

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	5
LISTE DES TABLEAUX.....	9
INTRODUCTION.....	11
I. Le tissu mammaire, les ovaires et le cycle sexuel des rongeurs : étude bibliographique.....	13
1. Développement du tissu mammaire des rongeurs en période pré-natale	13
1.1 Première étape : mise en place des crêtes mammaires.....	13
1.2 Deuxième étape : mise en place des bourgeons primaires des glandes mammaires	14
1.3 Troisième étape : position définitive sous-cutanée des glandes mammaires	14
1.4 Quatrième étape : mise en place des ramifications du canal galactophore primaire	15
2. Développement du tissu mammaire des rongeurs en période post natale	15
2.1 De la naissance à la puberté	15
2.1.1 Chez le mâle.....	15
2.1.2 Chez la femelle	15
2.2 Le développement post pubère.....	17
2.2.1 Chez la femelle vierge	17
2.2.2 Chez la femelle gestante	17
2.2.3 Chez la femelle en lactation.....	17
2.2.4 Chez la femelle en fin de lactation (involution de la glande mammaire) ...	17
3. Structure histologique du tissu mammaire des rongeurs	18
4. Structure histologique des ovaires	18
4.1 Les follicules primordiaux	19
4.2 Des follicules primordiaux aux follicules primaires	19
4.3 Des follicules primaires aux follicules secondaires	19
4.4 Des follicules secondaires aux follicules tertiaires	19
4.5 Des follicules tertiaires aux follicules de De Graaf.....	20
4.6 Le corps progestatif.....	20
5. Les facteurs mis en jeu au cours du développement du tissu mammaire murin	20
5.1 En période fœtale : le mésenchyme mammaire	20
5.2 En période post natale	20

5.2.1	La prolactine	21
5.2.1.1	La synthèse de la prolactine	21
5.2.1.2	Rôle de la prolactine.....	21
5.2.2	Les hormones ovariennes.....	22
5.2.2.1	La progestérone	22
5.2.2.2	Les œstrogènes	23
5.2.3	Les hormones thyroïdiennes	28
5.2.4	La leptine	28
5.2.5	Les facteurs de croissance.....	29
5.2.5.1	L' Insulin-like growth factor I (IGF-I).....	29
5.2.5.2	L' Epidermal growth factor (EGF)	29
6.	Le cycle sexuel de la souris	31
6.1	Les quatre étapes du cycle sexuel	31
6.2	Contrôle endocrinien du cycle sexuel	32
6.2.1	La phase folliculaire.....	32
6.2.2	La phase ovulatoire	33
6.2.3	La phase lutéale.....	33
6.3	Influences extérieures sur le cycle sexuel	34
6.3.1	L'alternance jour/nuit.....	34
6.3.2	La température	34
6.3.3	L'humidité.....	35
6.3.4	L'alimentation.....	35
6.3.5	L'exposition de la femelle au mâle.....	35
II.	Étude du développement du tissu mammaire murin en région interscapulaire, comparée à la région ventrale périmamelonnaire.....	37
1.	Animaux, matériels et méthodes	37
1.1	Les animaux	37
1.1.1	Lot 1 : étude en fonction du cycle sexuel	37
1.1.2	Lot 2 : étude chez les souris supplémentées en œstrogènes.....	39
1.1.3	Lot 3 : étude chez les souris supplémentées puis privées en œstrogènes ...	39
1.1.4	Lot témoin	40
1.2	La solution enrichie en œstrogènes	40
1.3	La méthode de prélèvement	40
1.3.1	La technique de prélèvement classique.....	41

1.3.1.1	La méthode de prélèvement	41
1.3.1.2	La réalisation des lames histologiques	43
1.3.2	La technique de prélèvement « Whole Mount »	47
1.3.2.1	La méthode de prélèvement	47
1.3.2.2	La réalisation des lames histologiques	49
1.4	Lecture des lames histologiques	51
1.4.1	Sélection des lames	51
1.4.2	Lecture des lames de tissu mammaire de la région abdominale et de tissu interscapulaire	51
1.4.3	Lecture des lames des ovaires	53
2.	Résultats.....	55
2.1	En fonction du cycle sexuel (lot 1).....	55
2.1.1	En proœstrus	55
2.1.2	En œstrus.....	59
2.1.3	En metœstrus.....	62
2.1.4	En début de diœstrus	65
2.1.5	En fin de diœstrus	68
2.1.6	Bilan de l'étude du développement du tissu mammaire au cours du cycle sexuel	71
2.2	En fonction de la supplémentation puis de la privation en œstrogènes (lots 2 et 3)	73
2.2.1	À J ₀	73
2.2.2	Chez les souris supplémentées en œstrogènes	75
2.2.2.1	Après cinq jours de supplémentation	75
2.2.2.2	Après dix jours de supplémentation	77
2.2.2.3	Après 28 jours de supplémentation	79
2.2.3	Chez les souris supplémentées puis privées en œstrogènes.....	81
2.2.3.1	Après 28 jours de supplémentation et cinq jours de privation	81
2.2.3.2	Après 28 jours de supplémentation et dix jours de privation.....	83
2.2.4	Bilan de l'étude du développement du tissu mammaire au cours de la supplémentation puis de la privation en œstrogènes	86
III.	Discussion.....	89
1.	En fonction du cycle sexuel.....	89
2.	En fonction de la supplémentation puis de la privation en œstrogènes.....	89

CONCLUSION 93
BIBLIOGRAPHIE 95



LISTE DES FIGURES

<i>Figure 1 : Mise en place des crêtes mammaires et croissance des bourgeons primaires au sein du mésenchyme chez le rat.....</i>	14
<i>Figure 2 : Glande mammaire thoracique M3 d'un rat femelle de 21 jours.....</i>	16
<i>Figure 3 : La synthèse des œstrogènes.....</i>	23
<i>Figure 4 : Mode de fonctionnement du binôme œstrogène-ER dans la cellule</i>	25
<i>Figure 5 : Fluctuations hormonales au cours du cycle sexuel chez le rat.....</i>	32
<i>Figure 6 : Chronologie du cycle sexuel de la souris.....</i>	38
<i>Figure 7 : Chronologie des prélèvements du lot 2.....</i>	39
<i>Figure 8 : Chronologie des prélèvements du lot 3.....</i>	40
<i>Figure 9 : Étape (2) et localisation des bourrelets de tissus adipeux bruns interscapulaires.</i>	42
<i>Figure 10 : Chronologie des prélèvements du lot 3.....</i>	48
<i>Figure 11 : Arborisation du tissu mammaire M4 d'une souris femelle et détail de ce même tissu.....</i>	49
<i>Figure 12 : Coupe histologique au sein du tissu interscapulaire murin femelle et détails de ce même tissu.....</i>	52
<i>Figure 13 : Coupe histologique au sein du tissu ovarien murin et détails de ce même tissu ..</i>	54
<i>Figure 14 : Arborisation du tissu mammaire en région interscapulaire et en région mammaire M4, à l'étape præstrus du cycle sexuel de la souris</i>	55
<i>Figure 15 : IDTM et répartition des différentes structures mammaires visibles microscopiquement au sein du tissu interscapulaire et du tissu mammaire M4, à l'étape præstrus du cycle sexuel de la souris</i>	57
<i>Figure 16 : Répartition du tissu mammaire au sein des différents types de tissus adipeux en région interscapulaires, à l'étape præstrus du cycle sexuel de la souris</i>	58
<i>Figure 17 : Arborisation du tissu mammaire en région interscapulaire et en région mammaire M4, à l'étape œstrus du cycle sexuel de la souris</i>	59
<i>Figure 18 : IDTM et répartition des différentes structures mammaires visibles microscopiquement au sein du tissu interscapulaire et du tissu mammaire M4, à l'étape œstrus du cycle sexuel de la souris.....</i>	60
<i>Figure 19 : Répartition du tissu mammaire au sein des différents types de tissus adipeux en région interscapulaires, à l'étape œstrus du cycle sexuel de la souris</i>	61
<i>Figure 20 : Arborisation du tissu mammaire en région interscapulaire et en région mammaire M4, à l'étape metœstrus du cycle sexuel de la souris</i>	62
<i>Figure 21 : Résultats du dénombrement des structures mammaires en région interscapulaire et en région mammaire M4, à l'étape metœstrus du cycle sexuel de la souris</i>	63

<i>Figure 22 : Répartition du tissu mammaire au sein des différents types de tissus adipeux en région interscapulaires, à l'étape metœstrus du cycle sexuel de la souris</i>	<i>64</i>
<i>Figure 23 : Arborisation du tissu mammaire en région interscapulaire et en région mammaire M4, au début de l'étape diœstrus du cycle sexuel de la souris</i>	<i>65</i>
<i>Figure 24 : Résultats du dénombrement des structures mammaires en région interscapulaire et en région mammaire M4, au début de l'étape diœstrus du cycle sexuel de la souris</i>	<i>66</i>
<i>Figure 25 : Répartition du tissu mammaire au sein des différents types de tissus adipeux en région interscapulaires, au début de l'étape diœstrus du cycle sexuel</i>	<i>67</i>
<i>Figure 26 : Arborisation du tissu mammaire en région interscapulaire et en région mammaire M4, en fin de l'étape diœstrus du cycle sexuel de la souris</i>	<i>68</i>
<i>Figure 27 : Résultats du dénombrement des structures mammaires en région interscapulaire et en région mammaire M4, en fin de l'étape diœstrus du cycle sexuel de la souris</i>	<i>69</i>
<i>Figure 28 : Répartition du tissu mammaire au sein des différents types de tissus adipeux en région interscapulaires, en fin de l'étape diœstrus du cycle sexuel</i>	<i>70</i>
<i>Figure 29 : Évolution en valeur absolue de chaque structure mammaire au sein du tissu mammaire M4 au cours des différentes étapes du cycle sexuel</i>	<i>71</i>
<i>Figure 30 : Évolution en valeur absolue de chaque structure mammaire au sein du tissu interscapulaire au cours des différentes étapes du cycle sexuel</i>	<i>72</i>
<i>Figure 31 : Résultats du dénombrement des structures mammaires en région interscapulaire et en région mammaire M4, à J₀</i>	<i>74</i>
<i>Figure 32 : Répartition du tissu mammaire au sein des différents types de tissus adipeux en région interscapulaires, à J₀</i>	<i>75</i>
<i>Figure 33 : Résultats du dénombrement des structures mammaires en région interscapulaire et en région mammaire M4, après cinq jours de supplémentation en œstrogènes.</i>	<i>76</i>
<i>Figure 34 : Répartition du tissu mammaire au sein des différents types de tissus adipeux en région interscapulaires, après cinq jours de supplémentation en œstrogènes</i>	<i>77</i>
<i>Figure 35 : Résultats du dénombrement des structures mammaires en région interscapulaire et en région mammaire M4, après dix jours de supplémentation en œstrogènes.</i>	<i>78</i>
<i>Figure 36 : Répartition du tissu mammaire au sein des différents types de tissus adipeux en région interscapulaires, après dix jours de supplémentation en œstrogènes</i>	<i>79</i>
<i>Figure 37 : Résultats du dénombrement des structures mammaires en région interscapulaire et en région mammaire M4, après 28 jours de supplémentation en œstrogènes</i>	<i>80</i>
<i>Figure 38 : Répartition du tissu mammaire au sein des différents types de tissus adipeux en région interscapulaires, après 28 jours de supplémentation en œstrogènes</i>	<i>81</i>
<i>Figure 39 : Résultats du dénombrement des structures mammaires en région interscapulaire et en région mammaire M4, après 28 jours de supplémentation en œstrogènes et cinq jours de privation</i>	<i>82</i>

<i>Figure 40 : Répartition du tissu mammaire au sein des différents types de tissus adipeux en région interscapulaires, après 28 jours de supplémentation en œstrogènes et cinq jours de privation</i>	<i>83</i>
<i>Figure 41 : Résultats du dénombrement des structures mammaires en région interscapulaire et en région mammaire M4, après 28 jours de supplémentation en œstrogènes et dix jours de privation</i>	<i>84</i>
<i>Figure 42 : Répartition du tissu mammaire au sein des différents types de tissus adipeux en région interscapulaires, après 28 jours de supplémentation en œstrogènes et dix jours de privation</i>	<i>85</i>
<i>Figure 43 : Évolution en valeur absolue de chaque structure mammaire au sein du tissu mammaire M4 au cours des différentes étapes de supplémentation en œstrogènes, puis de privation</i>	<i>86</i>
<i>Figure 44 : Évolution en valeur absolue de chaque structure mammaire au sein du tissu interscapulaire au cours des différentes étapes de supplémentation en œstrogènes, puis de privation</i>	<i>87</i>
<i>Figure 45 : Mode d'action des œstrogènes, de la progestérone et de la prolactine sur les cellules mammaires</i>	<i>91</i>

LISTE DES TABLEAUX

<i>Tableau 1 : Rôles des ERα et des ERβ exposés dans la partie 5.2.2.2.3</i>	28
<i>Tableau 2 : Effets des différents facteurs intervenant au cours de la morpho genèse des glandes mammaires de la souris</i>	30
<i>Tableau 3 : Rôle des différentes hormones intervenant dans la régulation du cycle sexuel de la souris</i>	34
<i>Tableau 4 : Facteurs influençant le développement du tissu mammaire chez la souris adulte pubère non gestante</i>	36
<i>Tableau 5 : Chronologie des différents bains nécessaires à la constitution des lames histologiques.....</i>	44
<i>Tableau 6 : Chronologie des différents bains nécessaires à la coloration des lames histologiques.....</i>	46
<i>Tableau 7 : Chronologie des différents bains nécessaires au protocole « Whole Mount ».....</i>	50
<i>Tableau 8 : Dénombrement des structures mammaires par animal en région mammaire M4, au stade præstrus du cycle sexuel</i>	99
<i>Tableau 9 : Dénombrement des structures mammaires par animal et répartition du tissu mammaire au sein des différents types de tissu adipeux en région inter scapulaire, au stade præstrus du cycle sexuel</i>	99
<i>Tableau 10 : Dénombrement des structures mammaires par animal en région mammaire M4, au stade œstrus du cycle sexuel</i>	100
<i>Tableau 11 : Dénombrement des structures mammaires par animal et répartition du tissu mammaire au sein des différents types de tissu adipeux en région interscapulaire, au stade œstrus du cycle sexuel</i>	100
<i>Tableau 12 : Dénombrement des structures mammaires par animal en région mammaire M4, au stade metœstrus du cycle sexuel.....</i>	101
<i>Tableau 13 : Dénombrement des structures mammaires par animal et répartition du tissu mammaire au sein des différents types de tissu adipeux en région interscapulaire, au stade metœstrus du cycle sexuel</i>	101
<i>Tableau 14 : Dénombrement des structures mammaires par animal en région mammaire M4, au début du stade diœstrus du cycle sexuel</i>	102
<i>Tableau 15 : Dénombrement des structures mammaires par animal et répartition du tissu mammaire au sein des différents types de tissu adipeux en région interscapulaire, au début du stade diœstrus du cycle sexuel.....</i>	102
<i>Tableau 16 : Dénombrement des structures mammaires par animal en région mammaire M4, à la fin du stade diœstrus du cycle sexuel</i>	103

