before mammary sampling. Despite this, we cannot exclude that cells have derived through cell culture passages and have acquired a phenotype dependent of each laboratory cell culture conditions (FBS concentration, insulin concentration, mycoplasma contamination, cell culture plastic brand, etc.). Overall, our results allowed the identifying of common markers and specific markers of both cell lines. However, new biomarkers that allow for a clear and consistent identification of MECs can be used in flow cytometry.

Flow cytometry has allowed us to clearly observe high expression of CD49f in both BME-UV1 and MAC-T cells, and these results confirm their epithelial profile, as described in previous studies (5, 22, 25). Villadsen et al. (30) suggested that ductal MECs expressed high levels of CD49f and CK14. Thus we focused our attention on the intensity of CD49f expression, and we observed that MAC-T cells expressed CD49f^{high} compared with BME-UV1 that expressed CD49f^{medium}. This result, combined with the restricted expression of CK14 within MAC-T cells, suggests that MAC-T cells have a ductal origin. Interestingly, MAC-T cells had a decline in CD49f expression in ULA condition. This might be explained by the intimate relationship between ECM and integrins, where cells are able to respond by defining their polarity and morphology, depending on their support (19). For MAC-T cells, the expression of CD49f seems to be required for cell proliferation and mammosphere formation. The subsequent analysis of EpCAM in MAC-T and BME-UV1 cells in ADH supports showed that EpCAM was expressed significantly higher in BME-UV1 than in MAC-T cells. Our findings correspond with EpCAM expression in luminal mammary cellular populations (18). The presence of EpCAM in MAC-T cells was

also in accordance with previous studies, where EpCAM seems to be expressed in both basal and luminal cellular populations (21). Moreover, our data indicate that BME-UV1 cells highly expressed CD10 in basal cell culture conditions (ADH). CD10⁺ cells decreased when BME-UV1 cells formed mammospheres in 3D conditions: ULA and Matrigel. These results are correlated with previous studies that reporting CD10⁺ cells have the ability to form mammospheres and have progenitor's phenotype. These data have been confirmed by the high ALDH activity in BME-UV1 cells. In 2012, Rauner and Barash (22) distinguished two major epithelial cell populations in primary MEC: CD24^{neg-med}CD49f^{pos} and CD24^{med-high}CD49^{neg} (22). In BME-UV1 cells, nearly 100% of cells were CD49^{pos}, but we never identified CD24^{pos} cells. This result suggests that cells could lose CD24 expression during their immortalization and putative stem cell markers. In the previous study, primary bovine MEC was from undifferentiated heifer mammary tissue. Thus CD24 could be expressed at specific stage during mammaryogenesis in dairy cows.

In conclusion, this study has shown BME-UV1 and MAC-T performances in 2D and 3D supports and has provided evidence about their phenotypical characteristics. This study confirms that BME-UV1 cells have a clear luminal-like profile by expression of CD10, CD49f, and EpCAM, along with higher ALDH and CK19 expression. Moreover, BME-UV1 cells have a high capacity to form mammospheres; this could also be related to their luminal progenitor/stem profile and their lactogenic origin. MAC-T cells have a high ability to proliferate, higher CD49f expression, lower ALDH activity, and CK14 expression means that MAC-T cells have a myoepithelial/ductal profile. Together, these results defined precisely the phenotypes of MAC-T and BME-UV1 cells, and we confirmed their distinct responses to culture support. Moreover, regarding myoepithelial profile and fibronectin production of MAC-T cells cultured in ULA support, it could be a nice model for epithelial-mesenchymal transition studies.

GRANTS

We gratefully acknowledge the Institut National de la Recherche Agronomique phase division for financial support.

DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the author(s).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Author contributions: M.A.T., M.-H.P., L.F., and F.D. conception and design of research; M.A.T., L.F., and F.M. performed experiments; M.A.T., M.-H.P., L.F., F.M., and F.D. analyzed data; M.A.T., M.-H.P., L.F., and F.D. interpreted results of experiments; M.A.T., L.F., and F.D. prepared figures; M.A.T., M.-H.P., L.F., and F.D. drafted manuscript; M.A.T., M.-H.P., L.F., and F.D. edited and revised manuscript; M.A.T., M.-H.P., L.F., and F.D. approved final version of manuscript.

REFERENCES

- Akers RM. *Lactation and the Mammary Gland*. Ames, IA: Iowa State University Press, 2002.
- Andrews JL, Kim AC, Hens JR. The role and function of cadherins in the mammary gland. *Breast Cancer Res* 14: 203, 2012.
- Berry SD, McFadden TB, Pearson RE, Akers RM. A local increase in the mammary IGF-1: IGFBP-3 ratio mediates the mammary effects of estrogen and growth hormone. *Domest Anim Endocrinol* 21: 39–53, 2001.
- Berry SD, Weber Nielsen MS, Sejrsen K, Pearson RE, Boyle PL, Akers RM. Use of an immortalized bovine mammary epithelial cell line (MAC-T) to measure the mitogenic activity of extracts from heifer mammary tissue: effects of nutrition and ovariectomy. *Domest Anim Endocrinol* 25: 245–253, 2003.
- Borena BM, Bussche L, Burvenich C, Duchateau L, Van de Walle GR. Mammary stem cell research in veterinary science: an update. *Stem Cells Dev* 22: 1743–1751, 2013.
- Dontu G, Abdallah WM, Foley JM, Jackson KW, Clarke MF, Kawamura MJ, Wicha MS. In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev* 17: 1253–1270, 2003.
- Feldman GJ, Mullin JM, Ryan MP. Occludin: structure, function and regulation. *Adv Drug Deliv Rev* 57: 883–917, 2005.
- Fernandez-Gonzalez R, Illa-Bohaca I, Welm BE, Fleisch MC, Werb Z, Ortiz-de-Solorzano C, Barcellos-Hoff MH. Mapping mammary gland architecture using multi-scale in situ analysis. *Integr Biol (Camb)* 1: 80–89, 2009.
- German T, Barash I. Characterization of an epithelial cell line from bovine mammary gland. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 38: 282–292, 2002.
- Gumbiner BM. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 84: 345–357, 1996.
- Huynh H, Pollak M. HH2A, an immortalized bovine mammary epithelial cell line, expresses the gene encoding mammary derived growth inhibitor (MDGI). *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 31: 25–29, 1995.
- Huynh HT, Robitaille G, Turner JD. Establishment of bovine mammary epithelial cells (MAC-T): an in vitro model for bovine lactation. *Exp Cell Res* 197: 191–199, 1991.
- Johnson TL, Fujimoto BA, Jimenez-Flores R, Peterson DG. Growth hormone alters lipid composition and increases the abundance of casein and lactalbumin mRNA in the MAC-T cell line. *J Dairy Res* 77: 199–204, 2010.
- Keller PJ, Lin AF, Arendt LM, Klebba I, Jones AD, Rudnick JA, DiMeo TA, Gilmore H, Jefferson DM, Graham RA, Naber SP, Schnitt S, Kuperwasser C. Mapping the cellular and molecular heterogeneity of normal and malignant breast tissues and cultured cell lines. *Breast Cancer Res* 12: R87, 2010.
- Kozłowski M, Gajewska M, Majewska A, Jank M, Motyl T. Differences in growth and transcriptomic profile of bovine mammary epithelial monolayer and three-dimensional cell cultures. *J Physiol Pharmacol* 60, Suppl 1: 5–14, 2009.
- Lambert AW, Ozturk S, Thiagalingam S. Integrin signaling in mammary epithelial cells and breast cancer. *ISRN Oncol* 2012: 493283, 2012.
- Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15: 178–196, 2014.
- Maguer-Satta V, Besancon R, Bachelard-Cascales E. Concise review: neutral endopeptidase (CD10): a multifaceted environment actor in stem cells, physiological mechanisms, and cancer. *Stem Cells* 29: 389–396, 2011.
- Manninen A. Epithelial polarity—generating and integrating signals from the ECM with integrins. *Exp Cell Res* 334: 337–349, 2015.
- Politis I, Zavizion B, White JH, Goldberg JJ, Baldi A, Akers RM. Hormonal and extracellular matrix regulation of plasminogen activator in a bovine mammary epithelial cell line. *Endocrine* 3: 345–350, 1995.
- Prpar S, Martignani E, Dovc P, Baratta M. Identification of goat mammary stem/progenitor cells. *Biol Reprod* 86: 117, 2012.
- Rauner G, Barash I. Cell hierarchy and lineage commitment in the bovine mammary gland. *PLoS One* 7: e30113, 2012.
- Raymond K, Faraldo MM, Deugnier MA, Glukhova MA. Integrins in mammary development. *Semin Cell Dev Biol* 23: 599–605, 2012.
- Schmid E, Schiller DL, Grund C, Stadler J, Franke WW. Tissue type-specific expression of intermediate filament proteins in a cultured epithelial cell line from bovine mammary gland. *J Cell Biol* 96: 37–50, 1983.
- Shehata M, Teschendorff A, Sharp G, Novcic N, Russell IA, Avril S, Prater M, Eirew P, Caldas C, Watson CJ, Stingl J. Phenotypic and functional characterisation of the luminal cell hierarchy of the mammary gland. *Breast Cancer Res* 14: R134, 2012.
- Sleeman KE, Kendrick H, Ashworth A, Isacke CM, Smalley MJ. CD24 staining of mouse mammary gland cells defines luminal epithelial, myoepithelial/basal and non-epithelial cells. *Breast Cancer Res* 8: R7, 2006.
- Smith GH. Experimental mammary epithelial morphogenesis in an in vivo model: evidence for distinct cellular progenitors of the ductal and lobular phenotype. *Breast Cancer Res Treat* 39: 21–31, 1996.

28. **Stingl J, Eirew P, Ricketson I, Shackleton M, Vaillant F, Choi D, Li H, Eaves CJ.** Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells. *Nature* 439: 993–997, 2006.
29. **Truchet S, Chat S, Ollivier-Bousquet M.** Milk secretion: the role of SNARE proteins. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 19: 119–130, 2014.
30. **Villadsen R, Fridriksdottir AJ, Ronnov-Jessen L, Gudjonsson T, Rank F, LaBarge MA, Bissell MJ, Petersen OW.** Evidence for a stem cell hierarchy in the adult human breast. *J Cell Biol* 177: 87–101, 2007.
31. **Woodward WA, Chen MS, Behbod F, Rosen JM.** On mammary stem cells. *J Cell Sci* 118: 3585–3594, 2005.
32. **Zarzynska J, Gajewska M, Motyl T.** Effects of hormones and growth factors on TGF-beta1 expression in bovine mammary epithelial cells. *J Dairy Res* 72: 39–48, 2005.
33. **Zavizion B, Gorewit RC, Politis I.** Subcloning the MAC-T bovine mammary epithelial cell line: morphology, growth properties, and cytogenetic analysis of clonal cells. *J Dairy Sci* 78: 515–527, 1995.
34. **Zavizion B, van Duffelen M, Schaeffer W, Politis I.** Establishment and characterization of a bovine mammary myoepithelial cell line. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 32: 149–158, 1996.



Conclusions sur la publication 1

Dans la publication précédente, nous avons utilisé les biomarqueurs (CD49f, CD24, CD326 (EpCAM) et CD10) dans les lignées mammaires bovines MAC-T et BME-UV1. Cette première étude nous a permis de faire la caractérisation phénotypique de deux lignées et d'étudier l'impact sur des conditions de culture sur l'expression des biomarqueurs en (2D et 3D). Nous avons testé les biomarqueurs dans les lignées mammaires bovines MAC-T et BME-UV1 car elles sont de lignées qui, selon la littérature, ont été prélevées à partir du tissu mammaire de vaches en lactation. Jusqu'à aujourd'hui aucune étude n'a montré l'utilisation de biomarqueurs au cours d'un cycle de lactation chez la vache. L'utilisation de biomarqueurs dans les lignées MAC-T et BME-UV1 a permis de les phénotyper. Les cellules qui exprimaient les différentes cytokératines (CK14 et CK19) et STAT5 ont confirmé leur phénotype luminaire dans les cellules BME-UV1 et ductale ou myoépithéliale dans la cellule MAC-T. En outre, l'expression de l'aldéhyde déshydrogénase nous a montré que la lignée BME-UV1 garde des caractéristiques de cellules souches ou progénitrices en comparaison avec MAC-T. Les caractéristiques des cellules de type souche/progénitrice dans les deux lignées ont été observées pour leur capacité à former la mammosphère.

Nous avons observé que l'expression de biomarqueurs CD49f, CD24, CD326 (EpCAM) et CD10 coïncidait avec ce qui est décrit dans la littérature chez d'autres espèces animales. Cependant, nous avons trouvées des différences d'expression entre MAC-T et BME-UV1. Ces différences sont probablement liées à leur lieu de prélèvement lors de leur établissement. Le biomarqueur CD49f est présent dans les cellules ayant un phénotype de CEM et de cellule myoépithéliale. Le biomarqueur EpCAM est exprimé dans les lignées MAC-T et BME-UV1 et d'après la littérature permet d'identifier les cellules de type luminaire ou différenciées. La capacité à former la mammosphère et l'expression de CD10 dans les cellules BME-UV1 coïncide avec d'autres études dans la littérature. Cependant, CD10 est ainsi un biomarqueur qui permet d'identifier les cellules de type myoépithéliales. Le CD24 est exprimé faiblement dans les lignées MAC-T et BME-UV1. La littérature montre que c'est un biomarqueur des cellules ayant une capacité de « repopulation ».

Notre étude sur les lignées mammaires bovines nous a permis d'obtenir un panel de 4 biomarqueurs (CD49f, CD24, CD326 (EpCAM) et le CD10) utilisables en cytométrie pour identifier des populations cellulaires dans la glande mammaire. Pour notre deuxième étude et à partir de l'utilisation de cet panel de biomarqueurs, nous analyserons des populations par mono et double marquage ce qui nous permettra d'identifier d'une manière plus fine les populations rares ou non présentes dans la glande mammaire bovine en lactation.

Publication 2

Hiéarchisation de cellules épithéliales mammaires de vaches laitières durant la lactation

Le nombre de cellules épithéliales en quantité et en activité détermine la production de lait (Boutinaud et al., 2004). Au début de la lactation il y a une augmentation de la quantité de cellules puis elles diminuent jusqu'à la fin de la lactation (Capuco et al., 2001) par apoptose cellulaire. La glande mammaire subit plusieurs modifications morphologiques connues comme la plasticité de la glande mammaire, ces modifications sont régulées par la balance cellulaire et par le renouvellement cellulaire. (Stefanon et al., 2002). La présence de cellules souches et progénitrices dans la glande mammaire pendant son développement et au cours de la lactation a été décrit dans d'autres espèces comme la souris (Smith et Medina, 1988). Cependant, les populations cellulaires spécifiques qui participent pendant la lactation et leur caractérisation restent inconnues. Dans la partie précédente, nous avons utilisé un panel de biomarqueurs qui permet l'identification et la caractérisation de cellules épithéliales dans la glande mammaire. L'objectif de cette étude est de caractériser les différents types cellulaires durant la lactation dans la glande mammaire bovine. Ce travail a été soumis pour publication à Stem Cells and Development en avril 2016 : il est en cours de révision, le résumé se trouve ci-dessous.

Cinq vaches primipares ont été utilisées pour cette étude. Le prélèvement de biopsies a été fait à 30 (B1), 90 (B2), 150 (B3) et 250 (B4) jours de lactation. Les vaches ont été traitées deux fois par jours, elles ont été hébergées et nourries dans l'étable et elles étaient au pâturage pendant l'été. La production de lait (PL), le comptage de cellules somatiques dans le lait, le TP et le TB ont été mesurés chaque jour pendant 52 semaines. Le tissu prélevé à partir de la biopsie a été coupé en explants et digéré à l'aide d'enzymes pour obtenir une fraction cellulaire. Les cellules obtenues ont été analysées par cytométrie en flux (mono et multi-marquage) par les biomarqueurs CD49f, CD24, CD326 et le CD10 que nous avons déjà validés dans la première expérience. Une autre partie du tissu prélevé à partir de la biopsie a été congelée et utilisée pour les études en histologie et pour analyser les biomarqueurs in situ. Une autre partie du tissu a permis l'obtention d'ARN pour analyser l'expression de CK19.

La PL était différente pendant les quatre prélèvements de biopsies ($P < 0.001$). La PL a été plus élevée au moment de la biopsie numéro deux, puis a diminué jusqu'au jour 250. Le contenu de matière grasse et de matière protéique dans le lait ont été plus élevées au début de la lactation, puis elles ont diminué jusqu'à la biopsie numéro trois et ont de nouveau

augmenté au moment de la biopsie numéro quatre. La composition et la PL et le comptage de cellules somatiques dans le lait ont montré des variations classiques de la production laitière.

L'expression du biomarqueur CD49f a été augmenté au début de la lactation (B1), puis il a d'expression à la fin de la lactation (B4) (44% à 28%) ($P < 0.005$). L'analyse des populations cellulaires a été faite en utilisant la combinaison de deux biomarqueurs qui ont permis de définir les différents types cellulaires comme décrits dans la littérature de la glande mammaire chez d'autres espèces. La population de cellules souches ($CD24^+CD49f^+$) n'a pas évolué de manière significative. De manière intéressante, la présence de cellules bipotentes ($CD24^+CD49f^+$) a évolué de manière significative ($P < 0.01$) au cours de la lactation. Elle a été plus élevée au début de lactation (B1) et a diminué jusqu'à la B4. Les populations de cellules lumino-alvéolaires matures ($CD49f^+EpCAM^-$) ont été augmentées dans la B1 (38%) puis elles ont diminué jusqu'à 21% dans la B4. En revanche, les cellules lumino-ductales ($CD49f^-EpCAM^-$) ont été augmentées légèrement au début de la B1, puis elles ont diminuée dans la B2, puis elles ont augmenté à la fin de la lactation. Nous avons aussi caractérisé d'autres types cellulaires : cellules progénitrices lumino-alvéolaires ($CD24^-EpCAM^+$), progénitrices myoépithéliales ($CD24^+CD10^-$), progénitrices lumino-ductales ($CD49f^-EpCAM^+$) et les cellules matures myoépithéliales ($CD49f^+CD10^+$) sans trouver de différences significatives durant la lactation. La cytokératine 19 a été exprimée pendant la lactation avec une expression significativement plus forte dans la B3 ($P < 0.05$). Les coupes histologiques ont montré des différences dans la morphologie des alvéoles pendant la lactation. L'expression de biomarqueurs in situ a validé et montré la localisation précise dans les alvéoles.

En conclusion, cette étude a montré pour la première fois les différents types cellulaires présents dans la glande mammaire bovine pendant la lactation. Les biomarqueurs CD49f, CD24, CD326 (EpCAM) et le CD10 ont permis de caractériser les différents types cellulaires. Cette étude montre la hiérarchisation des cellules souches, progénitrices et de cellules matures dans la glande mammaire bovine pendant la lactation.

Mammary epithelial cells hierarchy in dairy cows throughout lactation

Marie-Hélène Perruchot¹ ; Magdalena Arévalo-Turrubiarte¹ ; Florence Dufreneix¹ ; Laurence Finot¹ ; Vanessa Lollivier¹; Eric Chantat¹ ; Frédérique Mayeur¹ and Frédéric Dessauge^{1*}

¹ PEGASE, Agrocampus Ouest, INRA, 35590 Saint-Gilles, France

* Corresponding author: Frédéric Dessauge, INRA, UMR1348 Pegase, Domaine de la Prise, 35590 Saint-Gilles, France. Tel: +33 2 23 48 50 97; Fax: +33 2 23 48 50 80; E-mail:

ABSTRACT

Plasticity of mammary gland is related to adult mammary stem cells (MaSC) and progenitors giving rise to different mammary epithelial cell (MEC) populations. For milk-producing dairy animals, mammary gland plasticity needs to be deeply characterized for the selection of more sustainable and robust dairy cows facing to global changes. Identification and characterization of MaSC and progenitors would provide innovative tools in veterinary/human medicine against mammary tissue damages (carcinogenesis, bacterial infections). Hence, this study aimed to determine the dynamic of cell populations during a lactation cycle. Using mammary biopsies (at 30, 90, 150 and 250 days of lactation), we phenotyped cell populations in primiparous lactating dairy cows by flow cytometry. We used specific cell surface markers to lineage cells: CD49_f, CD24, EpCAM and CD10. Thus, we identified two cell populations linked to milk production: CD49_f⁺/EpCAM⁻ ($y = 0.88x + 4.42$, $R^2=0.36$, $p=0.00044$) and CD49_f⁻ / EpCAM⁻ ($y = -1.15x + 92.44$, $R^2=0.51$, $p = 5.2 \times 10^{-6}$) cells. Combining immunostaining analysis, flow cytometry, daily milk production data and statistical approach, we defined a stem cell population (CD24⁺ / CD49_f⁺) and four progenitor cell populations: bi-potent luminal progenitors (CD24⁻ / CD49_f⁺), lumino-alveolar progenitors (CD24⁻ / EpCAM⁺), myoepithelial progenitors (CD24⁺ / CD10⁻) and lumino-ductal progenitors (CD49_f⁻ / EpCAM⁺). Interestingly, the bi-potent luminal progenitors (CD24⁻ / CD49_f⁺) significantly ($p < 0.01$) decreased during lactation. From our results, this study provides for the first time a model of mammary cells hierarchisation to gain insight mammary cells plasticity during lactation.

INTRODUCTION

Milk yield (MY) is defined by breeding strategies and is finely regulated by cellular mechanisms determining the number and the activity of secreting cells [1] within mammary gland and therefore the sustainability of livestock. The mammary epithelium is composed of two cell layers: a luminal layer lining the lumen of ducts and alveoli, and an external basal myoepithelial layer [2]. Around this mammary epithelium, the stroma compartment is composed of other cell types (adipocytes, fibroblasts and immune cells) that are responsible for mammary plasticity and homeostasis. During lactation in dairy cows, mammary tissue undergoes extensive morphological and functional remodeling linked to cellular and architectural changes [3]. In early lactation, the rate of proliferating mammary cells overtakes the rate of apoptosis, increasing thereby the number of mammary cells. The decline in MY is the consequence of a loss of mammary cells (apoptosis) and a remodeling of mammary tissue, which results in alveolar regression during involution [4]. To date our understanding of the phenotypic differentiation of mammary epithelial cells is still limited. Current knowledge in mice and humans indicates the existence of stem cells and/or bi-potent stem/progenitor cell populations that would give rise to mature/differentiated cells [5]. In cows, recent reports demonstrating the presence of mammary stem cells (MaSC) and progenitors in the bovine mammary gland has been highlighted [6]. In order to improve the productivity of dairy cows and health of mammary gland and then to expand cow's lifespan, bovine MaSCs have to be characterized because they play a crucial role in cell proliferation and tissue regeneration. In addition, the bovine mammary gland represents an excellent alternative model for biomedical research to investigate the role of mammary stem cells in mammary function and carcinogenesis [7].

Evidence for the existence of MaSCs has been primarily derived from transplantation studies with murine mammary tissues. These studies revealed that ductal architecture could be regenerated *in vivo* when isolated parenchymal segments were transplanted into cleared mammary fat pads [8-10]. Further, it was shown that epithelial cells isolated from virgin, pubertal, gestational, and lactating glands could all repopulate cleared fat pads [9]. Because such a variety of parenchymal structures can regenerate a complete parenchymal framework it is likely that progenitor or stem cells are present throughout the mammary epithelium. To date mammary stem cell studies in ruminants have been extremely limited. Recently, Baratta et al. (2015) investigated different epithelial cell subpopulations in milk cells by flow cytometry [11]. They found an increase of CD49⁺ cells and cytokeratin 14/18 positive cells at the end of lactation in dairy cows. In 2002, Ellis and Capuco were the first to provide data on mammary

epithelial cells' (MEC) proliferation rate using histological analysis of mammary gland explants from heifers, which were injected with BrdU before euthanasia [6]. They identified different staining intensity in mammary epithelial cell populations and proposed that light staining cells were the primary proliferative cell population. In 2010, Martignani et al. showed that a putative bovine mammary stem cell population was able to regenerate and maintain a complete mammary gland structure [12]. They hypothesized that these putative mammary stem cells can give rise either to luminal (Cytokeratin 18 positive) or myoepithelial (Cytokeratin 14 positive) cells under specific cell culture conditions. To our knowledge on lactating mammals, no studies have been performed on mammary cell population's lineage and hierarchisation as well their proportion through a lactation cycle.

Using specific cell surface markers, flow cytometry is a sensitive approach to lineage and quantify cell populations and subpopulations in the mammary gland [7]. Expression of cluster of differentiation (CD) molecules, like heat stable antigen (CD24) and integrin alpha-6 (CD49f) have been widely used to identify epithelial cells in the mammary gland [13,14]. Recently, four populations have been found in the developing mammary gland (at puberty) by expression of CD24 and CD49f. Cell sorting experiments allowed to characterize putative stem-cells ($CD24^{Med}CD49f^{Pos}$), putative progenitor cells ($CD24^{High}CD49f^{Neg}$), basal ($CD24^{Neg}CD49f^{Pos}$) and luminal ($CD24^{Med}CD49f^{Neg}$) subpopulations[15]. In the human mammary gland, the combination of the cell surface marker EpCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule) and CD49f has served to identify basal cell populations [16,17]. In lactating goats, EpCAM has been found in luminal populations of alveoli by immunostaining and seems to be related to cell proliferation [18]. Moreover, cell populations expressing EpCAM and CD49f represent a source of mammary progenitors with stem cell characteristics due to their ability to form mammospheres [19-21]. To characterize myoepithelial cells, the neutral endopeptidase CD10 also called Common Acute Lymphoblastic Leukemia Antigen (CALLA) has been identified in the apical surface of myoepithelial cells during cell contraction in the mammary gland [22,23]. In the bovine mammary gland, CD10 has also been shown to be a pertinent marker of myoepithelial cell differentiation in prepubertal bovine mammary gland [24].

Therefore, the present study aims to determine cellular hierarchy throughout a lactation cycle to understand the implication of cellular populations in the bovine mammary gland plasticity and milk production. We used flow cytometry to determine cellular populations using cell surface markers CD49f, CD24, EpCAM and CD10 in mammary explants sampling from lactating dairy cows at 30, 90, 150 and 250 days of lactation. This

lineage allowed us to propose a cell hierarchisation schema of MEC populations in lactating periods.

MATERIALS & METHODS

All of the animal procedures were discussed and approved by the National Ethics Committee in Animal Experiment (File number: 00943.02) in compliance with French regulations (Decree No. 2001-464, May 29, 2001).

Animals and Experimental Design

The five Holstein primiparous cows used in this study were raised at the experimental barn of Méjusseume INRA-Rennes (France). The cows were collectively housed and fed in barns during winter and in fields during the summer. They were milked twice daily during the entire experimental period.

Milk production recording and milk composition analysis

The MY was recorded daily for 52 weeks. Milk samples were collected weekly for somatic cell counting (SCC) and milk composition analysis. Milk protein and fat contents were determined by an independent laboratory using an infrared method (Lillab, Chateaugiron, France).

Mammary tissue sampling

Mammary tissue samples were collected by biopsy at days 30 (B1), 90 (B2), 150 (B3) and 250 (B4) of lactation (adapted from the method of Farr et al. [25]). Mammary tissue samples were taken approximately halfway between the base of the teat and the dorsal body wall in a region containing a large amount of secretory tissue (right and left). For each animal, mammary biopsies were divided into three parts: one part was cut into small explants (1 mm³) for tissue digestion and cell isolation (stored in 90% Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco, 10270-106)/ 10% Di-Methyl-SulfOxide (DMSO) at -150°C), another part was directly frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until RNA extraction was performed and the last part was washed in Phosphate-Buffered Saline (PBS) before fixation for histological analysis. DMSO and PBS were purchased at Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier,

<http://www.sigmaaldrich.com/france>). FBS was purchased at Invitrogen (Gibco Invitrogen Saint Aubin, France, <http://www.invitrogen.com>).

Mammary biopsy digestion and single cell suspension

Tissue pieces were thawed and incubated for three hours at 37° C in a digestion medium containing Dulbecco's Modified Eagle Medium Nutrient Mixture F-12 (DMEM-F12, Gibco, 31331-028), 5% FBS, 5 µg/mL insulin (Sigma, 15523) , 1 µg/mL hydrocortisone (Sigma, H-0888) with 7000 U per mL of collagenase type II (Worthington 54N15271) and 2000 U per mL hyaluronidase (Sigma, H3506-G1). After centrifugation (5 minutes at 500 g at 4 ° C), 2 mL of trypsin- Ethylene-Diamine-Tetracetic Acid (EDTA, Sigma, T4049-100ML) was added to the pellet to complete the dissociation. After centrifugation, the pellet composed of cells and remaining tissue was drained through a specific filter of 70 µm (Miltenyi Biotec, <http://www.miltenyibiotec.com/en/>), washed with Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) 5% FBS to obtain a single cell suspension. Cells were processed for flow cytometry phenotyping. Collagenase was purchased at Serlabo (<http://www.serlabo.fr/index.php>).

Histological analysis

Mammary tissue samples collected by biopsy at 30, 90, 150 and 250 days of lactation were fixed in 4 % paraformaldehyde (pH 7.4) (Sigma Aldrich, P6118) for 2 h and paraffin-embedded (Sigma Aldrich, 327204) using standard protocols providing by the H2P2 platform (University of Rennes 1, France). Tissue sections (5 µm thickness) mounted on SuperFrostPlus slides (ThermoScientific, 4951PLUS4, Paris, France, <http://www.thermoscientific.com/en/home.html>) were deparaffinized in 3 different xylene baths and rehydrated in successive graded ethanol-water baths (100 % ethanol, 90 % ethanol, 70 % ethanol and distilled water). After rehydration, the tissue sections were either stained with hematoxylin and eosin or processed for immunohistochemical labeling. After hematoxylin/eosin staining and drying, the slides were scanned using NanoZoomer Digital Pathology technology (Hamamatsu, Kitsa, Sweden) with automatic detection of the whole tissue section.

Immunological staining procedure

For immunohistochemical labeling (CD10, CD49f, EpCAM, CD24 and α SMA), slides carrying 3 tissue sections were used. Two tissue sections per slide were processed for each primary antibodies labeling while the 3rd tissue section on each slide was used as a negative control. Following rehydration, the tissue sections were pre-incubated for 1 h in 0.2 % TBS-Triton with 1 % normal goat serum (NGS) and then incubated overnight at 4 °C with an anti-CD10, anti-CD49f, anti-EpCAM, anti-CD24 or α SMA antibody (diluted at 1:200). The primary antibody solution was replaced with a drop of 1 % TBS-NGS for negative control tissue sections. The slides were rinsed in TBS before incubation with adapted secondary antibody (diluted at 1:300) for 1 h at room temperature (20 °C). After being washed in TBS, the slides were treated with Hœchst 33258 dye (Sigma Aldrich, Lyon, France) and mounted with Vectashield mounting medium (H-1000, Vector Laboratories, Burlingame, USA). The tissue sections were observed under fluorescence using an Eclipse E400 Nikon microscope (Nikon France, Le Pallet, France), using both 568 nm and 350 nm wave length absorption/excitation.

