

## **Analyse de l'expression de gènes indicateurs de la mort cellulaire dans la glande mammaire, un indice du potentiel de production de la glande mammaire.**

*M. BOUTINAUD (1), J. GUINARD-FLAMENT (1) ET H. JAMMES (2)*

*(1) INRA-ENSAR, UMR sur la Production du Lait, 35590 St Gilles.*

*(2) INRA, Neurobiologie de l'olfaction et prise alimentaire, 78352 Jouy en Josas.*

**RESUME** - Le potentiel de production de lait de la glande mammaire de ruminant est hautement corrélé avec la masse du tissu sécréteur. La diminution caractéristique de la production laitière après le pic de lactation est due en partie à une perte progressive de cellules qui produisent du lait. Celle-ci s'effectue par mort cellulaire programmée, encore appelée "apoptose". Pour comprendre l'importance de ce mécanisme au cours de la lactation et ses effets sur la persistance de lactation, il importe de trouver des méthodes de mesure d'indicateurs de l'apoptose dans la glande mammaire. La mesure du nombre de cellules en apoptose est habituellement réalisée au niveau tissulaire à l'aide de la technique TUNEL permettant la détection de la fragmentation de l'ADN, caractéristique majeure de l'apoptose. Nous proposons une approche moléculaire afin de quantifier plus aisément ce mécanisme par la mesure du niveau d'expression des gènes Bcl-2 et Bax codant respectivement pour des protéines anti- et pro-apoptotique. Nous avons choisi deux techniques différentes permettant d'analyser le niveau d'expression des gènes : le Northern blot ainsi que la RT-PCR en temps réel. Nous avons utilisé ces différentes techniques afin d'étudier le mode d'action de la fréquence de traite et de l'hormone de croissance (GH) sur la production laitière. Six chèvres Saanen ont été soumises à une traite différentielle : une demi-mamelle traite 1 fois par jour et la demi-mamelle contralatérale traite 3 fois par jour. Dans le même temps, trois des 6 chèvres ont reçu une injection sous-cutanée de 5 mg de GH recombinante bovine par jour. Après 23 jours de traitement, les chèvres ont été abattues et les mamelles prélevées. La production laitière et le nombre de cellules mammaires ont varié avec la modification de la fréquence de traite, tandis que la GH n'a pas entraîné de modification significative. Par la technique TUNEL, nous n'avons pas observé de différence de taux de cellules apoptotiques dans l'ensemble des demi-mamelles. L'analyse en Northern blot a révélé un ARNm de Bcl-2 très faiblement exprimés. Par RT-PCR en temps réel, nous avons observé une variation du rapport des ARNm Bcl-2/ Bax entre les traitements suggérant une limitation de l'apoptose par une augmentation de la fréquence de traite, tandis que l'effet de la GH n'est pas clair. Ainsi la RT-PCR en temps réel est une technique adaptée pour analyser les ARNm pro et anti-apoptotiques afin d'étudier les processus apoptotiques mammaires. Une étude en dynamique de l'expression des gènes de Bcl-2 et Bax permettrait de s'assurer des effets de la fréquence de traite et de la GH, ainsi que d'autres pratiques d'élevage connues pour agir sur le potentiel de production laitière.