<i>Tableau 17 : Dénombrement des structures mammaires par animal et répartition du tissu mammaire au sein des différents types de tissu adipeux en région interscapulaire, à la fin du stade diœstrus du cycle sexuel.....</i>	103
<i>Tableau 18 : Dénombrement des structures mammaires par animal en région mammaire M4, à J₀.....</i>	104
<i>Tableau 19 : Dénombrement des structures mammaires par animal et répartition du tissu mammaire au sein des différents types de tissus adipeux en région interscapulaire, à J₀.....</i>	104
<i>Tableau 20 : Dénombrement des structures mammaires par animal en région mammaire M4, après cinq jours de supplémentation en œstrogènes.....</i>	105
<i>Tableau 21 : Dénombrement des structures mammaires par animal et répartition du tissu mammaire au sein des différents types de tissu adipeux en région interscapulaire, après cinq jours de supplémentation en œstrogènes.....</i>	105
<i>Tableau 22 : Dénombrement des structures mammaires par animal en région mammaire M4, après dix jours de supplémentation en œstrogènes.....</i>	106
<i>Tableau 23 : Dénombrement des structures mammaires par animal et répartition du tissu mammaire au sein des différents types de tissu adipeux en région interscapulaire, après dix jours de supplémentation en œstrogènes.....</i>	106
<i>Tableau 24 : Dénombrement des structures mammaires par animal en région mammaire M4, après 28 jours de supplémentation en œstrogènes.....</i>	107
<i>Tableau 25 : Dénombrement des structures mammaires par animal et répartition du tissu mammaire au sein des différents types de tissu adipeux en région interscapulaire, après 28 jours de supplémentation en œstrogènes.....</i>	107
<i>Tableau 26 : Dénombrement des structures mammaires par animal en région mammaire M4, après 28 jours de supplémentation et cinq jours de privation en œstrogènes.....</i>	108
<i>Tableau 27 : Dénombrement des structures mammaires par animal et répartition du tissu mammaire au sein des différents types de tissu adipeux en région interscapulaire, après 28 jours de supplémentation et cinq jours de privation en œstrogènes.....</i>	108
<i>Tableau 28 : Dénombrement des structures mammaires par animal en région mammaire M4, après 28 jours de supplémentation et dix jours de privation en œstrogènes.....</i>	109
<i>Tableau 29 : Dénombrement des structures mammaires par animal et répartition du tissu mammaire au sein des différents types de tissu adipeux en région interscapulaire, après 28 jours de supplémentation et dix jours de privation en œstrogènes.....</i>	109

INTRODUCTION

Comme dans toutes les espèces de mammifères, le tissu mammaire murin se développe en région ventrale du tronc. De plus, il s'étend en région interscapulaire, à proximité d'un bourrelet adipeux brun, depuis le tissu mammaire thoracique crânial.

L'étude du développement du tissu mammaire murin en région interscapulaire sous l'effet des œstrogènes s'applique dans une dynamique de recherche d'une thérapeutique ciblée contre le cancer du sein chez la femme. Le travail de recherche sur lequel repose cette thèse est réalisé en étroite collaboration avec le Laboratoire d'Investigations Précliniques (LIP) de l'Institut Curie dont les travaux sont dédiés à la lutte contre le cancer. Les chercheurs du LIP travaillent notamment sur des modèles de xénogreffes de cancer du sein entretenues sur des souris immunodéficientes. Les greffes sont effectuées en région interscapulaire, sous le bourrelet adipeux brun. Afin que la greffe prenne, les souris sont complémentées à haute concentration en œstrogènes pendant toute la durée de la prise et de la croissance de la greffe. La supplémentation en œstrogènes est généralement arrêtée lorsque les souris entrent en phase d'essai thérapeutique.

Un des critères considéré comme important dans l'évaluation de la pertinence des modèles de xénogreffes est que la greffe soit en position orthotopique. Une greffe est dite orthotopique si elle est réalisée dans sa région anatomique habituelle ou dans son tissu habituel. Dans le cas d'une tumeur mammaire, la greffe est orthotopique si elle est réalisée au sein d'un tissu mammaire. Il est donc intéressant de connaître l'extension du tissu mammaire murin en région interscapulaire et de caractériser les effets des œstrogènes, qui sont appliqués pendant toute la durée de l'expérimentation.

Le travail rédactionnel se divise en trois parties. La première partie est une étude bibliographique concernant le tissu mammaire et les ovaires des rongeurs. Cette partie traite du développement du tissu mammaire des rongeurs dans les périodes pré-natale et post-natale, la structure histologique du tissu mammaire murin et des ovaires, les facteurs mis en jeu au cours du développement du tissu mammaire murin, d'abord en période fœtale, puis en période post-natale et le cycle sexuel des souris. On remarquera le rôle central des œstrogènes dans ce développement. La deuxième partie concernera l'étude expérimentale avec une description des animaux, du matériel et des méthodes de prélèvement et d'analyse, puis les observations effectuées à partir des prélèvements réalisés. La troisième et dernière partie de l'étude sera une discussion des résultats obtenus.

I. Le tissu mammaire, les ovaires et le cycle sexuel des rongeurs : étude bibliographique

La souris adulte présente cinq paires de mamelles réparties en trois paires thoraciques, une paire abdominale et une paire inguinale.

Pour les parties I.1, I.2 et I.3, l'étude se fera principalement chez le rat, qui est le référentiel des rongeurs dans la plupart des publications ; les paragraphes traitant spécifiquement de la souris seront précisés.

1. Développement du tissu mammaire des rongeurs en période pré-natale

Une des principales différences entre la souris et le rat concerne le nombre de mamelles. Chez le rat, six paires de mamelles sont dénombrées dont une paire cervicale, deux paires thoraciques, deux paires abdominales et une paire inguinale.

La durée de la gestation d'une souris est de 19 à 21 jours. Chez le rat, elle est de 20 à 22 jours. L'organogenèse du tissu mammaire débute dès le développement embryonnaire et l'histogenèse se poursuit chez le fœtus, puis chez l'animal prépubère et enfin chez l'animal adulte. Le développement embryonnaire et fœtal des glandes mammaires se divise en quatre étapes distinctes selon l'âge et la taille de l'embryon ou du fœtus. RUSSO *et al.* (cités par JONES *et al.*, 1990), ont mis ces étapes en évidence sur le rat albinos.

1.1 Première étape : mise en place des crêtes mammaires

Au 11^{ème} jour de vie embryonnaire, deux épaisissements épidermiques se forment de façon symétrique en région crânio-ventrale du tronc, sur sa face ventrale. Des cellules mésodermiques s'agglomèrent autour de ces épaisissements afin de former deux crêtes mammaires ventrales à orientation crânio-caudale. La formation de ces crêtes s'observe sur un embryon de 6 à 10 mm de taille, ce qui correspond au 12^{ème} jour de gestation.

Au 13^{ème} jour et 1 heure de gestation, les crêtes mammaires se composent de deux rangées de cellules distinctes : une couche de cellules épithéliales et une couche de cellules mésenchymateuses, séparées par une membrane basale. Une assise basale se forme progressivement entre la couche de cellules épithéliales et la couche de cellules mésenchymateuses au fur et à mesure du développement des crêtes mammaires dans le sens crânio-caudal ; elles formeront les cellules myoépithéliales.

Chez le rat mâle, à 12 jours de vie intra-utérine (15^{ème} jour d'âge embryonnaire chez la souris mâle (THE STAFF of JACKSON LABORATORY, 1989)), sous l'influence de la testostérone, des récepteurs aux androgènes se mettent en place au pôle basal des cellules épithéliales et entraînent leur dégénérescence. Ce phénomène se passe dans les 36 à 84 heures après la différenciation morphologique des testicules. Chez la femelle au stade embryonnaire, l'absence de réponse aux androgènes est importante pour la survie des glandes mammaires.

1.2 Deuxième étape : mise en place des bourgeons primaires des glandes mammaires

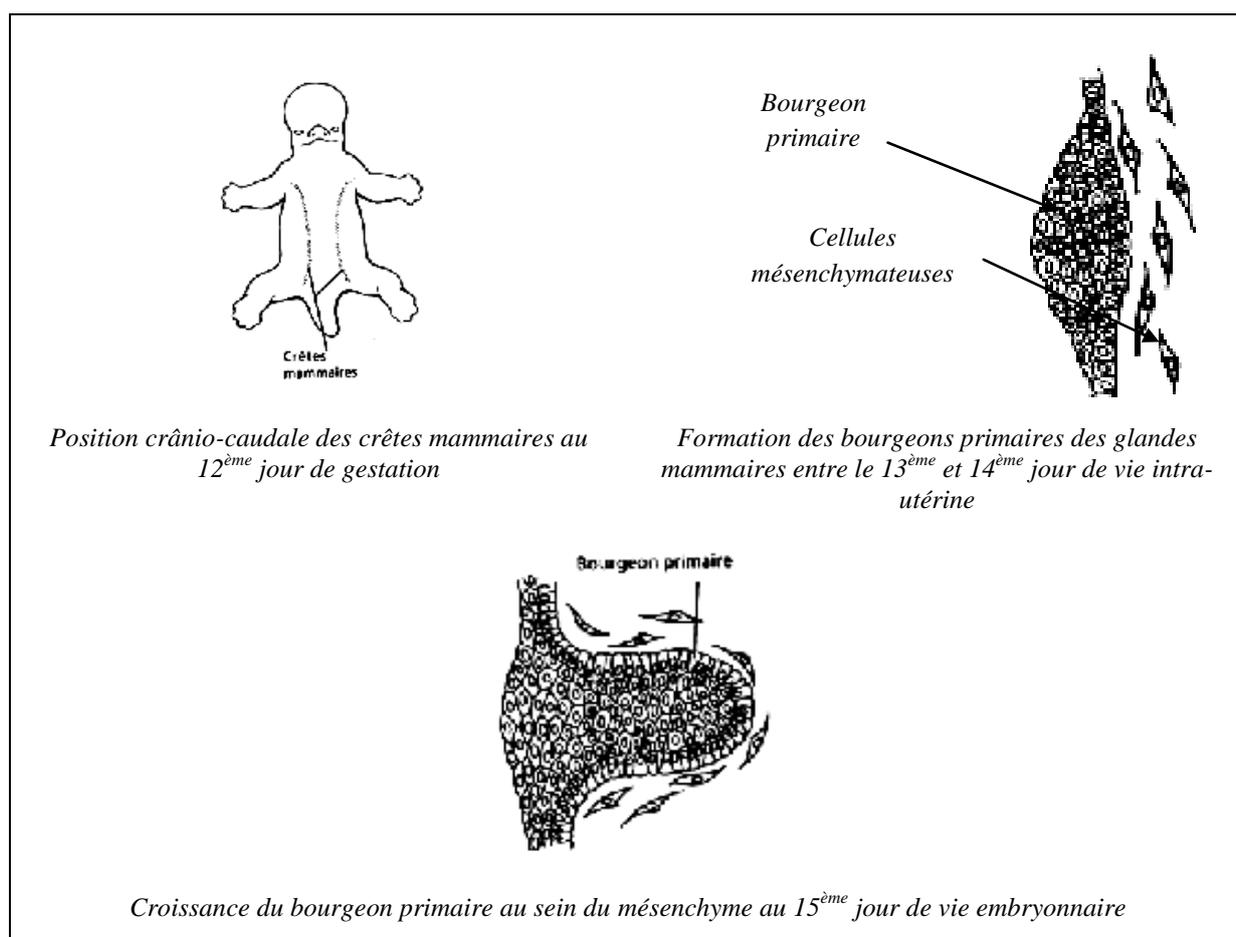
La deuxième étape est observée sur un fœtus de 17 à 18 mm de taille, soit entre 13 et 14 jours de vie intra-utérine. Cette étape est caractérisée par la formation des bourgeons primaires des glandes mammaires à partir d'un épaissement de cellules épithéliales (sur le site des futurs mamelons). À ce stade, les portions de crêtes mammaires situées entre les bourgeons primaires commencent à s'atrophier.

1.3 Troisième étape : position définitive sous-cutanée des glandes mammaires

La troisième étape est décrite au 15^{ème} jour de vie du fœtus. Les bourgeons primaires thoraciques croissent en profondeur dans le mésenchyme; et cela de façon prématurée par rapport à ceux en position inguinale.

La figure 1 schématise la mise en place des crêtes mammaires et la croissance des bourgeons primaires au sein du mésenchyme chez le rat.

*Figure 1 : Mise en place des crêtes mammaires et croissance des bourgeons primaires au sein du mésenchyme chez le rat
D'après LARSEN (2011)*



Chez le rat, à 15 jours et 14 heures de vie embryonnaire, les six paires de glandes mammaires occupent leur position définitive.

À 16 jours et 12 heures de vie embryonnaire, les mamelons apparaissent à la surface de la peau. Il y en a 12 répartis de part et d'autre de la ligne médiane.

1.4 Quatrième étape : mise en place des ramifications du canal galactophore primaire

La quatrième étape est décrite pour un fœtus de 18 à 32 mm. À ce stade, l'ébauche du canal galactophore primaire (issu du bourgeon primaire) pénètre plus profondément au sein du mésenchyme, jusqu'au futur coussinet adipeux qui induira la ramification du canal.

Les canaux galactophores primaires des glandes mammaires présentent une assise basale de cellules cubiques possédant un gros noyau. Leur centre est constitué de cellules apoptotiques, ce qui entraîne la formation de lacunes et de cavités et donc la mise en place d'une lumière canalaire. Ce phénomène d'apoptose est plus tardif dans les glandes mammaires inguinales comparativement aux glandes mammaires thoraciques et abdominales.

2. Développement du tissu mammaire des rongeurs en période post natale

À la naissance, les glandes mammaires des rongeurs sont encore rudimentaires. Elles vont donc poursuivre leur différenciation.

2.1 De la naissance à la puberté

Jusqu'à la puberté, la croissance des glandes mammaires des rongeurs est lente ; elle est dite isométrique car elle est équivalente à celle du corps.

2.1.1 Chez le mâle

Chez le mâle, la dégénérescence de l'unité fonctionnelle des glandes mammaires observée au cours de la vie fœtale se poursuit à la naissance.