RT-qPCR Procedure

Total RNA was extracted from tissue samples after grinding in liquid nitrogen with a mortar and pestle using Trizol (Invitrogen, Paris, France). Tissue powder was homogenized in 1 mL of Trizol reagent incubated for 5 min at room temperature before addition of 200 μ L chloroform (Sigma Aldrich). The mixture was centrifuged at 12,000 x g for 15 min at 4 °C, and the upper aqueous phase containing total RNA was recovered and mixed with 500 μ L of isopropyl alcohol to precipitate the RNA. Total RNA was extracted using the RNesay Mini Kit according to the manufacturer's instructions (Qiagen, 74014). Total RNA concentration and the 260 / 280 nm and 260 / 230 nm absorbance ratios were measured on a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). RNA quality was then determined on an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Massy, France) by RNA profile and RNA integrity number measured using Agilent 2100 Expert Software, version B.02 (Agilent Technologies, <http://www.agilent.com/home>). Subsequently, total RNA (1 μ g) was reverse-transcribed using Vilo SuperScript kit according to the manufacturer's recommendation (Invitrogen, 11754-050). The cDNA was diluted 1:50 prior to use in quantitative real time polymerase chain reaction (RT-qPCR). Following reverse transcription, RT-q PCR was run on a StepOne Plus system (Applied Biosystems). Triplicate 12.5 μ L

reactions were carried out in 96-well optical reaction plates (Applied Biosystems, <http://www.agilent.com/home>) using SYBR Green PCR master mix with 200 nM of specific primer (Cytokeratin 19: Forward 5' GGCGGGCAACGAGAAGC 3', Reverse 5' CGAGAATCTGGTCCCGCAG 3') and 2.5 μ L of diluted cDNA.

The amplification program consisted of an initial denaturation step at 95 °C for 10 min followed by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 10 sec and combined primer-annealing-extension at 60 °C for 1 min, during which fluorescence was measured. A melting curve was produced after completion of the thermal PCR program to check for the presence of a gene-specific peak and the absence of a primer dimer. Data raw Cycle Threshold (Ct) values obtained from raw StepOne Software version 2.3 (Applied Biosystems) were transformed to quantities using the comparative Ct method [26] and specific efficiencies. Ribosomal Protein Large P0 (RPLP0: Forward 5' CAACCCTGAAGTGCTTGACAT 3', Reverse 5' AGGAGATGGATCAGCCA 3') was used as the endogenous control gene. Results at days 90, 150 and 250 are expressed using day 30 as control.

Flow cytometry analysis

Cells obtained from mammary biopsy digestions were prepared for flow cytometry analysis with MACS buffer (autoMACS™ with 2% Bovine Serum Albumin) (Miltenyi Biotec, France, <http://www.miltenyibiotec.com>). Cells were dispensed at 500,000 cells in each respective tube. Cells were incubated in darkness at 4°C for 30 min with the either one or a mixture of the following antibodies (**Table 1**): Fluorescein isothiocyanate (FITC) anti-rat IgG1 CD49f (α 6 integrin), Allophycocyanine (APC) anti-rat IgG2bk CD24 (clone HAS), Vioblue® anti-mouse IgG1 CD326 (EpCam) (Miltenyi Biotec) and anti-mouse IgG1 PE-VIO700 CD10 (CALLA) (Miltenyi Biotec). Isotype controls were used for each antibody to set specific fluorescence eliminating non-specific background (Table 1). Then cells were centrifuged at 400 x g and re-suspended in 0.3 mL of MACS buffer. Multi-staining of the four antibodies was performed to determine specific populations. Propidium iodide (PI) was used to discriminate the live cells. Then, acquisition of this stained population was gated to forward-scattered light (FSC) and side-scattered light (SSC), to exclude dead cells and delimit cell granularity and size, as well as doublets by adjustments in height and photomultiplier voltage. Flow cytometry analysis was performed on a data set of 30000 events (single cells) using MACSQuant® Analyzer10 (Miltenyi Biotec) and data were analyzed using

MACSQuantify analysis software (Miltenyi Biotec). Results were expressed in percentages (dot plot analysis).

Table : 1 List of antibodies used in flow cytometry analysis

Antigen	Antibody	Manufacturer	Reference	Dilution
CD10	CD10-PE-Vio770, human (clone: 97C5)	Miltenyi Biotec	130-100-421	1:10
Isotype control	Mouse IgG1-PE-Vio770	Miltenyi Biotec	130-096-654	1:10
CD24	CD24-APC, mouse (clone: M1/69)	Miltenyi Biotec	130-102-733	1:10
Isotype control	Rat IgG2b-APC	Miltenyi Biotec	130-102-664	1:10
CD49f	CD49f-FITC, human and mouse (clone: GoH3)	Miltenyi Biotec	130-097-245	1:10
Isotype control	Rat IgG2a-FITC	Miltenyi Biotec	130-102-653	1:10
EpCAM	CD326 (EpCAM)-VioBlue, human (clone: HEA-125)	Miltenyi Biotec	130-097-324	1:10
Isotype control	Mouse IgG1-VioBlue	Miltenyi Biotec	130-099-089	1:10

Statistical analysis

Experiments were repeated three times. Milk composition, flow cytometry and qPCR data were analyzed by the analysis of variance (ANOVA one-way) using the following model: $y_{ij} = \mu + \text{time}_i + \varepsilon_{ij}$ (y =Flow cytometry data or qPCR data; μ = mean; i = time of biopsies and ε =residuals). Post-hoc Tukey pairwise were used. Significant differences were considered at $p < 0.05$. All statistical analyses were performed using the R software.

RESULTS

Milk yield of primiparous lactating dairy cows

The daily MY was recorded for the five primiparous lactating cows of this study from calving to the drying off period. At each time of mammary biopsies (30, 90, 150 and 250 days), the MY was significantly different, with 29.9 kg/day, 34.3 kg/day, 32.9 kg/day and 19 kg/day respectively ($p < 0.001$) (**Figure 1**).

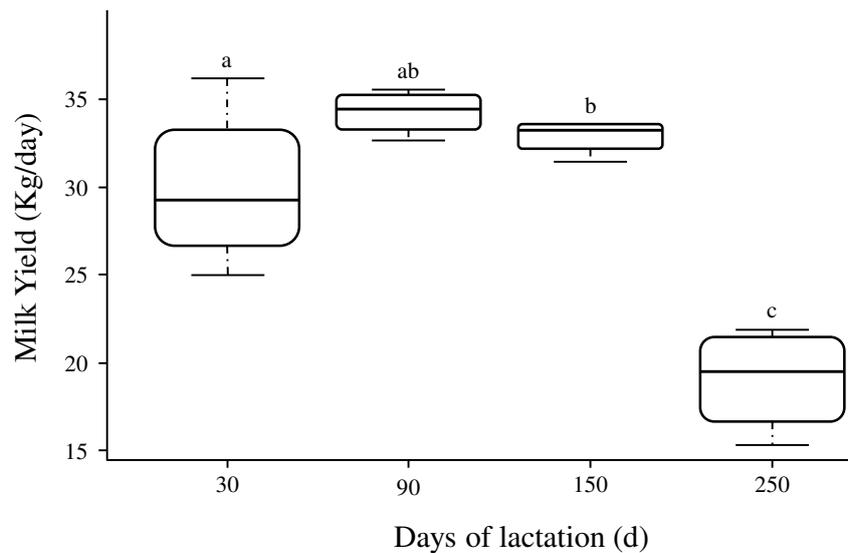


Figure: 1 Representative Booxplots of milk yield during the lactation cycle.

Each boxplot represents the mean (five dairy cows) of daily milk production (kg/day) at the indicated time prior to mammary biopsy. The different letters above the boxplots indicate the statistical significance ($p < 0.05$) of each value compared to other counterpart values.

The mean of daily MY described a classical curve of lactation with a peak of production at ≈ 60 days posts calving. We analyzed milk composition data and we observed that contents of fat and protein yields vary according to MY as expected during lactation in primiparous dairy cows (**Table 2**). For instance, SCC values were less than 250 (103 cells / mL) throughout the lactation leading healthy dairy cows and mammary glands. This prerequisite was the first step to validate our experimental model.

Table : 2 Milk yield, fat and protein contents and somatic cell count (SCC) during lactation.

	Biopsy			
	B1	B2	B3	B4
Days of lactation (d)	30	90	150	250
Milk Yield (Kg/d)	29,9 ± 1.2 ^a	34,3 ± 0.3 ^b	32,9 ± 0.3 ^{ab}	19,1 ± 0.8 ^c
Fat content (g/d)	46,9 ± 2.0 ^a	35,8 ± 1.6 ^{bc}	30,2 ± 2.0 ^c	39,9 ± 0.8 ^{ab}
Protein content (g/d)	29,6 ± 0.3 ^{ab}	26,3 ± 0.9 ^{bc}	24,5 ± 1.2 ^c	31,3 ± 0.8 ^a
SCC (10 ³ /mL)	111,2 ± 16.9 ^{ab}	54,2 ± 8.6 ^b	105 ± 17.0 ^{ab}	166,5 ± 33.7 ^a

Milk of five primiparous lactating cows was collected during all lactation. The MY was recorded daily over 52 weeks. Milk samples were collected weekly during the study for somatic cell counting and to determine the milk fat and protein composition. The data are expressed as the mean values (\pm SEM) at 30 (B1), 90 (B2), 150 (B3) and 250 (B4) days of lactation. Different letters indicate statistically significant ($p < 0.05$) differences in the comparison of each value of its three other counterpart values.

Mammary gland morphology and differentiation during lactation

The second step to validate our experimental approach was to check mammary gland morphology using eosin/hematoxylin staining of mammary section at each biopsy times (**Figure 2**). At 30 days of lactation, we observed mammary alveoli with small luminal spaces (**Figure 2**, left upper panel). At 90 days, luminal spaces appeared distinctly in relation with a high secretory activity at this time of lactation (**Figure 2**, right upper panel). At 150 days and 250 days of lactation, we noted the regression of the alveolar structure and the apparition of stromal taken the place of mammary epithelium at the end of lactation (**Figure 2**, lower panels).

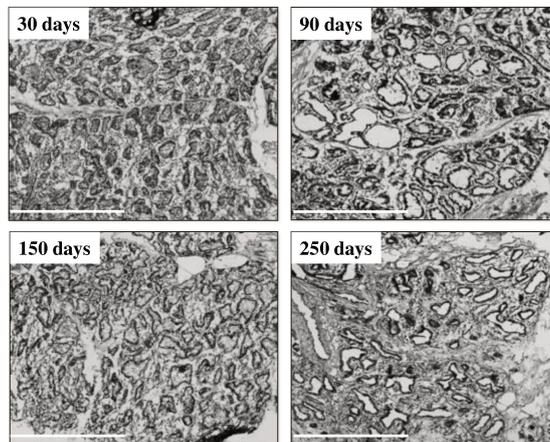


Figure: 2 Follow-up of mammary secretory tissue organization by histology during lactation.

Mammary tissues were collected at 30, 90, 150 and 250 days of lactation by biopsies was processed for hematoxylin/eosin histological staining. The scale bars represent 500 μ m.

Using RT-qPCR analysis, we analyzed the expression of the cytokeratin 19 (CK19) in each mammary sample over the lactation (**Figure 3**). We demonstrated that the level of this cytokeratin varied significantly during lactation with a maximum of expression at 150 days of lactation ($p < 0.05$).

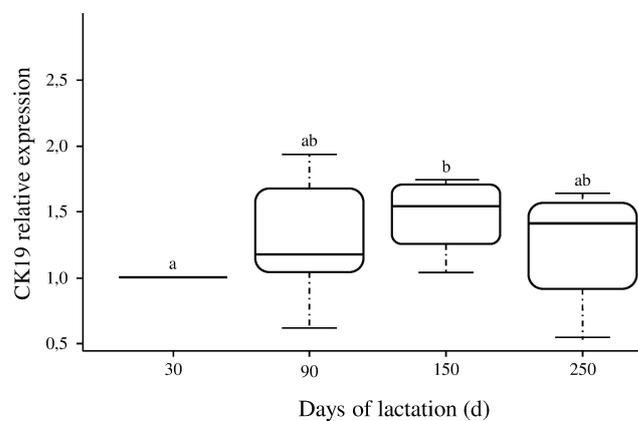


Figure: 3 Representative Boxplots of relative CK19 gene expression during the lactation cycle.

Each boxplot represents the mean (five dairy cows) of relative CK19 expression at the indicated time prior to mammary biopsy (RPLP0 was used as the reference gene). Different letters above the boxplots indicate statistically significant ($p < 0.05$) differences in the comparison of each value of its three other counterpart values.

In situ localization of cell surface markers in mammary gland tissue

To estimate the pertinence of the four lineage markers used (CD10, CD49f, CD24 and EpCAM), we characterized their expression in specific cell populations within mammary gland sections. DAPI staining allowed us to discriminate nuclei in the alveoli and stroma. Immunohistochemical labelling of CD10 showed a major staining of cells surrounded the luminal MEC layer corresponding to myoepithelial cells (**Figure 4A**, left panels). Additionally, alpha smooth muscle actin (α SMA) counterstaining was observed in myoepithelial cells layer around CD49f positive cells (**Figure 4A**, right panels). CD49f was expressed and localized in the basement of luminal MEC. Expression of CD24 and EpCAM was examined in situ. CD24 was only detected in some cells located in the luminal MEC layer. High magnification of CD24 staining confirmed the specific surface cell staining and localization (**Figure 4B**, left panels). Concerning EpCAM localization, we observed an apical staining in some luminal MEC within mammary acini (**Figure 4B**, right panels).

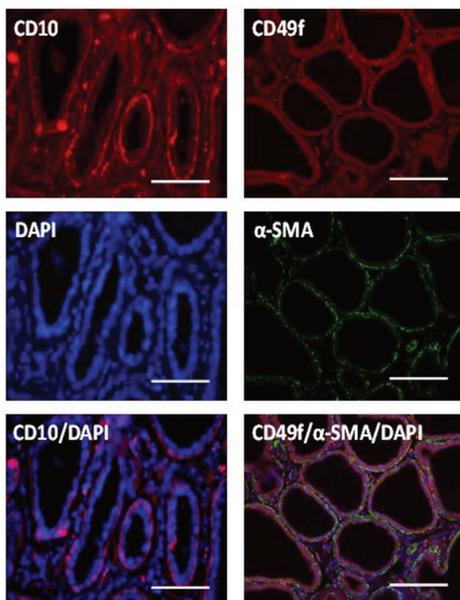


Figure 4A

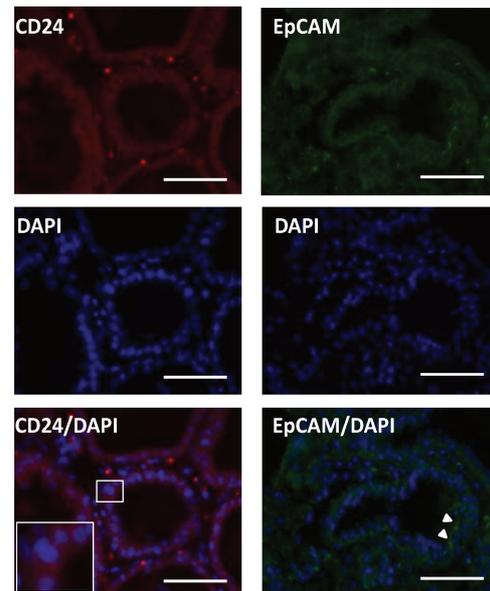


Figure 4B

Figure: 4 In situ localization of cell surface markers in lactating mammary gland.

(A) Left panels showed the staining of myoepithelial cells using CD10 antibody and nuclei were counterstained with DAPI. Right panels highlighted mammary luminal cells staining with CD49f and the myoepithelial cells stained with α -SMA. (B) Left panels showed the staining of some luminal cells using CD24 antibody. Right panels showed the apical staining (white arrows) in some luminal MEC within mammary acini using EpCAM antibody. The scale bars represent 50 μ m.

Gating strategy for flow cytometry data analysis

To validate the multicolor panel of four antibodies coupled with four different fluorochromes, we performed single staining with each antibody (**Table 3**) and Fluorescent Minor One for our multicolor panel.

Table : 3 Flow cytometry analysis of isolated cells dissociated from mammary biopsies using monostaining.

	Biopsy / Days of lactation (d)			
	B1	B2	B3	B4
Cell surface makers	30	90	150	250
CD24 ⁺	5.4 \pm 0.8	5.7 \pm 1.5	3.9 \pm 0.9	3.2 \pm 0.7
EpCAM ⁺	4.4 \pm 0.9	6,9 \pm 1.5	6.2 \pm 0.6	4.5 \pm 1.5
CD49 _f ⁺	47.0 \pm 3.9 ^a	44.1 \pm 3.6 ^a	38.6 \pm 2.6 ^{ab}	28.8 \pm 2.5 ^b
CD10 ⁺	4.0 \pm 0.7	5.7 \pm 1.0	3,9 \pm 0.6	4.7 \pm 2.1

At 30 (B1), 90 (B2), 150 (B3) and 250 (B4) days of lactation, mammary biopsies were collected and single cell suspensions were phenotyped using CD24, EpCAM, CD10 and CD49f antibodies. Each data correspond to the mean (\pm SEM) of fluorescence for each monostaining. Different letters indicate statistically significant ($p < 0.05$) differences in the comparison of each value of its three other counterpart values.

For this technical step essential to setup correctly multicolor assays, we used a manual compensation matrix based on the Median Fluorescence Intensity procedure. We ensured to analyze only single living cells by eliminating the cell aggregates and dead cells from our analysis. For eliminating aggregates, we performed doublets exclusion using FSC-H/A and

Résultats expérimentaux
 SSC-H/A parameters. We used PI to discriminate live cells from dead cells. This strategy is essential to analyze each cell surface markers in single live cells (**Figure 5A**). **Figure 5B** illustrates the strategy to analyze within a stained populations (here, the CD49f positive cells) the expression of our others cellular markers.

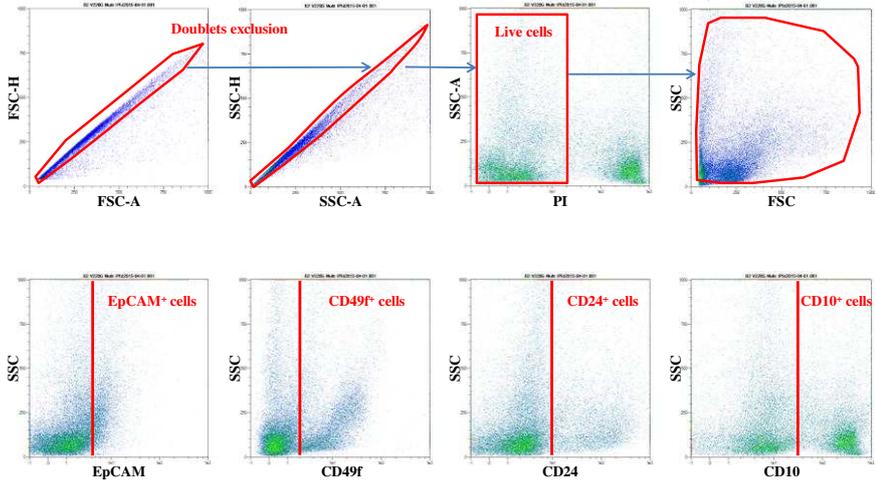


Figure 5A

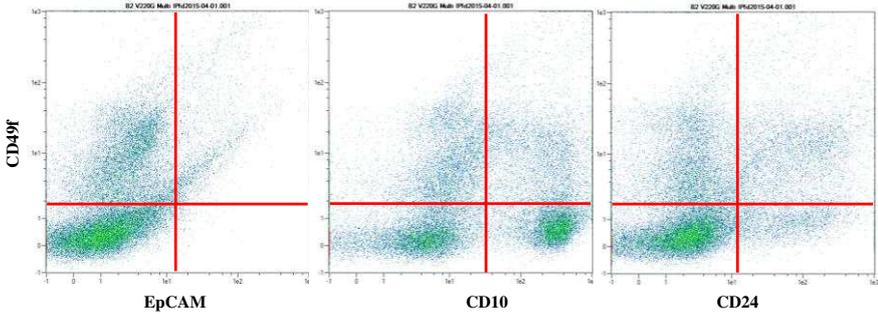


Figure 5B

Figure: 5 Gating strategy used in flow cytometry to analyze stained cell populations.

(A) Gating strategy to setup the analysis of single living cells. Doublets exclusion using FSC-H/A and SSC-H/A parameters were performed. Next, propidium iodide discriminated living cells from dead cells. On living cells, each monostaining was analyzed using CD49_f, CD10, CD24 and EpCAM antibodies. (B) Illustration of the gating strategy used to analyze the multi-stained populations. Gated CD49_f positive cells were selected and then co-immunostained populations were analyzed: CD49_f and EpCAM, CD49_f and CD10, CD49_f and CD24.

In our example, we gated on CD49f positive cells to analyze co-immunostained populations: CD49f and EpCAM, CD49f and CD10, CD49f and CD24. This procedure was applied for every cell surface marker (CD49f, CD10, CD24 and EpCAM).

Cell hierarchy and lineage in the bovine mammary gland during throughout lactation

After tissue dissociation and single cells isolation, we determined the proportion of each putative cell types according to the expression of cell surface markers for four stages of the lactation: B1 (30 days), B2 (90 days), B3 (150 days) and B4 (250 days). First, we analyzed the single staining of cells obtained as mentioned previously with CD24, CD10, and EpCAM and CD49f cell surface markers (**Table 4**).

Table : 4 Cell hierarchy and lineage in bovine mammary gland during a lactation period.

		Biopsy / Days of lactation (d)			
		B1	B2	B3	B4
Putative cell type	Cell surface makers	30	90	150	250
Mammary stem cells	CD49 _f ⁺ / CD24 ⁺	2.4 ± 0.8	3.3 ± 1.3	0.9 ± 0.3	0.7 ± 0.5
Bi-potent luminal progenitors	CD49 _f ⁺ / CD24 ⁻	38.2 ± 3.6 ^a	35.9 ± 2.3 ^a	31.9 ± 2.0 ^{ab}	23.8 ± 1.6 ^b
Lumino-ductal progenitors	CD49 _f ⁻ / EpCAM ⁺	0.7 ± 0.1	1.4 ± 0.4	1 ± 0.4	1.3 ± 0.7
Lumino-alveolar progenitors	CD24 ⁻ / EpCAM ⁺	1.3 ± 0.3	5.1 ± 1.8	2.6 ± 0.5	2.4 ± 1.1
Myoepithelial progenitors	CD10 ⁻ / CD24 ⁺	3.4 ± 0.7	4.9 ± 1.4	2.9 ± 0.6	2.4 ± 0.7
Mature lumino-ductal cells	CD49 _f ⁻ / EpCAM ⁻	55 ± 4.3 ^a	53.3 ± 2.8 ^a	57.9 ± 2.4 ^{ab}	68.5 ± 2.0 ^b
Mature lumino-alveolar cells	CD49 _f ⁺ / EpCAM ⁻	38 ± 3.9 ^a	31 ± 2.4 ^{ab}	28 ± 1.8 ^{bc}	21.5 ± 1.3 ^c
Mature myoepithelial cells	CD10 ⁺ / CD49 _f ⁺	2.6 ± 0.5	3.4 ± 1.0	1.7 ± 0.3	1.7 ± 1.2

After tissue digestion, cells dissociation and single cell isolation, proportion of each putative cell types according to expression of cell surface marker at four stages throughout lactation was determined: B1 (30 days), B2 (90 days), B3 (150 days) and B4 (250 days). Proportions of double stained cell population proportions using EpCAM, CD49_f, CD24 and CD10 markers were presented as the mean of fluorescence (\pm SEM). Different letters indicate statistically significant ($p < 0.05$) differences in the comparison of each value of its three other counterpart values.

We observed that the predominant population expressed CD49_f. Interestingly, the proportion of CD49_f positive cells significantly decreased over the lactation (B1: 47% vs. B4: 28.8%, $p < 0.005$). The proportions of the other single stained cell population, were lower ($< 7\%$) and their expression did not vary during lactation.

Next, we defined double stained cell populations using combination of CD10, CD49_f, CD24 and EpCAM markers. The different combination of markers was determined in accordance with their specific localization found by immunohistochemistry and the literature on other lactating species. From our data and literature, we proposed 3 putative categories of cell types: stem cells, progenitors and mature cells according to their differentiation status (Table 4). First, our results showed that the proportion of putative MaSC (CD24⁺ / CD49_f⁺) did not significantly evolve throughout the lactation. Concerning the progenitor populations, we found that the putative bi-potent luminal progenitor cells (CD24⁻ / CD49_f⁺) were the majority of cells among the putative progenitors. The proportion of this population significantly decreased during lactation from 38.2% (B1) to 23.8% (B4) ($p < 0.01$). The proportions of the other putative progenitors were very low (0.7% to 5.1%) and their expression did not vary during lactation. We focused next on mature (differentiated) cells. The cell populations with negative expression of EpCAM and the presence or not of CD49_f (CD49_f⁺ / EpCAM⁻ and CD49_f⁻ / EpCAM⁻) were the most abundant putative mature cells. Interestingly, the variations of both populations over the lactation are opposites: the putative lumino-alveolar cells significantly decreased while the putative lumino-ductal cells increased (respectively from 38% (B1) to 21.5% (B4) and from 55% (B1) to 68.5% (B4)). The third putative mature cells, the myoepithelial cells (CD49_f⁺ / CD10⁺) did not significantly vary in proportion between 30 days and 250 days of lactation and remained low (from 1.7% to 3.4%).

Correlation between putative mature cells proportion and milk yield

From further statistical analysis, we found a positive correlation between the proportions of CD49_f positive cells and the MY ($R^2 = 0.39$, $p < 0.001$). Number of CD49_f positive cells increased as level of milk production (**Figure 6A**). We observed an opposite

relation between proportion of putative lumino-alveolar cells and putative lumino-ductal cells related to MY (**Figure 6B** and **6C**).

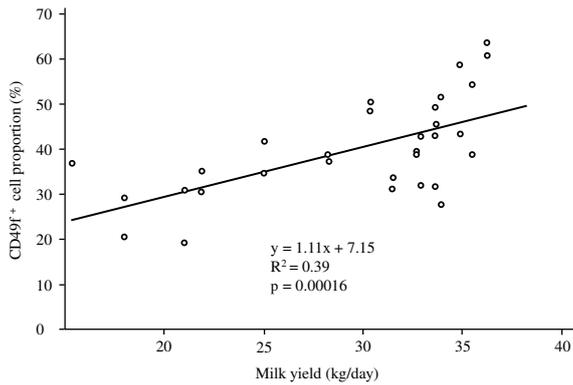


Figure 6A

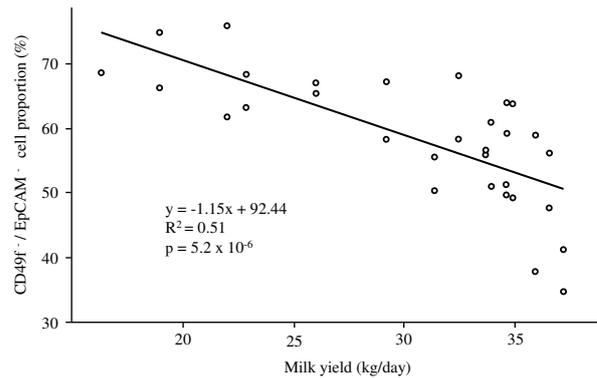


Figure 6B

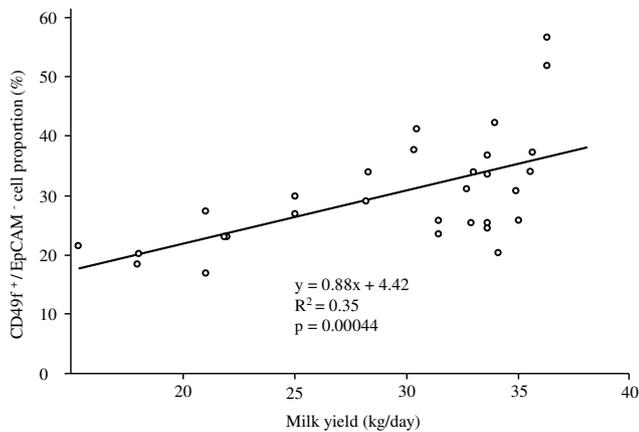


Figure 6C

Figure: 6 Analysis of correlation between proportions of cell population and milk yield (MY).

- (A) Correlation between CD49_f⁺ positive cells and MY ($R^2 = 0.39$, $p = 0.00016$).
- (B) Correlation between CD49_f⁻ / EpCAM⁻ cells proportion and MY ($R^2 = 0.51$, $p = 5.2 \times 10^{-6}$).
- (C) Correlation between CD49_f⁺ / EpCAM⁻ cells proportions and MY ($R^2 = 0.35$, $p = 0.00044$).

Indeed, the correlation between putative lumino-ductal cells (CD49_f⁻/EpCAM⁻) and milk production was negative ($R^2=0.51$, $p < 0.001$, **Figure 6B**) whereas the proportion of putative

lumino-alveolar cells (CD49f⁺ / EpCAM⁻) was positively correlated to milk production (R² = 0.35, p < 0.001, **Figure 6C**).

DISCUSSION

During the development of the mammary gland (mammaryogenesis) and lactation (galactopoiesis) in dairy cows, each cell population has a specific feature involved in mammary gland plasticity. Like most of the glandular tissue, the adult mammary gland is composed of many cell types that interact to shape the body and make it functional. In this study, we specifically focused on epithelial-like, myoepithelial and progenitor/stem cells implicated in mammary gland plasticity. The use of flow cytometry is a suitable method to analyze and to discriminate single cell phenotypes on precious and small samples such as mammary biopsies. In this study, we used flow cytometry to analyze and to lineage cell populations based on the expression of cell surface markers commonly used in the mammary gland field: CD49f, CD24, CD10 and EpCAM. Prerequisites of our study were to ensure that mammary explants sampling were representative of a lactating mammary gland. Thus, using five primiparous dairy cows, we first analyzed zootechnical data to ensure of their MY responses and of milk composition. A classical curve of lactation is defining by a peak of milk production located between 30 and 90 days of lactation and a decrease of milk production after this period. Observations of mammary morphology by histology using mammary gland sections and analysis of CK19 gene expression (a conventional marker of mature alveolar cells [27,28]) allowed us to validate the mammary sampling prior to phenotypic characterization of mammary cells. Indeed, morphological observations showed increasing luminal spaces in alveoli at 90 days of lactation, then decline with MY. These key events validated that mammary biopsies were well representative of the four chosen stages of lactation.