## **Analysis of gene expression involved in mammary cell death; a clue to the milk potential of the mammary gland.**

*M. BOUTINAUD (1), J. GUINARD-FLAMENT (1) ET H. JAMMES (2)*

*(1) INRA-ENSAR, UMR sur la Production du Lait, 35590 St Gilles.*

**SUMMARY** - The physiological performance of the mammary gland (the amount of milk produced) is highly correlated with secretory tissue mass. Declining milk production characteristic of the lactating dairy animal is due to cell loss from the secretory epithelium where milk is synthesised. Furthermore, mammary cells have been demonstrated to die by programmed cell death (apoptosis). In order to understand the importance of mammary apoptosis during lactation, and its effect on the persistency of lactation, it is necessary to find a method to measure indicators of cell death in the mammary gland. Measuring the level of apoptotic cells is currently performed in situ using the TUNEL assay, which detects DNA fragmentation, one of the main characteristics of apoptotic cells. We are now proposing an alternative molecular approach to more easily quantify apoptosis by studying the expression of Bcl-2 and Bax, anti- and pro-apoptotic genes respectively. We chose two assays to analyse their level of expression: 1. Northern blot analysis and 2. Real time RT-PCR. We used these assays to study the effects of milking frequency and Growth Hormone (GH) treatment on the milk production. Six Saanen goats were submitted to a differential milking frequency: one half- udder milked once a day and the controlateral half- udder milked thrice a day. Concomitantly, 3 of the six goats received an injection of 5 mg recombinant bovine GH per day. After 23 days of treatment, the goats have been slaughtered and the mammary glands collected. The milking frequency affected the milk yield and the number of mammary cells, whereas no significant variation was observed with GH treatment. With the TUNEL assay, we did not observe any variation in the number of apoptotic cells in the half-udders, and we conclude that this assay is not sensitive enough to demonstrate the effects of milking frequency. However, Northern blot analysis revealed very low level expression of Bcl-2 mRNA. By real time RT-PCR, we showed variations of the Bcl-2/Bax mRNA ratio between half-udders, suggesting that milking thrice a day limits apoptosis compared to milking once a day, whereas the effect of GH remains unclear. Therefore, real time RT-PCR is an effective assay for analysing anti- and pro-apoptotic transcripts in order to study apoptosis in the mammary gland. A dynamic study of Bcl-2 and Bax gene expression is necessary to assume the effects of milking frequency and GH administration, as well as breeding practises known to affect the potential for milk production.

## INTRODUCTION

La régulation de la synthèse des constituants du lait dans la glande mammaire est fonction du nombre de cellules épithéliales sécrétrices et de leur activité métabolique. Les deux paramètres, seuls ou ensemble déterminent le potentiel laitier de la glande mammaire.

La diminution caractéristique de la production laitière après le pic de lactation serait due en partie à une perte progressive de cellules qui produisent du lait. En effet, chez la vache, entre le 90<sup>ème</sup> et le 240<sup>ème</sup> jour de lactation, la production laitière baisse de 23 % et la quantité d'ADN diminue de 17 % (Capuco *et al.* 2001). Il a été démontré que les cellules mammaires meurent par mort cellulaire programmée, encore appelée apoptose (Wilde *et al.* 1997, Capuco *et al.* 2001). L'étude de l'évolution du nombre de cellules dans la mamelle permettrait d'envisager de moduler la persistance de la lactation afin d'adapter la production laitière aux conditions d'élevages.

Plusieurs méthodes sont aujourd'hui disponibles pour étudier l'évolution du nombre de cellules mammaires. La quantité d'ADN présent dans la mamelle est une mesure directe, représentative du nombre de cellules. Le taux de cellules apoptotiques et le taux d'expression de gènes indicateurs de la mort cellulaire sont deux mesures indirectes, analysant un phénomène responsable de l'évolution du nombre de cellules. Ces critères ont été utilisés pour analyser un essai réalisé sur des chèvres en fin de lactation soumises à une modification de la fréquence de traite et traitées ou non par l'hormone de croissance (GH).

## 1. MATERIEL ET METHODES

### 1.1. EVALUATION DE L'EVOLUTION DU NOMBRE DE CELLULES MAMMAIRES

#### 1.1.1. Mesure de la quantité d'ADN dans la mamelle

En faisant l'approximation que la quantité d'ADN par cellule est stable, le nombre total de cellules mammaires est évalué en mesurant la quantité d'ADN présent dans la mamelle.

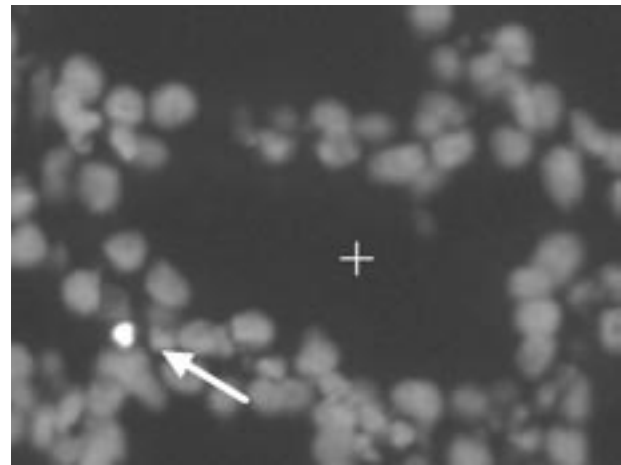
L'extraction d'ADN est réalisée après homogénéisation d'un échantillon de mamelle dans de l'azote liquide. L'homogénat est ensuite lysé en présence de protéinase K. Après une extraction au phénol/chloroforme, la concentration en ADN est mesurée par une méthode fluorométrique utilisant comme standard de l'ADN de chèvre (Labarca et Paigen, 1980). La quantité d'ADN dans la mamelle est calculée en multipliant la concentration en ADN avec la masse de la demi-mamelle.