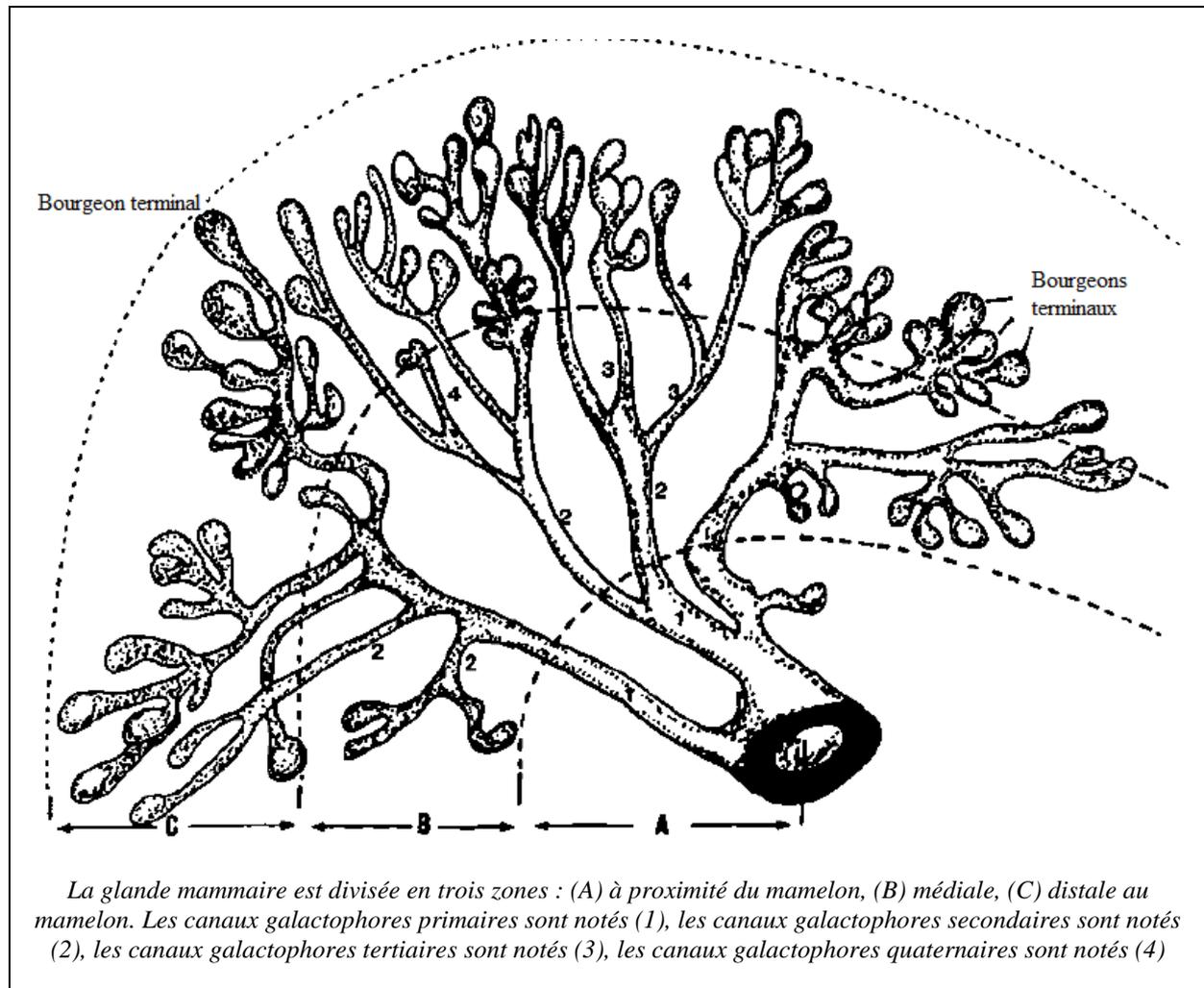
2.1.2 Chez la femelle

D'après RUSSO *et al.* (cités par JONES *et al.*, 1990), chaque glande mammaire est généralement composée de trois zones nommées A, B et C.

La zone A est la zone proximale au mamelon et elle comporte les canaux galactophores primaires. La zone C est la zone distale au mamelon et elle comporte les canaux galactophores terminaux (de troisième et de quatrième générations) et les bourgeons terminaux. La zone B est la zone intermédiaire, située entre les zones A et C et elle comporte beaucoup de bourgeons terminaux et de canaux galactophores secondaires.

La figure 2 schématise les trois zones d'une glande mammaire thoracique (M3) d'un rat femelle de 21 jours.

Figure 2 : Glande mammaire thoracique M3 d'un rat femelle de 21 jours
D'après RUSSO et al. (cités par JONES et al., 1990)



Le nombre et la taille des structures glandulaires dépendent de la localisation thoracique, abdominale ou inguinale. Par exemple, les glandes mammaires thoraciques comportent un plus grand nombre de bourgeons terminaux, localisés essentiellement en zone C.

Le développement des glandes se fait par une succession de ramifications entraînant l'apparition de bourgeons terminaux, une élongation des canaux préexistants et un clivage des bourgeons terminaux en un minimum de deux petits canaux ou alvéoles, appelés à ce stade bourgeons alvéolaires.

2.2 Le développement post pubère

Après la puberté, la croissance du tissu mammaire devient plus importante que celle du corps : elle est allométrique. Elle concerne essentiellement les canaux et le stroma.

2.2.1 Chez la femelle vierge

Chez la souris vierge, le développement du tissu mammaire est complet à l'âge de 4 à 7 mois. Cela consiste en la mise en place de nombreuses ramifications à partir des canaux galactophores qui se terminent en alvéoles.

À partir de la puberté (8 semaines en moyenne), la croissance des glandes mammaires suit le cycle sexuel. Il y a une prolifération des canaux galactophores au moment des étapes de proœstrus et d'œstrus et ceux-ci régressent au moment des étapes de metœstrus et de diœstrus du fait d'une régulation hormonale par les œstrogènes, la progestérone et la prolactine.

2.2.2 Chez la femelle gestante

Chez les rongeurs, dans la première partie de la gestation, c'est-à-dire avant 10 jours de gestation, la croissance des canaux galactophores est extensive et de nombreuses ramifications se mettent en place conduisant à la formation d'une structure tubuloalvéolaire. Le tissu adipeux interstitiel disparaît progressivement, celui-ci étant remplacé par des cellules épithéliales. Il semble d'ailleurs que l'augmentation de la vascularisation de la glande et la perte du coussinet adipeux soient induites par la prolifération des cellules épithéliales (BORELLINI *et al.*, 1989)).

À 14 jours de gestation, le système alvéolaire est entièrement établi afin d'anticiper la lactation future. L'activité sécrétoire commence en région des alvéoles situés proximale aux mamelons et progresse distalement.

À 17 jours de gestation, les glandes mammaires de la future mère sont entièrement fonctionnelles (RUGH, 1990).

2.2.3 Chez la femelle en lactation

Chez les rongeurs, la lactation dure environ 3 semaines. Au cours de celle-ci, les canaux et les alvéoles sont dilatés du fait de la présence de sécrétions. Les glandes mammaires non utilisées et celles en fin de lactation régressent (RUGH, 1990).

2.2.4 Chez la femelle en fin de lactation (involution de la glande mammaire)

En fin de lactation, le coussinet adipeux entourant les glandes mammaires se reforme et la lumière des canaux galactophores se comble. Les glandes mammaires se mettent au repos jusqu'à la prochaine lactation (RUGH, 1990). Chez la souris, l'involution du tissu mammaire prend environ 10 jours.

3. Structure histologique du tissu mammaire des rongeurs

Les glandes mammaires sont de structure tubuloalvéolaire. Elles sont entourées de fibres de collagène associées à des fibroblastes, des capillaires sanguins et des vaisseaux lymphatiques, le tout contenu dans un coussinet adipeux (JONES *et al.*, 1990).

Chez les rongeurs, chaque glande mammaire l'histologie des canaux et des alvéoles varie avec la localisation de la glande, l'âge de l'animal, le stade de son cycle sexuel et la gestation. Par exemple, chez la souris vierge, le système canalaire est le système le plus développé. Les lobules sont petits et peu développés. Les lobules situés proximement au mamelon sont généralement les plus développés (BOORMAN *et al.*, 1990).

La paroi des canaux galactophores est constituée d'un épithélium bistratifié comportant une assise luminale de cellules glandulaires et une couche basale de cellules myoépithéliales (SOBOTTA et WELSCH, 2004).

Les bourgeons terminaux sont constitués de trois à six couches de cellules indifférenciées et les bourgeons alvéolaires, qui se développent à partir des bourgeons terminaux sont uni ou bistratifiés. Les cellules sécrétantes (bordant la lumière) sont de structure cubique ou prismatique avec un noyau rond ou ovale. Des cellules myoépithéliales sont présentes mais leur nombre est variable et elles ne forment pas une strate cellulaire continue.

Il existe trois sous types de cellules épithéliales qui peuvent être distinguées de par leur ultra-structure et leurs caractéristiques histochimiques : les cellules claires (light cells), les cellules intermédiaires (intermediate cells) et les cellules sombres (dark cells). Les cellules claires possèdent un noyau rond à ovale avec une hétérochromatine lâche et un cytoplasme électroluminescent. Les cellules sombres possèdent un noyau de forme irrégulière avec une hétérochromatine dense et un cytoplasme dense aux électrons. Les cellules intermédiaires possèdent un noyau ovale avec une hétérochromatine homogène et un cytoplasme d'aspect intermédiaire. Les trois quarts des cellules composant les canaux galactophores et les bourgeons terminaux sont des cellules sombres et le quart restant est réparti équitablement entre les cellules intermédiaires et les cellules myoépithéliales. Les cellules claires représentent moins de 1% de la population cellulaire des glandes mammaires.

C'est au cours de la lactation que se déroule la majorité des différenciations fonctionnelles des cellules épithéliales. En effet le tissu mammaire montre alors un aspect typique d'un épithélium sécrétoire. Les cellules épithéliales qui bordent la lumière des acini sont hautement polarisées. Elles sont reliées entre elles par des jonctions serrées et elles présentent des microvillosités au pôle apical dirigées vers la lumière. L'épithélium mammaire est entouré par une lame basale qui constitue une frontière avec le stroma (BORELLINI *et al.*, 1989).

4. Structure histologique des ovaires

Les ovaires réunissent, au sein d'une charpente conjonctive et vasculaire, des follicules ovariens, qui abritent les gamètes femelles dont ils permettent la maturation et qui développent au cours de leur évolution des activités endocrines (CORDONNIER et FONTAINE, 2006).

L'ovaire est recouvert par un épithélium dit « germinatif » qui prolonge le mésothélium péritonéal tapissant le ligament suspenseur de l'ovaire et le ligament large. Sous

cet épithélium cubique simple, on distingue une zone superficielle constituant la corticale et une zone centrale constituant la médullaire.

La corticale est constituée d'un stroma conjonctif dense, richement cellulaire, qui se densifie sous l'épithélium germinatif pour former l'albuginée. Elle renferme des édifices cellulaires sphériques, de taille variable, qui représentent les différents stades évolutifs d'une même formation qui est le follicule ovarien. Les différents stades évolutifs observables sont les follicules primordiaux, les follicules primaires, les follicules secondaires ou follicules pleins, les follicules tertiaires ou follicules cavitaires et les follicules de De Graaf ou follicules mûrs qui font protrusion à la surface de l'ovaire. Des corps progestatifs, ainsi que des follicules atrésiques, sont aussi observables.

La médullaire est de nature essentiellement conjonctive et renferme des artères, des veines et les vaisseaux lymphatiques ovariens.

4.1 Les follicules primordiaux

Les follicules primordiaux correspondent au stade de développement folliculaire le plus précoce. Les follicules primordiaux se forment au moment du développement fœtal et sont typiquement localisés à la périphérie du cortex, juste sous l'albuginée ovarienne. Ils consistent en des ovocytes primaires entourés d'un épithélium folliculaire pavimenteux simple.

En permanence, des cohortes de follicules primordiaux sont prêtes à évoluer en follicules primaires. Ce processus est indépendant d'une quelconque stimulation hormonale extraovarienne.

4.2 Des follicules primordiaux aux follicules primaires

L'épithélium folliculaire pavimenteux simple se différencie en une couche simple de cellules folliculaires cubiques uniformes et les ovocytes primaires s'hypertrophient.

4.3 Des follicules primaires aux follicules secondaires

Au fur et à mesure que les follicules augmentent de taille, les cellules folliculaires deviennent cubiques, puis aplaties. La zone pellucide s'incère entre les ovocytes et les cellules folliculaires ; elle jouera un rôle important dans le processus de fécondation. Chaque follicule est inclus dans une matrice de tissu conjonctif formant la thèque folliculaire. Quand les follicules atteignent une taille suffisante, une distinction peut être faite entre la thèque interne, riche en vaisseaux sanguins et en cellules interstitielles à vocation endocrine, et entre la thèque externe riche en fibres conjonctives arrangées de façon concentrique. Ce sont les follicules secondaires.

4.4 Des follicules secondaires aux follicules tertiaires

Les follicules secondaires qui atteignent leur plein développement au moment du pic de FSH marquant le début du cycle ovarien poursuivent leur croissance et une petite lacune de forme irrégulière se forme entre les cellules. Celle-ci se remplit de liquide folliculaire ou liqueur folliculaire et est nommée antrum. Ce sont les follicules tertiaires.

La prolifération des cellules folliculaires forme la granulosa.

Les follicules non recrutés par le pic de FSH dégèrent (atrésie folliculaire).

4.5 Des follicules tertiaires aux follicules de De Graaf

Un petit nombre de follicules tertiaires entre dans un stade pré-ovulatoire. Ce processus se déroule sous contrôle hormonal ovarien et extraovarien. L'ovocyte primaire entouré de sa zone pellucide et d'une couche simple de cellules folliculaires (la corona radiata) se détache de la granulosa et flotte librement au sein de l'antrum. La croissance du follicule lui fait atteindre la surface de l'ovaire et l'ovocyte poursuit sa maturation en ovocyte secondaire. Le follicule se nomme alors follicule de De Graaf (ou follicule mûr), et cette structure atteint une taille de 500 µm de diamètre au stade de l'ovulation chez la souris (RUGH, 1990).

4.6 Le corps progestatif

Après l'ovulation, les cellules de la granulosa et de la thèque interne s'hypertrophient et s'hyperplasient. Ce processus se nomme la lutéinisation et se passe sous l'influence de l'hormone lutéinisante LH et de la prolactine, deux hormones hypophysaires. La lutéinisation est accompagnée par une dégénérescence de la membrane basale qui sépare la thèque interne de la granulosa, et par une infiltration du follicule post ovulatoire par des vaisseaux sanguins provenant de la thèque interne.

Le corps progestatif mature est une large structure constituée de grandes cellules au cytoplasme éosinophile. Cette structure dégénère en 10 à 12 jours en l'absence de gestation. Ainsi à un instant donné du cycle sexuel, jusqu'à trois séries de corps progestatifs d'âge différent sont observables.

5. Les facteurs mis en jeu au cours du développement du tissu mammaire murin

La croissance du tissu mammaire résulte d'une multiplication cellulaire permettant la formation d'unités sécrétrices de lait (CERIANI, 1974). Cette multiplication cellulaire est en partie sous dépendance hormonale et aboutit, au stade de la lactation, à une structure épithéliale alvéolaire, composée de cellules différenciées (McCARTY et McCARTY, 1974). Des études expérimentales sur la mammogénèse de la souris ont montré que jusqu'au 7^{ème} jour de vie fœtale, le développement du tissu mammaire murin n'est pas sous contrôle hormonal spécifique. En effet, RAYNAUD (1961) a montré que la gonadectomie chez les deux sexes entraînait une différenciation de type femelle du tissu mammaire, ce qui indique que les hormones gonadiques à ce stade ne sont pas essentielles pour la différenciation du tissu mammaire.

5.1 En période fœtale : le mésenchyme mammaire

Deux types de cellules mésenchymateuse sont impliqués dans la morphogénèse de l'épithélium des glandes mammaires chez la souris : les cellules adipeuses et les fibroblastes du futur coussinet adipeux (BORELLINI *et al.*, 1989). Les interactions entre les cellules du futur coussinet adipeux et les cellules épithéliales sont importantes pour induire la ramification du canal galactophore primaire.