In this study, we demonstrated that cell populations expressing EpCAM and CD49f cell surface markers varied significantly and inversely during lactation from 30 days to 250 days of lactation. Indeed, 30 days after the beginning of lactation, the proportion of CD49f⁺ / EpCAM⁻ cells reached a maximum of expression (38%) while the proportion of CD49f⁻ / EpCAM⁻ cells started at a minimum of expression at 55%. In late lactation, we have shown that these proportions were reversed, with 21% of CD49f⁺ / EpCAM⁻ cells and 68.5% of CD49f⁻ / EpCAM⁻ cells. Moreover statistical correlations established between CD49f⁺ / EpCAM⁻ cells, CD49f⁻ / EpCAM⁻ cells and MY demonstrated that these two cell populations are related to milk production. Thus, when milk production increased, the proportion of CD49f⁺ / EpCAM⁻ cells increased whereas the proportion of CD49f⁻ / EpCAM⁻ cells

decreased. CD49f and EpCAM are cell surface markers associated with cell adhesion and very often used to phenotype mammary gland cells and their maturation degree. All these data and the literature strongly suggest that mammary alveolar cells involved in milk production (myoepithelial and lumino-alveolar cells) expressed CD49f while epithelial cells present in the mammary ducts (lumino-ductal cells) did not express CD49f. Additionally, it is well known that the loss of EpCAM is correlated with a decrease in progenitor activity [29]. Thus we highlighted that differentiated mature cells did not express EpCAM marker. Considering these results and the literature, we hypothesize that CD49f and EpCAM are suitable markers to discriminate mature luminal cells and their progenitors. In 2012, Rauner and Barash demonstrated that CD24⁻/CD49f⁺ cells are bi-potent progenitor's cells that give rise to luminal progenitors and then differentiated luminal cells. In human breast and in mouse mammary gland, CD24⁻/CD49f⁺ cells are also considered as bi-potent progenitor's cells through in vivo transplantation and in vitro experiments [30,31]. In our study, the proportion of CD24⁻ / CD49f⁺ cells significantly decreased during lactation (38% in early lactation vs. 23.8% in late lactation). In the lactating mammary gland, the self-renewal of MEC is constantly ensured by two mechanisms that are cell proliferation and programmed cell death (apoptosis). Capuco et al. (2001) estimated that in bovine lactating mammary gland, the average rate of proliferation was about 0.3% per day and the average rate of apoptosis was about 0.56% per day, corresponding to a cell turnover of approximately 50% during lactation [32]. Progenitor cells are the main actors of this biological process because they both proliferate and give rise to differentiated cells involved in the milk synthesis; these cells are then removed from the mammary epithelium by apoptosis. Thus, the high proportion of bi-potent progenitor cells found in early lactation is consistent with the literature.

In order to perform a complete lineage and cell hierarchy in bovine lactating mammary gland, we focused on myoepithelial cells and their putative progenitors. A characteristic of myoepithelial cells is a dual phenotype of both smooth muscle (positive for α SMA) and epithelial cells [33]. Myoepithelial cells also express CD10 (neutral endopeptidase). Clarke et al. (1994) used CD10 as myoepithelial marker to separate luminal cells from myoepithelial cells by immunomagnetic techniques [34]. In 2009, Ellis et al. showed that CD10 was a marker expressed by myoepithelial cells within mammary gland in heifers during mammogenesis. In our study, immunolocalization of CD10 on lactating mammary gland sections confirmed that CD10 was specifically expressed by myoepithelial cells [24]. Thus, we included CD10 in our flow cytometry panel to deeply phenotype myoepithelial cells. Based on the presence of CD49f at the surface of basal epithelial cells [35], we decided to combine CD49f and CD10 to analyze mature myoepithelial cells. Our

results showed that CD49f⁺ / CD10⁺ cell population as CD10⁺ population were slightly present without significant variation from B1 to B4. This stable proportion of putative myoepithelial cells assumes that this population must be conserved during all the lactation. The same process has also been observed in skeletal muscle where the proportion of satellite cells is conserved for muscle homeostasis [36]. In murine mammary gland, the presence of mature and functional myoepithelial cells has been associated to the identification of myoepithelial progenitors and their expression of CD24 [5]. Despite a very scarce literature about myoepithelial progenitor phenotype, the transition from progenitors to differentiated cells occurs with different modifications such a switch of cell surface markers. Hence, we hypothesized that putative bovine myoepithelial progenitors were CD10⁻ / CD24⁺. This hypothesis is supported by our immunostaining data demonstrating that CD10⁺ cells were only mature myoepithelial cells.

In many reports, the expression of CD24 is associated with stem cell phenotype. In 2006, Shackleton et al. isolated discrete subpopulation of mouse mammary cells on the basis of cell-surface markers (Lin-CD29^{hi}CD24⁺). They showed that a single cell of this subpopulation, marked with a LacZ transgene, could reconstitute a complete mammary gland *in vivo*. The transplanted cell contributed to both the luminal and myoepithelial lineages and generated functional lobulo-alveolar units during pregnancy. The self-renewing capacity of these cells was demonstrated by serial transplantation of clonal outgrowths. Here, we found by immunolocalization that CD24 was expressed by some luminal cells within the mammary epithelium. Rauner and Barash (2012) also exhibited CD24⁺ cells in the luminal compartment of developing mammary gland sections in heifers. With the combination of CD49f and CD24 markers for primary MEC sorting, they isolated CD24⁺ / CD49f⁺ cell population that were able to form large mammospheres *in vitro*. They also showed that these cells had a high proliferation rate and were able to form organized colonies. These proliferative properties of undifferentiated cells define a stem cell phenotype with the ability to multipotency and self-renewing. Thus, these specifications allowed defining the CD24⁺/CD49f⁺ population as putative mammary stem cells. In our study, this population was present throughout lactation with a maximum proportion (3.3%) observed at 90 days of lactation ($p < 0.10$). Therefore the CD24⁺ / CD49f⁺ population could play this role in bovine mammary gland. In conclusion, we defined a stem cell population (CD24⁺ / CD49f⁺) and four progenitor cell populations: bipotent luminal progenitors (CD24⁻ / CD49f⁺), lumino-alveolar progenitors (CD24⁻ / EpCAM⁺), myoepithelial progenitors (CD24⁺ / CD10⁻) and lumino-ductal progenitors (CD49f⁻ / EpCAM⁺). From these data, we propose a cell hierarchisation schema of the mammary gland in lactating dairy cows (Figure fournie dans la discussion).

This study provides a dynamic view of the mammary populations based on the common markers used in mammary lineage. Our next goal will be to carry out the same analyzes on mammary gland at different physiological stages: before and after puberty, during gestation, as well as at the peak of lactation and at drying-off. The analysis of functional proteins (cytokeratins, steroid receptors, aldehyde dehydrogenase activity) will be performed on sorted cells isolated among the different populations described in this study and combined with mammospheres' assays. In summary, this study contributes not only to better understand the role of stem cells in the plasticity of the mammary gland but also to identify new biomarkers for use in veterinary and human medicine.

LITTERATURE

1. Boutinaud M, J Guinard-Flament and H Jammes. (2004). The number and activity of mammary epithelial cells, determining factors for milk production. *Reproduction Nutrition Development* 44 499-508.
2. Chiche A, M Moumen, V Petit, J Jonkers, D Medina, MA Deugnier, MM Faraldo and MA Glukhova. (2013). Somatic loss of p53 leads to stem/progenitor cell amplification in both mammary epithelial compartments, basal and luminal. *Stem Cells* 31:1857-67.
3. Inman JL, C Robertson, JD Mott and MJ Bissell. (2015). Mammary gland development: cell fate specification, stem cells and the microenvironment. *Development* 142:1028-42.
4. Stefanon B, M Colitti, G Gabai, CH Knight and CJ Wilde. (2002). Mammary apoptosis and lactation persistency in dairy animals. *Journal of Dairy Research* 69:37-52.
5. Visvader JE and J Stingl. (2014). Mammary stem cells and the differentiation hierarchy: current status and perspectives. *Genes & Development* 28:1143-58.
6. Ellis SE and AV Capuco. (2002). Cell proliferation in bovine mammary epithelium: identification of the primary proliferative cell population. *Tissue and Cell* 34:155-163.
7. Borena BM, L Bussche, C Burvenich, L Duchateau and GR Van de Walle. (2013). Mammary stem cell research in veterinary science: an update. *Stem cells and development* 22:1743-51.
8. Deome KB, LJ Faulkin, Jr., HA Bern and PB Blair. (1959). Development of mammary tumors from hyperplastic alveolar nodules transplanted into gland-free mammary fat pads of female C3H mice. *Cancer Research* 19:515-20.
9. Medina D and GH Smith. (1999). Chemical carcinogen-induced tumorigenesis in parous, involuted mouse mammary glands. *Journal of the National Cancer Institute* 91:967-9.
10. Ormerod EJ and PS Rudland. (1986). Regeneration of mammary glands in vivo from isolated mammary ducts. *Journal of embryology and experimental morphology* 96:229-43.
11. Baratta M, MG Volpe, D Nucera, G Gabai, N Guzzo, M Faustini and E Martignani. (2015). Differential expression of living mammary epithelial cell subpopulations in milk during lactation in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 98:6897-904.
12. Martignani E, P Eirew, P Accornero, CJ Eaves and M Baratta. (2010). Human milk protein production in xenografts of genetically engineered bovine mammary epithelial stem cells. *PloS one* 5:e13372.

13. Shackleton M, F Vaillant, KJ Simpson, J Stingl, GK Smyth, ML Asselin-Labat, L Wu, GJ Lindeman and JE Visvader. (2006). Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature* 439:84-8.
14. Stingl J, P Eirew, I Ricketson, M Shackleton, F Vaillant, D Choi, HI Li and CJ Eaves. (2006). Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells. *Nature* 439:993-7.
15. Rauner G and I Barash. (2012). Cell hierarchy and lineage commitment in the bovine mammary gland. *PloS one* 7:e30113.
16. Ghebeh H, GM Sleiman, PS Manogaran, A Al-Mazrou, E Barhoush, FH Al-Mohanna, A Tulbah, K Al-Faqeeh and CN Adra. (2013). Profiling of normal and malignant breast tissue show CD44high/CD24low phenotype as a predominant stem/progenitor marker when used in combination with Ep-CAM/CD49f markers. *BMC Cancer* 13:289.
17. Shehata M, A Teschendorff, G Sharp, N Novcic, IA Russell, S Avril, M Prater, P Eirew, C Caldas, CJ Watson and J Stingl. (2012). Phenotypic and functional characterisation of the luminal cell hierarchy of the mammary gland. *Breast cancer research : BCR* 14:R134.
18. Prpar S, E Martignani, P Dovc and M Baratta. (2012). Identification of goat mammary stem/progenitor cells. *Biology of Reproduction* 86:117.
19. Dey D, M Saxena, AN Paranjape, V Krishnan, R Giraddi, MV Kumar, G Mukherjee and A Rangarajan. (2009). Phenotypic and functional characterization of human mammary stem/progenitor cells in long term culture. *PloS one* 4:e5329.
20. Dontu G, WM Abdallah, JM Foley, KW Jackson, MF Clarke, MJ Kawamura and MS Wicha. (2003). In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes & Development* 17:1253-70.
21. Villadsen R, AJ Fridriksdottir, L Ronnov-Jessen, T Gudjonsson, F Rank, MA LaBarge, MJ Bissell and OW Petersen. (2007). Evidence for a stem cell hierarchy in the adult human breast. *The Journal of cell biology* 177:87-101.
22. Maguer-Satta V, R Besancon and E Bachelard-Cascales. (2011). Concise review: neutral endopeptidase (CD10): a multifaceted environment actor in stem cells, physiological mechanisms, and cancer. *Stem Cells* 29:389-96.
23. Moritani S, R Kushima, H Sugihara, M Bamba, TK Kobayashi and T Hattori. (2002). Availability of CD10 immunohistochemistry as a marker of breast myoepithelial cells on paraffin sections. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 15:397-405.
24. Safayi S, N Korn, A Bertram, RM Akers, AV Capuco, SL Pratt and S Ellis. (2012). Myoepithelial cell differentiation markers in prepubertal bovine mammary gland: effect of ovariectomy. *Journal of Dairy Science* 95:2965-76.
25. Farr VC, K Stelwagen, LR Cate, AJ Molenaar, TB McFadden and SR Davis. (1996). An improved method for the routine biopsy of bovine mammary tissue. *Journal of Dairy Science* 79 543-549.
26. Livak KJ and TD Schmittgen. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-8.
27. Moll R, M Divo and L Langbein. (2008). The human keratins: biology and pathology. *Histochemistry and cell biology* 129:705-33.
28. Ontsouka EC, JS Bertschi, X Huang, M Luthi, S Muller and C Albrecht. (2016). Can widely used cell type markers predict the suitability of immortalized or primary mammary epithelial cell models? *Biological research* 49:1.

29. Stingl J, CJ Eaves, I Zandieh and JT Emerman. (2001). Characterization of bipotent mammary epithelial progenitor cells in normal adult human breast tissue. *Breast Cancer Research and Treatment* 67:93-109.
30. Keller PJ, AF Lin, LM Arendt, I Klebba, AD Jones, JA Rudnick, TA DiMeo, H Gilmore, DM Jefferson, RA Graham, SP Naber, S Schnitt and C Kuperwasser. (2010). Mapping the cellular and molecular heterogeneity of normal and malignant breast tissues and cultured cell lines. *Breast cancer research : BCR* 12:R87.
31. Smith GH and D Medina. (2008). Re-evaluation of mammary stem cell biology based on in vivo transplantation. *Breast cancer research : BCR* 10:203.
32. Capuco AV, D Wood, R Baldwin, K McLeod and M Paape. (2001). Mammary cell number, proliferation, and apoptosis during a bovine lactation: relation to milk production and effect of bST. *Journal of Dairy Science* 84:2177-2187.
33. Adriance MC, JL Inman, OW Petersen and MJ Bissell. (2005). Myoepithelial cells: good fences make good neighbors. *Breast cancer research : BCR* 7:190-7.
34. Clarke C, J Titley, S Davies and MJ O'Hare. (1994). An immunomagnetic separation method using superparamagnetic (MACS) beads for large-scale purification of human mammary luminal and myoepithelial cells. *Epithelial cell biology* 3:38-46.
35. Sarrio D, CK Franklin, A Mackay, JS Reis-Filho and CM Isacke. (2012). Epithelial and mesenchymal subpopulations within normal basal breast cell lines exhibit distinct stem cell/progenitor properties. *Stem Cells* 30:292-303.
36. Demontis F, R Piccirillo, AL Goldberg and N Perrimon. (2013). Mechanisms of skeletal muscle aging: insights from *Drosophila* and mammalian models. *Disease models & mechanisms* 6:1339-52.

Discussion générale

Discussion Générale

The main objectives of this thesis were to identify and obtain a biomarker's panel for characterizing the presence of specific cell populations during lactation in the bovine mammary gland and to provide knowledge about the current understanding of cell plasticity during a lactation cycle. To accomplish both objectives, we carried out several *in vitro* and *in vivo* studies.

The *in vitro* study was based on the utilization of specific clusters of differentiation or cell surface markers as biomarkers to identify cell populations in the bovine BME-UV1 and MAC-T mammary cell lines. Through this *in vitro* study, we decided to evaluate the expression of these biomarkers using BME-UV1 and MAC-T cells, commonly called as 2D (adherent) and 3D (adherent and non-adherent) supports, and to determine their performance abilities. The biomarkers selection was based on literature studies made in other species, notably mice and humans since bovine mammary biomarkers had not been extensively investigated and data on the use of suitable biomarkers is lacking. We chose CD49f, CD24, CD10 and EpCAM biomarkers as previous studies revealed them to be capable of identifying the main cell types (Borena et al., 2013) in mammary gland. This study helped us to define a panel of biomarkers and to understand the actual origin and phenotype of BME-UV1 and MAC-T.

The *in vivo* study consisted on taking four biopsies from five primiparous Holstein cows on 30 (B1), 90 (B2), 150 (B3) and 250 (B4) days of a lactation cycle. The production of milk was recorded continuously over a 52 weeks period. Milk samples were taken to evaluate protein and fat content composition as well as somatic cell counts. We isolated mammary cells from tissue biopsies to identify the presence of different cell types and populations during a lactation cycle. The characterization of cells was conducted using biomarkers (CD49f, CD24, CD10 and EpCAM), following mono-staining and multiple-staining protocols, to discriminate between cell populations by flow cytometry.

To evaluate the accuracy of cells populations, histological and functional assays were performed. These studies helped us to determine for the first time the precise cellular phenotypes which compose the bovine mammary gland and govern the course of lactation in dairy cows. This discussion is based on the main findings in our *in vitro* and *in vivo* studies. In the following paragraphs we will discuss the use and selection of biomarkers, followed by the

characterization of cellular plasticity in populations throughout lactation, the utility of studying mammary cells by biomarkers in the lactating cow.

1. The biomarkers CD49f, CD24, CD10 and EpCAM allow us to identify cell types and cell populations within the mammary gland of lactating cows

We decided to use flow cytometry due to the fact that it is a technology that allows us to identify and characterize (quantitatively and qualitatively) cell populations in a refine and precise way (Shapiro, 2003) compared with other (qPCR, western blot etc.) laboratory tools. In order to know if the biomarkers were highly expressed during lactation in the mammary gland, we tested them in BME-UV1 and MAC-T cells in 2D and 3D supports. BME-UV1 and MAC-T mammary cell lines have been largely used as in vitro mammary gland models during lactation (Huynh et al., 1991; Zavizion et al., 1996). Working with BME-UV1 and MAC-T cell lines helped us to test different available cell biomarkers due to cell lines' stability and easily manipulation. The 2D adherent support is commonly used in culture cells in vitro, however, when cells are cultured in 3D supports, mammary cells revert to in vivo spatial orientation and recall natural tissue conditions (Dontu et al., 2003).

1.1. C49f identifies mammary epithelial cells in the bovine mammary gland

The CD49f biomarker identifies epithelial (MEC and myoepithelial) cells in the mammary gland of mice, humans, cow, dog and horse. However, most of these studies mention that CD49f is expressed in a “normal” mammary gland and the precise CD49f cell expression regarding mammary gland phase remains unclear (Lambert et al., 2012 ; Raymond et al., 2012 ; Borena et al., 2013). Since the expression of CD49f has been studied in the mammary gland of heifers (Rauner and Barash, 2012) but it has not been studied in lactating cows, we decided to firstly evaluate its expression in BME-UV1 and MAC-T cells under two different culture conditions (2D and 3D). Our results confirmed the presence of CD49f in the bovine mammary cells BME-UV1 and MAC-T. Its expression gave us the answer to continue using this biomarker in bovine mammary cells and the suitability for its use in further phenotyping lactating mammary gland cells. This justified the further use of CD49f in our in vivo study. The expression of CD49f in our in vitro study corresponded with the origin of BME-UV1 and MAC-T as they were obtained from the mammary gland of lactating cows (Zavizion et al., 1996).

Additionally, expression of biomarker CD49f was relatively high (~99%) compared to the other biomarkers in the mono-staining analysis of the lactating mammary gland in our *in vivo* study. Our combined *in vitro* and *in vivo* results confirmed the role of CD49f as a biomarker that identifies mammary epithelial cells during the lactation cycle. Our *in vitro* results are supported by the high proportion of CD49f cells (~99%) previously found in the mammary glands of lactating mares (Spaas et al., 2012).

We observed that the expression of CD49f was differing when BME-UV1 and MAC-T cells were cultured in 3D Matrigel and ULA supports. The higher expression of CD49f and its performance in 3D supports showed us that BME-UV1 cells have a luminal phenotype. This corresponds with mammary cells' capacity to form sphere-like (mammospheres) structures when cultured in 3D supports (Barcellos-Hoff et al., 1989 ; Dontu et al., 2003 ; Riley et al., 2010).

There are some studies related to differentiation patterns and the mammosphere capacity in mammary cells (Kleinman and Martin, 2005). There is a reason to believe that a cellular population was "activated" when BME-UV1 was cultured in Matrigel in our *in vitro* study. This population could be represented by stem/progenitor cells in BME-UV1 3D Matrigel due to the higher size increment of mammospheres during culture (Vaillant et al., 2011 ; Dong et al., 2013).

1.2. CD10 identifies myoepithelial cells in the bovine mammary gland

We also studied the CD10 biomarker since it has been used as a marker of myoepithelial cells in the mammary gland of heifers (Safayi et al., 2012). We found a higher expression in BME-UV1 cells in 2D and 3D (ULA and Matrigel) supports compared to MAC-T. Our results agree with those of Bachelar-Cascales et al. (2010), where the ability to form spheres and renewing capability in MECs were related to CD10⁺ expression. Furthermore, the expression of CD10 in our *in vitro* study is in line with the higher expression of ALDH in BME-UV1 cells and with the presence of stem/progenitor cells (Bachelard-Cascales et al., 2010). Therefore, for a better interpretation, the analysis of CD10 was used in conjugation with other biomarker (CD49f and CD24) since CD10 can be also implicated during epithelial-mesenchymal morphogenesis (Maguer-Satta et al., 2011). Therefore and as reported in literature, in our *in vivo* experiment the expression of CD10 in the mammary gland of lactating cows served to identify myoepithelial-like cells.

1.3. The identification of biomarkers in stem/progenitor cells in the mammary gland bovine

We have decided to evaluate the expression of the enzyme ALDH which has been previously used to identify stem cells from luminal progenitor cells in the human mammary gland (Eirew et al., 2012). For this reason, we have focused our research on studying in vitro MAC-T and BME-UV1 stem/progenitor capabilities. We found higher ALDH expression along with sphere formation in the BME-UV1 than in the MAC-T cells, which it allowed us to establish a closer luminal committed profile and renewing capabilities between the enzyme ALDH and the BME-UV1 cells. It agrees with previous research where it was observed an elevated ALDH activity in primitive stem-like luminal epithelial cell fractions from human breast tissue (Eirew et al. 2012). Our results for BME-UV1 cells are in line with studies carried out by Cravero et al. (2015) as they identified the presence of stem-like cell populations in the adult cow by the expression of ALDH⁺ in the mammary gland. Results from our in vivo study also confirm in vitro results as the presence of stem and progenitor cells in adult lactating cows were evident.

In addition to ALDH, we have also evaluated the expression of CD24 by taking into consideration previous work to identify stem or progenitor cells based on their repopulating capacity in fat pad transplants from the mammary gland of virgin mice (Sleeman et al., 2006). The results from our in vivo study agree with their findings, we have observed expression of CD24⁺ in stem/progenitor cells of the lactating mammary gland. Due to it has been demonstrated that the multiple staining quantitative method allows determining cell's hierarchy populations in a more defining way (Stingl et al., 2006), the use of CD24 would describe better the population of interest when use combined with other biomarkers like CD49f (Rauner and Barash, 2012).

1.4. The immortal BME-UV1 and MAC-T cells possess a different epithelial phenotype

In relation to the expression of CD24 in our in vitro study, BME-UV1 and MAC-T cells scarcely showed an expression of CD24 when cultured in 2D and 3D supports. The BME-UV1 cells showed higher CD24 expression in adherent supports while the MAC-T cells showed higher expression in Matrigel supports. However, this could be due to the BME-UV1 and MAC-T cells were experiencing some post-immortal modifications during their establishment. It is possible that the MAC-T cells lose their phenotype and undergo the epithelial mesenchymal transition (EMT). It has been previously observed in immortalized hepatic cells. Takenouchi et al. (2010) found that immortal hepatic cells were able to change

their phenotype from epithelial cell to mesenchymal cells due to the influence of cell's medium composition. The hypothesis that the MAC-T cells underwent the EMT in our study was confirmed by higher fibronectin expression in ULA supports after 6 days of culture. The EMT in the MAC-T cells is further supported in other studies by the expression of vimentin, a typical marker during this process (Ontsouka et al., 2016). During the EMT process, disassembly of polarity and reorganization of epithelial components such as integrins and cytokeratin shifts occurs (Vincent-Salomon and Thiery, 2003 ; Manninen, 2015).

Mammary epithelial cells lose their cell-cell adhesion and CDH-1 expression when they experience the EMT and metastasis (Onder et al., 2008). In contrast, our results showed that the MAC-T cells formed a conglomerate of cells and continued expressing CDH-1 in 3D ULA supports. The expression of CDH-1 in MAC-T ULA supports could be explained by the fact that the MAC-T cells do not have the capacity to form tumor nodules when injected into mouse tissue (Huynh et al., 1991). However, the high expression of fibronectin in 3D ULA supports corroborates the hypothesis that the MAC-T cells might be passing by the EMT program.

As mentioned in chapter 3 of this thesis, in the section related to bibliography synthesis (cf. chapitre 3,2.1.1) , the MAC-T cells are able to react at hormonal presence depending on in vitro culture medium. The MAC-T cells have been treated with prolactin hormone to observe their MEC performance (Huynh et al., 1991). Evidently, the MAC-T cells behave as the MEC cells when hormones are added into the medium (prolactin, progesterone or either growth hormone). It explains the lactating profile of the MAC-T cells in other studies (Zhou et al., 2008 ; Hosseini et al., 2013 ; Johnson et al., 2013). Furthermore, immortalized cells have the ability to differentiate and dedifferentiate (change their cell type) from the mesenchymal to the epithelial phenotype depending on culture's medium additives (Takenouchi et al., 2010). In order to accomplish our primary research purposes, we have decided to use a medium without adding hormones to study the MAC-T and the BME-UV1 cells in a more "neutral" medium to approach their remaining "original" phenotype when established.

The expression of EpCAM was found also in both BME-UV1 and MAC-T cells in our in vitro study. Our results are supported by the expression of EpCAM in luminal cells and the slight staining of myoepithelial cells in lactating goats (Prpar et al., 2012). We have found that the transcription factor STAT5 was absent in the MAC-T cells, whereas it was expressed in 2D and 3D cultures of the BME-UV1 cells. In addition, we have observed higher expression

of STAT5 in the BME-UV1 compared with the MAC-T cells using Matrigel. It provided evidence of its similarities to luminal MECs. These findings agree with the necessity of STAT5 presence for the differentiation and function of luminal cell lineage. In contrast, the absence of STAT5 in the MAC-T cells coincides with the failure of alveolar luminal progenitor cells development in the mouse mammary gland (Yamaji et al., 2013).

In our *in vitro* study, the lack of STAT5 in the MAC-T cells and of CK19 in 2D and 3D is an evidence of its non-luminal phenotype. The ductal-origin of the MAC-T cells was supported by the expression of CD49f (Villadsen et al., 2007). However, a recent study demonstrated the high expression of α -SMA marker in MAC-T (Ontsouka et al., 2016). In that study, the MAC-T cells were compared with mammary epithelial cells of cows which were in mid and late lactation. The results found by these authors are in line with our *in vitro* results which showed that the MAC-T cells might have a myoepithelial-like phenotype.

To summarize, these results probed our biomarker's selection and their appropriated utilization to phenotype the mammary gland of lactating cows. The use of biomarkers (CD49f, CD24, CD10 and EpCAM) in immortalized bovine BME-UV1 and MAC-T cells confirmed their functional presence in mammary lactating cells. In addition, the use of these two immortal cells showed that the BME-UV1 cells possess a closer luminal-like phenotype which resembles bovine MECs. On the other hand, the MAC-T cells showed a closer ductal-like and myoepithelial cell characteristics.

2. Cell types (stem, progenitor and mature) and mammary gland plasticity throughout lactation in the cow

In our *in vivo* study, mammary tissue was obtained by biopsies; it allowed us to take samples from the mammary tissue throughout a complete lactation cycle. During our *in vivo* study, somatic cells counts (SCC) were determined in milk and the lowest and the highest counts were ranging from 54 to 166 $\times 10^3$ cell/mL. Our results correspond with normal SCC from lactating cows where less than 200 $\times 10^3$ cells/mL are considered as typical values from uninfected animals, while milk samples from cows with SCC greater than 400 $\times 10^3$ are considered under mastitis infection (Akers, 2002). The measurements of milk fat and protein rate composition were under classical variations and were not affected by biopsy sampling since milk yield recovery occurred as reported in other studies and did not affect mammary gland after the procedure (Farr et al., 1996). Given that the mammary gland of the cow is a large organ, samples were taken from an area which is rich in secretory tissue and contains

alveolar tissue in the right and left quarter sides (Farr et al., 1996). In spite of the fact that our study represents a proportion of tissue collected from the whole mammary gland; however, our cell populations at different stages during the lactation are representatives of a cycle and corresponded with the typical populations found in lactating cows.

2.1. Cell types (stem, progenitor and mature cells) during lactation in the cow

2.1.1. Stem and bi-potent cells are mammary gland cells reserve

The expression of CD49f⁺/CD24⁺ cells populations and their performance during lactation made us to hypothesize about the fact that they might belong to stem-like cells in the mammary gland. Even if this cellular proportion did not evolve significantly during a lactation cycle the percentage of these stem like cells (CD49f⁺/CD24⁺) increment in B2 and it made us to think that the mammary gland growth continues slowly and that is possible due to the fact that a stem-like population is repopulating (Capuco et al., 1997 ; Capuco et al., 2001). Some studies have shown that stem cells are slow-cycling in the adult mammary gland and that their division capacity is under the influence of their environment. Although the presence of stem cells is slightly low, it has been demonstrated in other study that a single stem cell has the capacity to repopulate an important area of tissue in the mammary gland and generate many daughters (Stingl et al., 2006).

In spite that it was thought that myoepithelial and luminal progenitor cells came from the same common progenitor cell (Visvader and Lindeman, 2006 ; Asselin-Labat et al., 2008), previous reports using cell biomarkers have shown that luminal cells and myoepithelial cells come from a different ancestor. Today we know that stem cells divide and give rise to distinct luminal and basal (myoepithelial) progenitor cells. Within the luminal lineage, a luminal bi-potent progenitor cell can give origin to two luminal cells: a lumino-alveolar cell and a lumino-ductal progenitor cell (Visvader and Stingl, 2014). In our in vivo study the expression of CD49f⁺/CD24⁺ populations corresponded to the bi-potent progenitor cells, as previously was reported in literature (Rauner and Barash, 2012).

Capuco et al. (2001) has reported that the percentage of new cells usually represent the 50% of the cells which were originally present and the proliferation rate is considered to reach at least 0.3% per day while apoptotic rate is 0.56% during lactation in the mammary cow. Those studies contrast the idea that even if mammary gland lose some cells during lactation, the presence of bi-potent cells helps to maintain cell populations by cell renewal in the

mammary gland of cows. In addition, our results evidence that this bi-potent population remains higher during a complete lactation cycle. These results agree with those reported on the literature, where progenitor cells can survive during mammary gland evolution and those cells retain their restricted profile. The presence of bi-potent cells during the active life could derive from the same cell ancestor during different stages of development (Rodilla et al., 2015). There is a hypothesis which establishes that cells involved in mammary gland's development remain after birth. By studying cellular progeny we would be able to validate our results in the lactating mammary gland. Current studies are being carried out in our laboratory to validate the presence of these biomarkers in the mammary gland of heifers.