#### 1.1.2. Mesure du taux de cellules apoptotiques par la méthode TUNEL

La mesure du taux de cellules apoptotiques sur coupes histologiques de glande mammaire est réalisée à l'aide d'un kit (In Situ Cell Death detection kit, Roche Diagnostics, Meylan, France) qui permet de mettre en évidence la fragmentation de l'ADN, phénomène spécifique et terminal de l'apoptose. Le principe de la méthode est d'incorporer à l'extrémité des fragments d'ADN des nucléotides marqués par un fluorochrome *in situ*. La coupe histologique mammaire ainsi marquée est ensuite observée par microscopie optique et photographiée. Les cellules apoptotiques présentent un noyau fluorescent, l'ensemble des cellules est par ailleurs dénombré par un second

marquage en présence d'un intercalant de l'ADN (figure 1). Le taux de cellules apoptotiques est déterminé à partir de deux photographies de tissu pour chaque demi-mamelle représentant une surface de 0,22 mm<sup>2</sup> (correspondant en moyenne à un total de 770 cellules).

**Figure 1** : Détection d'une cellule apoptotique sur coupe de glande mammaire de chèvre en lactation par la méthode TUNEL. Lumière alvéolaire (+). Noyau fluorescent ( ) présentant une condensation de la chromatine et une fragmentation de son contenu.



#### 1.1.3. Mesure des niveaux d'expression des gènes impliqués dans la mort cellulaire

Il est possible d'évaluer l'intensité de la mort cellulaire par l'étude de l'expression de gènes connus pour être des signaux pro ou anti-apoptotiques. Les mesures sont réalisées à l'aide de 2 techniques différentes, le Northern Blot et la RT-PCR en temps réel.

Les ARN totaux sont extraits selon la méthode rapportée par Puissant et Houdebine (1990). Brièvement, après broyage d'un échantillon de tissu mammaire dans un tampon destructurant, les ARN sont extraits par un mélange de phénol/chloroforme. Après précipitation, les ARN totaux sont quantifiés au spectrophotomètre et leur qualité observée après migration sur gel d'agarose.

Le principe de l'analyse des ARN en Northern blot repose sur une séparation préalable des ARN par électrophorèse sur gel d'agarose et leur transfert sur une membrane de nylon. Puis l'ARN messenger (ARNm) est identifié et quantifié après hybridation avec un ADN complémentaire (ADNc) radioactif et spécifique de l'ARNm cible. Nous avons ainsi analysé l'expression du gène Bcl-2.

La technique de RT-PCR en temps réel est constituée de deux étapes. Une 1ère étape de rétro-transcription permet d'obtenir des ADNc à partir des ARN totaux. La 2ème étape permet l'amplification spécifique par PCR de l'ADNc cible (en utilisant des amorces spécifiques de l'ARNm cible). La mesure de la quantité d'ADN amplifié est réalisée en temps réel par mesure de la fluorescence émise par un fluorochrome s'intercalant dans l'ADN, à l'aide d'un appareil spécifique (ABI prism 7000, Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Nous avons ainsi mesuré l'expression des gènes de Bax et Bcl-2, codant pour des protéines respectivement pro- et anti-apoptotiques. Les amorces utilisées ont été choisies à l'aide d'un logiciel (Primer Express, Applied Biosystems) à partir de la séquence nucléotidique bovine des ARNm.

**Tableau 1** : Production laitière et caractéristiques des demi-mamelles (masse, concentration et quantité d'ADN, taux de cellules apoptotiques)

	Témoïn		GH		ESM	Effet		
	1X	3X	1X	3X		Traite	GH	Interaction
Production laitière (mL/j)	816 <sup>a</sup>	1333 <sup>b</sup>	776 <sup>a</sup>	1471 <sup>b</sup>	77	0,01	NS	NS
Production laitière (% de la semaine de pré-traitement)	-26%	+8%	-31%	+19%				
Masse de la demi-mamelle (g)	531 <sup>a</sup>	602 <sup>b</sup>	613 <sup>b</sup>	747 <sup>c</sup>	15	0,01	0,05	0,09
Concentration en ADN (mg/g de demi-mamelle)	4,25 <sup>a</sup>	5,46 <sup>c</sup>	4,46 <sup>b</sup>	4,74 <sup>ab</sup>	0,20	0,02	NS	0,08
Quantité d'ADN (mg/demi-mamelle)	2260 <sup>a</sup>	3300 <sup>b</sup>	2710 <sup>ab</sup>	3520 <sup>b</sup>	170	0,01	NS	NS
Taux de cellules apoptotiques (%)	0,30	0,44	0,43	0,29	0,11	NS	NS	NS

ESM, erreur standard sur la moyenne, NS non significatif

Analyse de variance testée pour les effets de la fréquence de traite, du traitement à la GH et de l'interaction entre les deux traitements.