5.2 En période post natale

Contrairement à de nombreux autres tissus dont le développement se déroule principalement à des stades précoces du développement de l'individu, c'est-à-dire au cours de

la vie fœtale et au début de la période post natale (avant la puberté), la majeure partie du développement de la glande mammaire se déroule au moment où l'animal a atteint sa maturité. Ce développement se poursuit au cours de la gestation et de la lactation. Le potentiel de croissance du tissu mammaire est maintenu pendant toute la durée de vie de reproduction de l'animal et se poursuit même après. Le cycle de prolifération/différenciation/involution se répète à chaque gestation et à un moindre degré au cours des cycles sexuels stériles.

Le fonctionnement et le développement des glandes mammaires sont contrôlés par des facteurs de croissance produits par l'épithélium mammaire lui-même ou par le bourrelet adipeux qui n'est donc pas une simple matrice inerte, et par des hormones.

Jusqu'au 23^{ème} jour de vie, le développement des glandes mammaires est soumis à des régulations locales liées à une augmentation de la quantité de tissu conjonctif et de tissu adipeux. Ensuite se met en place un contrôle hormonal.

Les différentes hormones mises en jeu au cours du développement de la glande mammaire sont produites par les ovaires, l'hypophyse et le pancréas. Les hormones ovariennes incluent les œstrogènes et la progestérone, les hormones hypophysaires incluent la prolactine ou la somatotropine et il est supposé un rôle de l'insuline pancréatique dans le développement du tissu mammaire.

5.2.1 La prolactine

5.2.1.1 La synthèse de la prolactine

La prolactine est une hormone peptidique synthétisée par les cellules lactotropes de la partie antérieure de l'hypophyse (SCULLY *et al.*, 1997).

5.2.1.2 Rôle de la prolactine

La prolactine est nécessaire à la différenciation fonctionnelle de l'épithélium mammaire et participe à la mise en place des bourgeons terminaux et au développement alvéolaire des glandes mammaires. La prolactine induit entre autres l'expression des gènes codant pour les protéines du lait dans les cellules de l'épithélium mammaire.

Le nombre de récepteurs membranaires de la prolactine est élevé dans les glandes mammaires des souris vierges, diminue au cours de la gestation et augmente après la mise bas. Il varie à l'inverse de la concentration sérique en progestérone (BORELLINI *et al.*, 1989). La régulation de la concentration des récepteurs de la prolactine semble être dirigée par la prolactine elle-même. Celle-ci exerce un contrôle positif ou négatif sur l'expression de ses propres récepteurs. Les facteurs agissant sur la prolactinémie, tels que la progestérone ou les œstrogènes, régulent donc indirectement l'expression des récepteurs à la prolactine (MARTINET et HOUDEBINE, 1993).

5.2.2 Les hormones ovariennes

5.2.2.1 La progestérone

5.2.2.1.1 La synthèse de la progestérone

La progestérone est une hormone stéroïde principalement sécrétée par les corps progestatifs des ovaires. Elle est synthétisée à partir du cholestérol sous l'action de la LH.

5.2.2.1.2 Les récepteurs de la progestérone

Les récepteurs de la progestérone (PR) font partie de la superfamille des récepteurs nucléaires (AUPPERLEE et HASLAM, 2007), comme la testostérone.

L'action de la progestérone sur la glande mammaire est médiée par deux récepteurs localisés dans les cellules épithéliales claires (décrites dans la partie I.3) : A (PRA) et B (PRB). Les PRA et PRB ont une structure voisine mais possèdent des fonctions distinctes (KARIAGINA *et al.*, 2006). Ils sont exprimés à des moments différents en fonction du cycle sexuel de la souris. Ceci est une particularité de la souris, qui n'est pas retrouvée chez le rat ou l'Homme.

Les PRA sont les isoformes majoritaires dans la glande mammaire de la souris vierge, tandis que les PRB sont les isoformes prédominants détectés au moment de la gestation. Il est donc rare que les PRA et les PRB coexistent dans une même cellule. Ainsi, l'action de la progestérone est médiée soit par les PRA, soit par les PRB, mais pas par les deux types de récepteurs au même moment (AUPPERLEE et HASLAM, 2007).

Des études au cours desquelles une superexpression ou une inhibition des PRA ou des PRB ont été réalisées, montrent que les PRB sont nécessaires au développement tubuloalvéolaire de la glande mammaire (CONNELLY *et al.*, 2003 ; MULAC-JERICEVIC *et al.*, 2003 ; SHYAMALA *et al.*, 2000 ; SHYAMALA *et al.*, 1998).

5.2.2.1.3 Rôle de la progestérone

La progestérone est importante comme hormone et comme précurseur de la synthèse des androgènes et des œstrogènes.

Elle participe au développement et à la différenciation des canaux galactophores au cours de la dernière moitié de la gestation. Elle limite l'augmentation du nombre de récepteurs de la prolactine et donc inhibe l'effet lactogène de la prolactine pendant la mammogénèse (GAYRARD, 2007).

De plus, la progestérone exerce un rôle mineur, comparativement au rôle majeur joué par les œstrogènes, sur le rétrocontrôle des hormones gonadotrope et lutéinisante et sur le système nerveux central. Cela inclut un ralentissement dans le relargage de LH ou un avancement du moment de la charge ovulatoire de LH, une augmentation de la température corporelle, de l'appétit et de la prise calorique au cours de la gestation. Le comportement de reproduction des rongeurs femelles, c'est-à-dire la réceptivité sexuelle, est corrélé à des pics de progestéronémie.

5.2.2.2 Les œstrogènes

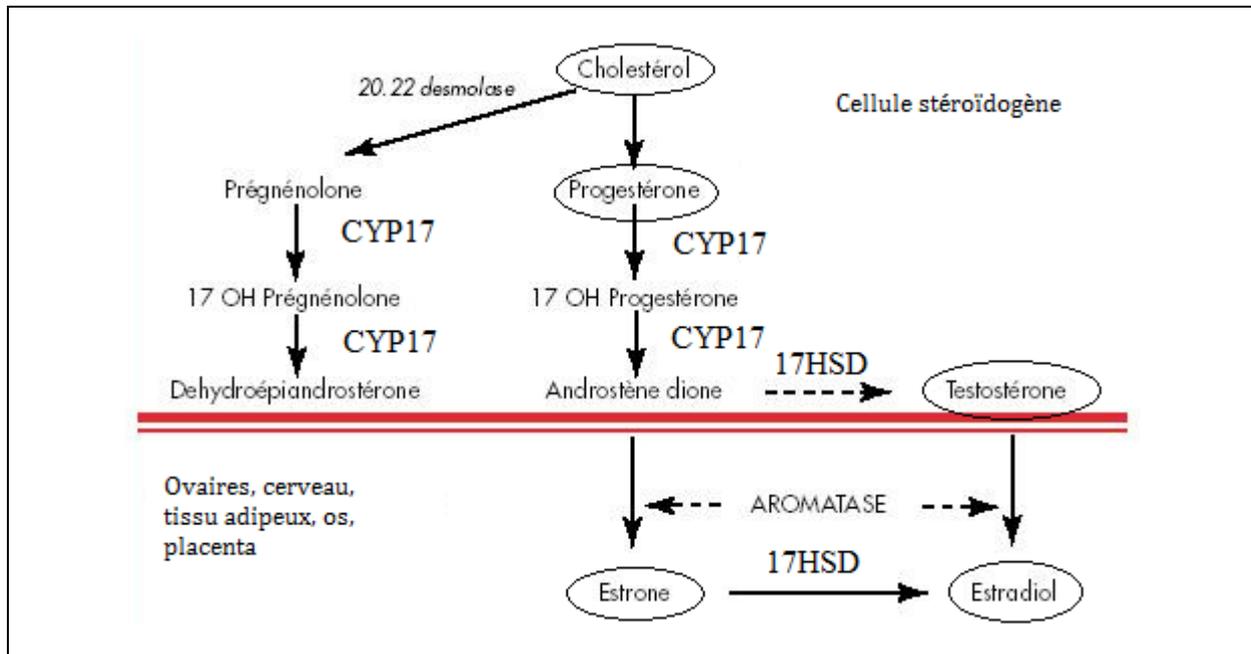
Les œstrogènes sont des hormones stéroïdes dont les trois représentants majeurs sont l'œstradiol, l'œstrone et l'œstriol. Ce sont des composants essentiels de la fonction de reproduction femelle, caractérisés par une action sur l'utérus, les ovaires, les glandes mammaires et l'axe hypothalamo-hypophysaire.

5.2.2.2.1 La synthèse des œstrogènes

Les cellules de la thèque interne des follicules ovariens produisent les androgènes. Les cellules de la granulosa expriment l'aromatase (CYP19) qui permet la synthèse des œstrogènes à partir de la testostérone ou de l'androstènedione en 17 β œstradiol et en œstrone respectivement (TIRET, 2008).

La figure 3 résume les différentes étapes de la synthèse des œstrogènes.

Figure 3 : La synthèse des œstrogènes
D'après JAUZEIN (2006)



Les follicules ovariens sont les principaux sites de production des œstrogènes. Le cerveau et le tissu adipeux sont aussi capables de convertir les androgènes en œstrogènes, grâce à l'action de l'aromatase (GOLOVINE *et al.*, 2003).

L'aromatase est un complexe d'enzymes dont les deux composants essentiels sont l'aromatase cytochrome P450 et une réductase, la NADPH-cytochrome P450 réductase (CONLEY *et al.*, 2001). Elle est exprimée dans les gonades (ovaires et testicules) et le cerveau (ZHAO *et al.*, 2009).

L'aromatase est essentielle pour le développement de l'appareil reproducteur et donc pour la fertilité de l'animal. Dans les ovaires, l'expression de l'aromatase P450 est plus importante dans les cellules de la granulosa des follicules pré ovulatoires que dans les petits follicules (HICKEY *et al.*, 1988). Dans certaines lignées murines, l'aromatase P450 peut aussi être localisée dans les corps progestatifs. Au stade folliculaire du cycle sexuel des souris, les

œstrogènes sont synthétisés exclusivement au niveau des cellules de la granulosa à partir des androgènes produits par les cellules de la thèque interne. Le cytochrome P450c17 qui catalyse la biosynthèse des androgènes est localisé exclusivement en région de la thèque interne tandis que l'aromatase P450 qui convertit les androgènes en œstrogènes est exprimée exclusivement dans la membrane des cellules de la granulosa. Le cytochrome P450c17 et l'aromatase P450 sont retrouvées au sein des corps progestatifs après l'ovulation (CONLEY *et al.*, 2001).

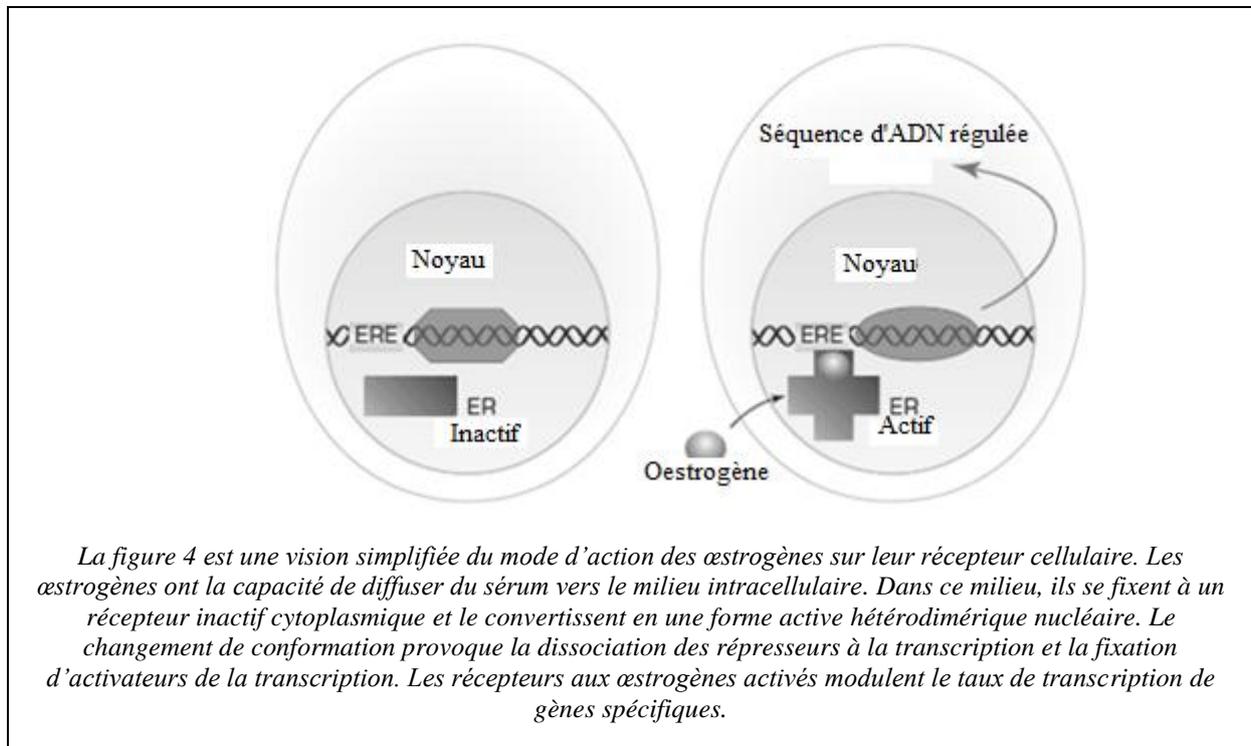
La synthèse des œstrogènes et l'expression de l'aromatase P450 dans le cerveau sont essentielles pour que l'animal manifeste un comportement sexuel normal. Chez le rat mâle une forte activité de l'aromatase a été mise en évidence dans la section médiale basale hypothalamique et en région des amygdales (LEPHART, 1996). Plus précisément, l'activité de l'aromatase est élevée en région des amygdales et des noyaux préoptiques périventriculaire et médial, et basse en région du noyau suprachiasmatique, de l'hypothalamus antérieur périventriculaire, du noyau arqué et du cortex notamment. Ces régions sont importantes dans la régulation neuroendocrine de la reproduction et du comportement sexuel. Chez le rat, il semble que l'activité de l'aromatase soit plus élevée chez le mâle que chez la femelle. Ce complexe enzymatique est retrouvé dans l'hypothalamus des deux sexes au cours de la période pré natale, à partir de 16 jours de vie embryonnaire. Ensuite le taux d'aromatase diminue à la naissance et cela jusqu'à la puberté. La régulation de l'expression de l'aromatase P450 dans les gonades est différente de celle observée dans le cerveau. Dans les ovaires et les testicules, les hormones folliculostimulante FSH et lutéinisante LH agissent à travers une augmentation de la quantité d'AMPc afin d'induire l'expression de l'aromatase P450. *A contrario*, dans le cerveau, une augmentation intracellulaire d'AMPc provoque une diminution de l'activité de l'aromatase.

5.2.2.2 Les récepteurs aux œstrogènes

Les œstrogènes interviennent obligatoirement dans la croissance, le développement et le fonctionnement du tissu mammaire. Pour cela, ils se fixent sur des récepteurs spécifiques qui font partie de la superfamille des récepteurs nucléaires. Les œstrogènes fixés à leur ER se lient aux séquences ERE de l'ADN.

Ce mécanisme d'action est résumé dans la figure 4.