2.1.2 Luminal progenitor cells in the bovine lactating mammary gland

Our results might propose that the lumino-alveolar progenitor cells expressed CD24-/EpCAM⁺ while the lumino-ductal progenitor cells expressed CD49⁻/EpCAM⁺. The expression of biomarker EpCAM⁺ was in agreement with the identification of progenitor populations in luminal cells (Ghebeh et al., 2013). We have found that both luminal (alveolar and ductal) progenitor cells had a lower expression in early lactation. The low expression of this luminal progenitor cells suggest that changes in cellular population would be related with cell quiescence.

Although no statistically significant differences were found, both lumino-ductal and lumino-alveolar cells showed the same tendency at this stage. The mammary gland is still growing up when there is a higher number of cells in the proliferation rate and this one exceeds cell death. Contrarily, mammary gland regresses when cell death exceeds cell proliferation rate (Capuco et al., 2001).

2.1.3 Lumino-alveolar cells are responsible for milk yield during lactation

Due to the secretory milk mature cells derive from luminal alveolar cells (Visvader et Lindeman, 2006), we have decided to use double-staining to precise the identity of that population. The identification of mature lumino-alveolar cells was based on the expression of CD49⁺/EpCAM⁻. Our results are in line with other previous studies where the loss of the expression in EpCAM was attributed to luminal mature/differentiated cells (Stingl et al., 2001). Additionally, our mammary gland hematoxylin-eosin histological study shows the presence of active mature luminal cells; and it is supported by the increment in alveoli physical size in B2 as well as milk yield.

Our results show that CK19 was expressed in the mammary gland during lactation. According to Ontsouka et al. (2016), CK19 is a marker of lactating luminal cell populations. It has been suggested that CK19 could be also used as a marker of progenitor cells (Gudjonsson et al., 2002b) and it has been highly expressed in differentiating ducts from the mammary tissue of sheeps. However, its expression during lactation probably differs and it is not homogeneous (Colitti, 2011). In our study, CK19 was analyzed and was present throughout the lactation cycle. However, in order to know which specific mammary cell express CK19 in the lactating bovine mammary gland more research needs to be conducted.

2.1.4 Lumino-ductal role in mammary gland branching

The mature lumino-ductal cells in our study were identified by the expression of CD49^f/EpCAM⁻. We have observed that the decline of milk yield correspond with a significant increment in the proportion (%) of these mature lumino-ductal cells (CD49^f/EpCAM⁻). It seems that these mature lumino-ductal cells do not synthetize milk (Shehata et al., 2012).

2.1.5 Myoepithelial cells interact with luminal cells in the bovine lactating mammary gland

In the mammary gland, myoepithelial cells contract to allow expulsion of milk from the alveoli. The expression of CD24 has been observed in the myoepithelial cells of the murine mammary gland during lactation (Visvader and Stingl, 2014). Taking into account these statements, we have decided to test its combination with the already mentioned CD10 biomarker present in the myoepithelial cells of the bovine mammary gland (Safayi et al., 2012). In our in vivo study we have observed that CD10⁻/CD24⁺ allows the identification of myoepithelial progenitor cells. Our results showed no significant differences in the myoepithelial progenitor cells during lactation. However, we observed that during early lactation (B1) both progenitor and mature myoepithelial cells were diminished and in B2 their expression was increased. With respect to B3 and B4, both progenitor and mature myoepithelial cells were alike but decreased in comparison with B2.

Mature myoepithelial cells were higher in B2 and it might be explained by the influence of luminal cells on that as it has been suggested by Gudjonsson et al. (2005). Therefore, we could imply that the higher myoepithelial cell population in B2 was present after lumino-alveolar cell proportion were increased in B1, it could help mature lumino-alveolar cells to eject milk. The interaction between epithelial and myoepithelial cells is

closely regulated (Zavizion et al., 1992). Myoepithelial cells have the capacity to recognize epithelial cells and move them in vitro and organize them in well-defined colonies. Thus, it is possible that a higher mature myoepithelial cell population would be present at B2 after a higher proportion of mature lumino-alveolar cells were already differentiated to aid milk removal. If so, then the mature myoepithelial cells expression would be declined.

The relationship between luminal and myoepithelial cells was validated by our in situ localization. In this case, CD49f represented luminal cells and α -SMA myoepithelial cells. Moreover, the presence of myoepithelial cells during lactation is important because they also participate in the polarization of luminal cells (Gudjonsson et al. 2002). This polarization allows luminal cell function during lactation. In addition, myoepithelial cells contribute to the preservation of the suitable environment in the mammary gland by synthesizing laminin 1 which helps facilitate crosstalk between luminal cells.

In summary, before our in vivo study, one limitation was the lack of previous data on hierarchy cell populations of the bovine lactating mammary gland. Our in vivo study results helped us to propose for the first time a mammary epithelial cell hierarchy hypothetical model during lactation (**Figure 20**).

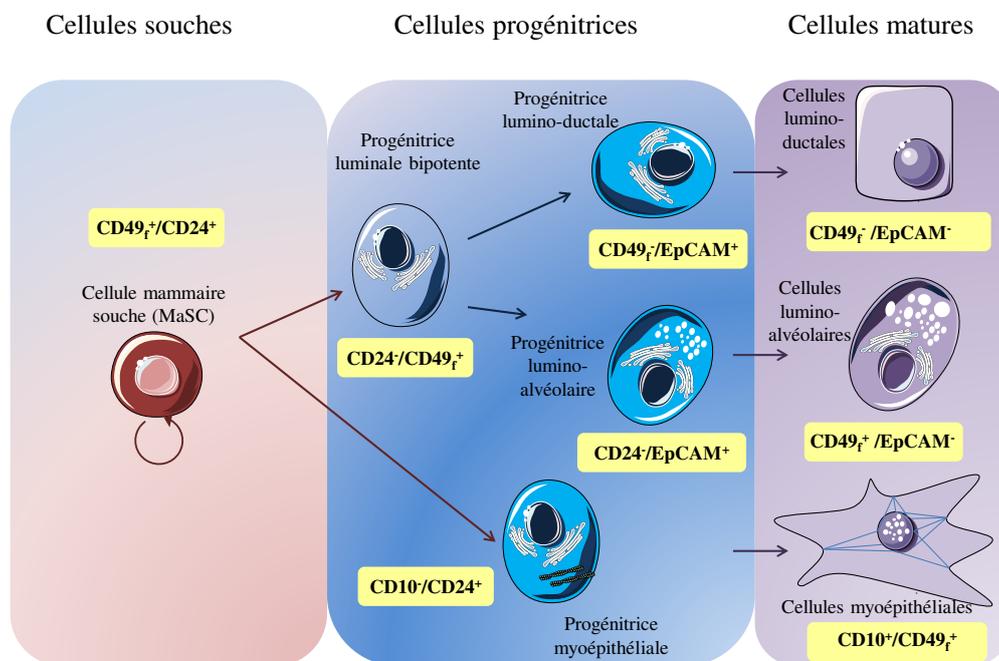


Figure 20 Proposed cell hierarchisation schema in the mammary gland of dairy cows throughout lactation.

2.2. Cell types in and mammary gland plasticity throughout lactation in the cow

Mammary tissue modifications during a lactation cycle have been mainly studied at early lactation, mid-lactation, mid-late lactation and the declining of MY (Knight and Peaker, 1984). In our *in vivo* study, we have decided to phenotype cell populations at 30 (B1), 90 (B2), 150 (B3) and 250 (B4) days of a lactation cycle.

Lactation stage: early lactation

In the 30-days (B1), close to early lactation we have observed that cell populations of bi-potent cells (CD49^{f+}/CD24⁻) had a significant evolution throughout lactation (**Figure 21**). At the beginning of lactation, we have found the highest bi-potent population compared with other stages. This might correspond with mammary gland state, since close to the beginning of lactation the mammary cell proliferation increases (Stefanon et al., 2002). Although we have not measured cell proliferation rate, our results suggest that the differences on cell proportions during lactation might be due to cell proliferation and cell death allowing mammary cells renewal or turnover (Capuco et al., 2001). During early lactation hormonal influences of prolactin and progesterone induce the commitment of luminal progenitor cells into active and secretory MECs (Lee et al., 2012).

The presence of mature lumino-alveolar cells (CD49^{f+}/EpCAM⁻) agrees with literature in the highest number of lumino-alveolar cells found in B1 (Capuco et al., 2001). It seems that cell epithelial populations are trying to be prepared for the coming lactation peak and milk synthesis during the early lactation stage. Moreover, during this stage, cellular protein synthesis and growth rate are higher before the 90 day of lactation (Capuco et al., 2001). Mature lumino-ductal cells (CD49^{f-}EpCAM⁻) were then increased at this lactation stage (**Figure 21**). At the beginning of lactation, ductal cells might be related with alveoli physical organization and it could explain its lower amount as it has been observed in the mammary gland of mouse (Villadsen et al 2007).

Lactation stage : mid-lactation

Our results showed a slightly decrease in the bi-potent luminal progenitor cells at 90-days (38.2 to 35.9%) (**Figure 21**). This could be attributed to the decline in milk yield during lactation and the decrease in cell number (Knight and Peaker, 1984).

Mature lumino-alveolar cells began to decrease in our study. It agrees with the results of Knight and Peaker (1984), which measured cell decline number and cellular activity during

late lactation in goats. The proportion of mature lumino-alveolar cells in our *in vivo* study had a significant correlation with milk yield. It is due to the fact that a large number of active cells are necessary to produce milk (milk yield/per cell) at this moment (Boutinaud et al., 2004).

Mature lumino-ductal cells slightly diminished from 55% in B1 to 53.3% in B2, this might be probably explained by the proliferation balance and cell division process (Holland and Holland 2005). At the beginning of lactation MEC cell proliferation is increased to provide and maintain cells populations then throughout lactation, then cell number began to decrease.

Lactation stage : mid-late lactation

We could observe that bi-potent population cells were decreased from B2 to B3 (35% to 31%). Cellular quiescence refers to a resting cell state under certain circumstances, which allow cells to prepare themselves and to preserve their replication capacity to continue mitosis. Our results in the low progenitor population could be related with other reports where cells are supposed to rest under the G0 phase and return to cell cycle under hormonal and external factors exposure (Harmes and DiRenzo, 2009). The microenvironment in the mammary gland regulates cell apoptosis and there is the possibility that progenitor cells have their own regulation to diminish or increase cell proliferation/differentiation patterns.

Mature lumino-alveolar populations at this stage are diminishing from B2 to B3 (31% to 28%). Active MECs have been related with MY decreasing and have been largely studied in mammary gland (Capuco et al., 2001 ; Stefanon et al., 2002). At this point, extracellular matrix MMP influence mammary gland tissue remodeling and mammary cell apoptosis (Rabot et al., 2007).

In the case of mature lumino-ductal cells, the increment in their population numbers after the peak of milk yield could be related to the need for reconstructing ductal trees. Evidence of stem-like cells has been localized *in situ* from dissected ducts in the adult human mammary gland (Villadsen et al., 2007).

Lactation stage : late lactation

Decreasing of bi-potent populations in this lactation stage (23%) compared with early lactation (38%) might be related with cell involution processes (**Figure 21**). As mentioned before, cell arrest by quiescence will occur.

Apoptosis balance during involution has been also described by Stefanon et al., (2002). Therefore, the diminishing of lumino-alveolar populations in our study also agrees with the increment of apoptosis at this stage and the decreasing of proliferation. It might be explained by the fact that mammary alveolar size can be observed by the histological staining by hematoxylin and eosin in the 250-day of the lactation cycle.

The higher mature lumino-ductal “remaining” cells in our in vivo study could be related with the presence of a “survival” cell population in ductal luminal epithelial cells during involution. The expression of protein annexin 8 in mammary gland has been linked with cell quiescence (Iglesias et al., 2015). In addition, it might be possible that the increment of lumino-ductal populations at the end of lactation in our study could be related to mammary gland reconstruction after lactation (Capuco et al., 2002 ; Villadsen et al., 2007).

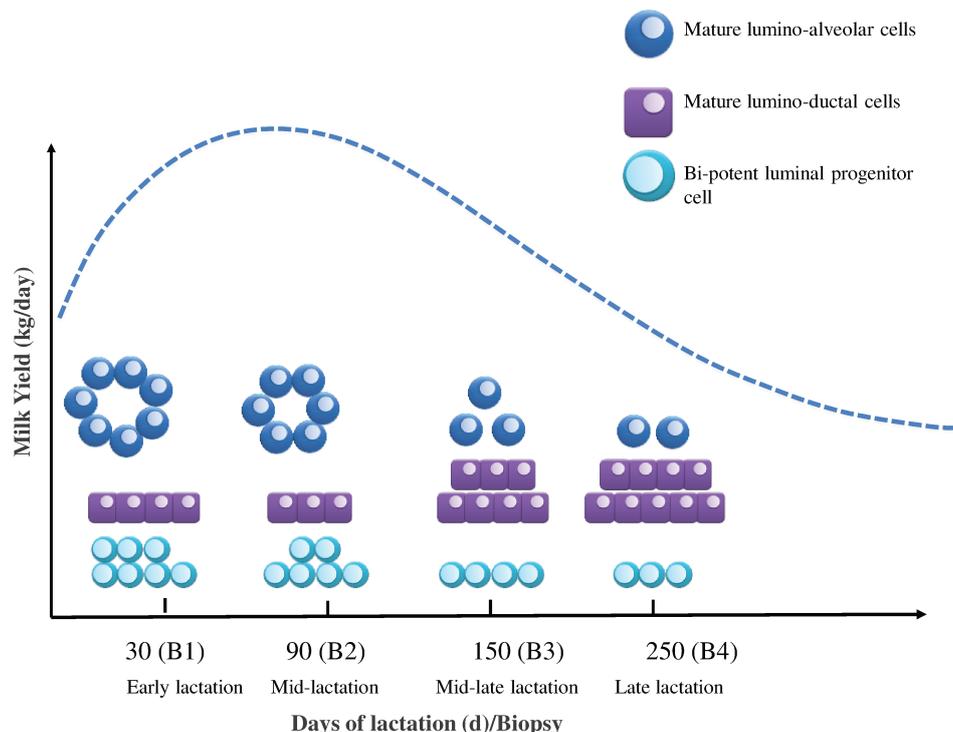


Figure 21 Proposed representation of luminal bi-potent progenitor cells, mature luminal (ductal and alveolar) cells throughout a lactation cycle

Discussion conclusion

We could observe that a bi-potent luminal progenitor population is present in the mammary lactating gland and there is a possibility that it could be responsible for the maintenance of cell population proportions during lactation. We confirmed that the presence

of a mature lumino-alveolar population is responsible of milk synthesis in dairy cows. After a lactation cycle, the presence of a mature mammary ductal population cells might serve to rebuild mammary gland branching to prepare it for following lactations. Overall, our data together shows mammary gland heterogeneity and plasticity during lactation. Further studies need to be made to understand cell function and cell lineage. Complementary studies by cell sorting and cell in vitro cultures regarding cellular populations obtained in our in vivo study would provide knowledge about their functional characteristics and cell differentiation pathways. We are aware that since this is the first time that a cellular population in the bovine lactating mammary gland is proposed by the aid of cell surface markers (biomarkers), further analysis need to be made. Current studies are being held in our laboratory to complete and clarify our results. Our results provide for the first time a clear understanding of cell populations composition during lactation in bovines.

Conclusion

Conclusion générale

Ce travail de thèse a utilisé des protéines de surface comme biomarqueurs de cellules dans les lignées cellulaires bovines MAC-T et BME-UV1. Cela nous a permis d'obtenir un panel de biomarqueurs pertinents pour identifier et caractériser pour la première fois l'évolution des populations cellulaires dans la glande mammaire bovine au cours d'un cycle de lactation.

L'utilisation de biomarqueurs dans les lignées MAC-T et BME-UV1 a permis d'étudier pour la première fois leur phénotype. L'utilisation d'un panel de biomarqueurs (CD49f, CD24, CD10 et EpCAM) nous a permis d'identifier les principales populations dans la glande mammaire de la vache. Nos résultats montrent que les deux lignées cellulaires bovines MAC-T et BME-UV1 cultivées en conditions adhérentes (2D) expriment le biomarqueur CD49f, un marqueur des cellules épithéliales (CEM et cellules myoépithéliales). L'expression de biomarqueurs CD49f et d'EpCAM dans les conditions de culture en 2D et 3D montrent que les cellules BME-UV1 possèdent des caractéristiques de cellules de type luminales alvéolaires. Ces résultats ont été confirmés par l'expression des protéines spécifiques des CEM telles STAT5 et CK19. Par la forte expression de l'ALDH et par sa capacité à former des mammosphères en culture 3D, ainsi que par l'expression du biomarqueur CD10, la lignée cellulaire bovine BME-UV1 possède des caractéristiques de cellules souches/progénitrices. En ce qui concerne la lignée MAC-T, elle exprime plus faiblement CD49f en culture 3D et montre une incapacité à former des structures de type « mammosphère ». Du fait de la forte expression de CK14 et à l'absence de CK19 et STAT5, la cellule MAC-T révèle un phénotype différent de celui de BME-UV1. La cellule MAC-T exprime le biomarqueur CD49f dans les conditions en 2D, pourtant, en raison de l'expression de ce biomarqueur dans la lignée MAC-T dans les cultures en 3D et à l'absence de l'expression de quelques protéines STAT5 et CK19 nous avons observé que la lignée MAC-T contient dans ses populations et dans son profil des cellules de type ductale ou myoépithéliale.

Les biomarqueurs CD49f, CD24, CD10 et EpCAM nous ayant permis de caractériser les lignées MAC-T et BME-UV1, ils ont été utilisés pour la suite pour le phénotypage et l'identification de populations de cellules épithéliales dans la glande mammaire bovine.

Nous avons étudié l'évolution des populations cellulaires de la glande mammaire de vaches primipares au cours de la lactation à 4 temps clés (30, 60, 150 et 250 jours de la lactation). Des biopsies ont été prélevées puis digérées pour obtenir des cellules dissociées que nous avons marquées puis analysées par la cytométrie en flux. Nos résultats montrent que les populations des cellules de la glande mammaire bovine ayant une forte expression de CD49f, biomarqueur des cellules épithéliales, évoluent fortement pendant la lactation. En début de lactation, les populations exprimant CD49f augmentent puis diminuent au cours du temps. Un autre de nos résultats est que les cellules lumino-alvéolaires matures que nous avons identifiées par double marquage $CD49^+/EpCAM^-$ augmentent à 30 jours de lactation puis diminuent jusqu'au 250^{ème} jour de lactation. Nous avons montré une corrélation positive entre les populations cellulaires $CD49^+/EpCAM^-$, cellules lumino-alvéolaires, et la production de lait. En outre, les cellules bi-potentes ($CD49^+/CD24^-$) ont une évolution significative au cours du temps. Au début de la lactation (J30) la présence des cellules bi-potentes augmente puis elle diminue légèrement au cours du temps. Les cellules lumino-ductales matures ($CD49f/EpCAM^-$) évoluent légèrement au cours de la lactation pour augmenter de manière significative du 30^{ème} jour au 250^{ème} jour de lactation. Nous pouvons lier cette évolution avec le rôle de ces cellules dans le renouvellement et le maintien des structures la glande mammaire bovine.

Par immunohistologie nous avons localisé in situ l'expression de biomarqueurs tels que CD10 qui permet d'identifier les cellules myoépithéliales en bordure des acinis et confirmer ainsi leur expression par un double marquage en utilisant α -SMA et CD49f. Même si la proportion de cellules souches ne varie pas significativement au cours de la lactation, leur présence est évidente et reste importante pour le maintien et la régulation cellulaire dans la glande mammaire bovine. Nous avons aussi montré la présence des cellules progénitrices (luminales et ductales), cellules intermédiaires avant de devenir cellules matures (différenciées), avec une régulation de ces populations pendant la lactation. D'autre part, les coupes histologiques des biopsies ont montré la morphologie des acinis, lesquels présentent des tailles de lumière différentes au cours de la lactation.

A partir de nos résultats, pour la première fois nous avons proposé un schéma hypothétique de hiérarchisation des populations cellulaires (souches, bi-potentes, progénitrices et cellules matures) de la glande mammaire de vache en lactation.

Nos résultats sont innovants et nouveaux et ont permis d'obtenir un panel de biomarqueurs pour étudier la glande mammaire de vache. De plus, nos résultats sur l'étude de la glande mammaire bovine en lactation apportent des connaissances pour mieux comprendre la plasticité mammaire et identifier les populations de cellules dans la glande mammaire bovine pendant une lactation.

Il semble pertinent d'approfondir les études sur les différentes populations cellulaires obtenues dans cette thèse. L'utilisation d'autres outils de laboratoire, telles que le tri cellulaire permet de sélectionner des populations cellulaires spécifiques pour les étudier par différentes techniques. Il serait intéressant d'étudier les populations de cellules mammaires dans les cultures *in vitro*. Cela pourrait permettre de compléter les caractéristiques spécifiques de chaque phénotype cellulaire trouvé dans la glande mammaire en lactation. Les études, sur des cellules cultivées avec différents types de milieu, supports et conditions de culture pourront donner des pistes sur leur évolution et comportement dans la glande mammaire en lactation. En outre, d'après l'obtention des populations cellulaires par le tri cellulaire, la transplantation de cellules dans les coussins adipeux permettra d'étudier leur capacité et leur comportement dans le tissu « *in vivo* » par rapport à leur phénotype (cellule souches, progénitrices ou cellules matures).

Les études sur l'expression génétique et les protéines spécifiques permettront de compléter cette étude. En ce qui concerne l'analyse de cytométrie en flux, la combinaison du panel de biomarqueurs obtenu dans cette étude en utilisant trois ou quatre biomarqueurs serait intéressante pour compléter la caractérisation de la glande mammaire bovine au cours de la lactation. De plus, l'analyse d'autres molécules tels que le Lgr5, miR-200c...etc permettra peut-être de mieux comprendre les populations composant la glande mammaire bovine.

De plus, étudier les différentes phases de développement mammaire (avant la puberté, durant la puberté et la gestation) complètera notre étude et permettra de mieux comprendre la plasticité mammaire et l'évolution des populations cellulaires dans la glande mammaire avant la lactation.

Certain points ne pouvaient pas être abordés pendant ma thèse mais il serait intéressant de pouvoir répondre à quelques questions: est-ce que les facteurs externes tels que le climat et la nutrition des vaches par rapport au type de pâturage saisonnier ont une influence ou modifient la composition cellulaire de la glande mammaire? Quelles différences existent entre

les cellules de la glande mammaire bovine par rapport aux vaches qui ont déjà suivi une lactation (multipares)? Quelle est la composition de la glande mammaire pendant la lactation par rapport aux autres types cellulaires par exemple de cellules stromales ? Est-ce que d'autres cellules non identifiées dans ce travail et qui peuvent se trouver dans la glande mammaire, ont un rôle important dans la plasticité et la composition de la glande mammaire dans la lactation? L'utilisation de modèles in vivo comme la transplantation des populations cellulaires de la glande mammaire dans le coussin graisseux permettra de compléter nos résultats sur la plasticité de la glande mammaire bovine au cours de la lactation.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Abd El-Rehim, D.M., Pinder, S.E., Paish, C.E., Bell, J., Balmey, R.W., Robertson, J.F.R., Nicholson, R.I., Ellis, I.O., 2004. Expression of luminal and basal cytokeratins in human breast carcinoma. *J. Pathol.* 203, 661–671.
- Adriance, M.C., Inman, J.L., Petersen, O.W., Bissell, M.J., 2005. Myoepithelial cells: good fences make good neighbors. *Breast Cancer Res.* 7, 190–197.
- Agreste Info, 2015. Lait. Agreste Infos rapides — Lait — Novembre 2015 — n° 11/12 2–7.
- Ahn, J.Y., Aoki, N., Adachi, T., Mizuno, Y., Nakamura, R., Matsuda, T., 1995. Isolation and culture of bovine mammary epithelial cells and establishment of gene transfection conditions in the cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59, 59–64.
- Akers, R.M., Bauman, D.E., Goodman, G.T., Capuco, A. V, Tucker, H.A., 1981. Prolactin regulation of cytological differentiation of mammary epithelial cells in periparturient cows. *Endocrinology* 109, 31–40.
- Akers, R.M., 1985. Lactogenic hormones: binding sites, mammary growth, secretory cell differentiation, and milk biosynthesis in ruminants. *J. Dairy Sci.* 68, 501–519.
- Akers, R.M., 1990. Lactation physiology: A ruminant animal perspective. *Protoplasma* 159, 96–111.
- Akers, R.M., 2002. Lactation and the mammary gland. Balckwell Publishing.
- Akers, R.M., Ellis, S.E., Berry, S.D., 2005. Ovarian and IGF-I axis control of mammary development in prepubertal heifers. *Domest. Anim. Endocrinol.* 29, 259–267.
- Andersen, J.B., Madsen, T.G., Larsen, T., Ingvarsten, K.L., Nielsen, M.O., 2005. The effects of dry period versus continuous lactation on metabolic status and performance in periparturient cows. *J. Dairy Sci.* 88, 3530–3541.
- Annen, E.L., Fitzgerald, A.C., Gentry, P.C., McGuire, M.A., Capuco, A. V, Baumgard, L.H., Collier, R.J., 2007. Effect of continuous milking and bovine somatotropin supplementation on mammary epithelial cell turnover. *J. Dairy Sci.* 90, 165–183.
- Asselin-Labat, M.-L., Vaillant, F., Shackleton, M., Bouras, T., Lindeman, G.J., Visvader, J.E., 2008. Delineating the epithelial hierarchy in the mouse mammary gland. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 73, 469–478.
- Athie, F., Bachman, K.C., Head, H.H., Hayen, M.J., Wilcox, C.J., 1996. Estrogen administered at final milk removal accelerates involution of bovine mammary gland. *J. Dairy Sci.* 79, 220–226.
- Auldlist, M.J., Turner, S.-A., McMahon, C.D., Prosser, C.G., 2007. Effects of melatonin on the yield and composition of milk from grazing dairy cows in New Zealand. *J. Dairy Res.* 74, 52–57.