<sup>a</sup>, <sup>b</sup>, <sup>c</sup> différence significative à P < 0,05

Les amorces choisies sont localisées sur deux exons différents afin d'éviter l'amplification de l'ADN génomique. Pour le gène de Bax, les amorces sens AGAAGCTGAGCGAGTGTCTGAA et antisens CGCTCTCGAAGGAAGTCCAA permettent l'amplification d'un fragment de 271 bp avec une efficacité de 82 % et pour le gène de Bcl-2, les amorces sens GGTGGTGGAGGAGCTCTTCA et antisens GACAGCCAGGAGAAATCAAACAG, un fragment de 252 bp avec une efficacité de 92 %. Les analyses par RT-PCR sont réalisées en duplicate.

## 1.2. SCHEMA EXPERIMENTAL

6 chèvres Saanen en 32<sup>ème</sup> semaine de lactation, après deux semaines de pré-traitement à deux traites par jour, ont été soumises à une traite différentielle pendant 23 jours : une demi-mamelle traite 1 fois par jour (1X) et la demi-mamelle contralatérale traite trois fois par jour (3X). Dans le même temps, trois de ces chèvres ont reçu une injection sous-cutanée de 5 mg de GH recombinante bovine par jour et les 3 autres chèvres n'ont reçu aucune injection. La production laitière a été mesurée tous les jours. Au 24<sup>ème</sup> jour, les animaux ont été abattus et les demi-mamelles ont été prélevées et conservées à -80°C jusqu'à extraction de l'ADN et de l'ARN à partir de 1 g de tissu. Des explants de demi-mamelles ont aussi été préparés (fixation, déshydratation et inclusion dans la paraffine) afin de réaliser des coupes histologiques pour l'analyse du taux de cellules apoptotiques.

## 2. RESULTATS

### 2.1. LA FREQUENCE DE TRAITE ET LA GH ONT MODIFIE LA QUANTITE DE LAIT PRODUIT

Dans notre schéma expérimental, nous avons observé une diminution de -26% de la production laitière lorsque la fréquence de traite passe de 2 traites par jour à 1 traite par jour, tandis que l'augmentation de la fréquence de traite à 3 traites par jour entraîne une augmentation de 8 % la production laitière (tableau 1). Le traitement par la GH a eu tendance à augmenter la quantité de lait produit par les demi-mamelles traitées 3 fois par jour (+ 19% par rapport à la semaine de pré-traitement). Ainsi, la capacité de la mamelle à produire du lait a varié entre les traitements comme précédemment observé chez la chèvre (Knight *et al.*, 1990, Li *et al.*, 1999). Nous avons voulu savoir si cette variation était due à une évolution du nombre de cellules de la mamelle et particulièrement du nombre de cellules apoptotiques.

### 2.2. SEULE LA FREQUENCE DE TRAITE A MODIFIE CLAIREMENT LA QUANTITE D'ADN DANS LA MAMELLE

La pesée des demi-mamelles nous a montré que les demi-mamelles traitées plus fréquemment ont une masse de tissu significativement (P<0,01) plus élevée (tableau 1). Les demi-mamelles des chèvres traitées par la GH ont également une masse significativement (P<0,05) plus élevée que les animaux témoins (tableau 1). Nous avons mesuré la concentration en ADN comme indicateur de la concentration de cellules dans la mamelle. Il existe un effet significativement positif de la fréquence de traite sur la concentration en ADN. L'effet significatif de la fréquence de traite sur la concentration en ADN et sur la masse de tissu a entraîné un effet hautement significatif (P<0,01) de la fréquence de traite sur la quantité d'ADN dans la mamelle suggérant un nombre plus élevé de cellules dans les demi-mamelles plus fréquemment traitées. Par contre, nous n'avons pas observé d'effet significatif du traitement par la GH sur la quantité d'ADN dans la mamelle.