Figure 4 : Mode de fonctionnement du binôme œstrogène-ER dans la cellule
D'après HEWITT et al. (2003)



Chez les rongeurs il existe deux types de récepteurs nucléaires aux œstrogènes (ER), les récepteurs α (ER α) et les récepteurs β (ER β) (SAJI *et al.*, 2000). Un troisième récepteur membranaire potentiel a été récemment décrit ; il est codé par le gène GPR30 (CRABTREE *et al.*, 2008).

L'expression embryonnaire de ces récepteurs est relativement tardive dans le mésenchyme des glandes mammaires. En effet, chez la souris, ceux-ci sont exprimés à 12.5 jours de vie embryonnaire (LEMMEN *et al.*, 1999).

Chez la souris, les ER α sont exprimés dans l'ovaire, l'oviducte, l'utérus, la glande mammaire, l'hypophyse, l'hypothalamus, le cortex, les os, les vaisseaux sanguins, les muscles squelettiques et la moelle osseuse. Les ER β sont exprimés dans l'ovaire, l'utérus, la glande mammaire, l'hypothalamus, le cortex et le poumon. Dans les ovaires la proportion d'ER β est plus importante que celle d'ER α . Les ER α sont préférentiellement exprimés dans la thèque et les régions interstitielles, tandis que les ER β sont principalement exprimés dans les cellules de la granulosa (HEWITT *et al.*, 2003).

5.2.2.2.3 Rôle des œstrogènes

L'action des œstrogènes est médiée par leurs récepteurs présentés ci-dessus.

5.2.2.2.3.1 De la naissance à la puberté

À la naissance, les glandes mammaires sont formées par un épithélium rudimentaire enrobé dans un tissu mésenchymateux. Avant 3 semaines d'âge, les œstrogènes ne participent pas encore à la prolifération de l'épithélium mammaire.

5.2.2.2.3.2 À la puberté

La concentration en hormones stéroïdes ovariennes augmente jusqu'à la puberté et la croissance des glandes mammaires commence.

5.2.2.2.3.2.1 Les œstrogènes couplés aux ER α

Une inhibition du gène codant pour les ER α montre que les ER α des cellules mésenchymateuses (comparativement à ceux des cellules épithéliales), sont nécessaires à l'élongation des canaux galactophores au cours de la puberté et au développement complet des glandes mammaires chez la souris mature (MUELLER *et al.*, 2002 ; SAJI *et al.*, 2000).

5.2.2.2.3.2.1.1 Leur action sur l'hypophyse et ses conséquences

PORTER (1974) a montré que quand l'hypophyse est retirée, les ovaires cessent de sécréter des hormones et le tissu mammaire commence à s'atrophier. De plus, quand des hormones ovariennes sont injectées à un animal qui a subi une hypophysectomie, il n'y a pas de croissance du tissu mammaire, ou alors cette croissance est anormale. Ainsi pour que les œstrogènes aient un effet sur la croissance du tissu mammaire, il faut que la glande pituitaire soit fonctionnelle. Les œstrogènes contribuent donc au développement du tissu mammaire en agissant directement sur la glande mammaire et/ou en agissant indirectement sur l'hypothalamus, l'hypophyse ou sur l'axe gonadique.

Cependant, l'hypophysectomie d'un animal n'entraîne pas qu'un déficit en une seule hormone, et l'absence chronique de l'hypophyse antérieure provoque de nombreuses modifications métaboliques. En plus de diminuer les stimulations ovariennes, thyroïdiennes et adrénérergiques, l'hypophysectomie retarde la croissance corporelle et perturbe l'homéostasie. Par ailleurs, les glandes mammaires d'un animal intact mais affamé ne répondent pas aux hormones ovariennes.

Si on injecte de l'insuline longue action à une femelle castrée et hypophysectomisée, le tissu mammaire répond par une croissance au traitement par des œstrogènes et de la progestérone. Ainsi les hormones ovariennes et l'insuline peuvent stimuler la croissance du tissu mammaire en l'absence des hormones hypophysaires.

Les cinq types de cellules endocrines exprimées dans l'hypophyse antérieure murine sont les cellules gonadotropes, les cellules corticotropes, les cellules thyrotropes, les cellules somatotropes et les cellules lactotropes. Celles-ci sont issues d'une même cellule souche primaire. La différenciation de ces types cellulaires se fait par la transcription de gènes spécifiques sous dépendance hormonale.

Les ER sont détectés précocement à 17 jours de vie embryonnaire dans l'hypophyse (SCULLY *et al.*, 1997). Une inhibition du gène codant pour les ER α chez la souris montre une réduction de l'ARNm codant pour la prolactine et une diminution du nombre de cellules lactotropes, qui présentent néanmoins un phénotype normal. De plus la souris montre des niveaux d'ARNm codant pour les hormones FSH et LH plus élevés que la normale, ce qui laisse supposer que les œstrogènes, couplés aux ER α , exercent un rôle inhibiteur sur la transcription du gène codant pour les hormones gonadotropes.

Ainsi les œstrogènes, couplés aux ER α , jouent un rôle dans la transcription des gènes codant pour la prolactine et pour les hormones FSH et LH, et sont impliqués dans la croissance des cellules lactotropes sans pour autant être nécessaires pour l'expression de leur phénotype. De plus, ils inhibent la sécrétion de dopamine par l'hypothalamus (la dopamine induit une inhibition de la synthèse et de la sécrétion de prolactine par la glande pituitaire) ; ils stimulent donc également la sécrétion de prolactine par ce mécanisme.

Une administration d'œstrogènes ou de prolactine à une femelle entraîne une hyperplasie des glandes mammaires. Cette modification est caractérisée par une hyperplasie diffuse ou multifocale des alvéoles avec ou sans dilatation des canaux galactophores et par la présence d'un contenu sécrétoire dans les alvéoles et/ou les canaux galactophores. La principale différence entre la réponse aux œstrogènes et la réponse à la prolactine semble être la stimulation de l'activité sécrétoire des glandes mammaires. Les canaux galactophores et les alvéoles peuvent être dilatés et remplis de liquide sécrétoire de nature protéique uniquement en réponse à une hyperprolactinémie.

5.2.2.2.3.2.1.2 Leur effet sur le mécanisme d'action de la progestérone

Chez les rongeurs, les œstrogènes couplés aux ER α des cellules épithéliales de la glande mammaires induisent l'expression des PR par les cellules épithéliales claires (SAJI *et al.*, 2000).

5.2.2.2.3.2.2 Les œstrogènes couplés aux ER β

Une des fonctions essentielle des ER β est d'antagoniser les effets des ER α des cellules épithéliales (induction de l'expression des PR par les cellules épithéliales claires) en formant des hétérodimères ER α -ER β (SAJI *et al.*, 2000).

Le tableau 1 résume les rôles des ER α et des ER β exposés dans la partie 5.2.2.2.3 :

Tableau 1 : Rôles des ER α et des ER β exposés dans la partie 5.2.2.2.3

ER	RÔLES
α	<ul style="list-style-type: none"> • Élongation des canaux galactophores et développement complet des glandes mammaires chez la souris mature (préférentiellement les ERα des cellules mésenchymateuses) • Stimulent la transcription des gènes codant pour la prolactine • Rétrocontrôle de la transcription des gènes codant pour les hormones FSH et LH • Inhibent la sécrétion de dopamine • Induisent l'expression des PR par les cellules épithéliales claires (ERα des cellules épithéliales) lors de la gestation
β	<ul style="list-style-type: none"> • Antagonise les effets des ERα des cellules épithéliales en formant des hétérodimères ERα-ERβ au cours de la lactation exclusivement

5.2.2.2.3.2.3 Autres rôles des œstrogènes

Les œstrogènes interviennent aussi dans la stimulation de la croissance des os longs, dans l'accélération de la fermeture des cartilages de conjugaison et dans la maturation de la muqueuse vaginale et de l'endomètre utérin.

5.2.3 Les hormones thyroïdiennes

Les hormones thyroïdiennes ne sont pas nécessaires à la croissance des conduits galactophores mais participent au développement lobulaire. Elles sont importantes pour le maintien des alvéoles au moment de l'involution de la glande mammaire, en fin de lactation. Au terme de la différenciation, les hormones thyroïdiennes accélèrent la réponse du tissu mammaire à la prolactine en activant ses récepteurs (BORELLINI *et al.*, 1989).

5.2.4 La leptine

Le développement de la glande mammaire et la mise en place de sa fonction de lactation est un procédé complexe régulé par une grande variété de facteurs de croissance dont la leptine (LIN et LI, 2005).

Au cours de la gestation, la leptine stimule la mise en place des canaux galactophores et la prolifération des cellules épithéliales mammaires.

Au cours de la lactation, la leptine joue un rôle sur l'expression du gène codant pour la caséine et retarde l'involution de la glande mammaire après le sevrage.

La leptine joue aussi un rôle dans la régulation de la prise de nourriture et de la balance énergétique.

L'expression de la leptine est contrôlée par les hormones lactogènes (prolactine, hydrocortisone) qui exercent un effet inhibiteur sur sa synthèse.

5.2.5 Les facteurs de croissance

Des facteurs de croissance sont exprimés au cours du développement des mamelles et sont des promoteurs de la prolifération et de la différenciation cellulaire. Ils stimulent la phosphorylation des récepteurs aux œstrogènes et participent donc indirectement à la mise en place des canaux galactophores de la glande mammaire (GREGG *et al.*, 2004) et à la formation des bourgeons terminaux.

5.2.5.1 L' Insulin-like growth factor I (IGF-I)

Les IGF-I sont les médiateurs de l'hormone de croissance (GH) dans la période post natale. Chez les souris femelles mutantes IGF-I KO, la croissance des canaux galactophores au sein du coussinet adipeux est très limitée, bien que le taux en GH soit normal. La présence seule d'œstradiol et de GH ne stimule pas la croissance du tissu mammaire quand il y a une absence d'IGF-I. Ainsi la présence de GH et d'IGF-I est importante pour la formation post natale de l'arbre mammaire (RICHARDS *et al.*, 2004).

Les œstrogènes, en combinaison avec les IGF-I, sont promoteurs de la formation des bourgeons terminaux et des bourgeons alvéolaires à la puberté ; la progestérone, en combinaison avec les IGF-I stimule la croissance des canaux galactophores primaires et de leurs ramifications.

5.2.5.2 L' Epidermal growth factor (EGF)

L'EGF augmente la synthèse de collagène de type IV et favorise ainsi l'attachement des cellules épithéliales de la glande mammaire à la membrane basale (GAYRARD, 2007).

L'ensemble des facteurs décrits dans la partie I.5. et leurs effets sur le tissu mammaire sont résumés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Effets des différents facteurs intervenant au cours de la morpho genèse des glandes mammaires de la souris

STADE	FACTEUR	EFFETS
Période fœtale	Mésenchyme mammaire	<ul style="list-style-type: none"> • Induit la ramification du canal galactophore primaire
	Testostérone	<ul style="list-style-type: none"> • Dégénérescence de l'unité fonctionnelle de la glande mammaire
À partir de la puberté	Œstrogènes	<ul style="list-style-type: none"> • Élongation des canaux galactophores à la puberté et développement tubuloalvéolaire à la gestation (préférentiellement les ERα des cellules mésenchymateuses) • Activation de la synthèse de prolactine • Rétrocontrôle de la transcription des gènes codant pour les hormones FSH et LH • Inhibition de la sécrétion de dopamine par l'hypothalamus • Activation de l'expression des PR par les cellules épithéliales claires (par les ERα des cellules épithéliales) • Les ERβ antagonisent les effets des ERα des cellules épithéliales par la formation d'hétérodimères ERα-ERβ
	Prolactine	<ul style="list-style-type: none"> • Mise en place des bourgeons terminaux • Développement alvéolaire des glandes mammaires • Induction de la synthèse des protéines du lait dans les cellules de l'épithélium mammaire
	Progestérone	<ul style="list-style-type: none"> • Développement du système alvéolaire • Limite l'augmentation de nombre de récepteurs à la prolactine • Limite l'effet lactogène de la prolactine pendant la mammogenèse
	Hormones thyroïdiennes	<ul style="list-style-type: none"> • Activation des récepteurs à la prolactine au terme de la différenciation des cellules glandulaires mammaires • Maintien des alvéoles au moment de l'involution de la glande mammaire
	IGF-I	<ul style="list-style-type: none"> • Développement allométrique de la glande mammaire • Stimule la croissance des canaux galactophores primaires et de leurs ramifications avec la progestérone • Stimule la formation des bourgeons terminaux et des bourgeons alvéolaires avec les œstrogènes
	EGF	<ul style="list-style-type: none"> • Stimule la synthèse de collagène de type IV
	Leptine	<ul style="list-style-type: none"> • Stimule la mise en place des canaux galactophores et la prolifération des cellules épithéliales mammaires au cours de la gestation • Stimule l'expression des gènes codant pour la caséine et retarde l'involution de la glande mammaire après le sevrage

6. Le cycle sexuel de la souris

Le cycle sexuel correspond à l'ensemble des modifications comportementales, morphologiques et fonctionnelles dont le cycle ovarien n'est qu'un élément.

À la naissance, l'ensemble de la population folliculaire est représentée et le nombre total d'ovocytes est estimé à environ 75 000. Beaucoup de follicules dégèrent presque immédiatement et d'autres dégèrent plus tard, ou bien deviennent des follicules ovulatoires. Ainsi le nombre initial de 75 000 est diminué de façon assez drastique.

À la puberté, un cycle sexuel de 4 à 5 jours se met en place (RUGH, 1990). Le corps progestatif se développe sur le site des follicules qui ont ovulé. La présence de corps lutéaux au sein d'un ovaire n'inhibe pas la croissance folliculaire et ceux-ci peuvent être vus dans un ovaire contenant des follicules matures. Dans le cas où la fécondation n'a pas lieu, le corps progestatif dégère entre 10 et 12 jours, laissant place à un corps blanc fibreux. On rappelle que dans un ovaire il est possible d'observer jusqu'à trois séries de corps progestatifs d'âge différent.

La puberté de la souris peut se prévoir en fonction de l'âge et du poids vif. La majorité des individus deviennent sexuellement matures entre 6 et 9 semaines. Cependant, certains sont plus précoces et deviennent pubères à partir de la 5^{ème} semaine. Le poids vif moyen chez la souris pubère est de 25 grammes.

Un signe précurseur de la puberté chez la femelle est la disparition de la membrane vaginale. Cet événement précède de quelques jours le premier œstrus.

6.1 Les quatre étapes du cycle sexuel

Le cycle sexuel de la souris est dit poly-œstral et l'ovulation est spontanée. Il se compose de quatre phases que sont (CRISPENS, 1975):

- *le præstrus* de 24 à 36 heures
- *l'œstrus* de 12 à 14 heures : le début de l'œstrus a lieu en général 4 à 6 heures après le début de la nuit et l'ovulation a lieu 2 à 3 heures après le début de l'œstrus. La présence du bouchon muqueux qui signe l'accouplement persiste de 16 à 24 heures.
- *le metœstrus (ou diœstrus 1)* de 24 à 48 heures
- *le diœstrus (ou diœstrus 2)* de 36 à 72 heures

Le diœstrus est immédiatement suivi par le præstrus du cycle suivant. L'anœstrus, correspondant à une période de mise au repos entre les cycles de reproduction, n'est pas observé chez les souris cyclées et en bonne santé.