- Bachelard-Cascales, E., Chapellier, M., Delay, E., Pochon, G., Voeltzel, T., Puisieux, A., Caron de Fromental, C., Maguer-Satta, V., 2010. The CD10 enzyme is a key player to identify and regulate human mammary stem cells. *Stem Cells* 28, 1081–1088.
- Bachman, K.C., Hayen, M.J., Morse, D., Wilcox, C.J., 1988. Effect of pregnancy, milk yield, and somatic cell count on bovine milk fat hydrolysis. *J. Dairy Sci.* 71, 925–931.
- Barcellos-Hoff, M.H., Aggeler, J., Ram, T.G., Bissell, M.J., 1989. Functional differentiation and alveolar morphogenesis of primary mammary cultures on reconstituted basement membrane. *Development* 105, 223–235.
- Bauman, D.E., Mather, I.H., Wall, R.J., Lock, A.L., 2006. Major advances associated with the biosynthesis of milk. *J. Dairy Sci.* 89, 1235–43.
- Baumgarth, N., Roederer, M., 2000. A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping. *J. Immunol. Methods* 243, 77–97.
- Baumrucker, C.R., Deemer, K.P., Walsh, R., Riss, T.L., Akers, R.M., 1988. Primary culture of bovine mammary acini on a collagen matrix. *Tissue Cell* 20, 541–554.
- Baumrucker, C.R., Erondu, N.E., 2000. Insulin-like growth factor (IGF) system in the bovine mammary gland and milk. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 5, 53–64.
- Ben Chedly, H., Boutinaud, M., Bernier-Dodier, P., Marnet, P.-G., Lacasse, P., 2010. Disruption of cell junctions induces apoptosis and reduces synthetic activity in lactating goat mammary gland. *J. Dairy Sci.* 93, 2938–51.
- Bendall, S.C., Nolan, G.P., Roederer, M., Chattopadhyay, P.K., 2012. A deep profiler's guide to cytometry. *Trends Immunol.* 33, 323–332.
- Berry, S.D.K., Weber Nielsen, M.S., Sejrsen, K., Pearson, R.E., Boyle, P.L., Akers, R.M., 2003. Use of an immortalized bovine mammary epithelial cell line (MAC-T) to measure the mitogenic activity of extracts from heifer mammary tissue: effects of nutrition and ovariectomy. *Domest. Anim. Endocrinol.* 25, 245–253.
- Bionaz, M., Loor, J.J., 2011. Gene networks driving bovine mammary protein synthesis during the lactation cycle. *Bioinform. Biol. Insights* 5, 83–98.
- Bionaz, M., Hurley, W., Loor, J., 2012. Milk Protein Synthesis in the Lactating Mammary Gland: Insights from Transcriptomics Analyses, in: *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology "Milk Protein."* Intech, University of Illinois, Urbana, Illinois, USA, pp. 286–323.
- Bordeaux, J., Welsh, A., Agarwal, S., Killiam, E., Baquero, M., Hanna, J., Anagnostou, V., Rimm, D., 2010. Antibody validation. *Biotechniques* 48, 197–209.
- Borena, B.M., Bussche, L., Burvenich, C., Duchateau, L., Van de Walle, G.R., 2013. Mammary stem cell research in veterinary science: an update. *Stem Cells Dev.* 22, 1743–
- Boumendjel, A., Grunwald, D., Nicolle, E., Ronot, X., 2006. Fluorochromes, in: *La Cytométrie En Flux*. Paris, France, p. 54.
- Boutinaud, M., Rulquin, H., Keisler, D.H., Djiane, J., Jammes, H., 2002. Use of somatic cells from goat milk for dynamic studies of gene expression in the mammary gland. *J. Anim.*

- Sci. 80, 1258–1269.
- Boutinaud, M., Guinard-Flamenta, J., Jammes, H., 2004. The number and activity of mammary epithelial cells, determining factors for milk production. *Reprod. Nutr. Dev.* 44, 499–508.
- Boutinaud, M., Herve, L., Lollivier, V., 2015. Mammary epithelial cells isolated from milk are a valuable, non-invasive source of mammary transcripts. *Front. Genet.* 6, 323.
- Brisken, C., O'Malley, B., 2010. Hormone action in the mammary gland. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a003178.
- Brostoff, J., Scadding, D., Male, D., Roitt, I., 1997. *Immunologie*. De Boeck & Larcier, Paris, France, pp. 6–7.
- Buono, K.D., Robinson, G.W., Martin, C., Shi, S., Stanley, P., Tanigaki, K., Honjo, T., Hennighausen, L., 2006. The canonical Notch/RBP-J signaling pathway controls the balance of cell lineages in mammary epithelium during pregnancy. *Dev. Biol.* 293, 565–580.
- Burns, A.R., Bowden, R.A., MacDonell, S.D., Walker, D.C., Odebunmi, T.O., Donnachie, E.M., Simon, S.I., Entman, M.L., Smith, C.W., 2000. Analysis of tight junctions during neutrophil transendothelial migration. *J. Cell Sci.* 113 (Pt 1, 45–57).
- Bustin, S.A., Benes, V., Nolan, T., Pfaffl, M.W., 2005. Quantitative real-time RT-PCR--a perspective. *J. Mol. Endocrinol.* 34, 597–601.
- Capuco, A. V, Akers, R.M., Smith, J.J., 1997. Mammary growth in Holstein cows during the dry period: quantification of nucleic acids and histology. *J. Dairy Sci.* 80, 477–487.
- Capuco, A. V, Wood, D.L., Baldwin, R., Mcleod, K., Paape, M.J., 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.
- Capuco, A. V, Ellis, S., Wood, D.L., Akers, R.M., Garrett, W., 2002. Postnatal mammary ductal growth: three-dimensional imaging of cell proliferation, effects of estrogen treatment, and expression of steroid receptors in prepubertal calves. *Tissue Cell* 34, 143–154.
- Capuco, A. V, Ellis, S.E., Hale, S.A., Long, E., Erdman, R.A., Zhao, X., Paape, M.J., 2003. Lactation persistency: insights from mammary cell proliferation studies. *J. Anim. Sci.* 81 Suppl 3, 18–31.
- Capuco, A. V, 2007. Identification of putative bovine mammary epithelial stem cells by their retention of labeled DNA strands. *Exp. Biol. Med.* (Maywood). 232, 1381–1390.
- Capuco, A. V, Evock-Clover, C.M., Minuti, A., Wood, D.L., 2009. In vivo expansion of the mammary stem/ progenitor cell population by xanthosine infusion. *Exp. Biol. Med.* (Maywood). 234, 475–482.
- Capuco, A. V, Choudhary, R.K., Daniels, K.M., Li, R.W., Evock-Clover, C.M., 2012. Bovine mammary stem cells: cell biology meets production agriculture. *Animal* 6, 382–393.
- Carlton, S., 2002. Immunofluorescent techniques, in: *Histological Techniques*. Churchill

- Livingston, London, United Kingdom, pp. 579–592.
- Catchpole, H., 1977. Hormonal mechanisms in pregnancy and parturition. United States of America, pp. 344–345.
- Chatellier, V., LeLyon, B., Perrot, C., You, G., 2013. Le secteur laitier français à la croisée des chemins. *La vache le lait* 77–99.
- Choudhary, R.K., Capuco, A. V, 2012. In vitro expansion of the mammary stem/progenitor cell population by xanthosine treatment. *BMC Cell Biol.* 13, 14.
- Choudhary, R.K., Li, R.W., Evock-Clover, C.M., Capuco, A. V, 2013. Comparison of the transcriptomes of long-term label retaining-cells and control cells microdissected from mammary epithelium: an initial study to characterize potential stem/progenitor cells. *Front. Oncol.* 3, 21.
- Colitti, M., 2011. Expression of keratin 19, Na-K-Cl cotransporter and estrogen receptor alpha in developing mammary glands of ewes. *Histol. Histopathol.* 26, 1563–1573.
- Connor, C., 1995. Rural dairy technology. Ethiopia.
- Connor, E.E., Siferd, S., Elsasser, T.H., Evock-Clover, C.M., Van Tassell, C.P., Sonstegard, T.S., Fernandes, V.M., Capuco, A. V, 2008. Effects of increased milking frequency on gene expression in the bovine mammary gland. *BMC Genomics* 9, 362.
- Cravero, D., Martignani, E., Miretti, S., Accornero, P., Baratta, M., 2015. Bovine CD49 positive-cell subpopulation remarkably increases in mammary epithelial cells that retain a stem-like phenotype. *Res. Vet. Sci.* 102, 1–6.
- D'Hour, P., Coulon, J., Petit, M., Garel, J., 1995. Caractérisation zootechnique de génisses de races Holstein, Montbéliarde et Tarentaise. *Ann. Zootech.* 44, 217–227.
- Daniel, C.W., Silberstein, G.B., 2000. Working with the mammary end bud, in: *Methods in Mammary Gland Biology and Breast Cancer Research*.
- Dahl, G.E., Buchanan, B.A., Tucker, H.A., 2000. Photoperiodic effects on dairy cattle: a review. *J. Dairy Sci.* 83, 885–893.
- De Kruif, A., 1978. Factors influencing the fertility of a cattle population. *J. Reprod. Fertil.* 54, 507–518.
- Delbecchi, L., Miller, N., Prud'homme, C., Petitclerc, D., Wagner, G., Lacasse, P., 2005. 17beta-estradiol reduces milk synthesis and increases stanniocalcin gene expression in the mammary gland of lactating cows. *Livest. Prod. Sci.* 98, 57–66.
- Delouis, C., Richard, P., 1991. La lactation, in: *Ellipse (Ed.), La Reproduction Chez Les Mammifères et L'homme*. Inra, Paris, France, pp. 487–514.
- Deng, S., Yang, X., Lassus, H., Liang, S., Kaur, S., Ye, Q., Li, C., Wang, L.-P., Roby, K.F., Orsulic, S., Connolly, D.C., Zhang, Y., Montone, K., Butzow, R., Coukos, G., Zhang, L., 2010. Distinct expression levels and patterns of stem cell marker, aldehyde dehydrogenase isoform 1 (ALDH1), in human epithelial cancers. *PLoS One* 5, e10277.
- Deome, K.B., Faulkin, L.J.J., Bern, H.A., Blair, P.B., 1959. Development of mammary

- tumors from hyperplastic alveolar nodules transplanted into gland-free mammary fat pads of female C3H mice. *Cancer Res.* 19, 515–520.
- Desjardins, C., Paape, M.J., Tucker, H.A., 1968. Contribution of pregnancy, fetuses, fetal placentas and deciduomas to mammary gland and uterine development. *Endocrinology* 83, 907–910.
- Dessauge, F., Finot, L., Wiart, S., Aubry, J.M., Ellis, S.E., 2009. Effects of ovariectomy in prepubertal goats. *J. Physiol. Pharmacol.* 60 Suppl 3, 127–133.
- Dessauge, F., Lollivier, V., Ponchon, B., Bruckmaier, R., Finot, L., Wiart, S., Cutullic, E., Disenhaus, C., Barbey, S., Boutinaud, M., 2011. Effects of nutrient restriction on mammary cell turnover and mammary gland remodeling in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 94, 4623–4635.
- Deugnier, M.A., Moiseyeva, E.P., Thiery, J.P., Glukhova, M., 1995. Myoepithelial cell differentiation in the developing mammary gland: progressive acquisition of smooth muscle phenotype. *Dev. Dyn.* 204, 107–117.
- Dewar, R., Fadare, O., Gilmore, H., Gown, A.M., 2011. Best practices in diagnostic immunohistochemistry: myoepithelial markers in breast pathology. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 135, 422–429.
- Dong, Q., Wang, D., Bandyopadhyay, A., Gao, H., Gorena, K.M., Hildreth, K., Rebel, V.I., Walter, C.A., Huang, C., Sun, L.-Z., 2013. Mammospheres from murine mammary stem cell-enriched basal cells: clonal characteristics and repopulating potential. *Stem Cell Res.* 10, 396–404.
- Dontu, G., Abdallah, W.M., Foley, J.M., Jackson, K.W., Clarke, M.F., Kawamura, M.J., Wicha, M.S., 2003. In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev.* 17, 1253–1270.
- Dulbecco, R., Unger, M., Armstrong, B., Bowman, M., Syka, P., 1983. Epithelial cell types and their evolution in the rat mammary gland determined by immunological markers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80, 1033–1037.
- Eirew, P., Kannan, N., Knapp, D.J.H.F., Vaillant, F., Emerman, J.T., Lindeman, G.J., Visvader, J.E., Eaves, C.J., 2012. Aldehyde dehydrogenase activity is a biomarker of primitive normal human mammary luminal cells. *Stem Cells* 30, 344–348.
- Ellis, S., Capuco, A., 2002. Cell proliferation in bovine mammary epithelium: identification of the primary proliferative cell population. *Tissue Cell* 34, 155–163.
- Emerman, J.T., Pitelka, D.R., 1977. Maintenance and induction of morphological differentiation in dissociated mammary epithelium on floating collagen membranes. *In Vitro* 13, 316–328.
- Enquête Annuelle Laitière, 2013. URL <http://www.maison-du-lait.com/fr/chiffres-cles/filiere-laitiere-francaise-en-50-chiffres>
- Eurostat, 2015. Production of cows milk on farms at national and regional level, by level of production, 2014.
- Faraldo, M.M., Deugnier, M.-A., Tlouzeau, S., Thiery, J.P., Glukhova, M.A., 2002.

- Perturbation of beta1-integrin function in involuting mammary gland results in premature dedifferentiation of secretory epithelial cells. *Mol. Biol. Cell* 13, 3521–3531.
- Faraldo, M.M., Teuliere, J., Deugnier, M.-A., Taddei-De La Hossieraye, I., Thiery, J.P., Glukhova, M.A., 2005. Myoepithelial cells in the control of mammary development and tumorigenesis: data from genetically modified mice. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 10, 211–219.
- Farr, V.C., Stelwagen, K., Cate, L.R., Molenaar, A.J., McFadden, T.B., Davis, S.R., 1996. An improved method for the routine biopsy of bovine mammary tissue. *J. Dairy Sci.* 79, 543–549.
- Finot, L., Marnet, P.G., Dessauge, F., 2011. Reference gene selection for quantitative real-time PCR normalization: Application in the caprine mammary gland. *Small Rumin. Res.* 95, 20–26.
- Finucane, K.A., McFadden, T.B., Bond, J.P., Kennelly, J.J., Zhao, F.-Q., 2008. Onset of lactation in the bovine mammary gland: gene expression profiling indicates a strong inhibition of gene expression in cell proliferation. *Funct. Integr. Genomics* 8, 251–264.
- Fleet, I.R., Peaker, M., 1978. Mammary function and its control at the cessation of lactation in the goat. *J. Physiol.* 279, 491–507.
- Freeman, M.E., Kanyicska, B., Lerant, A., Nagy, G., 2000. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol. Rev.* 80, 1523–1631.
- Fuchs, A.R., Cubile, L., Dawood, M.Y., Jorgensen, F.S., 1984. Release of oxytocin and prolactin by suckling in rabbits throughout lactation. *Endocrinology* 114, 462–469.
- Gajewska, M., Motyl, T., 2004. IGF-binding proteins mediate TGF-beta 1-induced apoptosis in bovine mammary epithelial BME-UV1 cells. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 139, 65–75.
- Gamble, M., Wilson, I., 2002. Histological techniques, in: *Histological Techniques*. Churchill Livingstone, London, United Kingdom, pp. 125–138.
- Gaucheron, F., 2005. The minerals of milk. *Reprod. Nutr. Dev.* 45, 473–483.
- Geiger, A.J., Parsons, C.L.M., Akers, R.M., 2016. Feeding a higher plane of nutrition and providing exogenous estrogen increases mammary gland development in Holstein heifer calves. *J. Dairy Sci.* 99, 7642–7653.
- German, T., Barash, I., 2002. Characterization of an epithelial cell line from bovine mammary gland. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 38, 282–292.
- Ghebeh, H., Sleiman, G.M., Manogaran, P.S., Al-Mazrou, A., Barhoush, E., Al-Mohanna, F.H., Tulbah, A., Al-Faqeeh, K., Adra, C.N., 2013. Profiling of normal and malignant breast tissue show CD44^{high}/CD24^{low} phenotype as a predominant stem/progenitor marker when used in combination with Ep-CAM/CD49f markers. *BMC Cancer* 13, 289.
- Gibson, C.A., Vega, J.R., Baumrucker, C.R., Oakley, C.S., Welsch, C.W., 1991. Establishment and characterization of bovine mammary epithelial cell lines. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 27A, 585–594.

- Goodman, G.T., Akers, R.M., Friderici, K.H., Tucker, H.A., 1983. Hormonal regulation of alpha-lactalbumin secretion from bovine mammary tissue cultured in vitro. *Endocrinology* 112, 1324–1330.
- Graham, L., 2006. Fow cytometry, a basic guide. Denmark.
- Green, K.A., Streuli, C.H., 2004. Apoptosis regulation in the mammary gland. *Cell. Mol. Life Sci.* 61, 1867–1883.
- Gudjonsson, T., Ronnov-Jessen, L., Villadsen, R., Rank, F., Bissell, M.J., Petersen, O.W., 2002a. Normal and tumor-derived myoepithelial cells differ in their ability to interact with luminal breast epithelial cells for polarity and basement membrane deposition. *J. Cell Sci.* 115, 39–50.
- Gudjonsson, T., Villadsen, R., Nielsen, H.L., Ronnov-Jessen, L., Bissell, M.J., Petersen, O.W., 2002b. Isolation, immortalization, and characterization of a human breast epithelial cell line with stem cell properties. *Genes Dev.* 16, 693–706.
- Gudjonsson, T., Adriance, M.C., Sternlicht, M.D., Petersen, O.W., Bissell, M.J., 2005. Myoepithelial cells: their origin and function in breast morphogenesis and neoplasia. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 10, 261–272.
- Guernion, J.M., 2013. Génisses laitières. Region Bretagne, France.
- Hahm, H.A., Ip, M.M., Darcy, K., Black, J.D., Shea, W.K., Forczek, S., Yoshimura, M., Oka, T., 1990. Primary culture of normal rat mammary epithelial cells within a basement membrane matrix. II. Functional differentiation under serum-free conditions. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 26, 803–814.
- Hale, S.A., Capuco, A. V, Erdman, R.A., 2003. Milk yield and mammary growth effects due to increased milking frequency during early lactation. *J. Dairy Sci.* 86, 2061–2071.
- Harley, C.B., Futcher, A.B., Greider, C.W., 1990. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345, 458–460.
- Harley, C.B., Vaziri, H., Counter, C.M., Allsopp, R.C., 1992. The telomere hypothesis of cellular aging. *Exp. Gerontol.* 27, 375–382.
- Harmes, D.C., DiRenzo, J., 2009. Cellular quiescence in mammary stem cells and breast tumor stem cells: got testable hypotheses? *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 14, 19–27.
- Herrington, J., Carter-Su, C., 2001. Signaling pathways activated by the growth hormone receptor. *Trends Endocrinol. Metab.* 12, 252–257.
- Hickson, R.E., Lopez-Villalobos, N., Dalley, D.E., Clark, D.A., Holmes, C.W., 2006. Yields and persistency of lactation in Friesian and Jersey cows milked once daily. *J. Dairy Sci.* 89, 2017–2024.
- Holland, M.S., Tai, M.-H., Trosko, J.E., Griffin, L.D., Stasko, J.A., Cheville, N.C., Holland, R.E., 2003. Isolation and differentiation of bovine mammary gland progenitor cell populations. *Am. J. Vet. Res.* 64, 396–403.
- Holland, M.S., Holland, R.E., 2005. The cellular perspective on mammary gland

- development: stem/progenitor cells and beyond. *J. Dairy Sci.* 88 Suppl 1, E1–E8.
- Hosseini, A., Sharma, R., Bionaz, M., Loor, J.J., 2013. Transcriptomics Comparisons of Mac-T cells Versus Mammary Tissue during Late Pregnancy and Peak Lactation. *Adv. Dairy Res.* 01, 1–12.
- Hovey, R.C., Harris, J., Hadsell, D.L., Lee, A. V, Ormandy, C.J., Vonderhaar, B.K., 2003. Local insulin-like growth factor-II mediates prolactin-induced mammary gland development. *Mol. Endocrinol.* 17, 460–471.
- Hu, P., Zhang, W., Xin, H., Deng, G., 2016. Single Cell Isolation and Analysis. *Front. cell Dev. Biol.* 4, 116.
- Hughes, A.J., Spelke, D.P., Xu, Z., Kang, C.-C., Schaffer, D. V, Herr, A.E., 2014. Single-cell western blotting. *Nat. Methods* 11, 749–755.
- Hulspas, R., O’Gorman, M.R.G., Wood, B.L., Gratama, J.W., Sutherland, D.R., 2009. Considerations for the control of background fluorescence in clinical flow cytometry. *Cytometry B. Clin. Cytom.* 76, 355–364.
- Huynh, H.T., Robitaille, G., Turner, J.D., 1991. Establishment of bovine mammary epithelial cells (MAC-T): an in vitro model for bovine lactation. *Exp. Cell Res.* 197, 191–199.
- Iglesias, J.M., Cairney, C.J., Ferrier, R.K., McDonald, L., Soady, K., Kendrick, H., Pringle, M.-A., Morgan, R.O., Martin, F., Smalley, M.J., Blyth, K., Stein, T., 2015. Annexin A8 identifies a subpopulation of transiently quiescent c-kit positive luminal progenitor cells of the ductal mammary epithelium. *PLoS One* 10, e0119718.
- Jacob, M.C., Mayol, J.F., Grunwald, D., 2006. Préparation et analyse des échantillons, in: *La Cytométrie En Flux.* p. 66.
- Jamrozik, J., Schaeffer, L.R., Dekkers, J.C., 1997. Genetic evaluation of dairy cattle using test day yields and random regression model. *J. Dairy Sci.* 80, 1217–1226.
- Jenkins, G.M., Amer, P., Stachowicz, K., Meier, S., 2016. Phenotypic associations between gestation length and production, fertility, survival, and calf traits. *J. Dairy Sci.* 99, 418–426.
- Jenness, R., 1974. Proceedings: Biosynthesis and composition of milk. *J. Invest. Dermatol.* 63, 109–118.
- Jenness, R., 1986. Lactational performance of various mammalian species. *J. Dairy Sci.* 69, 869–885.
- Jha, K.K., Banga, S., Palejwala, V., Ozer, H.L., 1998. SV40-Mediated immortalization. *Exp. Cell Res.* 245, 1–7.
- Jo, J., Garssen, J., Knippels, L., Sandalova, E., 2014. Role of cellular immunity in cow’s milk allergy: pathogenesis, tolerance induction, and beyond. *Mediators Inflamm.* 2014, 249784.
- Johnson, T.L., Tomanek, L., Peterson, D.G., 2013. A proteomic analysis of the effect of growth hormone on mammary alveolar cell-T (MAC-T) cells in the presence of lactogenic hormones. *Domest. Anim. Endocrinol.* 44, 26–35.

- Kang, C.-C., Yamauchi, K.A., Vlassakis, J., Sinkala, E., Duncombe, T.A., Herr, A.E., 2016. Single cell-resolution western blotting. *Nat. Protoc.* 11, 1508–1530.
- Kleinman, H., Martin, G., 2005. Matrigel: Basement membrane matrix with biological activity. *Semin. Cancer Biol.* 15, 378–386.
- Knight, C.H., Peaker, M., 1982. Development of the mammary gland. *J. Reprod. Fertil.* 65, 521–536.
- Knight, C.H., Peaker, M., 1984. Mammary development and regression during lactation in goats in relation to milk secretion. *Q. J. Exp. Physiol.* 69, 331–338.
- Kolek, O., Gajkowska, B., Godlewski, M.M., Motyl, T., 2003. Antiproliferative and apoptotic effect of TGF-beta 1 in bovine mammary epithelial BME-UV1 cells. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 134, 417–430.
- Kozłowski, M., Gajewska, M., Majewska, A., Jank, M., Motyl, T., 2009. Differences in growth and transcriptomic profile of bovine mammary epithelial monolayer and three-dimensional cell cultures. *J. Physiol. Pharmacol.* 60 Suppl 1, 5–14.
- Kratochwil, K., 1971. In vitro analysis of the hormonal basis for the sexual dimorphism in the embryonic development of the mouse mammary gland. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 25, 141–153.
- Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjoback, R., Sjogreen, B., Strombom, L., Stahlberg, A., Zoric, N., 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Mol. Aspects Med.* 27, 95–125.
- Kurien, B.T., Scofield, R.H., 2006. Western blotting. *Methods* 38, 283–293.
- Kushner, K.F., Velitok, I.G., Sebryakov, E. V, Sergienko, N.A., 1973. Phenotypical and genetic parameters of the functional indices of different quadrants of the udder in cows. Communication II. Phenotypical changes of the quadrants of the udder in cows. *Sov. Genet.* 7, 194–199.
- Lacasse, P., Lollivier, V., Bruckmaier, R.M., Boisclair, Y.R., Wagner, G.F., Boutinaud, M., 2011. Effect of the prolactin-release inhibitor quinagolide on lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 94, 1302–1309.
- Lambert, A., Ozturk, S., Thiagalingam, S., 2012. Integrin Signaling in Mammary Epithelial Cells and Breast Cancer. *ISRN Oncol.* 2012, 1–9.
- Lamote, I., Meyer, E., Massart-Leen, A.M., Burvenich, C., 2004. Sex steroids and growth factors in the regulation of mammary gland proliferation, differentiation, and involution. *Steroids* 69, 145–159.
- Lamouille, S., Xu, J., Derynck, R., 2014. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 178–196.
- Le Cozler, Y., Lollivier, V., Lacasse, P., Disenhaus, C., 2008. Rearing strategy and optimizing first-calving targets in dairy heifers: a review. *Animal* 2, 1393–1404.
- Lee, H.J., Ormandy, C.J., 2012. Interplay between progesterone and prolactin in mammary development and implications for breast cancer. *Mol. Cell. Endocrinol.* 357, 101–107.

- Leccia, F., Nardone, A., Corvigno, S., Vecchio, L. Del, De Placido, S., Salvatore, F., Veneziani, B.M., 2012. Cytometric and biochemical characterization of human breast cancer cells reveals heterogeneous myoepithelial phenotypes. *Cytometry. A* 81, 960–972.
- Lelyon, B., Chatellier, V., Daniel, K., 2012. Fin des quotas laitiers, contractualisation et stratégies productives : enseignements d'une modélisation bioéconomique. *Inra Prod. Anim* 2012,25 1–10.
- Li, J.-X., Zhang, Y., Ma, L.-B., Sun, J.-H., Yin, B.-Y., 2009. Isolation and culture of bovine mammary epithelial stem cells. *J. Vet. Med. Sci.* 71, 15–19.
- Liu, H., 2014. Application of immunohistochemistry in breast pathology: a review and update. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 138, 1629–1642.
- Lima, J.A.M., Ruas, J.R.M., Vasconcelos, A.C., Silper, B.F., Lana, A.M.Q., Gheller, V.A., Saturnino, H.M., Reis, R.B., Coelho, S.G., 2015. Effects of bovine mammary gland biopsy and increased milking frequency on post-procedure udder health, histology, and milk yield. *Animal* 1–9.
- Lin, Y., Sun, X., Hou, X., Qu, B., Gao, X., Li, Q., 2016. Effects of glucose on lactose synthesis in mammary epithelial cells from dairy cow. *BMC Vet. Res.* 12, 81.
- Liu, W., Capuco, A. V., Romagnolo, D.F., 2006. Expression of cytosolic NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase in bovine mammary epithelium: Modulation by regulators of differentiation and metabolic effectors. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. 231, 599–610.
- Loeffler, M., Roeder, I., 2002. Tissue stem cells: definition, plasticity, heterogeneity, self-organization and models--a conceptual approach. *Cells. Tissues. Organs* 171, 8–26.
- Loizzi, R.F., 1985. Progesterone withdrawal stimulates mammary gland tubulin polymerization in pregnant rats. *Endocrinology* 116, 2543–2547.
- Lollivier, V., Guinard-Flament, J., Ollivier-Bousquet, M., Marnet, P.-G., 2002. Oxytocin and milk removal: two important sources of variation in milk production and milk quality during and between milkings. *Reprod. Nutr. Dev.* 42, 173–186.
- Lollivier, V., Marnet, P.-G., Delpal, S., Rainteau, D., Achard, C., Rabot, A., Ollivier-Bousquet, M., 2006. Oxytocin stimulates secretory processes in lactating rabbit mammary epithelial cells. *J. Physiol.* 570, 125–140.
- Lollivier, V., Lacasse, P., Angulo Arizala, J., Lambertson, P., Wiart, S., Portanguen, J., Bruckmaier, R., Boutinaud, M., 2015. In vivo inhibition followed by exogenous supplementation demonstrates galactopoietic effects of prolactin on mammary tissue and milk production in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 98, 8775–8787.
- Macey, M., 2007. Davies, D., in: *Flow Cytometry. Principles and Applications*. Human Press, Inc, New Jersey, United States of America, pp. 257–276.
- Maecker, H.T., Trotter, J., 2006. Flow cytometry controls, instrument setup, and the determination of positivity. *Cytometry. A* 69, 1037–1042.
- Magin, T.M., Vijayaraj, P., Leube, R.E., 2007. Structural and regulatory functions of keratins. *Exp. Cell Res.* 313, 2021–2032.

- Maguer-Satta, V., Besancon, R., Bachelard-Cascales, E., 2011. Concise review: neutral endopeptidase (CD10): a multifaceted environment actor in stem cells, physiological mechanisms, and cancer. *Stem Cells* 29, 389–396.
- Manninen, A., 2015. Epithelial polarity - Generating and integrating signals from the ECM with integrins. *Exp. Cell Res.* doi:10.1016/j.yexcr.2015.01.003
- Mansson, H.L., 2008. Fatty acids in bovine milk fat. *Food Nutr. Res.* 52.
- Martignani, E., Eirew, P., Accornero, P., Eaves, C.J., Baratta, M., 2010. Human milk protein production in xenografts of genetically engineered bovine mammary epithelial stem cells. *PLoS One* 5, e13372.
- Martinet, J., Houdebine, L.M., 1993. *Biologie de la lactation*, 1993rd ed. Paris.
- Masters, J.R., Stacey, G.N., 2007. Changing medium and passaging cell lines. *Nat. Protoc.* 2, 2276–2284.
- Mayol, F., Grunwald, D., 2006. Principes de la cytométrie en flux, in: *La Cytométrie En Flux*. pp. 3–27.
- McManaman, J.L., Neville, M.C., 2003. Mammary physiology and milk secretion. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55, 629–641.
- Meyer, M.J., Capuco, A. V, Ross, D.A., Lintault, L.M., Van Amburgh, M.E., 2006. Developmental and nutritional regulation of the prepubertal bovine mammary gland: II. Epithelial cell proliferation, parenchymal accretion rate, and allometric growth. *J. Dairy Sci.* 89, 4298–4304.
- Mikaelian, I., Hovick, M., Silva, K. a, Burzenski, L.M., Shultz, L.D., Ackert-Bicknell, C.L., Cox, G. a, Sundberg, J.P., 2006. Expression of terminal differentiation proteins defines stages of mouse mammary gland development. *Vet. Pathol.* 43, 36–49.
- Mills, E.S., Topper, Y.J., 1969. Mammary alveolar epithelial cells: effect of hydrocortisone on ultrastructure. *Science* 165, 1127–1128.
- Mollett, T.A., Erb, R.E., Monk, E.L., Malven, P. V, 1976. Changes in estrogen, progesterone, prolactin and lactation traits associated with injection of estradiol-17beta and progesterone into lactating cows. *J. Anim. Sci.* 42, 655–663.
- Mohd Nor, N., Steeneveld, W., van Werven, T., Mourits, M.C.M., Hogeveen, H., 2013. First-calving age and first-lactation milk production on Dutch dairy farms. *J. Dairy Sci.* 96, 981–992.
- Morrissey, A.D., Cameron, A.W.N., Tilbrook, A.J., 2008. Artificial lighting during winter increases milk yield in dairy ewes. *J. Dairy Sci.* 91, 4238–4243.
- Motyán, J.A., Toth, F., Tozser, J., 2013. Research applications of proteolytic enzymes in molecular biology. *Biomolecules* 3, 923–942.
- Motyl, T., Gajkowska, B., Zarzynska, J., Gajewska, M., Lamparska-Przybysz, M., 2006. Apoptosis and autophagy in mammary gland remodeling and breast cancer chemotherapy. *J. Physiol. Pharmacol.* 57 Suppl 7, 17–32.

