

Les globules gras du lait comme source non-invasive de microARN mammaires

Milk fat globules as a non-invasive source of mammary microRNA

PAWLOWSKI K. (1)*, LAGO-NOVAIS D. (1, 2)*, PIRES J.A.A. (1), BEVILACQUA C. (3), MOBUCHON L. (1, 3), BOBY C. (1), FAULCONNIER Y. (1), BES S. (1), MARTIN P. (3), LEROUX C. (1)

(1) INRA, UMR1213 Herbivores, VetAgroSup, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France

(2) Universidade Federal da Bahia, CEP 40170110 Salvador-BA, Brazil

(3) INRA, UMR1313 Gabi, AgroParisTech, F-78352 Jouy-en-Josas, France

(*) contribution égale des 2 premiers auteurs

INTRODUCTION

Les microARN (**miARN**) sont des petits ARN non codants qui contrôlent divers processus biologiques dont la réponse immunitaire et le métabolisme notamment des lipides. Chez les ruminants, les données sur les microARN croissent rapidement. Ainsi, un séquençage haut débit de l'ensemble des miARN extraits de la glande mammaire (**GM**) a permis d'établir un répertoire exhaustif (miRNome) de cet organe chez la vache¹ et la chèvre² en lactation. De plus, nous avons mis en exergue une régulation nutritionnelle de 30 miARN dans la GM chez la chèvre en lactation³. Récemment, des miARN ont été décrits, chez l'homme, comme biomarqueurs de maladies⁴ alors que chez les animaux d'élevage, leur utilisation comme biomarqueur est encore peu explorée. L'accès aux ARN mammaires est limité en raison des techniques invasives utilisées (biopsies ou le prélèvement post-mortem). Les cellules présentes dans le lait ont été considérées comme une alternative mais elles nécessitent le traitement de grands volumes de lait peu gérable avec un grand nombre d'animaux. Récemment, les globules gras (**GG**) du lait ont été exploités comme source d'ARNm alternative, non-invasive chez l'Homme^{5,6} puis les ruminants^{7,8}, mais l'utilisation de la matière grasse laitière (**MGL**) bovine pour accéder aux miARN n'a pas encore été explorée. L'**objectif** de ce projet était double. Il visait d'abord à démontrer que les GG du lait contiennent des miARN et si tel est bien le cas à rechercher parmi ces microARN d'éventuels marqueurs précoces de l'inflammation ou de changements d'état nutritionnel, afin de les utiliser comme indicateurs de l'état physio-pathologique des animaux.

1. MATERIEL ET METHODES

Les ARN totaux ont été extraits, à partir de GM (n=6) et de MGL (n=6), par traitement au TRIzol ((ThermoFisher, Inc, USA). Neuf miARN (miR-29a, miR-125b, miR-126, miR-141, miR-148a, miR-204, miR-223, miR-320a, miR-494), ont été choisis sur la base de leur forte expression dans la GM. Leur abondance a été mesurée par RT-qPCR (ThermoFisher Inc, USA) après normalisation en utilisant U6 comme référence interne. Les t-test ont été réalisés sous DataAssit™ software (ThermoFisher Inc) avec un seuil de $P < 0.05$. Les analyses bioinformatiques ont été réalisées en utilisant le logiciel Pathway Studio.

2. RESULTATS & DISCUSSION

Parmi les neuf miARN étudiés, deux (miR-126 et miR-204) n'ont pas été détectés dans la MGL alors qu'ils sont abondants dans la GM. Trois autres miARN étaient beaucoup plus abondants dans la GM que dans la MGL: miR-29a, miR-125b, et miR-148a présentant respectivement un facteur de variation de 23,2, 13,9 et 8,7. Les miR-141, miR-223, miR-320a, miR-494 étaient détectés, quant à eux, avec un même niveau d'expression dans les deux sources d'ARN (GM et MGL). Ces résultats suggèrent plusieurs hypothèses. La première est qu'il existerait des mécanismes sélectifs de sécrétion des miARN via les GG de la MGL.

Cependant, nous ne pouvons pas exclure la seconde hypothèse selon laquelle les miARN absents de la MGL ne seraient pas exprimés dans les cellules épithéliales, mais proviendraient des autres types cellulaires qui composent le tissu mammaire. L'isolement de cellules épithéliales mammaires par microdissection laser est actuellement en cours, afin de trancher entre ces 2 hypothèses. Néanmoins, une analyse bioinformatique a montré que les processus biologiques régulés par les deux miRNA détectés exclusivement dans la GM sont notamment impliqués dans l'adhésion des cellules et leurs jonctions justifiant d'une localisation non apicale. De plus parmi les processus biologiques communs ciblés par miR-126 et miR-204, deux sont impliqués dans la différenciation et quatre dans la régulation de la vie cellulaire. L'ensemble de ces processus pouvant être spécifiques de la vie des cellules dans la GM.

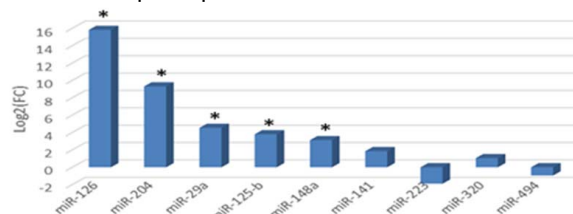


Figure 1 : Comparaison de l'abondance de 9 miARN dans la glande mammaire et les globules gras.

CONCLUSION

En conclusion, nous avons montré que la MGL peut être utilisée comme source non-invasive de miARN mais ils ne reflètent pas exactement le miRNome de la GM. La présence de miARN dans le lait et la connaissance de leur régulation nutritionnelle et de leur rôle dans différentes situations permet d'envisager leur utilisation en tant que biomarqueurs de l'état physio-pathologique des animaux, en permettant un phénotypage des animaux à grande échelle. Des travaux d'identification de tels biomarqueurs sont actuellement en cours. De plus le rôle des miARN du lait sur la santé du consommateur est actuellement une question cruciale à laquelle les travaux engagés pourraient apporter des éléments de réponse.

Travaux financés par un crédit incitatif du département Phase de l'Inra. Les auteurs remercient l'Herbipôle pour son aide durant cette expérimentation.

- 1: Le Guillou et al., 2014. PLoSOne 9, 9(3):e91938.
- 2: Mobuchon et al., 2015. BMC Genomics 16: 285, 16(1):285.
- 3: Mobuchon et al., 2015. PLoSOne. 10(10):e0140111.
- 4: Ribeiro & Sousa, 2014 Mol Biol Rep. 41(3):1525-31.
- 5: Maningat et al., 2007. Journal of endocrinology 195: 503-11
- 6: Maningat et al., 2009. Physiological Genomics, 37: 12-22
- 7: Brenaut et al., 2012. Journal of Dairy Science 95: 6130-6144.
- 8: Canovas et al., 2014. Scientific Reports 4: 5297