Le præstrus et l'œstrus correspondent à la phase folliculaire du cycle ovarien et sont marqués par la phase ovulatoire du cycle ovarien. Les étapes metœstrus et diœstrus correspondent à la phase lutéale du cycle ovarien.

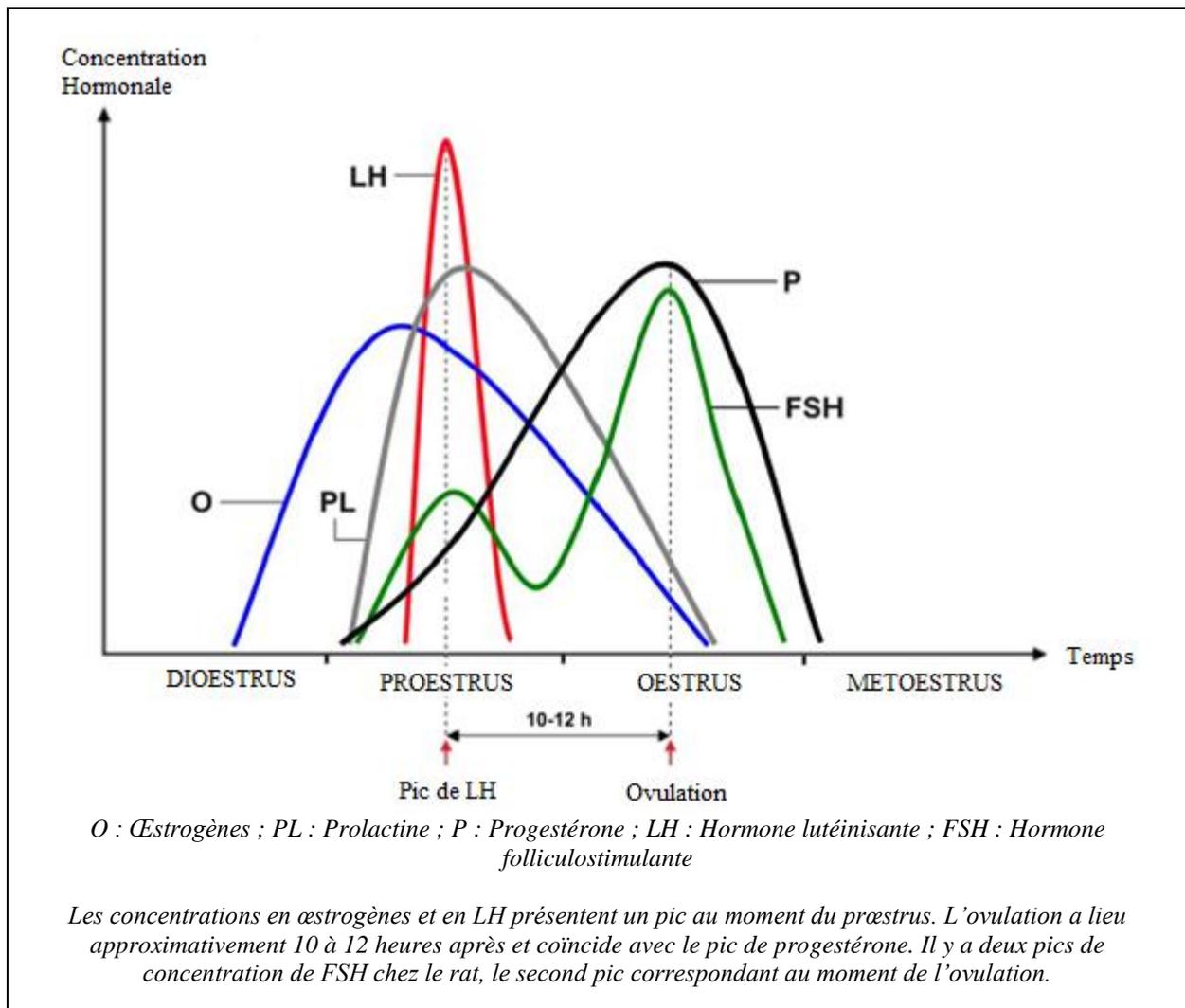
Le cycle peut être interrompu par une pseudo-gestation, une gestation, une lactation ou un anœstrus.

6.2 Contrôle endocrinien du cycle sexuel

Les changements physiologiques et comportementaux associés au cycle sexuel sont sous la dépendance des hormones hypophysaires et ovariennes et aussi sous la dépendance des hormones androgènes de par leur contrôle sur l'hypothalamus.

La figure 5 montre les variations hormonales observées au cours du cycle sexuel chez le rat. Le comportement hormonal chez la souris est sensiblement identique.

Figure 5 : Fluctuations hormonales au cours du cycle sexuel chez le rat
Par CREASY et al. (2008)



6.2.1 La phase folliculaire

Les concentrations de FSH et de LH commencent à augmenter juste après le diœstrus. La FSH stimule le développement de la granulosa des follicules tertiaires et induit l'expression des récepteurs à la LH par les cellules de la thèque interne. La LH initie la synthèse et la sécrétion d'androstènedione et de testostérone par la thèque interne. Ces androgènes sont utilisés par les cellules de la granulosa, où l'aromatase P450 est exprimée, comme substrats pour la synthèse des œstrogènes. Ainsi, l'hypophyse sécrète les hormones

FSH et LH qui conduisent à la maturation folliculaire et à la sécrétion d'œstrogènes au moment du prœstrus.

La sécrétion des hormones hypophysaires FSH et LH est régulée par la Gonadolibérine (GnRH) qui est produite par l'hypothalamus. La GnRH est sécrétée de façon pulsatile. Cette pulsation est essentielle pour la sécrétion de la FSH et de la LH.

L'augmentation de la concentration en œstrogènes pendant le prœstrus initie plusieurs changements morphologiques de l'utérus et du vagin. Elle inhibe la sécrétion de GnRH par l'hypothalamus et de FSH et LH par l'hypophyse. Le rétrocontrôle négatif de la sécrétion de FSH est acheminé par un peptide, l'inhibine, qui est produit par les cellules de la granulosa du follicule mature.

6.2.2 La phase ovulatoire

Au cours de la phase ovulatoire, des follicules dont la taille est supérieure à 500 µm évoluent en follicules mûrs de De Graaf. Un pic de sécrétion en œstrogènes est observé, entraînant une levée de l'inhibition de la sécrétion de GnRH et des hormones FSH et LH. Un relarguage de GnRH par l'hypothalamus est observé, ce qui augmente la réponse de l'hypophyse à la GnRH. Cette modulation œstrogénique positive sur l'axe hypothalamo-hypophysaire entraîne une charge pré ovulatoire de GnRH et donc un pic ovulatoire de LH, ce qui induit une ovulation du follicule.

MURR *et al.* (1973) ont détecté un pic plasmatique de LH le jour du prœstrus entre 4 h et 5 h de l'après-midi chez des femelles en cage avec des adultes mâles, et entre 5 h et 8 h de l'après-midi chez des femelles cyclées spontanément. L'ovulation a lieu 12 heures après la décharge de LH, entre 1 h et 8 h du matin, le jour de l'œstrus.

6.2.3 La phase lutéale

La concentration en progestérone commence à augmenter au moment du prœstrus et on observe un pic de progestéronémie au moment de l'ovulation. Comme les œstrogènes, la progestérone exerce un rétrocontrôle sur l'axe hypothalamo-hypophysaire, celui-ci pouvant être positif ou négatif, dépendant du stade du cycle. À la suite de l'ovulation, la progestérone, en synergie avec les œstrogènes, inhibe les sécrétions des hormones FSH et LH. Inversement, pendant le prœstrus, la progestérone renforce la charge pré-ovulatoire de LH (CREASY *et al.*, 2008).

Au cours de la phase lutéale, les cellules folliculaires qui entouraient le follicule ovulatoire s'agrègent pour former un corps progestatif, lequel sécrète des œstrogènes et surtout de la progestérone. La progestérone stimule la croissance de l'utérus et des glandes mammaires en vue d'une possible gestation.

Si l'ovocyte n'est pas fécondé, celui-ci meurt en 24 heures. De plus, en l'absence de fécondation, le corps progestatif ne fonctionne pas ou sécrète de la progestérone à un faible niveau, ce qui induit une levée de l'inhibition sur la sécrétion de FSH et de LH, la maturation d'un nouveau groupe de follicules tertiaires commence et le cycle est répété.

Le tableau 3 résume le rôle des différentes hormones intervenant dans la régulation du cycle sexuel de la souris :

Tableau 3 : Rôle des différentes hormones intervenant dans la régulation du cycle sexuel de la souris

HORMONE	EFFETS
GnRH	<ul style="list-style-type: none"> • Stimule des cellules gonadotropes de l'hypophyse
FSH	<ul style="list-style-type: none"> • Stimule le développement et la croissance folliculaire • Stimule la sécrétion des œstrogènes en régulant l'expression des récepteurs à la LH des cellules de la granulosa • Augmente les effets de la LH sur l'ovulation
LH	<ul style="list-style-type: none"> • Stimule le développement terminal du follicule ovulatoire • Le pic de LH initie l'ovulation • Stimule la production d'androstènedione et de testostérone par la thèque interne
Œstrogènes	<ul style="list-style-type: none"> • Stimule la préparation de l'utérus à la nidation • Rétrocontrôle positif ou négatif sur l'axe hypothalamo-hypophysaire
Progestérone	<ul style="list-style-type: none"> • Maintient l'architecture utérine • Rétrocontrôle positif ou négatif sur l'axe hypothalamo-hypophysaire
Inhibine	<ul style="list-style-type: none"> • Rétrocontrôle négatif sur la sécrétion de FSH par l'hypophyse

6.3 Influences extérieures sur le cycle sexuel

Les conditions environnementales dans lesquelles se trouve la souris ont un effet sur son cycle sexuel. La facilité avec laquelle le cycle de la souris peut être interrompu montre l'extrême sensibilité de cet animal à la moindre altération dans la séquence des événements sur le rétrocontrôle du système hypothalamo-hypophyso-ovarien.

6.3.1 L'alternance jour/nuit

Le rythme nyctéméral joue un rôle sur le déroulement du cycle sexuel. L'éclairage doit ressembler à celui que l'on observe au printemps, c'est-à-dire 14 heures de luminosité pour 10 heures d'obscurité.

Chez les souris qui sont maintenues à un régime d'éclairage de 14 heures par jour de 5h du matin à 7h du soir (10 heures de nuit), la période critique du pic ovulatoire de LH se passe en fin d'après midi ou en début de soirée du præstrus. La décharge de LH est dépendante de l'augmentation concomitante du nombre de récepteurs à la LH (BINGEL *et al.*, 1974).

6.3.2 La température

La température d'ambiance doit être comprise entre 19 et 23°C (WOLFENSOHN et LLOYD, 1998).

6.3.3 L'humidité

L'humidité relative doit être comprise entre 45 et 50%.

6.3.4 L'alimentation

Une alimentation de qualité doit être donnée aux souris. La quantité journalière est de trois à cinq grammes de nourriture sèche par souris (WOLFENSOHN et LLOYD, 1998).

6.3.5 L'exposition de la femelle au mâle

Il existe plusieurs systèmes de reproduction pour les souris :

- Le système monogame : un mâle en présence d'une femelle.
- Le système trio : un mâle en présence de deux femelles.
- Le système harem : un mâle pour un maximum de quatre femelles.

Quand une femelle est isolée ou bien en cage avec un groupe de femelles, l'exposition à un mâle a immédiatement un effet sur le cycle sexuel. La durée du cycle est souvent réduite à 4 jours si l'exposition débute immédiatement après le metœstrus et est continue pendant 48 heures. Cela suggère que le stimulus du mâle initie ou accélère le taux de développement folliculaire.

WHITTEN (1966) a décrit que les femelles peuvent s'accoupler après la première nuit si elles ont été stimulées par contact avec de l'urine du mâle deux jours avant l'appariement. Cependant, l'observation de WHITTEN n'est pas universelle et ne s'applique pas à toutes les lignées. Les effets de l'urine mâle sur le cycle sexuel peuvent être reliés à la présence d'une phéromone androgène-dépendante contenue dans l'urine de mâle. Cette phéromone a été détectée dans de l'urine vésicale ne contenant pas de sécrétions des glandes accessoires.

MARCHLEWSKA-KOY *et al.* (1978) ont montré que l'urine provenant de mâles ayant subi une prépuçialectomie avait des effets moindres sur la stimulation du cycle sexuel des femelles que l'urine des mâles intacts.

Le tableau 4 résume l'ensemble des éléments qui influencent le développement du tissu mammaire chez la souris pubère non gestante et leurs rôles :

Tableau 4 : Facteurs influençant le développement du tissu mammaire chez la souris adulte pubère non gestante

FACTEUR	EFFETS
Œstrogènes	<ul style="list-style-type: none"> • Élongation des canaux galactophores (préférentiellement les ERα des cellules mésenchymateuses) • Activation de la synthèse de prolactine par l'hypophyse • Inhibition de la sécrétion de dopamine par l'hypothalamus • Activation de l'expression des PR par les cellules épithéliales claires (par les ERα des cellules épithéliales) • Les ERβ antagonisent les effets des ERα des cellules épithéliales par la formation d'hétérodimères ERα-ERβ
Prolactine	<ul style="list-style-type: none"> • Mise en place des bourgeons terminaux • Développement alvéolaire des glandes mammaires • Induction de la synthèse des protéines du lait dans les cellules de l'épithélium mammaire
Progestérone	<ul style="list-style-type: none"> • Développement du système alvéolaire • Limite l'augmentation de nombre de récepteurs à la prolactine • Limite l'effet lactogène de la prolactine pendant la mammogénèse
IGF-I	<ul style="list-style-type: none"> • Développement allométrique de la glande mammaire • Stimule la croissance des canaux galactophores primaires et de leurs ramifications avec la progestérone • Stimule la formation des bourgeons terminaux et des bourgeons alvéolaires avec les œstrogènes
EGF	<ul style="list-style-type: none"> • Stimule la synthèse de collagène de type IV

II. Étude du développement du tissu mammaire murin en région interscapulaire, comparée à la région ventrale pérिमamelonnaire

Nous rappelons que le tissu mammaire murin se développe comme dans toutes les espèces de mammifères en région ventrale du tronc, sous une dépendance en partie œstrogénique, et a la particularité de s'étendre en région interscapulaire, à proximité d'un bourrelet adipeux brun, depuis le tissu mammaire thoracique crânial. Afin de déterminer si les xénogreffes de tissu mammaire tumoral sont en région orthotopique lorsqu'elles sont réalisées en région interscapulaire, il est intéressant de connaître les effets des œstrogènes appliqués pendant toute la durée de la prise et de la croissance de la greffe, sur cette région.

Dans cette partie nous comparerons l'extension du tissu mammaire de la région ventrale à celle de la région interscapulaire, au cours d'une supplémentation en œstrogènes, au moment de l'arrêt de cette même supplémentation et au cours du cycle sexuel, sous l'effet des œstrogènes endogènes.