### 2.3. LA MORT CELLULAIRE, UN FACTEUR EXPLICATIF DES VARIATIONS DU NOMBRE DE CELLULES DANS LA MAMELLE ?

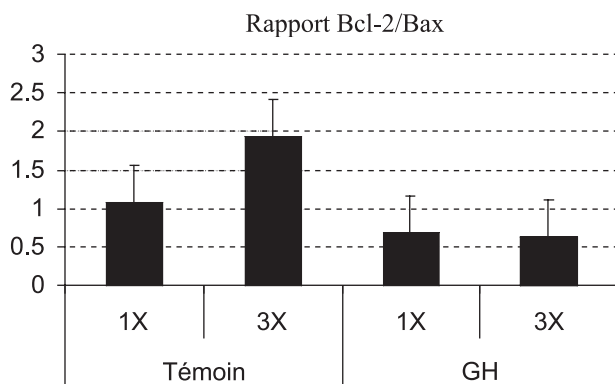
#### 2.3.1. Le taux de cellules apoptotiques n'a pas montré de modification après 23 jours de traitements

Sur coupes histologiques de tissu mammaire, les figures caractéristiques des cellules en apoptose, condensation de la chromatine et fragmentation du noyau en plusieurs lobules ont été observées (figure 1). Le taux moyen de cellules apoptotiques détecté par la méthode TUNEL est de 0,37 ± 0,11 % (tableau 1). Cette valeur est semblable aux valeurs précédemment rapportées en fin de lactation dans la glande mammaire chez la chèvre (Wareski *et al.* 2001) et chez la vache (Wilde *et al.* 1997 ; Capuco *et al.* 2001). Le taux de cellules apoptotiques n'a pas varié entre les traitements.

#### 2.3.2. Le taux d'expression des gènes indicateurs de la mort cellulaire tend à varier avec les traitements

L'analyse par Northern blot de l'expression du gène Bcl-2 a révélé un ARNm dont la taille est estimée à 4,5 kb. Les signaux obtenus ont été de faible intensité, ce qui n'a pas permis de réaliser une quantification fiable. Ceci pourrait être expliqué par le faible niveau d'expression de ce gène dans la mamelle comme cela a été montré chez la souris au cours de la lactation (Heermeier *et al.* 1996, Quarrie *et al.* 1996). Ces résultats nous ont incité à utiliser une technique plus sensible, comme la RT-PCR en temps réel.

La quantification du nombre de molécules d'ARNm de Bcl-2 et de Bax par la RT-PCR, a montré qu'effectivement les gènes concernés sont faiblement exprimés (résultats non montrés). Le taux d'expression du gène Bcl-2 a varié en fonction des traitements et ces variations sont exactement à l'inverse de celles du taux d'expression de Bax. Ceci nous a conduit à étudier le rapport des ARNm Bcl-2/Bax (figure 3). Celui-ci semble indiquer une différence non significative entre les deux fréquences de traites chez les animaux témoins : le rapport Bcl-2/Bax semble plus élevé dans les demi-mamelles traitées 3 fois par jour et serait en faveur d'un effet anti-apoptotique. Dans les demi-mamelles des chèvres traitées par la GH, le rapport Bcl-2/Bax semble être inférieur mais encore une fois, ces résultats ne sont pas significatifs.



**Figure 3** : Nombre de molécules d'ARNm de Bcl-2 (gène anti-apoptotique) rapporté au nombre de molécules d'ARNm de Bax (gène pro-apoptotique) quantifiés par RT-PCR en temps réel.

### 3. DISCUSSION

Dans cet essai, la variation de la capacité de la mamelle à produire du lait est essentiellement due à la modification de la fréquence de traite, l'effet de la GH étant non significatif. Cette observation est à rapprocher des effets sur le nombre de cellules de la mamelle comme le montre les variations de la quantité d'ADN.

L'explication des variations du nombre de cellules par une étude directe de l'apoptose dans la mamelle n'est pas probante puisque après 23 jours de traitements, le taux de cellules apoptotiques n'a pas varié. La technique TUNEL consiste à détecter un stade tardif de l'apoptose. Ne sont pas détectées les cellules qui sont en phase précoce d'apoptose et qui peuvent être par la suite éliminées par les macrophages ou abrasées de l'épithélium au cours de la lactation.