- Motyl, T., Bierła, J.B., Kozłowski, M., Gajewska, M., Gajkowska, B., Koronkiewicz, M., 2011. Identification, quantification and transcriptional profile of potential stem cells in bovine mammary gland. *Livest. Sci.* 136, 136–149.
- Mustafa, A. (2001): *Biology of Lactation (342-460B)*. Course outline Winter 2001, <http://animsci.agrenv.mcgill.ca/courses/460>.
- Neville, M.C., Medina, D., Monks, J., Hovey, R.C., 1998. The mammary fat pad. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*.
- Neville, M.C., McFadden, T.B., Forsyth, I., 2002. Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 7, 49–66.
- Nickerson, S., Akers, R.M., 2002. Mammary gland anatomy. *Encycl. Dairy Sci.*
- Nogalski, Z., Piwczynski, D., 2012. Association of length of pregnancy with other reproductive traits in dairy cattle. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* 25, 22–27.
- Norgaard, J. V., Sorensen, M.T., Theil, P.K., Sehested, J., Sejrsen, K., 2008. Effect of pregnancy and feeding level on cell turnover and expression of related genes in the mammary tissue of lactating dairy cows. *Animal* 2, 588–594.
- O’Gorman, M.R., Thomas, J., 1999. Isotype controls--time to let go? *Cytometry* 38, 78–80.
- Ollivier-Bousquet, M., 2002. Milk lipid and protein traffic in mammary epithelial cells: joint and independent pathways. *Reprod. Nutr. Dev.* 42, 149–162.
- Onder, T.T., Gupta, P.B., Mani, S.A., Yang, J., Lander, E.S., Weinberg, R.A., 2008. Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Cancer Res.* 68, 3645–3654.
- Ontsouka, E.C., Bertschi, J.S., Huang, X., Luthi, M., Muller, S., Albrecht, C., 2016. Can widely used cell type markers predict the suitability of immortalized or primary mammary epithelial cell models? *Biol. Res.* 49, 1.
- Pastrana, E., Silva-Vargas, V., Doetsch, F., 2011. Eyes wide open: a critical review of sphere-formation as an assay for stem cells. *Cell Stem Cell* 8, 486–498.
- Patel, O. V., Takenouchi, N., Takahashi, T., Hirako, M., Sasaki, N., Domeki, I., 1999. Plasma oestrone and oestradiol concentrations throughout gestation in cattle: relationship to stage of gestation and fetal number. *Res. Vet. Sci.* 66, 129–133.
- Paulson, J., Salfer, J., Newel, S., Santi, E., Seykora, T., Litherland, N., Endres, N., Janni, K., Renau, J., Broadwater, N., Schwartau, C., Rozeboom, G., Hudson, C., Salfer, L., Schmidt, S., 2015. *Learning about dairy*. Minnesota, United States of America.
- Peaker, M., Wilde, C.J., 1996. Feedback control of milk secretion from milk. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 1, 307–315.
- Pechoux, C., Gudjonsson, T., Ronnov-Jessen, L., Bissell, M.J., Petersen, O.W., 1999. Human mammary luminal epithelial cells contain progenitors to myoepithelial cells. *Dev. Biol.* 206, 88–99.
- Plath, A., Einspanier, R., Peters, F., Sinowatz, F., Schams, D., 1997. Expression of

- transforming growth factors alpha and beta-1 messenger RNA in the bovine mammary gland during different stages of development and lactation. *J. Endocrinol.* 155, 501–511.
- Proia, D.A., Kuperwasser, C., 2006. Reconstruction of human mammary tissues in a mouse model. *Nat. Protoc.* 1, 206–214.
- Prpar, S., Martignani, E., Dovc, P., Baratta, M., 2012. Identification of goat mammary stem/progenitor cells. *Biol. Reprod.* 86, 117.
- Prpar, S., Dovc, P., 2013. Mammary tumors in ruminants. *Acta agriculturae Slov.* 102, 83–86.
- Pullan, S., Wilson, J., Metcalfe, A., Edwards, G.M., Goberdhan, N., Tilly, J., Hickman, J.A., Dive, C., Streuli, C.H., 1996. Requirement of basement membrane for the suppression of programmed cell death in mammary epithelium. *J. Cell Sci.* 109 (Pt 3, 631–642.
- Pursley, J.R., Wiltbank, M.C., Stevenson, J.S., Ottobre, J.S., Garverick, H.A., Anderson, L.L., 1997. Pregnancy rates per artificial insemination for cows and heifers inseminated at a synchronized ovulation or synchronized estrus. *J. Dairy Sci.* 80, 295–300.
- Qi, P.X., 2007. Studies of casein micelle structure: the past and the present. *Lait* 87, 363–383.
- Rabot, A., Sinowatz, F., Berisha, B., Meyer, H.H.D., Schams, D., 2007. Expression and localization of extracellular matrix-degrading proteinases and their inhibitors in the bovine mammary gland during development, function, and involution. *J. Dairy Sci.* 90, 740–748.
- Rauner, G., Barash, I., 2012. Cell hierarchy and lineage commitment in the bovine mammary gland. *PLoS One* 7.
- Rauner, G., Barash, I., 2015. Enrichment for Repopulating Cells and Identification of Differentiation Markers in the Bovine Mammary Gland. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*.
- Raymond, K., Faraldo, M.M., Deugnier, M.A., Glukhova, M. a., 2012. Integrins in mammary development. *Semin. Cell Dev. Biol.* 23, 599–605.
- Riley, L.G., Gardiner-Garden, M., Thomson, P.C., Wynn, P.C., Williamson, P., Raadsma, H.W., Sheehy, P.A., 2010. The influence of extracellular matrix and prolactin on global gene expression profiles of primary bovine mammary epithelial cells in vitro. *Anim. Genet.* 41, 55–63.
- Robinson, J.T., 1977. Reproduction in cattle, in: *Reproduction in Domestic Animals*. Academic press, United States of America, p. 439.
- Roederer, M., 2001. Spectral compensation for flow cytometry: visualization artifacts, limitations, and caveats. *Cytometry* 45, 194–205.
- Rodilla, V., Dasti, A., Huyghe, M., Lafkas, D., Laurent, C., Reyat, F., Fre, S., 2015. Luminal progenitors restrict their lineage potential during mammary gland development. *PLoS Biol.* 13, e1002069.
- Ruan, W., Kleinberg, D.L., 1999. Insulin-like growth factor I is essential for terminal end bud formation and ductal morphogenesis during mammary development. *Endocrinology* 140,

5075–5081.

- Safayi, S., Theil, P.K., Elbrønd, V.S., Hou, L., Engbaek, M., Nørgaard, J. V, Sejrsen, K., Nielsen, M.O., 2010. Mammary remodeling in primiparous and multiparous dairy goats during lactation. *J. Dairy Sci.* 93, 1478–90.
- Safayi, S., Korn, N., Bertram, A., Akers, R.M., Capuco, A. V, Pratt, S.L., Ellis, S., 2012. Myoepithelial cell differentiation markers in prepubertal bovine mammary gland: effect of ovariectomy. *J. Dairy Sci.* 95, 2965–2976.
- Schams, D., Kohlenberg, S., Amselgruber, W., Berisha, B., Pfaffl, M.W., Sinowatz, F., 2003. Expression and localisation of oestrogen and progesterone receptors in the bovine mammary gland during development, function and involution. *J. Endocrinol.* 177, 305–317.
- Schillo, K.K., Hall, J.B., Hileman, S.M., 1992. Effects of nutrition and season on the onset of puberty in the beef heifer. *J. Anim. Sci.* 70, 3994–4005.
- Schmid, E., Franke, W.W., Grund, C., Schiller, D.L., Kolb, H., Paweletz, N., 1983. An epithelial cell line with elongated myoid morphology derived from bovine mammary gland. Expression of cytokeratins and desmosomal plaque proteins in unusual arrays. *Exp. Cell Res.* 146, 309–328.
- Schutz, M.M., Hansen, L.B., Steuernagel, G.R., Kuck, A.L., 1990. Variation of Milk, Fat, Protein, and Somatic Cells for Dairy Cattle¹. *J. Dairy Sci.* 73, 484–493.
- Seaberg, R.M., van der Kooy, D., 2003. Stem and progenitor cells: the premature desertion of rigorous definitions. *Trends Neurosci.* 26, 125–131.
- Sérieys, F., 1997. *Le tarissement des vaches laitières*. Paris, France.
- Shackleton, M., Vaillant, F., Simpson, K.J., Stingl, J., Smyth, G.K., Asselin-Labat, M.-L., Wu, L., Lindeman, G.J., Visvader, J.E., 2006. Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature* 439, 84–88.
- Shapiro, H.M., 2003. Practical flow cytometry, in: *Practical Flow Cytometry*. Wiley & Sons, Inc, New Jersey, United States of America, pp. 1–2; 38–39.
- Shehata, M., Teschendorff, A., Sharp, G., Novcic, N., Russell, I.A., Avril, S., Prater, M., Eirew, P., Caldas, C., Watson, C.J., Stingl, J., 2012. Phenotypic and functional characterisation of the luminal cell hierarchy of the mammary gland. *Breast Cancer Res.* 14, R134.
- Singh, K., Davis, S.R., Dobson, J.M., Molenaar, A.J., Wheeler, T.T., Prosser, C.G., Farr, V.C., Oden, K., Swanson, K.M., Phyn, C.V.C., Hyndman, D.L., Wilson, T., Henderson, H. V, Stelwagen, K., 2008. cDNA microarray analysis reveals that antioxidant and immune genes are upregulated during involution of the bovine mammary gland. *J. Dairy Sci.* 91, 2236–2246.
- Sinha, Y.N., Tucker, H.A., 1969. Mammary development and pituitary prolactin level of heifers from birth through puberty and during the estrous cycle. *J. Dairy Sci.* 52, 507–512.
- Sleeman, K.E., Kendrick, H., Ashworth, A., Isacke, C.M., Smalley, M.J., 2006. CD24

- staining of mouse mammary gland cells defines luminal epithelial, myoepithelial/basal and non-epithelial cells. *Breast Cancer Res.* 8, R7.
- Smith, G.H., Medina, D., 1988. A morphologically distinct candidate for an epithelial stem cell in mouse mammary gland. *J. Cell Sci.* 90 (Pt 1), 173–183.
- Sobolewska, A., Motyl, T., Gajewska, M., 2011. Role and regulation of autophagy in the development of acinar structures formed by bovine BME-UV1 mammary epithelial cells. *Eur. J. Cell Biol.* 90, 854–64.
- Sorensen, A., Knight, C.H., 2002. Endocrine profiles of cows undergoing extended lactation in relation to the control of lactation persistency. *Domest. Anim. Endocrinol.* 23, 111–123.
- Sorensen, M.T., Norgaard, J. V, Theil, P.K., Vestergaard, M., Sejrsen, K., 2006. Cell turnover and activity in mammary tissue during lactation and the dry period in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 89, 4632–4639.
- Spaas, J.H., Chiers, K., Bussche, L., Burvenich, C., Van de Walle, G.R., 2012. Stem/progenitor cells in non-lactating versus lactating equine mammary gland. *Stem Cells Dev.* 21, 3055–3067.
- Stefanon, B., Colitti, M., Gabai, G., Knight, C.H., Wilde, C.J., 2002. Mammary apoptosis and lactation persistency in dairy animals. *J. Dairy Res.* 69, 37–52.
- Stelwagen, K., Singh, K., 2014. The role of tight junctions in mammary gland function. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 19, 131–138. doi:10.1007/s10911-013-9309-1
- Stingl, J., Eaves, C.J., Zandieh, I., Emerman, J.T., 2001. Characterization of bipotent mammary epithelial progenitor cells in normal adult human breast tissue. *Breast Cancer Res. Treat.* 67, 93–109.
- Stingl, J., Eirew, P., Ricketson, I., Shackleton, M., Vaillant, F., Choi, D., Li, H.I., Eaves, C., 2006. Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells. *Nature* 439, 993–997.
- Strange, R., Li, F., Saurer, S., Burkhardt, A., Friis, R.R., 1992. Apoptotic cell death and tissue remodelling during mouse mammary gland involution. *Development* 115, 49 LP-58.
- Sun, P., Yuan, Y., Li, A., Li, B., Dai, X., 2010. Cytokeratin expression during mouse embryonic and early postnatal mammary gland development. *Histochem. Cell Biol.* 133, 213–221.
- Svennersten-Sjaunja, K., Olsson, K., 2005. Endocrinology of milk production. *Domest. Anim. Endocrinol.* 29, 241–258.
- Taddei, I., Faraldo, M.M., Teuliere, J., Deugnier, M.-A., Thiery, J.P., Glukhova, M.A., 2003. Integrins in mammary gland development and differentiation of mammary epithelium. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 8, 383–394.
- Takenouchi, T., Yoshioka, M., Yamanaka, N., Kitani, H., 2010. Reversible conversion of epithelial and mesenchymal phenotypes in SV40 large T antigen-immortalized rat liver cell lines. *Cell Biol. Int. Rep.* 17, e00001.

- Terstappen, L.W., Rao, C., Gross, S., Kotelnikov, V., Racilla, E., Uhr, J., Weiss, A., 1998. Flow cytometry--principles and feasibility in transfusion medicine. Enumeration of epithelial derived tumor cells in peripheral blood. *Vox Sang.* 74 Suppl 2, 269–274.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76, 4350–4354.
- Trott, J.F., Vonderhaar, B.K., Hovey, R.C., 2008. Historical perspectives of prolactin and growth hormone as mammogens, lactogens and galactagogues--agog for the future! *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 13, 3–11.
- Tucker, H.A., 1969. Factors affecting mammary gland cell numbers. *J. Dairy Sci.* 52, 720–729.
- Vaillant, F., Lindeman, G.J., Visvader, J.E., 2011. Jekyll or Hyde: does Matrigel provide a more or less physiological environment in mammary repopulating assays? *Breast Cancer Res.* 13, 1–4.
- Veltmaat, J.M., Mailleux, A.A., Thiery, J.P., Bellusci, S., 2003. Mouse embryonic mammaryogenesis as a model for the molecular regulation of pattern formation. *Differentiation.* 71, 1–17.
- Vermouth, N.T., Deis, R.P., 1974. Prolactin release and lactogenesis after ovariectomy in pregnant rats: effect of ovarian hormones. *J. Endocrinol.* 63, 13–20.
- Villadsen, R., Fridriksdottir, A.J., Ronnov-Jessen, L., Gudjonsson, T., Rank, F., LaBarge, M.A., Bissell, M.J., Petersen, O.W., 2007. Evidence for a stem cell hierarchy in the adult human breast. *J. Cell Biol.* 177, 87–101.
- Vincent-Salomon, A., Thiery, J.P., 2003. Host microenvironment in breast cancer development: epithelial-mesenchymal transition in breast cancer development. *Breast Cancer Res.* 5, 101–106.
- Visvader, J.E., Lindeman, G.J., 2006. Mammary stem cells and mammaryogenesis. *Cancer Res.* 66, 9798–9801.
- Visvader, J.E., Stingl, J., 2014. Mammary stem cells and the differentiation hierarchy: current status and perspectives. *Genes Dev.* 28, 1143–1158.
- Wathes, D.C., Pollott, G.E., Johnson, K.F., Richardson, H., Cooke, J.S., 2014. Heifer fertility and carry over consequences for life time production in dairy and beef cattle. *Animal* 8 Suppl 1, 91–104.
- Watson, C.J., Khaled, W.T., 2008. Mammary development in the embryo and adult: a journey of morphogenesis and commitment. *Development* 135, 995–1003.
- Wilde, C.J., Addey, C. V, Boddy, L.M., Peaker, M., 1995. Autocrine regulation of milk secretion by a protein in milk. *Biochem. J.* 305 (Pt 1, 51–58).
- Williams, J.M., Daniel, C.W., 1983. Mammary ductal elongation: differentiation of myoepithelium and basal lamina during branching morphogenesis. *Dev. Biol.* 97, 274–290.

- Yamaji, D., Kang, K., Robinson, G.W., Hennighausen, L., 2013. Sequential activation of genetic programs in mouse mammary epithelium during pregnancy depends on STAT5A/B concentration. *Nucleic Acids Res.* 41, 1622–1636.
- Yang, J., Richards, J., Bowman, P., Guzman, R., Enami, J., McCormick, K., Hamamoto, S., Pitelka, D., Nandi, S., 1979. Sustained growth and three-dimensional organization of primary mammary tumor epithelial cells embedded in collagen gels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76, 3401–3405.
- Yart, L., 2012. Role des stéroïdes ovariens dans la dynamique cellulaire et moléculaire de la glande mammaire bovine. *Agrocampus ouest*.
- Yart, L., Finot, L., Marnet, P.-G., Dessauge, F., 2012. Suppression of ovarian secretions before puberty strongly affects mammogenesis in the goat. *J. Dairy Res.* 79, 157–167.
- Yart, L., Finot, L., Lollivier, V., Dessauge, F., 2013. Oestradiol enhances apoptosis in bovine mammary epithelial cells in vitro. *J. Dairy Res.* 80, 113–21.
- Zavizion, B., Politis, I., Gorewit, R.C., 1992. Bovine Mammary Myoepithelial Cells. 2. Interactions with Epithelial Cells In Vitro. *J. Dairy Sci.* 75, 3381–3393.
- Zavizion, B., Gorewit, R.C., Politis, I., 1995. Subcloning the MAC-T bovine mammary epithelial cell line: morphology, growth properties, and cytogenetic analysis of clonal cells. *J. Dairy Sci.* 78, 515–527.
- Zavizion, B., van Duffelen, M., Schaeffer, W., Politis, I., 1996. Establishment and characterization of a bovine mammary epithelial cell line with unique properties. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 32, 138–148.
- Zarzynska, J., Gajewska, M., Motyl, T., 2005. Effects of hormones and growth factors on TGF-beta1 expression in bovine mammary epithelial cells. *J. Dairy Res.* 72, 39–48.
- Zarzynska, J., Gajkowska, B., Wojewodzka, U., Dymnicki, E., Motyl, T., 2007. 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.* 10, 1–9.
- Zhao, F.-Q., Keating, A.F., 2007. Expression and regulation of glucose transporters in the bovine mammary gland. *J. Dairy Sci.* 90 Suppl 1, E76–86.
- Zhou, Y., Akers, R.M., Jiang, H., 2008. Growth hormone can induce expression of four major milk protein genes in transfected MAC-T cells. *J. Dairy Sci.* 91, 100–108.
- Zola, H., Swart, B., Boumsell, L., Mason, D.Y., 2003. Human Leucocyte Differentiation Antigen nomenclature: update on CD nomenclature. Report of IUIS/WHO Subcommittee. *J. Immunol. Methods*.

Annexes

Annexe 1

Gordon Research Conference on Mammary Gland Biology 8-13 June, Lucca (Barga), Italy

Methodological applications to determine mammary cell fate in lactating cows by cell phenotyping

M. Arévalo Turrubiarte^{a,b}, M.H. Perruchot^{a,b}, V. Lollivier^{b,a}, L. Finot^{a,b}, F. Mayeur^{a,b}, F. Dessauge^{a,b}

^a INRA, UMR1348 Pegase, F-35590 Saint-Gilles, France

^b Agrocampus Ouest, UMR1348 Pegase, F-35590 Rennes, France

Mammary gland cellular proliferation/differentiation patterns determine milk yield. The lobulo-alveolar structures of the mammary gland are composed by the basal and luminal layers. They consist in mammary epithelial cells (MEC), adipocytes, fibroblasts and other cell types. Mammary plasticity differs through lactation due to cellular type composition, cellular fate (progenitor/stem cells), paracrine signals, cellular activity and tissue microenvironment. Cellular mammary gland plasticity needs to be evaluated to know cellular influence in milk yield; cellular surface markers help to phenotype cellular type. The objective of this study is to develop an accurate methodology in cell type determination by obtaining cells from bovine mammary gland biopsies through different lactation periods. Biopsies of mammary gland from Holstein cows (n=8) were obtained at different lactation stages. Productive parameters of milk (quality and production) were determined. Explants of mammary gland were prepared and cultured in collagen dishes. Enzymatic digestion (hyaluronidase/collagenase) and different protocols related to cellular dissociation systems by Gentle MACs/classic dissociation system were made to compare the total cellular monosuspension. Cellular pool extraction was plated under Matrigel culture conditions to determine cellular proliferation and differentiation potentials. Phenotype analysis by Fluorescence-Activated Cell Sorter (FACS) was made. Cell surface markers (CD49f, CD29, CD45, CD90, EpCAM and Sca-1) were analyzed by the flux cytometer. Cellular size (FSC), granularity (SSC) and cell mortality were determined. Mammary gland identification of cellular population depends on mammary tissue stage during lactation. To date, mammary gland plasticity in milk cows have not been determined through a complete lactation cycle. Specific and suitable markers in bovine mammary gland need to be verified.

Identification de biomarqueurs pour étudier la plasticité mammaire et pour prédire l'efficacité de production de vaches laitières

AREVALO-TURRUBIARTE Magdalena, PERRUCHOT Marie-Hélène, LOLLIVIER Vanessa & DESSAUGE Frédéric
INRA Agrocampus Ouest – UMR PEGASE – 35590 Saint Gilles

Introduction

✓ La production de lait chez la vache est représentée par une courbe de lactation (Fig. 1). La glande mammaire est un organe dynamique composé de plusieurs populations cellulaires dont les proportions varient en fonction du stade physiologique pendant la lactation (Fig. 1).

Objectif générale: Identification et validation de biomarqueurs pour étudier la production du lait pendant un cycle de lactation et pour comprendre la fonction de la lactation .

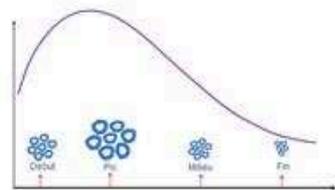
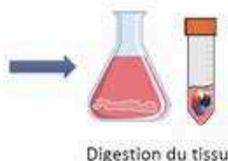


Fig.1 Evolution du tissu sécrétoire au cours d'un cycle de lactation

Matériels et méthodes



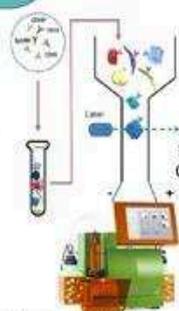
Prélèvement par biopsie* (de la glande mammaire) (n=6)



Digestion du tissu



Obtention de cellules



Identification de différents types cellulaires (cytométrie en flux et immuno-histochimie)

Phénotypage de cellules par 4 marqueurs de surface: CD49f, CD24, EpCAM et CD10

Résultats

✓ Validation de biomarqueurs par cytométrie en flux et immuno-histochimiques ont permis de mettre en évidence *in situ* la localisation spécifique des différents marqueurs (Figure 2):

CD49f: cellules épithéliales
EpCAM: cellules luminales

CD24: cellules basales
CD10: cellules myoépithéliales

- ✓ Les résultats mettent en évidence une évolution significative de différentes populations cellulaires au cours de la lactation (Fig 3)
- ✓ Le tissu mammaire évolue au cours de la lactation (Fig 4)
- ✓ La production de lait est représentée par une courbe de lactation classique (Fig 5)
- ✓ Les analyses ont montré une corrélation positive entre la production laitière et la proportion de cellules progénitrices bi-potentes (Figure 6)

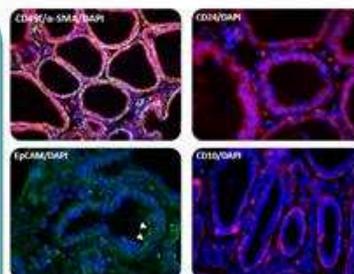


Figure 2: Immuno-Histochimies

Types cellulaires	Marqueurs (%)	Jours de lactation			
		30	90	150	250
Cellules épithéliales	CD49f ^a	47.0 ^a	44.1 ^a	38.6 ^{ab}	28.8 ^b
Cellules myoépithéliales	CD10 ^a	4.0 ^a	4.7 ^a	3.9 ^a	4.7 ^a
Cellules lumino-ductales	EpCAM/CD49f ^a	55.0 ^a	53.3 ^a	57.9 ^{ab}	68.9 ^b
Cellules progénitrices	CD24/CD49f ^a	38.2 ^a	35.9 ^a	31.9 ^{ab}	23.8 ^b
Cellules souches	CD24/CD49f ^a	2.4 ^a	3.3 ^a	0.9 ^a	0.7 ^a

Figure 3: Analyses des populations cellulaires post-cytométrie en flux



Figure 4: Coupes histologiques du tissu mammaire au cours la lactation

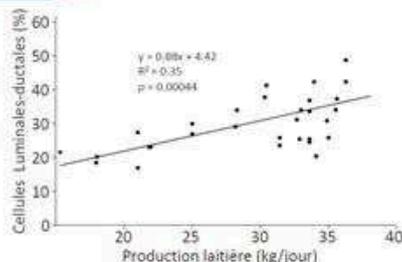


Fig 6, Proportion de cellules progénitrices bipotentes / production laitière

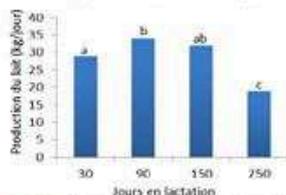


Figure 5: Production du lait pendant les prélèvements de biopsies

Conclusions

- ✓ Validation de marqueurs fonctionnels pour le phénotypage fin de la glande mammaire et localisation dans la glande mammaire.
- ✓ Lien entre les population cellulaires et la production du lait Les populations de cellules souches varient peu au cours de la lactation: leur nombre est-il fixé à la puberté ?

Mammary Epithelial Cell Hierarchy in the Dairy Cow Throughout Lactation

Marie-Hélène Perruchot, Magdalena Arévalo-Turrubiarte, Florence Dufreneix, Laurence Finot, Vanessa Lollivier, Eric Chanat, Frédérique Mayeur, and Frédéric Dessauge

The plasticity of the mammary gland relies on adult mammary stem cells (MaSCs) and their progenitors, which give rise to various populations of mammary epithelial cells (MECs). To face global challenges, an in-depth characterization of milk-producing animal mammary gland plasticity is required, to select more sustainable and robust dairy cows. The identification and characterization of MaSC and their progenitors will also provide innovative tools in veterinary/human medicine regarding mammary tissue damage (carcinogenesis, bacterial infections). This study aimed to determine the dynamics of mammary cell populations throughout a lactation cycle. Using mammary biopsies from primiparous lactating dairy cows at 30, 90, 150, and 250 days of lactation, we phenotyped cell populations by flow cytometry. To investigate cell lineages, we used specific cell-surface markers, including CD49_f, CD24, EpCAM (epithelial cell adhesion molecule), and CD10. Two cell populations linked to milk production were identified: CD49_f⁺/EpCAM⁻ ($y=0.88x+4.42$, $R^2=0.36$, $P<0.05$) and CD49_f⁻/EpCAM⁻ ($y=-1.15x+92.44$, $R^2=0.51$, $P<0.05$) cells. Combining immunostaining analysis, flow cytometry, daily milk production data, and statistical approaches, we defined a stem cell population (CD24⁺/CD49_f⁺) and four progenitor cell populations that include bipotent luminal progenitors (CD24⁻/CD49_f⁺), lumino-alveolar progenitors (CD24⁻/EpCAM⁺), myoepithelial progenitors (CD24⁺/CD10⁻), and lumino-ductal progenitors (CD49_f⁻/EpCAM⁺). Interestingly, we found that the bipotent luminal progenitors (CD24⁻/CD49_f⁺) decreased significantly ($P<0.05$) during lactation. This study provides the first results of mammary cell lineage, allowing insight into mammary cell plasticity during lactation.

Introduction

MILK YIELD (MY), and therefore, the sustainability of livestock, are determined by breeding strategies and are finely regulated by cellular mechanisms determining the number and the activity of secretory cells [1] within the mammary gland. The mammary epithelium is composed of two cell layers: a luminal layer, lining the lumen of ducts and alveoli, and an external basal myoepithelial layer [2]. The stroma compartment that surrounds this epithelium is composed of several other cell types (adipocytes, fibroblasts, and immune cells) that are responsible for mammary plasticity and homeostasis. During lactation in the dairy cow, the mammary tissue undergoes extensive morphological and functional remodeling, linked to cellular and architectural changes [3].

During early lactation, the rate of proliferating mammary cells overtakes the rate of apoptosis, thereby increasing the number of mammary cells. The decline in MY during late lactation is due to loss of mammary cells (apoptosis) and remodeling of mammary tissue. This results in alveolar regression during involution [4]. To date, our understanding of the phenotypic differentiation of mammary epithelial cells

(MECs) is limited. Current knowledge in mice and humans indicates the existence of stem cell and/or bipotent stem/progenitor cell populations that give rise to mature/differentiated cells [5]. The presence of mammary stem cells (MaSCs) and their progenitors in the bovine mammary gland has been recently shown [6]. Since they play a crucial role in cell proliferation and tissue regeneration, the characterization of bovine MaSCs is needed, to improve dairy cow productivity and mammary gland health, as well as to expand the lifespan of cows. In addition, the bovine mammary gland represents an excellent alternative model for biomedical research to investigate the role of MaSC in mammary function and carcinogenesis [7].

Evidence for the existence of MaSCs has been primarily derived from transplantation experiments with murine mammary tissues. These studies revealed that ductal architecture could be regenerated in vivo when isolated parenchymal segments were transplanted into cleared mammary fat pads [8–10]. Furthermore, it was shown that epithelial cells isolated from virgin, pubertal, gestational, and lactating glands could all repopulate cleared fat pads [9]. As such a variety of parenchymal structures can regenerate a complete

parenchymal framework; it is likely that progenitor or stem cells are present throughout the mammary epithelium. To date, MaSC studies in ruminants have been very sparse. Recently, Baratta et al. investigated different epithelial cell subpopulations in milk cells by flow cytometry [11]. They found an increase in CD49^f cells and cytokeratin 14/18 cells at the end of lactation in dairy cows.

In 2002, Ellis and Capuco were the first to provide data on the proliferation rate of MECs, using histological analysis of mammary gland explants from heifers, which were injected with BrdU before euthanasia [6]. They identified different staining intensities in MEC populations and proposed that the lightly stained cells were the primary proliferative cell population. In 2010, Martignani et al. showed that a putative bovine MaSC population was able to regenerate and maintain a complete mammary gland structure [12]. They hypothesized that these putative MaSCs can give rise either to luminal (cytokeratin 18 positive) or myoepithelial (cytokeratin 14 positive) cells under specific cell culture conditions. To our knowledge, no studies have been performed on the lineage, hierarchy, and proportion of mammary cell populations throughout a lactation cycle.

Flow cytometry with specific cell-surface markers is a sensitive approach to lineage and quantifies cell populations and subpopulations in the mammary gland [7]. The expression of cluster of differentiation (CD) molecules, such as heat stable antigen (CD24) and integrin alpha-6 (CD49_f), has been widely used to identify epithelial cells in the mammary gland [13,14]. Recently, four populations have been found in the developing mammary gland (at puberty) by expression of CD24 and CD49_f. Cell sorting experiments allowed the characterization of putative stem cells (CD24^{Med}CD49_f^{Pos}), putative progenitor cells (CD24^{High}CD49_f^{Neg}), and basal (CD24^{Neg}CD49_f^{Pos}) and luminal (CD24^{Med}CD49_f^{Neg}) subpopulations [15].

In the human mammary gland, the combination of the cell-surface markers EpCAM (epithelial cell adhesion molecule) and CD49_f has served to identify basal cell populations [16,17]. In lactating goats, EpCAM has been found by immunostaining in luminal populations of alveoli and seems to be related to cell proliferation [18]. Moreover, cell populations expressing EpCAM and CD49_f represent a source of mammary progenitors with stem cell characteristics, due to their ability to form mammospheres [19–21]. To characterize myoepithelial cells, the neutral endopeptidase CD10, also called common acute lymphoblastic leukemia antigen (CALLA), has been identified at the apical surface of myoepithelial cells during cell contraction in the mammary gland [22,23]. In the bovine mammary gland, CD10 has also been shown to be a relevant marker of myoepithelial cell differentiation in prepubertal bovine mammary gland [24].

The present study aims to determine the cellular hierarchy throughout a lactation cycle, to understand the involvement of the various cellular populations in bovine mammary gland plasticity and milk production. Toward this aim, we used flow cytometry to identify cellular populations using the cell-surface markers CD49_f, CD24, EpCAM, and CD10 in mammary explant sampled from lactating dairy cows at 30, 90, 150, and 250 days of lactation. The identification of cell populations allowed us to highlight MEC plasticity during lactating periods.

Materials and Methods

All animal procedures were discussed and approved by the National Ethics Committee for Animal Experiments (File No. 00943.02), in compliance with French regulations (Decree No. 2001-464, May 29, 2001).

Animals and experimental design

The five primiparous Holstein cows used in this study were raised at the Méjusseume INRA-Rennes (France) experimental barn. The cows were collectively housed and fed in barns during the winter and in fields during the summer. They were milked twice daily during the entire experimental period.

Milk production recording and milk composition analysis

The MY was recorded daily for 52 weeks. Milk samples were collected weekly for somatic cell counting (SCC) and milk composition analysis. Milk protein and fat contents were determined by an independent laboratory using an infrared method (LILLAB, Chateaugiron, France).