1. Animaux, matériels et méthodes

1.1 Les animaux

L'étude du développement du tissu mammaire chez la souris adulte en région interscapulaire, comparée à la région ventrale pérिमamelonnaire, sous l'effet des œstrogènes et au cours du cycle sexuel est centrée sur la souris nude. La lignée nude est celle qui est utilisée en routine par le LIP pour les xénogreffes.

Les animaux utilisés se trouvent à l'animalerie de l'Institut Curie située rue d'Ulm, Paris 5 et l'ensemble des prélèvements a été réalisé dans cette structure, agréée pour l'expérimentation animale.

L'étude se fait sur trois lots de souris distincts.

1.1.1 Lot 1 : étude en fonction du cycle sexuel

Le premier lot, nommé lot 1, correspond aux souris non traitées aux œstrogènes (la croissance du tissu mammaire est donc soumise aux œstrogènes endogènes) et étudiées sur leur cycle sexuel qui se déroule sur cinq jours.

À J_0 , nous avons huit souris mâles vasectomisés depuis trois jours (souvent une période d'une semaine est laissée entre la vasectomie et le début des expérimentations, mais pour des contraintes d'emploi du temps, cette période a été réduite à trois jours) et 16 souris femelles de sept semaines d'âge.

Le matin, à 9h, cinq mâles sont choisis parmi les huit à disposition. Le critère de sélection est l'absence d'un œdème en région scrotale. Les cinq mâles sélectionnés sont répartis dans cinq cages dans lesquelles se trouve une poignée de litière de la cage des femelles afin d'habituer les mâles à l'odeur des femelles. On ajoute aussi un peu de litière de la cage initiale des mâles dans la cage des femelles afin d'habituer les femelles à l'odeur des mâles (WHITTEN, 1966)).

Il faut savoir qu'une fois qu'un mâle porte l'odeur de la femelle, il est impossible de le remettre dans une cage où se trouvent d'autres mâles par risque d'agression par dominance.

Le soir, à 19h30, trois femelles sont réparties au hasard par cage de mâle.

À J₁, au matin, à 8h, on regarde si des souris femelles présentent un bouchon muqueux ou « plug » (coagulum de liquide des vésicules séminales et des glandes de la prostate antérieure) qui ferme l'orifice du vagin.

Quand une souris présente un bouchon muqueux, celle-ci est placée dans une cage correspondant au jour où elle a présenté son plug et il est précisé le jour où celle-ci sera sacrifiée et prélevée. Les souris femelles qui n'ont pas présenté de plug sont des femelles qui n'ont pas été saillies ou bien qui ont perdu leur bouchon muqueux au cours de la nuit. Celles-ci sont à nouveau isolées du mâle jusqu'au soir, 19h30 où elles seront remises en sa présence. Le mâle ne bouge pas de la cage qui lui a été attribuée à J₀.

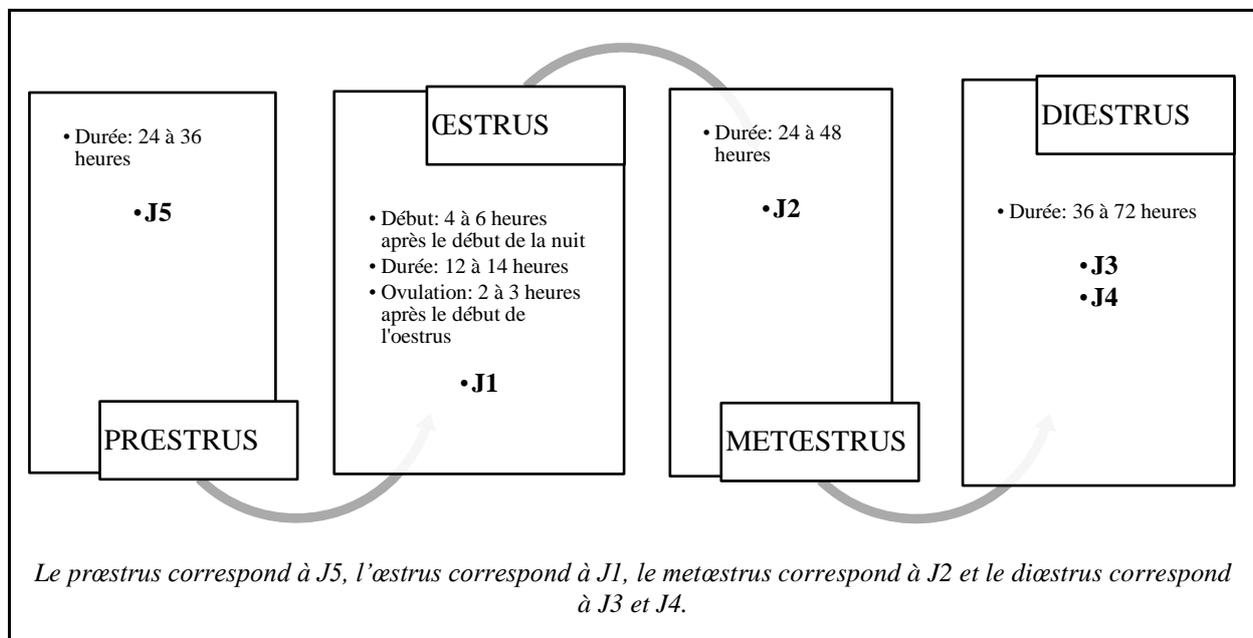
Le but des prélèvements est de prélever trois souris femelles par jour du cycle sexuel c'est-à-dire :

- J₁ : Présence du plug : trois souris
- J₂ : Présence du plug + un jour : trois souris
- J₃ : Présence du plug + deux jours : trois souris
- J₄ : Présence du plug + trois jours : trois souris
- J₅ : Présence du plug + quatre jours : trois souris

La présence du plug indique que la femelle a été saillie et qu'elle a ovulé. On se situe donc approximativement à l'étape œstrus du cycle sexuel de la souris (CRISPENS, 1975).

La figure 6 indique les dates auxquelles correspondent les différentes étapes du cycle sexuel.

Figure 6 : Chronologie du cycle sexuel de la souris



Au final, cette première expérience a duré 16 jours. À partir du 10^{ème} jour, aucun bouchon muqueux n'a été observé sur les trois femelles restantes. Cela peut s'expliquer par une non performance du mâle, une mauvaise fertilité de la femelle ou une perte précoce du bouchon muqueux. Nous n'avons donc pu récolter qu'une seule femelle à J₁ (stade œstrus).

Pour chaque animal les prélèvements réalisés pour analyse histologique sont :

- le tissu interscapulaire englobant le bourrelet adipeux brun
- le tissu mammaire abdominal caudal (M4)
- les ovaires

1.1.2 Lot 2 : étude chez les souris supplémentées en œstrogènes

Le second lot, nommé lot 2, correspond aux souris supplémentées en œstrogènes. Les œstrogènes se trouvent dans l'eau de boisson à la concentration de 8.5 ng/ml.

À J₀, une cage est constituée avec 15 souris femelles de sept semaines d'âge.

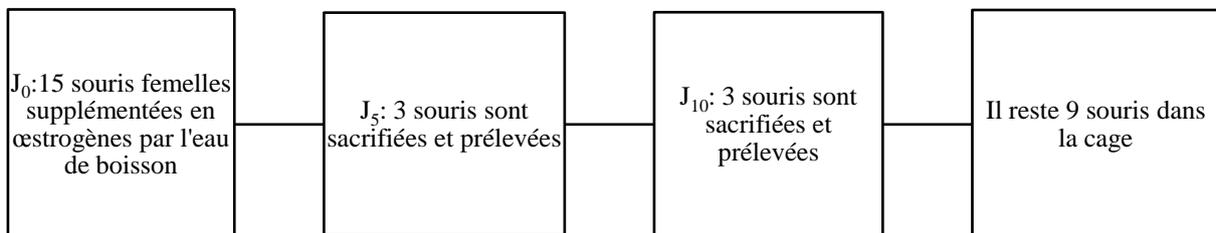
À J₅, on sacrifie trois souris et pour chaque animal les prélèvements réalisés pour analyse histologique sont :

- le tissu interscapulaire englobant le bourrelet adipeux brun
- le tissu mammaire abdominal caudal (M4)
- les ovaires

Cette même étape est répétée à J₁₀.

La figure 7 résume la chronologie des prélèvements du lot 2.

Figure 7 : Chronologie des prélèvements du lot 2



Il reste alors neuf souris dans la cage. Celles-ci correspondent aux souris du lot 3 décrit ci-dessous.

1.1.3 Lot 3 : étude chez les souris supplémentées puis privées en œstrogènes

Le troisième lot, nommé lot 3, correspond aux souris supplémentées puis privées en œstrogènes. Les souris sont supplémentées en œstrogènes pendant 28 jours. Les œstrogènes se trouvent dans l'eau de boisson à la concentration de 8.5 ng/ml.

Les neuf souris femelles restant dans la cage constituée précédemment sont supplémentées en œstrogènes jusqu'à J₂₈.

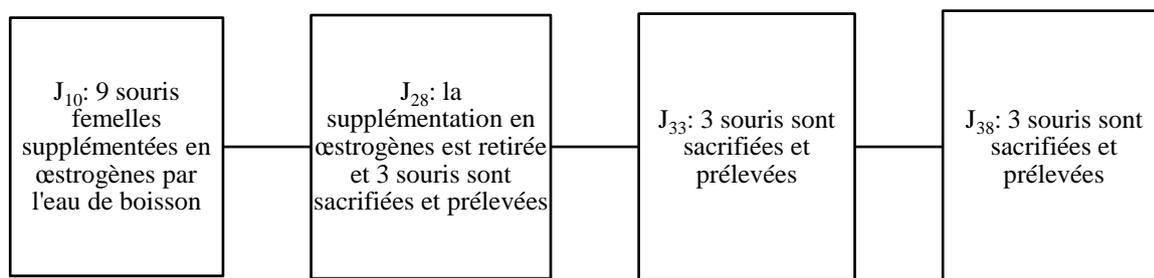
À J₂₈, on retire la supplémentation en œstrogènes pour toutes les souris, trois souris sont sacrifiées et pour chaque animal les prélèvements réalisés pour analyse histologique sont :

- le tissu interscapulaire englobant le bourrelet adipeux brun
- le tissu mammaire abdominal caudal (M4)
- les ovaires

Les mêmes prélèvements histologiques sont répétés à J₃₃ et J₃₈.

La figure 8 résume la chronologie des prélèvements du lot 3.

Figure 8 : Chronologie des prélèvements du lot 3



1.1.4 Lot témoin

Le lot témoin pour les expériences 2 et 3 correspond à des souris qui n'ont subi aucune complémentation en œstrogènes.

À J₀, on sacrifie trois souris femelles de sept semaines d'âge et pour chaque animal les prélèvements réalisés pour analyse histologique sont :

- le tissu interscapulaire englobant le bourrelet adipeux brun
- le tissu mammaire abdominal caudal (M4)
- les ovaires.

1.2 La solution enrichie en œstrogènes

La solution enrichie en œstrogènes qui sera mise à disposition des souris des lots 2 et 3 est faite à partir d'une poudre de β œstradiol commercialisée par le laboratoire Sigma-Aldrich.

Dans un premier temps, 425 mg de cette poudre sont dilués dans 100 ml d'éthanol, jusqu'à l'obtention d'une solution homogène. Dans un second temps, 400 ml d'eau distillée sont ajoutés. Dans un troisième et dernier temps, 1 ml de la solution est prélevé et dilué avec 100 ml d'eau distillée. Cette dernière solution est ce que contient le biberon laissé à disposition des souris à la concentration de 8.5 ng/ml.

1.3 La méthode de prélèvement

Au cours de ces expériences, deux techniques de prélèvements différentes ont été utilisées. La première technique est une technique classique de prélèvement histologique utilisée sur les lots 2 et 3. La seconde technique est la méthode de prélèvement « Whole

Mount » (DE ASSIS *et al.*, 2010) utilisée sur le lot 1 afin de visualiser l'arborisation du tissu mammaire murin dans son ensemble.

La technique de prélèvement « Whole Mount » n'a pas été utilisée sur les lots 2 et 3 car la possibilité de réaliser des immunomarquages de récepteurs hormonaux sur ces prélèvements n'avait pas été vérifiée (des études immunohistochimiques sont prévues en complément de ce travail). Il nous a parut intéressant de l'appliquer au tissu interscapulaire et au tissu mammaire de la région abdominale du lot 1 pour mieux visualiser leur développement tridimensionnel.

Les ovaires du lot 1 ont été récoltés par la méthode de prélèvement classique.

Au total, trois prélèvements différents sont effectués pour analyse histologique :

- le tissu interscapulaire englobant le bourrelet adipeux brun
- le tissu mammaire abdominal caudal (M4)
- les ovaires

Pour des contraintes d'emploi du temps, les prélèvements ont été réalisés par moi-même et deux personnes qui ont été formées de la même façon sur les techniques de prélèvement afin de diminuer le biais de manipulation.

1.3.1 La technique de prélèvement classique

1.3.1.1 La méthode de prélèvement

1.3.1.1.1 Le tissu mammaire abdominal caudal

Les différentes étapes du prélèvement du tissu mammaire M4 sont les suivantes :

- (1) Après le sacrifice de la souris, celle-ci est placée et fixée en décubitus dorsal sur une plaque de liège à l'aide d'aiguilles.
- (2) Un rectangle de peau est prélevé, englobant les mamelles de la région abdominale caudale M4.
- (3) Celui-ci est agrafé sur un support rigide (film radiographique) et plongé dans un flacon contenant du formol isotonique tamponné pendant 48 à 72 heures afin d'assurer la fixation du tissu.

1.3.1.1.2 Le tissu interscapulaire

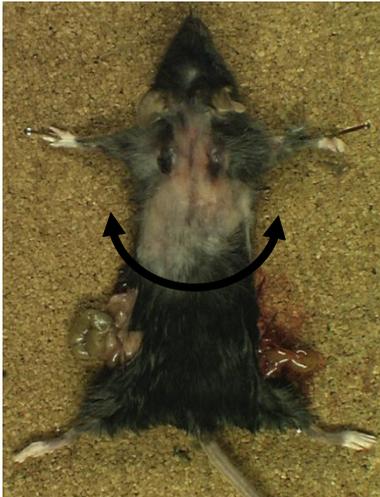
Les différentes étapes du prélèvement du tissu interscapulaire sont les suivantes :

- (1) Après avoir prélevé les mamelles M4, on réalise une incision de la peau jusqu'aux membres thoraciques et la souris est placée et fixée en décubitus ventral sur une plaque de liège à l'aide d'aiguilles.
- (2) Une incision cutanée circulaire sur un plan coronal en région abdominale caudale est réalisée.
- (3) On sépare délicatement la peau et le tissu sous-cutané des plans profonds.
- (4) En région interscapulaire, un rectangle de tissu est prélevé, englobant les bourrelets de tissu adipeux brun qui sont symétriques de part et d'autre de la ligne médiane de l'animal.

(5) Celui-ci est agrafé sur un support rigide (film radiographique) et plongé dans un flacon contenant du formol pendant 48 à 72 heures afin d'assurer la fixation du tissu.

L'étape (2) ainsi que la localisation des bourrelets de tissus adipeux bruns interscapulaires sont indiquées sur la figure 9.