Afin de quantifier plus précisément le phénomène d'apoptose, nous avons mesuré l'expression de gènes impliqués dans ce processus. Nous avons montré que le Northern blot n'est pas une technique assez sensible pour mesurer l'expression de ces gènes. Les résultats obtenus par RT-PCR en temps réel, suggèrent que l'apoptose est limitée dans les demi-mamelles traitées 3 fois par jour par rapport à celle traitée 1 fois par jour, ceci pouvant être mis en relation avec le nombre supérieur de cellules dans les demi-mamelles traitées 3 fois par jour. Cependant les effets de la fréquence de traite sur l'expression des gènes ne sont pas significatifs. Une analyse sur un plus grand nombre d'animaux devrait permettre d'obtenir des résultats

significatifs. De plus, il semble que les prélèvements de tissus aient été trop tardifs, la mort cellulaire responsable de la variation du nombre de cellules aurait eu lieu avant. Après 23 jours, seule la résultante du phénomène, c'est-à-dire le nombre de cellules mammaires a significativement varié. En ce qui concerne la GH, nous n'avons pas retrouvé l'effet anti-apoptotique observé en culture cellulaire (Goh *et al.* 1998, Costaya *et al.* 1999). Cependant chez des vaches en lactation, la GH stimule la prolifération des cellules mammaires (Capuco *et al.* 2001). La stimulation de la prolifération par la GH pourrait permettre un renouvellement tissulaire. Une étude en dynamique de l'expression des gènes de Bcl-2 et Bax permettrait de s'assurer des effets de la fréquence de traite et de la GH.

### CONCLUSION

Nous avons réalisé une étude de la variation du nombre de cellules par l'apoptose afin d'expliquer des variations du potentiel de production de lait de la mamelle à la suite d'une modification de la fréquence de traite et d'un traitement par la GH. Nous avons montré que la RT-PCR en temps réel semble être plus appropriée que la méthode TUNEL pour étudier l'apoptose dans la glande mammaire étant donnée sa sensibilité. En effet, c'est une technique adaptée pour l'analyse des ARNm pro et anti-apoptotiques. L'analyse en dynamique de l'expression de ces gènes sur de plus grands nombres d'animaux devrait permettre de déterminer la cinétique d'action de la fréquence de traite et de la GH afin de comprendre comment ces facteurs agissent sur la persistance de la lactation. Enfin, l'étude conjointe de la prolifération cellulaire permettra d'évaluer l'ensemble des processus responsables de l'évolution du nombre de cellules mammaires.

*Nous remercions l'équipe de la ferme expérimentale de Brouÿssy pour la prise en charge des animaux, B. Pétridou pour le don de la sonde de Bcl-2 ; K.H. Al-Gubory et J.P. Furet pour l'appui technique concernant respectivement la méthode TUNEL et la PCR en temps réel et enfin l'équipe "Caractérisation des tissus et qualité des viandes" de l'UMRVP pour son accueil.*

- Capuco, A. V., Wood, D. L., Baldwin, R., McLeod, K., Paape, M. J., 2001. *J. Dairy Sci.*, 84, 2177-87.
- Costaya, J. A., Finidori, J., Moutoussamy, S., Searis, R., Devesa, J., Arce, V. M., 1999. *Endocrinol.*, 140, 5937-43.
- Goh, E. L., Pircher, T. J., Lobie, P. E., 1998. *Endocrinol.*, 139, 4364-72.
- Heermeier, K., Benedict, M., Li, M., Furth, P., Nunez, G., Hennighausen, L., 1996. *Mech. Dev.*, 56, 197-207
- Knight, C. H., Fowler, P. A., Wilde, C. J., 1990. *J. Endocrinol.*, 127, 129-138.
- Labarca, C., Paigen, K., 1980. *Anal. Biochem.*, 102, 344-352.
- Li, P., Rudland, P. S., Fernig, D. G., Finch, L. M., Wilde, C. J., 1999. *J. Physiol.*, 519, Pt 3, 885-900.
- Puissant, C., Houdebine, L.M., 1990. *Biotechniques*, 8, 148-149.
- Quarrie, L. H., Addey, C. V., Wilde, C. J., 1996. *J. Cell. Physiol.*, 168, 559-69.
- Wareski, P., Motyl, T., Ryniewicz, Z., Orzechowski, A., Gajkowska, B., Wojewodzka, U., Ploszaj, T. 2001. *Small Ruminant Research*, 40, 279-289.
- Wilde, C. J., Addey, C. V., Li, P., Fernig, D. G., 1997. *Exp. Physiol.*, 82, 943-53.