Mammary tissue sampling

Mammary tissue samples were collected by biopsy at days 30 (B1), 90 (B2), 150 (B3), and 250 (B4) of lactation (adapted from the method of Farr et al. [25]) from the left and the right halves of the udder. Biopsies were taken approximately halfway between the base of the teat and the dorsal body wall in a region containing a large amount of secretory tissue. Each biopsy was divided into three parts. The first part was cut into small explants (1 mm³) and samples were stored in 90% fetal bovine serum (FBS, 10270-106; Gibco)/10% dimethyl sulfoxide (DMSO) at -150°C for tissue digestion and cell isolation. The second part was immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until RNA extraction was performed. The last part was washed in phosphate-buffered saline (PBS) before fixation for histological analysis (See Histological section). DMSO and PBS were from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France, www.sigmaaldrich.com/france). FBS was purchased from Invitrogen (Gibco Invitrogen Saint Aubin, France, www.invitrogen.com).

Mammary biopsy digestion and single cell suspension

Tissue explants were thawed and incubated for 3 h at 37°C in a digestion medium containing Dulbecco's modified Eagle's medium nutrient mixture F-12 (31331-028; Gibco), 5% FBS, 5 µg/mL insulin (15523; Sigma-Aldrich), 1 µg/mL hydrocortisone (H-0888; Sigma-Aldrich), 7,000 U/mL collagenase type II (54N15271; Worthington), and 2,000 U/mL hyaluronidase (H3506-G1; Sigma-Aldrich). After centrifugation at 500 g for 5 min at 4°C, 2 mL of trypsin-ethylene-diamine-tetraacetic acid (EDTA, T4049-100ML; Sigma-Aldrich) was added to the pellet to complete the dissociation process. After centrifugation, the pellet, composed of cells and remaining tissue, was drained through a 70 µm filter (Miltenyi Biotec,

Paris, France, www.miltenyibiotec.com/en) and washed with Hank's balanced salt solution, 5% FBS, to obtain a single cell suspension. Cells were then processed for flow cytometry phenotyping (see Flow Cytometry Analysis section). Collagenase was purchased from Serlabo (www.serlabo.fr/index.php).

Histological analysis

Mammary tissue samples were fixed in 4% paraformaldehyde (pH 7.4) (P6118; Sigma-Aldrich) for 2 h and paraffin embedded (327204; Sigma-Aldrich) using standard protocols provided by the H2P2 platform (University of Rennes 1, France). Tissue sections (5 µm thickness) were mounted on Superfrost Plus slides (4951PLUS4; Thermo Scientific, Paris, France, www.thermoscientific.com/en/home.html), deparaffinized with three different xylene baths, and rehydrated in successive graded ethanol-water baths (100% ethanol, 90% ethanol, 70% ethanol, and distilled water). After rehydration, the tissue sections were either stained with hematoxylin and eosin or processed for immunohistochemical labeling. After hematoxylin/eosin staining and drying, the slides were scanned using NanoZoomer Digital Pathology technology (Hamamatsu, Kitsa, Sweden) with automatic detection of the entire tissue section.

Immunological staining procedure

Immunohistochemical labeling was performed using slides bearing three tissue sections. Two tissue sections were processed for each primary antibody, while the third section was used as a negative control. Following rehydration, tissue sections were preincubated for 1 h in 0.2% Triton X-100 and 1% normal goat serum (NGS) in Tris-buffered saline (TBS) (1% TBS-NGS) and incubated overnight at 4°C with either anti-CD10-PE, anti-CD49_f-PE, anti-EpCAM-FITC, and anti-CD24-PE or alpha smooth muscle actin (αSMA) antibodies, all diluted at 1:200. Negative control (Isotypes) tissue sections were incubated in a drop of 1% TBS-NGS. Slides were rinsed with TBS and incubated with the relevant isotype control (1:300 dilution) for 1 h at room temperature. Slides were washed in TBS, treated with Hoechst 33258 dye (Sigma-Aldrich, Lyon, France) and mounted with VECTASHIELD mounting medium (H-1000; Vector Laboratories, Burlingame, CA). Tissue sections were observed by fluorescence microscopy using an Eclipse E400 Nikon microscope (Nikon France, Le Pallet, France), using both 568 and 350 nm wavelength absorption/excitation.

Quantitative real-time polymerase chain reaction procedure

Total RNA was extracted from tissue samples after grinding them in liquid nitrogen with a mortar and pestle using TRIzol (Invitrogen, Paris, France). Briefly, tissue powder was homogenized in 1 mL of TRIzol reagent, incubated for 5 min at room temperature, and supplemented with 200 µL chloroform (Sigma-Aldrich). The mixture was centrifuged at 12,000 g for 15 min at 4°C and the upper aqueous phase, which contains the total RNA, was recovered and mixed with 500 µL of isopropyl alcohol to precipitate the RNA. Total RNA was extracted using the RNeasy Mini Kit according to the manufacturer's instructions (74014; Qiagen). Total RNA concentration and the 260/280 nm and 260/230 nm absorbance ratios were measured on a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE).

RNA quality was then determined on an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Massy, France) by RNA profile and RNA integrity, measured using Agilent 2100 Expert Software, version B.02 (Agilent Technologies, www.agilent.com/home). Subsequently, total RNA (1 µg) was reverse transcribed using the VILO SuperScript Kit according to the manufacturer's recommendations (11754-050; Invitrogen). The cDNA was diluted 1:50 before use in quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR). Following reverse transcription, RT-qPCR was run on a StepOnePlus system (Applied Biosystems). Triplicate 12.5 µL reactions were carried out in 96-well optical reaction plates (Applied Biosystems, www.agilent.com/home) using SYBR Green PCR master mix with 200 nM of specific primer (*Cytokeratin 19*: Forward 5' GGCGGGCAACGAGAAGC 3', Reverse 5' CGAGAATCTGGTCCCGCAG 3') and 2.5 µL of diluted cDNA.

The amplification program consisted of an initial denaturation step at 95°C for 10 min followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 10 s and combined primer-annealing-extension at 60°C for 1 min, during which fluorescence was measured. A melting curve was produced after completion of the thermal PCR program to check for the presence of a gene-specific peak and the absence of a primer dimer. Raw cycle threshold (Ct) values obtained from raw StepOne Software version 2.3 (Applied Biosystems) were transformed into quantities using the comparative Ct method [26] and specific efficiencies. Ribosomal Protein Large P0 (RPLP0: Forward 5' CAACCCTGAAGTGCTTGACAT 3', Reverse 5' AGGAGATGGATCAGCCA 3') was used as the

TABLE 1. LIST OF ANTIBODIES USED IN FLOW CYTOMETRY ANALYSIS AND IMMUNOHISTOLOGY

Antigen	Primary antibody	Manufacturer	Reference	Dilution
CD10	CD10-PE-Vio770, human (clone: 97C5)	Miltenyi Biotec	130-100-421	1:10
Isotype control	Mouse IgG1-PE-Vio770	Miltenyi Biotec	130-096-654	1:10
CD24	CD24-APC, mouse (clone: M1/69)	Miltenyi Biotec	130-102-733	1:10
Isotype control	Rat IgG2b-APC	Miltenyi Biotec	130-102-664	1:10
CD49f	CD49f-FITC, human and mouse (clone: GoH3)	Miltenyi Biotec	130-097-245	1:10
Isotype control	Rat IgG2a-FITC	Miltenyi Biotec	130-102-653	1:10
EpCAM	CD326 (EpCAM)-VioBlue, human (clone: HEA-125)	Miltenyi Biotec	130-097-324	1:10
Isotype control	Mouse IgG1-VioBlue	Miltenyi Biotec	130-099-089	1:10

EpCAM, epithelial cell adhesion molecule; FITC, fluorescein isothiocyanate.

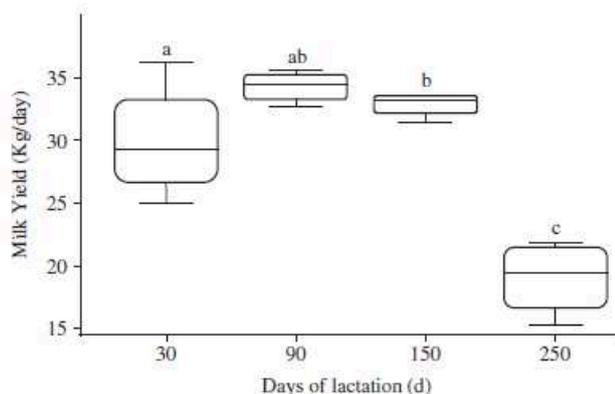


FIG. 1. Representative box plots of MY during the lactation cycle. Each box plot represents the mean (five dairy cows) of daily milk production (kg/day) before mammary gland biopsy at the indicated time point. The letters above the box plots indicate statistically significant ($P < 0.05$) differences between each value and the value at each of the other three time points. MY, milk yield.

endogenous control gene. Results at days 90, 150, and 250 are expressed as percent of the tissue content at day 30.

Flow cytometry analysis

Cells obtained from mammary biopsy digestions were prepared for flow cytometry analysis with MACS buffer (auto-MACS™ with 2% bovine serum albumin; Miltenyi Biotec, www.miltenyibiotec.com). Cells were dispensed at 500,000 cells in each tube. Cells were incubated in the dark at 4°C for 30 min with either one or a mixture of the following antibodies (see also Table 1): fluorescein isothiocyanate (FITC) anti-rat IgG1 CD49_f ($\alpha 6$ integrin), allophycocyanine (APC) anti-rat IgG2b κ CD24 (clone HAS), VioBlue® anti-mouse IgG1 CD326 (EpCAM) (Miltenyi Biotec), and anti-mouse IgG1 PE-VIO700 CD10 (CALLA; Miltenyi Biotec). Isotype controls were performed for each antibody to set the specific fluorescence, eliminating nonspecific background (Table 1).

After labeling, cells were centrifuged at 400 g and resuspended in 0.3 mL of MACS buffer. Multistaining of the four antibodies was performed to determine specific populations. Propidium iodide (PI) was used to identify the live cells. Acquisition of the PI-stained population was gated to

forward-scattered light (FSC) and side-scattered light (SSC) to exclude dead cells and delineate cell granularity and size, as well as doublets, by adjustments in height and photomultiplier voltage. Flow cytometry analysis was performed on a data set of 30,000 events (single cells) using an MACSQuant® Analyzer 10 (Miltenyi Biotec) and data were analyzed using MACSQuantify analysis software (Miltenyi Biotec). Results were expressed in percentages (dot plot analysis).

Statistical analyses

Each experimental condition was repeated thrice. Milk composition, flow cytometry, and qPCR data were subjected to analysis of variance (one-way ANOVA) using the following model: $y_{ij} = \mu + \text{time}_i + \epsilon_{ij}$ (y = flow cytometry data or qPCR data; μ = mean; i = time of biopsies and ϵ = residuals). Post hoc Tukey pairwise comparisons were used. Differences were considered significant at $P < 0.05$. All statistical analyses were performed using R software (the R foundation).

Results

MY of primiparous lactating dairy cows

Daily MY was recorded for the five primiparous cows, from calving to the drying-out period. As expected, the MY was significantly different at each mammary gland biopsy time point of mammary biopsies (30, 90, 150, and 250 days) with 29.9, 34.3, 32.9, and 19 kg/day, respectively ($P < 0.05$) (Fig. 1). The mean of daily MY described a classical lactation curve, with a peak of production at ≈ 60 days post-calving. Analysis of milk composition data showed that fat and protein yields varied according to MY, as expected during lactation in primiparous dairy cows (Table 2). Furthermore, SCC values were less than 250×10^3 cells/mL throughout lactation, showing that the cows and their mammary glands were healthy. This prerequisite was the first step to validate our experimental model.

Mammary gland morphology and differentiation during lactation

The second step to validate our experimental approach was to examine the morphology of the mammary gland tissue using eosin/hematoxylin staining of tissue sections at each biopsy time point (Fig. 2). At 30 days of lactation, the

TABLE 2. MILK YIELD, FAT AND PROTEIN CONTENTS, AND SOMATIC CELL COUNT DURING LACTATION

	Biopsy			
	B1	B2	B3	B4
Days of lactation	30	90	150	250
Milk yield, kg/day	29.9 \pm 1.2 ^a	34.3 \pm 0.3 ^b	32.9 \pm 0.3 ^{ab}	19.1 \pm 0.8 ^c
Fat content, g/day	46.9 \pm 2.0 ^a	35.8 \pm 1.6 ^{bc}	30.2 \pm 2.0 ^c	39.9 \pm 0.8 ^{ab}
Protein content, g/day	29.6 \pm 0.3 ^{ab}	26.3 \pm 0.9 ^{bc}	24.5 \pm 1.2 ^c	31.3 \pm 0.8 ^a
SCC, 10 ³ /mL	111.2 \pm 16.9 ^{ab}	54.2 \pm 8.6 ^b	105 \pm 17.0 ^{ab}	166.5 \pm 33.7 ^a

The milk of five primiparous lactating cows was collected throughout lactation. The MY was recorded daily over 52 weeks. Milk samples were collected weekly for SCC and to determine the milk fat and protein composition. The data are expressed as the mean value \pm SEM at 30 (biopsy 1: B1), 90 (B2), 150 (B3), and 250 (B4) days of lactation. Different letters indicate statistically significant ($P < 0.05$) differences between each value and the value at each of the other three time points.

MY, milk yield; SCC, somatic cell counting.

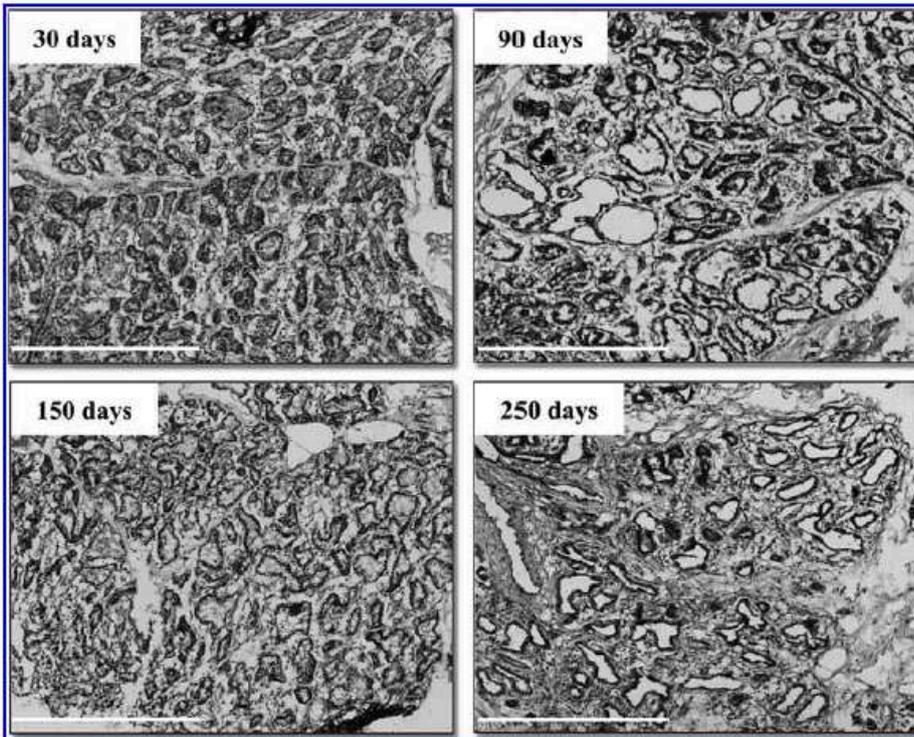


FIG. 2. Organization of the mammary gland secretory tissue throughout lactation. Mammary tissue was collected by biopsy at 30, 90, 150, and 250 days of lactation and processed for hematoxylin/eosin histological staining. The stained tissue sections were scanned using a NanoZoomer (Hamamatsu). Scale bar = 500 μ m.

mammary alveoli displayed small luminal spaces (Fig. 2, left upper panel). At 90 days, distinct luminal spaces appeared, in agreement with the high secretory activity of the MEC at this time of the lactation cycle (Fig. 2, right upper panel). In contrast, we noted the regression of the alveolar structure at 150 and 250 days of lactation, with stromal tissue increasing and taking the place of the mammary epithelium at the end of lactation (Fig. 2, lower panels). In line with these observations, we observed that the level of cytokeratin 19 (CK19), estimated using RT-qPCR (Fig. 3),

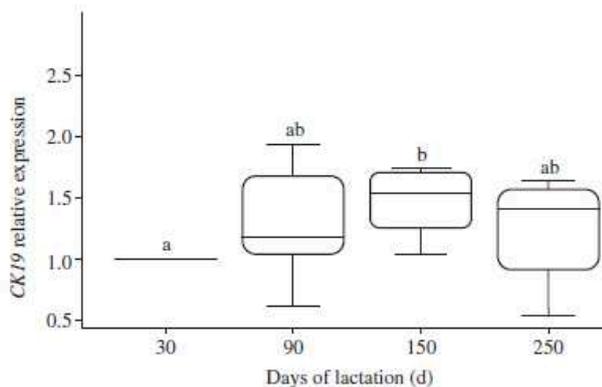


FIG. 3. Representative box plots of relative CK19 gene expression throughout lactation. Each box plot represents the mean (five dairy cows) of CK19 expression at the indicated time point before mammary biopsy (RPLP0 was used as the reference gene). Results at days 90, 150, and 250 are expressed as percentage of the tissue content at day 30. Different letters above the box plots indicate statistically significant ($P < 0.05$) differences between each value and the value at each of the other three time points.

varied significantly throughout lactation, with maximal expression at 150 days of lactation ($P < 0.05$).

In situ localization of cell-surface markers in mammary gland tissue

To estimate the relevance of the four lineage markers used in the present study (CD10, CD49_f, CD24, and EpCAM), we characterized their expression in specific cell populations within mammary gland sections during lactation. DAPI staining allowed us to identify nuclei in the alveoli and stroma. Immunohistochemical labeling using antibodies against CD10 showed exclusive staining of cells surrounding the luminal MEC layer, corresponding to myoepithelial cells (Fig. 4A, left panels). In line with this, α SMA counterstaining was observed in the myoepithelial cell layer around CD49_f-positive cells (Fig. 4A, right panels). CD49_f was expressed and localized in cells located in the basal part of the lumen. Expression of CD24 and EpCAM was also examined in situ. CD24 was only detected in some of the cells located in the luminal MEC layer (Fig. 4B, left panels). Higher magnification of CD24 staining confirmed the specific cell-surface staining and localization (Fig. 4B, left panels, insets). With regard to EpCAM localization, we observed apical staining in some of the luminal MEC (Fig. 4B, right panels).

Gating strategy for flow cytometry data analysis

To validate the multicolor panel of the four antibodies used in the present study, coupled with four different fluorochromes, we performed single cell staining with each antibody (Table 3) and Fluorescent Minor One. To develop this technique, essential to set up our multicolor assays, we

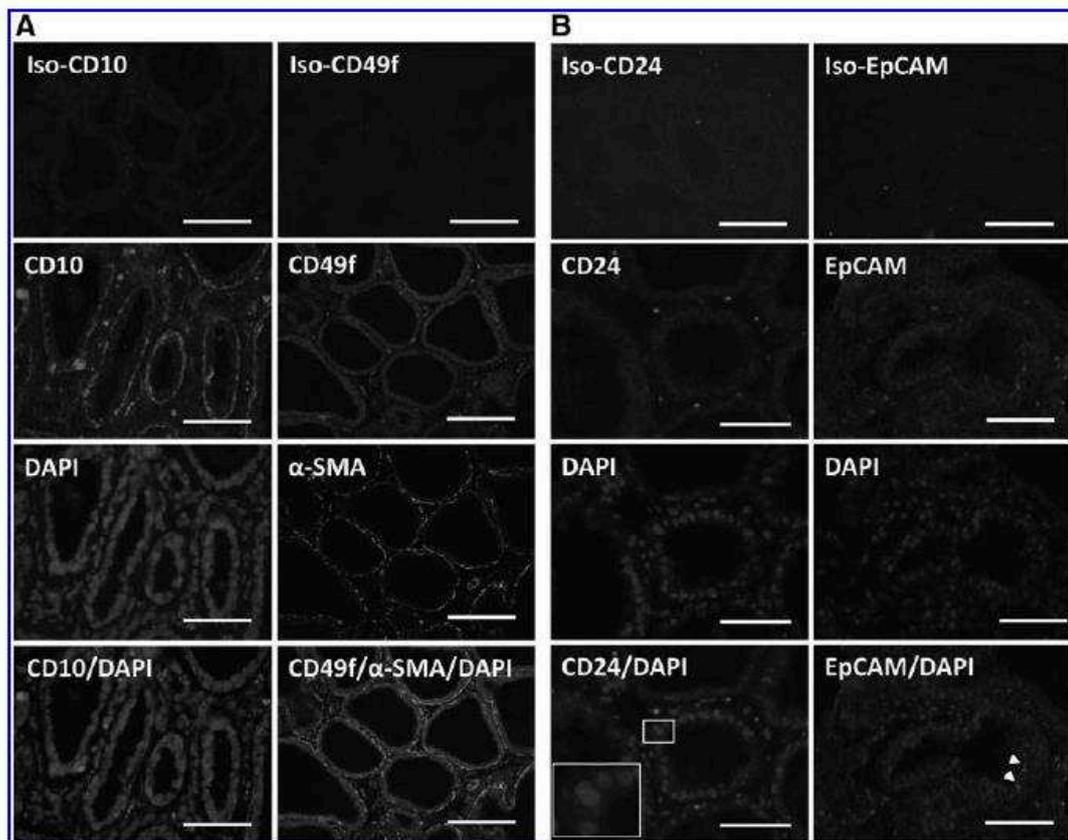


FIG. 4. In situ localization of cell-surface markers in lactating mammary gland tissue. (A) The *left panels* show the staining of myoepithelial cells using the iso-CD10 and CD10 antibodies. Nuclei were counterstained with DAPI. The *right panels* show basal part of the mammary lumen staining with iso-CD49_f (negative control) and CD49_f and myoepithelial cell staining with α SMA. (B) The *left panels* show the staining of some of the luminal cells using the anti-CD24 antibody compared with the negative control iso-CD24. The *right panels* show the negative control iso-EpCAM and the apical staining (*white arrowheads*) in some of the luminal MEC within the mammary acini using anti-EpCAM antibody. Nuclei were counterstained with DAPI. *Large white box* is the magnification of the *little white box*. Scale bars = 50 μ m. α SMA, alpha smooth muscle actin; EpCAM, epithelial cell adhesion molecule; MEC, mammary epithelial cell.

TABLE 3. FLOW CYTOMETRY ANALYSIS OF ISOLATED CELLS DISSOCIATED FROM MAMMARY BIOPSIES USING SINGLE STAINING

	<i>Biopsy/Days of lactation</i>			
	<i>B1</i>	<i>B2</i>	<i>B3</i>	<i>B4</i>
Cell-surface markers	30	90	150	250
CD24 ⁺	5.4 ± 0.8	5.7 ± 1.5	3.9 ± 0.9	3.2 ± 0.7
EpCAM ⁺	4.4 ± 0.9	6.9 ± 1.5	6.2 ± 0.6	4.5 ± 1.5
CD49 _f ⁺	47.0 ± 3.9 ^a	44.1 ± 3.6 ^a	38.6 ± 2.6 ^{ab}	28.8 ± 2.5 ^b
CD10 ⁺	4.0 ± 0.7	5.7 ± 1.0	3.9 ± 0.6	4.7 ± 2.1

Mammary biopsies were collected at 30 (biopsy 1: B1), 90 (B2), 150 (B3), and 250 (B4) days of lactation. After tissue digestion and cell dissociation, single cell suspensions were phenotyped using anti-CD24, -EpCAM, -CD10, and -CD49_f antibodies. Each data point corresponds to the mean ± SEM of fluorescence for each single staining. *Different letters* indicate statistically significant ($P < 0.05$) differences between each value and the values at each of the other three time points.

used a manual compensation matrix based on the median fluorescence intensity procedure. We also ensured that only single living cells were analyzed, by eliminating cell aggregates and dead cells from our analysis. To eliminate aggregates, we performed doublet exclusion using FSC-H/A and SSC-H/A parameters. To discriminate between live cells and dead cells, we used PI staining. This technical strategy is essential to analyze each cell-surface marker in single living cells (Fig. 5A). The strategy to analyze the expression of the three other cellular markers used in the present study within a stained population (here, the CD49_f-positive cells) is illustrated in Fig. 5B. In our example, we gated on CD49_f-positive cells to analyze coimmunostained populations: CD49_f and EpCAM, CD49_f and CD10, and CD49_f and CD24. This procedure was applied for each cell-surface marker (CD49_f, CD10, CD24, and EpCAM).

Cell hierarchy and lineage in the bovine mammary gland during lactation

After tissue dissociation and single cell isolation, we determined the proportion of each putative cell type according

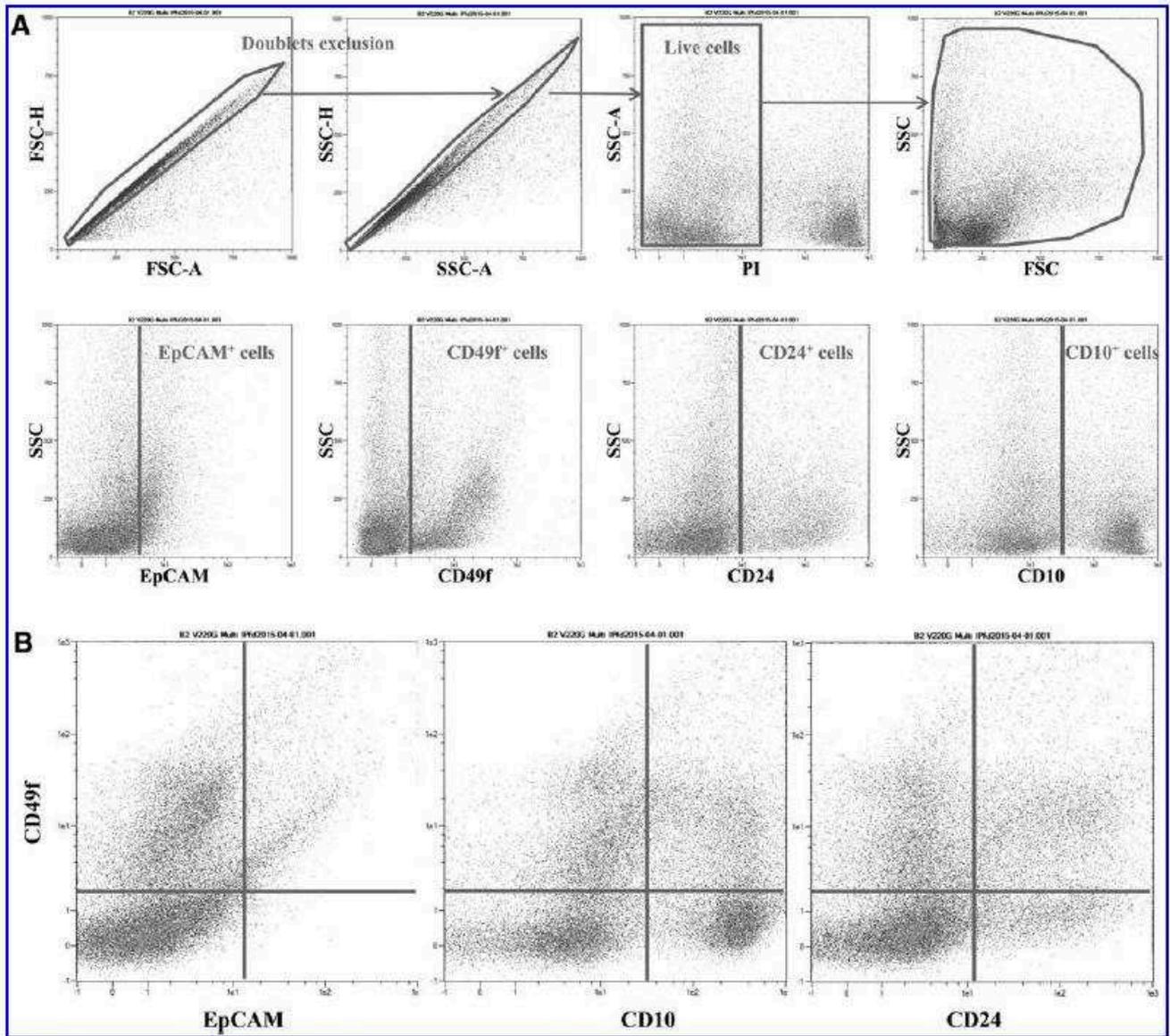


FIG. 5. Gating strategy used to analyze the stained cell populations by flow cytometry. **(A)** Gating strategy to set up the analysis of single living cells. Doublet exclusion using FSC-H/A and SSC-H/A parameters was performed. Propidium iodide allowed discrimination between living cells and dead cells. Each single staining with anti-CD49_f, -CD10, -CD24, and -EpCAM antibodies was analyzed in living cells. **(B)** Illustration of the gating strategy used to analyze the multistained populations. Gated CD49_f-positive cells were selected and then coimmunostained populations were analyzed: CD49_f and EpCAM, CD49_f and CD10, and CD49_f and CD24. FSC, forward-scattered light; SSC, side-scattered light.

to the expression of cell-surface markers at four stages of the lactation cycle, namely 30, 90, 150, and 250 days of lactation. Flow cytometry dot plots depicting the main populations (CD49_f⁺, CD24/CD49_f, and CD49_f/EpCAM) at 30, 90, 150, and 250 days of lactation are presented in Fig. 6. First, we analyzed single staining with CD24, CD10, EpCAM, and CD49_f cell-surface markers (Table 3). We observed that the predominant cell population expressed CD49_f. Interestingly, the proportion of CD49_f-positive cells significantly decreased over the lactation cycle (B1: 47% vs. B4: 28.8%, $P < 0.05$, data not shown). The proportions of the other single-stained cell populations were lower (<7%) and their expression did not vary during lactation (data not shown).

Next, we defined double-stained cell populations using combinations of CD10, CD49_f, CD24, and EpCAM markers. The different marker combinations were determined in accordance with their specific localization, as observed by immunohistochemistry and reported in the literature for other lactating species (Table 4). First, we showed that the proportion of CD24⁺/CD49_f⁺ cells did not significantly evolve throughout the lactation cycle. Concerning the putative progenitor populations, we found that CD24/CD49_f⁺ cells represented the majority of the cells among the putative progenitors. Of note, the proportion of this cell population significantly decreased during lactation, from 38.2% (B1) to 23.8% (B4) ($P < 0.05$). In contrast, the proportions of the other putative progenitors were very low (0.7%–5.1%) and their expression did not vary

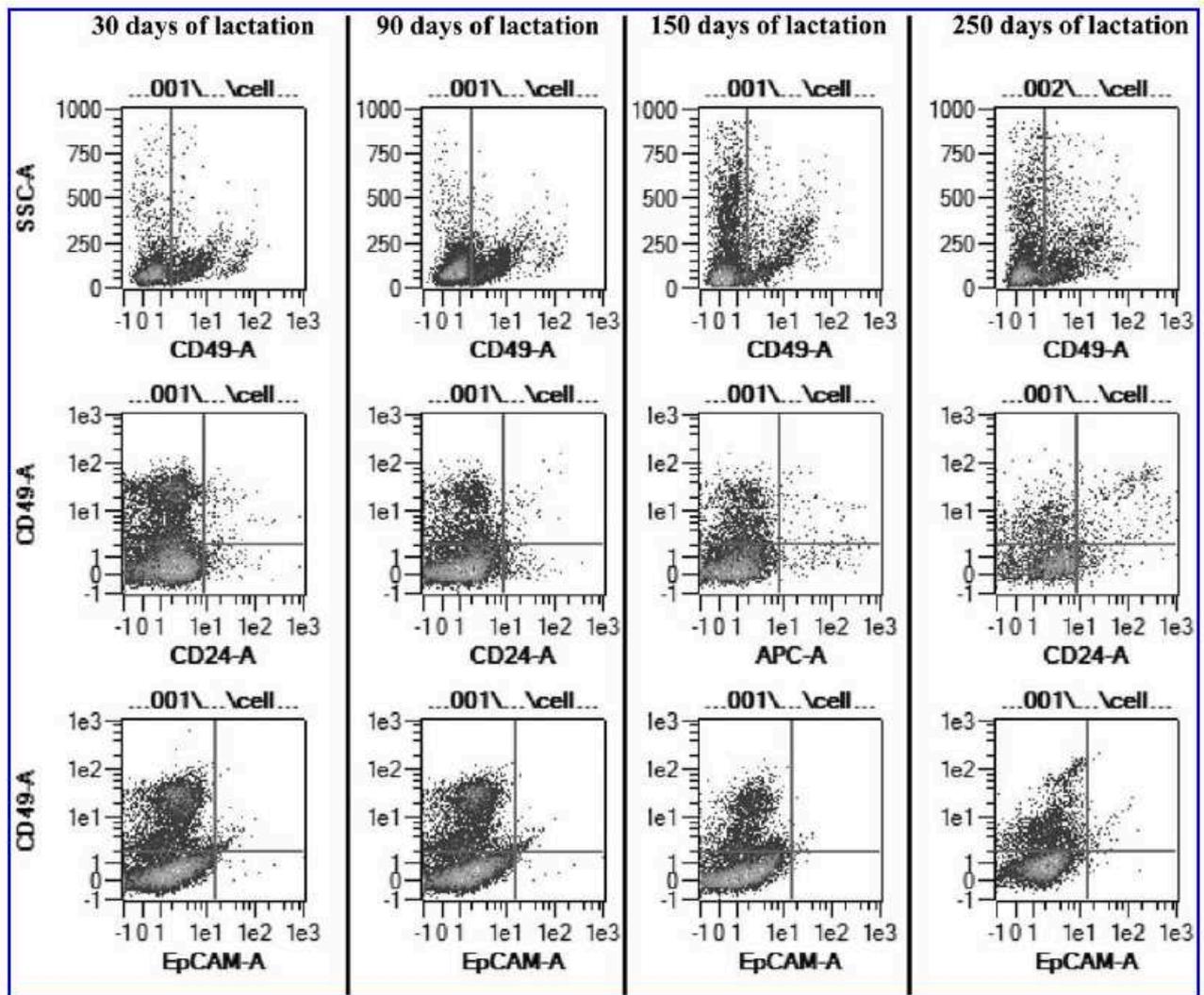


FIG. 6. Evolution of main MEC populations over the lactation. Flow cytometry dot-plots depicting the main populations at 30, 90, 150, and 250 days of lactation. *Upper panels* highlighted CD49_F-positive cells, *middle panels*: CD49_F/CD24 populations, and *lower panels*: CD49_F/EpCAM populations.

TABLE 4. CELL HIERARCHY AND LINEAGES IN THE BOVINE MAMMARY GLAND THROUGHOUT A LACTATION PERIOD

Cell-surface markers	<i>Biopsy/Days of lactation</i>			
	<i>B1</i>	<i>B2</i>	<i>B3</i>	<i>B4</i>
CD49 _F ⁺ /CD24 ⁺	2.4±0.8	3.3±1.3	0.9±0.3	0.7±0.5
CD49 _F ⁺ /CD24 ⁻	38.2±3.6 ^a	35.9±2.3 ^a	31.9±2.0 ^{ab}	23.8±1.6 ^b
CD49 _F ⁻ /EpCAM ⁺	0.7±0.1	1.4±0.4	1±0.4	1.3±0.7
CD24 ⁻ /EpCAM ⁺	1.3±0.3	5.1±1.8	2.6±0.5	2.4±1.1
CD10 ⁻ /CD24 ⁺	3.4±0.7	4.9±1.4	2.9±0.6	2.4±0.7
CD49 _F ⁻ /EpCAM ⁻	55±4.3 ^a	53.3±2.8 ^a	57.9±2.4 ^{ab}	68.5±2.0 ^b
CD49 _F ⁺ /EpCAM ⁻	38±3.9 ^a	31±2.4 ^{ab}	28±1.8 ^{bc}	21.5±1.3 ^c
CD10 ⁺ /CD49 _F ⁺	2.6±0.5	3.4±1.0	1.7±0.3	1.7±1.2

Mammary biopsies were collected at 30 (biopsy 1: B1), 90 (B2), 150 (B3), and 250 (B4) days of lactation. After tissue digestion, cell dissociation, and single cell isolation, the proportion of each cell type was determined at each stage of lactation according to the expression of cell-surface markers. *Light gray line* represents putative stem cell population, *middle gray line* represents putative progenitor cell populations and *dark gray line* represents putative mature cell populations. The proportions of double-stained cell populations, using EpCAM, CD49_F, CD24, and CD10 markers, are presented as the mean of fluorescence±SEM. *Different letters* indicate statistically significant ($P < 0.05$) differences between each value and the values at each of the other three time points.

significantly during lactation. Next, we focused on the mature (differentiated) cell populations. The cell populations, which did not express EpCAM and in which CD49_f was either present or absent (CD49_f⁺/EpCAM⁻ and CD49_f⁻/EpCAM⁻), were the most abundant putative mature cells. Interestingly, the variations in both populations over the lactation period were in opposite directions. Indeed, the CD49_f⁺/EpCAM⁻ cells significantly decreased while the CD49_f⁻/EpCAM⁻ cells increased from 38% (B1) to 21.5% (B4) and from 55% (B1) to 68.5% (B4), respectively. The proportion of the third population of putative mature cells, that is, CD49_f⁺/CD10⁺ cells did not significantly vary between 30 and 250 days of lactation and remained low (from 1.7% to 3.4%).

Correlation between putative mature cell proportion and MY

Statistical analysis showed a positive correlation between the proportions of CD49_f-positive cells and the MY ($R^2=0.39$, $P<0.05$), as the number of CD49_f-positive cells increased as the level of milk production increased (Fig. 7A). In contrast, we observed opposite changes in the proportion of CD49_f⁻/EpCAM⁻ cells and the proportion of CD49_f⁺/EpCAM⁻ cells in relation to MY (Fig. 7B, C). Indeed, the correlation between CD49_f⁻/EpCAM⁻ cells and milk production was negative ($R^2=0.51$, $P<0.05$, Fig. 6B), whereas the proportion of CD49_f⁺/EpCAM⁻ cells positively correlated with milk production ($R^2=0.35$, $P<0.05$, Fig. 7C).

Discussion

During the development of the mammary gland (mammarygenesis) and lactation (galactopoiesis) in dairy cows, each cell population has a specific feature involved in mammary gland plasticity. Like most glandular tissue, the adult mammary gland is composed of many cell types that interact to shape the organ and make it functional. In this study, we specifically focused on epithelial-like, myoepithelial, and progenitor/stem cells implicated in mammary gland plasticity. Flow cytometry is a suitable method to analyze and to discriminate between single cell phenotypes on precious and small samples such as mammary gland biopsies. We used this method to analyze and to identify the lineage of cell populations based on the expression of cell-surface markers commonly used in the mammary gland field: CD49_f, CD24, CD10, and EpCAM.

The prerequisites for our study were to ensure that mammary explant samples were representative of a lactating mammary gland. Using five primiparous dairy cows, we first monitored their zootechnical data to ensure their MY responses and the quality of the milk composition. A classical lactation curve is defined by a peak in milk production between 30 and 90 days of lactation, followed by a decrease in milk production. To validate the mammary gland samples before the phenotypic characterization of mammary cells, we observed the morphology of the tissue obtained by biopsy and analyzed the expression of the *CK19* gene (a conventional marker of mature alveolar cells [27,28]). As expected, we observed an increase in the surface of luminal spaces in alveoli at 90 days of lactation, followed by a decline, which correlated with the decline in MY. These key events validated that the mammary biopsies represented well the four chosen stages of lactation.

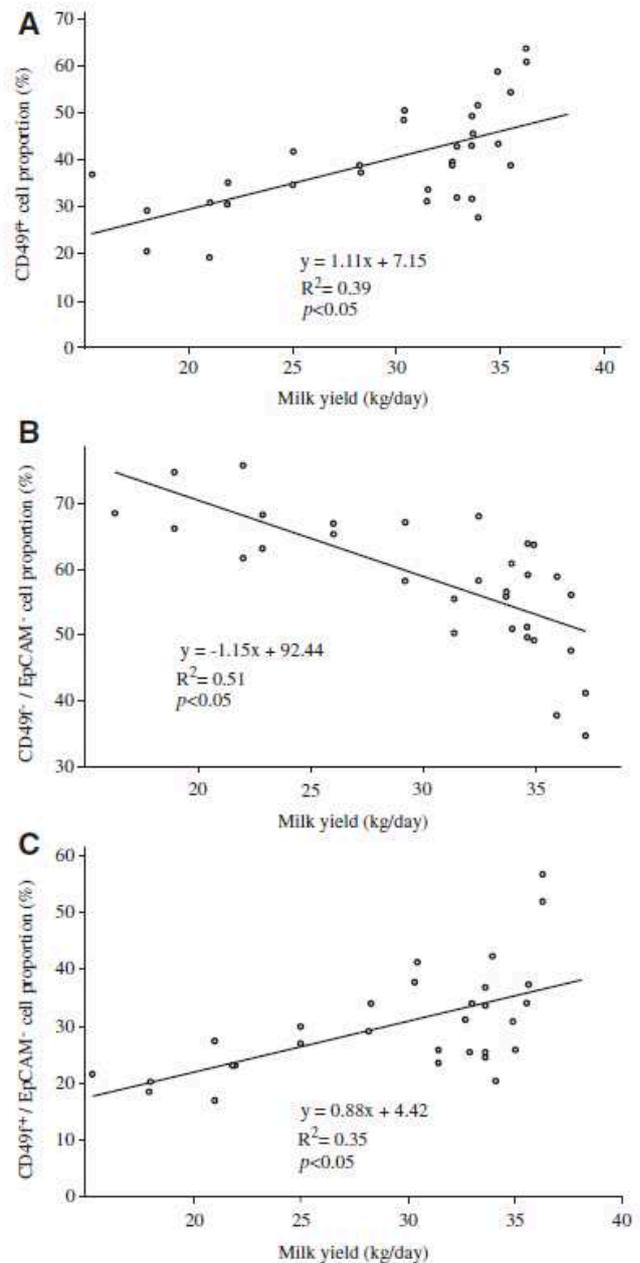


FIG. 7. Analysis of the correlation between the proportions of various cell populations and MY. **(A)** Correlation between the proportion of CD49_f-positive cells and MY ($R^2=0.39$, $P<0.05$). **(B)** Correlation between the proportion of CD49_f⁻/EpCAM⁻ cells and MY ($R^2=0.51$, $P<0.05$). **(C)** Correlation between the proportion of CD49_f⁺/EpCAM⁻ cells and MY ($R^2=0.35$, $P<0.05$).

In this study, we demonstrated that cell populations expressing EpCAM and CD49_f cell-surface markers varied significantly and inversely during lactation from 30 to 250 days of lactation. Indeed, 30 days after the beginning of lactation, the proportion of CD49_f⁺/EpCAM⁻ cells reached their maximal expression level (38%), while the proportion of CD49_f⁻/EpCAM⁻ cells started at their minimal expression level (55%). We also showed that these relative proportions were reversed in late lactation, with 21% CD49_f⁺/EpCAM⁻ cells and 68.5%

CD49_f⁻/EpCAM⁻ cells. Moreover, the statistical correlations established between CD49_f⁺/EpCAM⁻ cells and CD49_f⁻/EpCAM⁻ cells and MY demonstrated that these two cell populations are related to milk production. When milk production increased, the proportion of CD49_f⁺/EpCAM⁻ cells increased, whereas the proportion of CD49_f⁻/EpCAM⁻ cells decreased. Both CD49_f and EpCAM are cell-surface markers associated with cell adhesion and are very often used to phenotype mammary gland cells and their degree of maturation. Altogether, these data and the literature strongly suggest that mammary alveolar cells that are involved in milk production (myoepithelial and lumino-alveolar cells) expressed CD49_f, while epithelial cells present in the mammary ducts (lumino-ductal cells) did not express this marker.

CD49_f is also expressed mainly by bipotent progenitors and basal/myoepithelial cells of the breast [29–31]. In addition, it is well known that the loss of EpCAM is correlated to a decrease in progenitor activity [31]. Thus, we hypothesized that differentiated mature cells did not express the marker EpCAM. Considering these results and the literature, we hypothesize that CD49_f and EpCAM are suitable markers to discriminate between mature luminal cells and their progenitors. In 2012, Rauner and Barash demonstrated that CD24⁻CD49_f⁺ cells are bipotent progenitor cells that give rise to luminal progenitors and then differentiate into luminal cells. In human breast and mouse mammary gland, CD24⁻/CD49_f⁺ cells are also considered to be bipotent progenitor cells. This has been established through *in vivo* transplantation and *in vitro* experiments [32,33]. In our study, the proportion of CD24⁻/CD49_f⁺ cells significantly decreased during lactation (38% in early lactation vs. 23.8% in late lactation).

In the lactating mammary gland, the self-renewal of MEC is constantly ensured by two mechanisms: cell proliferation and programmed cell death (apoptosis). Capuco et al. estimated that, in the lactating bovine mammary gland, the average rate of proliferation was about 0.3% per day and the average rate of apoptosis was about 0.56% per day, corresponding to a cell turnover of ~50% during lactation [34]. Progenitor cells are the main actors in this biological process, as they both proliferate and give rise to differentiated cells involved in milk synthesis; these cells are then removed from the mammary epithelium by apoptosis. Thus, the high proportion of bipotent progenitor cells found in early lactation is consistent with the literature.

To perform a complete lineage and cell hierarchy analysis in the bovine lactating mammary gland, we also focused on myoepithelial cells and their putative progenitors. A characteristic of myoepithelial cells is a dual phenotype of both smooth muscle (positive for α SMA) and epithelial cells [35]. Myoepithelial cells also express CD10 (neutral endopeptidase). Clarke et al. used CD10 as a myoepithelial marker to separate myoepithelial cells from luminal cells by immunomagnetic techniques [36]. In 2009, Ellis and colleagues showed that CD10 is a marker of myoepithelial cells within the mammary gland in heifers during mammary development. In our study, immunolocalization of CD10 in lactating mammary gland sections confirmed that CD10 was specifically expressed by myoepithelial cells [24]. Thus, we included CD10 in our flow cytometry panel, to thoroughly phenotype myoepithelial cells. Based on the presence of CD49_f at the surface of basal epithelial cells [37], we decided to combine CD49_f and CD10 to analyze putative mature myoepithelial cells.

Our results showed that the CD49_f⁺/CD10⁺ cell population, like the CD10⁺ population, was few and present without significant variation from B1 to B4. This stable proportion of putative myoepithelial cells proves that this population must be conserved during the entire lactation cycle. The same process has also been observed in skeletal muscle, in which the proportion of satellite cells is conserved for muscle homeostasis [38]. In murine mammary gland, the presence of mature and functional myoepithelial cells has been associated with the identification of myoepithelial progenitors and their expression of CD24 [5]. Despite very scarce literature about myoepithelial progenitor phenotypes, the transition from progenitors to differentiated cells occurs with different modifications, such as a switch in cell-surface markers. Hence, we hypothesized that the putative bovine myoepithelial progenitors were CD10⁻/CD24⁺. This hypothesis was supported by our immunostaining data, which demonstrated that CD10⁺ cells were mature myoepithelial cells only.

In many reports, the expression of CD24 is associated with a stem cell phenotype. In 2006, Shackleton et al. isolated a discrete subpopulation of mouse mammary cells on the basis of cell-surface markers (Lin⁻CD29^{hi}CD24⁺). They showed that a single cell from this subpopulation, marked with a LacZ transgene, could reconstitute a complete mammary gland *in vivo*. The transplanted cell contributed to both the luminal and myoepithelial lineages and generated functional lobulo-alveolar units during pregnancy. The self-renewing capacity of these cells was demonstrated by serial transplantation of clonal outgrowths. In this study, we found, by immunolocalization, that CD24 was expressed by some luminal cells within the mammary epithelium. Rauner and Barash also showed CD24⁺ cells in the luminal compartment of developing mammary gland sections in heifers. CD24 is also highly expressed in luminal progenitors in the breast [39,40].

Using the combination of the CD49_f and CD24 markers to sort primary MEC, they isolated CD24⁺/CD49_f⁺ cell populations that were able to form large mammospheres *in vitro*. They also showed that these cells had a high proliferation rate and were able to form organized colonies. These proliferative properties of undifferentiated cells define a stem cell phenotype, with the ability for multipotency and self-renewing. These features allowed defining the CD24⁺/CD49_f⁺ population as putative MaSCs. In our study, this population was present throughout lactation with a maximal proportion (3.3%) observed at 90 days of lactation ($P=0.09$). Therefore, the CD24⁺/CD49_f⁺ population could play this putative MaSC role in bovine mammary gland. In conclusion, we hypothesized a stem cell population (CD24⁺/CD49_f⁺) and four progenitor cell populations: bipotent luminal progenitors (CD24⁻/CD49_f⁺), lumino-alveolar progenitors (CD24⁻/EpCAM⁺), myoepithelial progenitors (CD24⁺/CD10⁻), and lumino-ductal progenitors (CD49_f⁻/EpCAM⁺).

This study provides a dynamic view of the mammary cell populations based on common markers used in mammary gland cell lineage identification. Our next goal will be to carry out the same analyses on mammary glands at different physiological stages: before and after puberty and during gestation, as well as at the peak of lactation and at the drying-out stage. An analysis of functional proteins (cytokeratin, steroid receptors, and aldehyde dehydrogenase activity) will be performed on sorted cells, isolated from the different populations described in this study and combined

with mammosphere assays. In summary, this study not only contributes to a better understanding of the role of stem cells in the plasticity of the mammary gland but also identifies new biomarkers for veterinary and human medicine.

Acknowledgments

This research was cosupported by the French National Institute of Agricultural Science (INRA) and the INRA-PHASE department.

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

- Boutinaud M, J Guinard-Flament and H Jammes. (2004). The number and activity of mammary epithelial cells, determining factors for milk production. *Reprod Nutr Dev* 44:499–508.
- Chiche A, M Moumen, V Petit, J Jonkers, D Medina, MA Deugnier, MM Faraldo and MA Glukhova. (2013). Somatic loss of p53 leads to stem/progenitor cell amplification in both mammary epithelial compartments, basal and luminal. *Stem Cells* 31:1857–1867.
- Inman JL, C Robertson, JD Mott and MJ Bissell. (2015). Mammary gland development: cell fate specification, stem cells and the microenvironment. *Development* 142:1028–1042.
- Stefanon B, M Colitti, G Gabai, CH Knight and CJ Wilde. (2002). Mammary apoptosis and lactation persistency in dairy animals. *J Dairy Res* 69:37–52.
- Visvader JE and J Stingl. (2014). Mammary stem cells and the differentiation hierarchy: current status and perspectives. *Genes Dev* 28:1143–1158.
- Ellis SE and AV Capuco. (2002). Cell proliferation in bovine mammary epithelium: identification of the primary proliferative cell population. *Tissue Cell* 34:155–163.
- Borena BM, L Bussche, C Burvenich, L Duchateau and GR Van de Walle. (2013). Mammary stem cell research in veterinary science: an update. *Stem Cells Dev* 22:1743–1751.
- Deome KB, LJ Faulkin Jr., HA Bern and PB Blair. (1959). Development of mammary tumors from hyperplastic alveolar nodules transplanted into gland-free mammary fat pads of female C3H mice. *Cancer Res* 19:515–520.
- Medina D and GH Smith. (1999). Chemical carcinogen-induced tumorigenesis in parous, involuted mouse mammary glands. *J Natl Cancer Inst* 91:967–969.
- Ormerod EJ and PS Rudland. (1986). Regeneration of mammary glands in vivo from isolated mammary ducts. *J Embryol Exp Morphol* 96:229–243.
- Baratta M, MG Volpe, D Nucera, G Gabai, N Guzzo, M Faustini and E Martignani. (2015). Differential expression of living mammary epithelial cell subpopulations in milk during lactation in dairy cows. *J Dairy Sci* 98:6897–6904.
- Martignani E, P Eirew, P Accornero, CJ Eaves and M Baratta. (2010). Human milk protein production in xenografts of genetically engineered bovine mammary epithelial stem cells. *PLoS One* 5:e13372.
- Shackleton M, F Vaillant, KJ Simpson, J Stingl, GK Smyth, ML Asselin-Labat, L Wu, GJ Lindeman and JE Visvader. (2006). Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature* 439:84–88.
- Stingl J, P Eirew, I Ricketson, M Shackleton, F Vaillant, D Choi, HI Li and CJ Eaves. (2006). Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells. *Nature* 439:993–997.
- Rauner G and I Barash. (2012). Cell hierarchy and lineage commitment in the bovine mammary gland. *PLoS One* 7:e30113.
- Ghebeh H, GM Sleiman, PS Manogaran, A Al-Mazrou, E Barhoush, FH Al-Mohanna, A Tulbah, K Al-Faqeeh and CN Adra. (2013). Profiling of normal and malignant breast tissue show CD44high/CD24low phenotype as a predominant stem/progenitor marker when used in combination with Ep-CAM/CD49f markers. *BMC Cancer* 13:289.
- Shehata M, A Teschendorff, G Sharp, N Novcic, IA Russell, S Avril, M Prater, P Eirew, C Caldas, CJ Watson and J Stingl. (2012). Phenotypic and functional characterisation of the luminal cell hierarchy of the mammary gland. *Breast Cancer Res* 14:R134.
- Prpar S, E Martignani, P Dovc and M Baratta. (2012). Identification of goat mammary stem/progenitor cells. *Biol Reprod* 86:117.
- Dey D, M Saxena, AN Paranjape, V Krishnan, R Giraddi, MV Kumar, G Mukherjee and A Rangarajan. (2009). Phenotypic and functional characterization of human mammary stem/progenitor cells in long term culture. *PLoS One* 4:e5329.
- Dontu G, WM Abdallah, JM Foley, KW Jackson, MF Clarke, MJ Kawamura and MS Wicha. (2003). In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev* 17:1253–1270.
- Villadsen R, AJ Fridriksdottir, L Ronnov-Jessen, T Gudjonsson, F Rank, MA LaBarge, MJ Bissell and OW Petersen. (2007). Evidence for a stem cell hierarchy in the adult human breast. *J Cell Biol* 177:87–101.
- Maguer-Satta V, R Besancon and E Bachelard-Cascales. (2011). Concise review: neutral endopeptidase (CD10): a multifaceted environment actor in stem cells, physiological mechanisms, and cancer. *Stem Cells* 29:389–396.
- Moritani S, R Kushima, H Sugihara, M Bamba, TK Kobayashi and T Hattori. (2002). Availability of CD10 immunohistochemistry as a marker of breast myoepithelial cells on paraffin sections. *Mod Pathol* 15:397–405.
- Safayi S, N Korn, A Bertram, RM Akers, AV Capuco, SL Pratt and S Ellis. (2012). Myoepithelial cell differentiation markers in prepubertal bovine mammary gland: effect of ovariectomy. *J Dairy Sci* 95:2965–2976.
- Farr VC, K Stelwagen, LR Cate, AJ Molenaar, TB McFadden and SR Davis. (1996). An improved method for the routine biopsy of bovine mammary tissue. *J Dairy Sci* 79:543–549.
- Livak KJ and TD Schmittgen. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 25:402–408.
- Moll R, M Divo and L Langbein. (2008). The human keratins: biology and pathology. *Histochem Cell Biol* 129:705–733.
- Ontsouka EC, JS Bertschi, X Huang, M Luthi, S Muller and C Albrecht. (2016). Can widely used cell type markers predict the suitability of immortalized or primary mammary epithelial cell models? *Biol Res* 49:1.
- Stingl J, A Raouf, P Eirew and CJ Eaves. (2006). Deciphering the mammary epithelial cell hierarchy. *Cell Cycle* 5:1519–1522.
- Koukoulis GK, I Virtanen, M Korhonen, L Laitinen, V Quaranta and VE Gould. (1991). Immunohistochemical localization of integrins in the normal, hyperplastic, and neoplastic breast. Correlations with their functions as receptors and cell adhesion molecules. *Am J Pathol* 139:787–799.

31. Stingl J, CJ Eaves, I Zandieh and JT Emerman. (2001). Characterization of bipotent mammary epithelial progenitor cells in normal adult human breast tissue. Breast Cancer Res Treat 67:93–109.
32. Keller PJ, AF Lin, LM Arendt, I Klebba, AD Jones, JA Rudnick, TA DiMeo, H Gilmore, DM Jefferson, et al. (2010). Mapping the cellular and molecular heterogeneity of normal and malignant breast tissues and cultured cell lines. Breast Cancer Res 12:R87.
33. Smith GH and D Medina. (2008). Re-evaluation of mammary stem cell biology based on in vivo transplantation. Breast Cancer Res 10:203.
34. Capuco AV, D Wood, R Baldwin, K McLeod and M Paape. (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.
35. Adriance MC, JL Inman, OW Petersen and MJ Bissell. (2005). Myoepithelial cells: good fences make good neighbors. Breast Cancer Res 7:190–197.
36. Clarke C, J Titley, S Davies and MJ O'Hare. (1994). An immunomagnetic separation method using superparamagnetic (MACS) beads for large-scale purification of human mammary luminal and myoepithelial cells. Epithelial Cell Biol 3:38–46.
37. Sarrio D, CK Franklin, A Mackay, JS Reis-Filho and CM Isacke. (2012). Epithelial and mesenchymal subpopulations within normal basal breast cell lines exhibit distinct stem cell/progenitor properties. Stem Cells 30:292–303.
38. Demontis F, R Piccirillo, AL Goldberg and N Perrimon. (2013). Mechanisms of skeletal muscle aging: insights from *Drosophila* and mammalian models. Dis Models Mech 6:1339–1352.
39. Sleeman KE, H Kendrick, D Robertson, CM Isacke, A Ashworth and MJ Smalley. (2007). Dissociation of estrogen receptor expression and in vivo stem cell activity in the mammary gland. J Cell Biol 176:19–26.
40. Lim E, D Wu, B Pal, T Bouras, ML Asselin-Labat, F Vaillant, H Yagita, GJ Lindeman, GK Smyth and JE Visvader. (2010). Transcriptome analyses of mouse and human mammary cell subpopulations reveal multiple conserved genes and pathways. Breast Cancer Res 12:R21.

Address correspondence to:
Dr. Frédéric Dessauge
UMR1348 PEGASE
Agrocampus Ouest, INRA
Domaine de la Prise
Saint-Gilles 35590
France

E-mail: frederic.dessauge@inra.fr

Received for publication April 28, 2016

Accepted after revision August 10, 2016

Prepublished on Liebert Instant Online August 12, 2016

RÉSUMÉ

ABSTRACT

Caractérisation de biomarqueurs cellulaires pour étudier la plasticité mammaire au cours de la lactation chez la vache laitière.

La recherche sur la fonction de lactation est indispensable pour la filière laitière. La glande mammaire est un organe composé de cellules épithéliales, de cellules myoépithéliales, de fibroblastes, d'adipocytes et de cellules endothéliales. L'identification et l'évolution en dynamique des populations cellulaires dans la glande mammaire bovine au cours la lactation reste encore à ce jour méconnues. Les objectifs de cette thèse ont été 1) l'obtention d'un panel des biomarqueurs pour identifier les différentes cellules dans la glande mammaire bovine et 2) le suivi de leur évolution au cours d'un cycle de lactation. Les biomarqueurs de surface (CD49f, EpCAM, CD24 et CD10) ont permis de phénotyper deux lignées mammaires bovines. Nous avons également utilisé ces biomarqueurs pour phénotyper les cellules dans la glande mammaire bovine au cours d'un cycle de lactation. Dans cet objectif, des biopsies ont été prélevées sur 5 vaches laitières primipares à quatre étapes durant la lactation. Après la digestion des biopsies, les cellules obtenues ont été marquées et phénotypées par cytométrie en flux. L'analyse des résultats montre des corrélations positives entre les populations cellulaires CD49f+ et CD49f+/CD24- avec la production laitière. Nous avons mis en évidence une population cellulaire CD49f-/EpCAM- qui augmente au cours de la lactation. Ces résultats suggèrent qu'à partir de l'utilisation de biomarqueurs il est possible d'identifier et phénotyper l'évolution de différentes cellules pendant la lactation dans la glande mammaire bovine.

Mots clés : cellule épithéliale mammaire (CEM), biomarqueurs, glande mammaire, lactation, vache laitière.

Characterization of cell biomarkers for studying mammary gland plasticity throughout lactation in dairy cattle

Research of lactation function of the bovine mammary gland remains essential in dairy farming. The mammary gland is an organ composed of epithelial cells, myoepithelial cells, fibroblasts, adipose cells and endothelial cells. The identification and evolution of cell populations in the bovine mammary gland during lactation is currently unknown. The objectives of this thesis were 1) to obtain a panel of biomarkers capable of identifying different cells within the mammary gland 2) to follow the evolution of these cells throughout a lactation cycle. The cell surface biomarkers (CD49f, CD24, CD10 and EpCAM) allowed us to phenotype two bovine mammary cell lines. We also used these cell biomarkers to phenotype cell populations during lactation. For this objective mammary gland explants were obtained by biopsies taken on 5 primiparous lactating cows at four different times during lactation. After the biopsies were digested, the cells obtained were phenotyped by flow cytometry. Analysis of the results revealed a positive correlation between the CD49f+ and CD49f+/CD24- cell populations and milk yield. We also found evidence that one cell population (CD49f-EpCAM-) was increased during lactation. In general these results suggest that biomarker expression can be utilized to identify the phenotype and the evolution of different cell types during lactation in the bovine mammary gland.

Keywords: Mammary epithelial cell (MEC), biomarkers, mammary gland, lactation, dairy cow.



AGROCAMPUS OUEST • Institut supérieur des sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage
65 rue de Saint-Brieuc - CS84215 - F-35042 Rennes Cedex
Tél. : 02 23 48 50 00
www.agrocampus-ouest.fr