Figure 9 : Étape (2) et localisation des bourrelets de tissus adipeux bruns interscapulaires
(Source : Unité d'anatomie pathologique ENVA)



Incision cutanée circulaire sur un plan coronal en région abdominale caudale, souris placée en décubitus ventral



(1) Position des bourrelets de tissu adipeux brun interscapulaires chez une souris placée en décubitus ventral

1.3.1.1.3 Les ovaires

Les différentes étapes du prélèvement des ovaires sont les suivantes :

- (1) Après avoir prélevé les mamelles M4 et le tissu interscapulaire, on replace l'animal en décubitus dorsal sur une plaque de liège à l'aide d'aiguilles.
- (2) L'abdomen est ouvert le long de la ligne blanche.
- (3) On localise l'utérus et les cornes utérines et on prélève les ovaires.
- (4) Ceux-ci sont fixés dans le formol pendant 48 à 72 heures.

1.3.1.2 La réalisation des lames histologiques

La réalisation des lames histologique passe par plusieurs étapes qui sont détaillées ci-dessous. Celles-ci ont été réalisées à l'ENVA dans le service d'anatomie pathologique.

1.3.1.2.1 La recoupe des tissus

1.3.1.2.1.1 Le tissu interscapulaire

Une fois la fixation dans le formol effectuée, le traitement du tissu interscapulaire commence. Pour cela le prélèvement est séparé en deux échantillons suivant l'axe de symétrie de la ligne médiane. Les deux échantillons sont inclus en paraffine, un pour l'étude histologique de cette région et l'autre pour la réalisation d'immunomarquages.

Pour l'inclusion en paraffine, l'échantillon est d'abord recoupé à l'aide d'un scalpel sur une plaque de liège et disposé dans une cassette. Il est ensuite déposé dans un automate à inclusion pour un cycle de 12 heures environ, puis enrobé de paraffine.

1.3.1.2.1.2 Le tissu mammaire abdominal caudal

Une fois la fixation dans le formol effectuée, le traitement du tissu mammaire M4 commence. Pour cela le prélèvement est séparé en deux échantillons suivant l'axe de symétrie de la ligne médiane. Un des échantillons est réservé pour la réalisation d'immunomarquages et le second sera inclus en paraffine pour l'étude histologique de cette région.

1.3.1.2.1.3 Les ovaires

Les deux ovaires sont débarrassés de l'excédent de tissu adipeux qui les entoure. Les deux ovaires seront inclus en paraffine.

1.3.1.2.2 L'inclusion en paraffine

L'étape de l'inclusion en paraffine, suivie d'une étape d'enrobage, a pour but d'imprégner le tissu par une masse plastique qui le pénètre intimement jusque dans la profondeur des éléments cellulaires les plus délicats. Des blocs facilement maniables sont ainsi obtenus, renfermant les tissus, même très petits, parfaitement orientés pour être coupés dans un sens déterminé.

L'inclusion en paraffine se fait par un automate. Celui-ci comporte une série de bains contenant des solutions dans lesquelles seront successivement immergées les cassettes. L'appareil normalement utilisé à l'ENVA comporte un cycle de 14 solutions différentes sur une durée de 12 heures environ.

Les différentes étapes de l'inclusion par l'automate sont :

- (1) Passage dans le formol qui a pour but de parfaire la fixation. Les cassettes sont plongées dans deux bains successifs de formol 4%.
- (2) Déshydratation : lorsque la paraffine est l'agent d'inclusion, les tissus doivent préalablement être débarrassés de toute leur eau. La déshydratation se fait en plongeant les cassettes dans cinq bains d'alcool éthylique à 100°.

- (3) Agent éclaircissant qui a pour but de remplacer l'alcool contenu dans les tissus par un solvant miscible à la paraffine et de rendre les tissus plus transparents. Il doit être miscible au déshydratant et à l'agent d'inclusion. Trois solutions successives de toluène (solvant organique) sont utilisées.
- (4) Paraffine : le but de cette partie du processus est l'obtention d'une imprégnation aussi complète que possible des tissus. Ainsi, au moment du coulage du bloc, le refroidissement des tissus inclus transformera les tissus, hétérogènes du point de vue de la consistance et de l'élasticité, en une masse homogène dont les différentes parties se comportent de façon sensiblement égale lors de la confection des coupes. La température de fusion de la paraffine explique la nécessité d'exécuter à chaud cette partie des opérations (environ 58°C).

Le tableau 5 résume les différentes étapes présentées précédemment.

Tableau 5 : Chronologie des différents bains nécessaires à la constitution des lames histologiques

	PRODUITS	TEMPS	TEMPÉRATURES
1	Formol 4%	15 min	35°C
2	Formol 4%	2 h 30 min	35°C
3	Alcool 100°	15 min	35°C
4	Alcool 100°	15 min	35°C
5	Alcool 100°	45 min	35°C
6	Alcool 100°	1 h	35°C
7	Alcool 100°	1 h 30 min	35°C
8	Toluène	15 min	35°C
9	Toluène	30 min	35°C
10	Toluène	45 min	35°C
11	Paraffine	15 min	58°C
12	Paraffine	30 min	58°C
13	Paraffine	1 h 30 min	58°C
14	Paraffine	1 h 30 min	59°C
Cycle de lavage	Alcool 100° + Toluène	45 min	65°C

1.3.1.2.3 L'enrobage

Cette étape est réalisée au moyen d'un appareil d'enrobage, elle a pour but d'orienter convenablement les tissus dans un bloc de paraffine. Le tissu interscapulaire est orienté sur la tranche, ainsi que le tissu mammaire M4. Les ovaires sont enrobés sans orientation particulière.

Les différents tissus sont inclus dans des moules en acier inoxydable de taille appropriée à chaque échantillon. Le fond du moule est rempli avec de la paraffine fondue. L'échantillon est saisi avec une pince et placé dans le moule selon la position recherchée.

Le fond de chaque moule est ensuite refroidi de manière à fixer les tissus dans l'orientation voulue et une cassette est placée par-dessus. Le moule est rempli entièrement de paraffine liquide, puis déposé sur une plaque froide à -5°C. Après quelques minutes, le bloc est démoulé et est prêt à être coupé.

1.3.1.2.4 La réalisation des coupes

La confection des coupes doit permettre de rendre les tissus propres à l'étude microscopique, en les réduisant en tranches assez minces pour être examinées par

transparence. La confection des coupes pour cette thèse est faite au moyen d'un microtome à rotation manuelle muni d'un réglage de l'épaisseur des coupes.

1.3.1.2.4.1 Le tissu interscapulaire

Le bloc de paraffine est dégrossi jusqu'au tissu, puis une première coupe de 500 µm est effectuée. Le bloc est ensuite dégrossi de 500 µm puis une seconde coupe est effectuée. Cette manipulation est répétée jusqu'à épuisement du bloc. On obtient ainsi des coupes semi-sérialisées distantes d'un intervalle de 500 µm.

1.3.1.2.4.2 Le tissu mammaire abdominal caudal

Le bloc de paraffine est dégrossi jusqu'au tissu, puis une première coupe de 500 µm est effectuée. Le bloc est ensuite dégrossi de 500 µm puis une seconde coupe est effectuée. Cette manipulation est répétée jusqu'à épuisement du bloc.

1.3.1.2.4.3 Les ovaires

Le bloc de paraffine est dégrossi jusqu'au tissu, puis cinq coupes de 4 µm sont réalisées.

1.3.1.2.5 La coloration des lames

La coloration de routine à l'hématoxyline-éosine-safran (H.E.S) permet de visualiser de façon satisfaisante les composants cellulaires des différents tissus prélevés.

La première étape de la coloration H.E.S repose sur la fixation de l'hématoxyline sur le noyau des cellules (principalement). Cette substance est chargée négativement, et n'a, à la base, aucune affinité pour les acides nucléiques présents dans les noyaux cellulaires. Il est donc nécessaire de combiner l'hématoxyline avec un « mordant », c'est-à-dire un sel métallique qui va chélater le colorant et lui conférer une importante charge positive. Ainsi, le complexe colorant-ion métallique, ou hémalum, chargé positivement, va se lier avec la chromatine nucléaire, chargée négativement.

On dit aussi que l'hémalum est une substance basique, qui colore les tissus basophiles. Elle confère une teinte bleue à violette aux composants cellulaires acides comme la chromatine ou certaines sécrétions.

La deuxième étape de la coloration H.E.S consiste à appliquer aux lames le colorant-neutralisant, l'éosine qui va colorer dans différentes nuances les fibres tissulaires, les cytoplasmes et nombre de produits extracellulaire. L'éosine est une substance chargée négativement, qui va se combiner aux tissus acidophiles (=éosinophiles) et leur donner une teinte rose à rouge.

La dernière étape est la coloration par le safran, qui se lie et donne une teinte jaune orangée au collagène du tissu conjonctif.

La méthode de coloration des lames est réalisée de façon automatique à l'aide d'un appareil composé de bacs fixes où les lames rangées dans un panier sont amenées et agitées pendant des temps variables. Chaque station est programmée individuellement selon le temps pendant lequel les lames doivent rester dans la solution.

Avant d'être colorées, les lames sont déparaffinées à l'aide de toluène (deux bains successifs de 15 minutes et un bain de 10 minutes). Il faut débarrasser les coupes de toute

trace de paraffine pour permettre ensuite aux différents réactifs, utilisés en phase aqueuse, d'agir de façon convenable.

Les coupes sont ensuite réhydratées par passage des lames dans des bains d'alcool éthylique de titres décroissants (100°, 95°). Ceci a pour but d'augmenter graduellement la quantité d'eau dans les tissus, tout en évitant le gonflement excessif des cellules. Une fois les lames passées dans quatre bains d'eau déminéralisée, elles peuvent être colorées.

Les lames sont plongées dans l'hématoxyline pendant deux minutes, puis rincées rapidement dans quatre bains d'eau du robinet pour enlever l'excès de colorant, ainsi que dans deux bains d'eau distillée pendant une minute. Elles sont ensuite décolorées par une solution d'acide (HCl) qui enlève le colorant du cytoplasme, tout en le maintenant dans les noyaux. Le bleuissement de l'hématoxyline est provoqué par un séjour des lames dans l'eau distillée. Les lames sont ensuite placées dans un bain de carbonate de lithium de façon à préparer la contre coloration à l'éosine.

La contre coloration à l'éosine a pour but de colorer les composants de la cellule qui n'ont pas pris l'hématoxyline. Le bain dure une minute. L'excès de colorant est ensuite enlevé en faisant passer les lames dans quatre bains d'eau, puis dans un bain d'alcool 100°.

La dernière étape de la coloration est un bain de safran de 7 minutes. Il faut ensuite déshydrater les tissus par deux bains d'alcool 100° et deux bains de toluène pour pouvoir réaliser une préparation permanente : lamelle collée avec un milieu de montage. De plus une déshydratation non complète entraînerait une décoloration des tissus.

La technique de coloration H.E.S est précisée dans le tableau 6:

Tableau 6 : Chronologie des différents bains nécessaires à la coloration des lames histologiques

	PRODUITS	TEMPS	TEMPÉRATURES
1	Toluène	15 min	Ambiante
2	Toluène	15 min	Ambiante
3	Toluène	10 min	Ambiante
4	Alcool 100°	3 min	Ambiante
5	Alcool 95°	2 min	Ambiante
6	Eau	4 fois	Ambiante
7	Hemalun	2 min	Ambiante
8	Eau	4 fois	Ambiante
9	Eau distillée	1 min	Ambiante
10	Eau distillée	1 min	Ambiante
11	HCl	Passage	Ambiante
12	Eau distillée	1 min 30 s	Ambiante
13	Carbonate de lithium	3 min	Ambiante
14	Eau	4 fois	Ambiante
15	Eosine	1 min	Ambiante
16	Eau	4 fois	Ambiante
17	Eau distillée	1 min 30 s	Ambiante
18	Alcool 100°	30 s	Ambiante
19	Safran	7 min	Ambiante
20	Alcool 100°	Passage	Ambiante
21	Alcool 100°	Passage	Ambiante
22	Toluène	Passage	Ambiante
23	Toluène	Passage	Ambiante

1.3.2 La technique de prélèvement « Whole Mount »

Cette technique de prélèvement permet d'observer sur un prélèvement l'arborisation complète du tissu mammaire. En effet, c'est une préparation qui permet d'avoir une vision d'ensemble d'un organe (RASMUSSEN *et al.*, 2000).

Cette technique a été mise en œuvre sur les tissus interscapulaire et mammaire de la région abdominale des souris du lot 1.

1.3.2.1 La méthode de prélèvement

1.3.2.1.1 Le tissu mammaire abdominal caudal

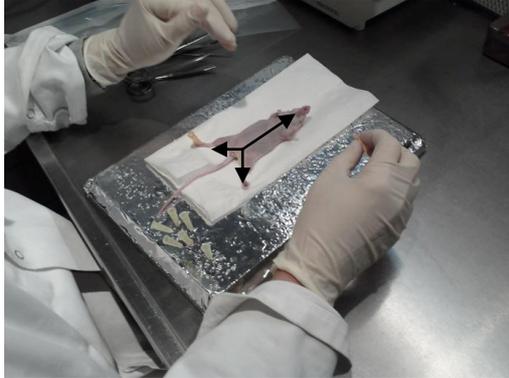
Les différentes étapes du prélèvement du tissu mammaire M4 sont les suivantes :

- (1) Après le sacrifice de la souris, celle-ci est placée et fixée en décubitus dorsal sur une plaque de liège à l'aide d'aiguilles.
- (2) Une ponction de la peau est réalisée entre les deux mamelles de la région inguinale, puis on incise délicatement la peau et le tissu sous cutané de la région ventrale caudo-crânialement jusqu'aux membres thoraciques à l'aide de ciseaux, le long d'une sonde cannelée.
- (3) Une incision en Y inversé est réalisée en région des membres pelviens. Celle-ci est indiquée sur la photographie 3 ci-dessous.
- (4) La glande mammaire d'intérêt, c'est-à-dire la mamelle M4 est localisée.
- (5) La glande mammaire M4 est séparée de la peau de l'extérieur vers l'intérieur.
- (6) Une fois récoltée, la glande mammaire est étendue sur une lame de verre, et le prélèvement est laissé sécher à l'air libre pendant 20 minutes, la glande mammaire devient alors opaque.

L'ensemble de ces étapes est répété pour la glande mammaire controlatérale.

Les étapes (3), (4) et (6) sont indiquées sur la figure 10.

Figure 10 : Chronologie des prélèvements du lot 3
(Source : FERRIER Edwige)



Incision en Y inversé



Localisation de la glande mammaire M4



Prélèvement étendu sur une lame de verre

1.3.2.1.2 Le tissu interscapulaire

Les différentes étapes du prélèvement du tissu interscapulaire sont les suivantes :

- (1) Après avoir prélevé les glandes mammaires M4, la souris est placée et fixée en décubitus ventral sur une plaque de liège à l'aide d'aiguilles.
- (2) On réalise une incision cutanée circulaire sur un plan coronal en région abdominale caudale.
- (3) On sépare délicatement la peau et le tissu sous cutané des plans profonds.
- (4) Dans la région des bourrelets de tissu adipeux brun interscapulaires, on sépare délicatement les bourrelets de la peau et on les étend sur une lame de verre. Le prélèvement est laissé sécher à l'air libre pendant 20 minutes.

1.3.2.2 La réalisation des lames histologiques

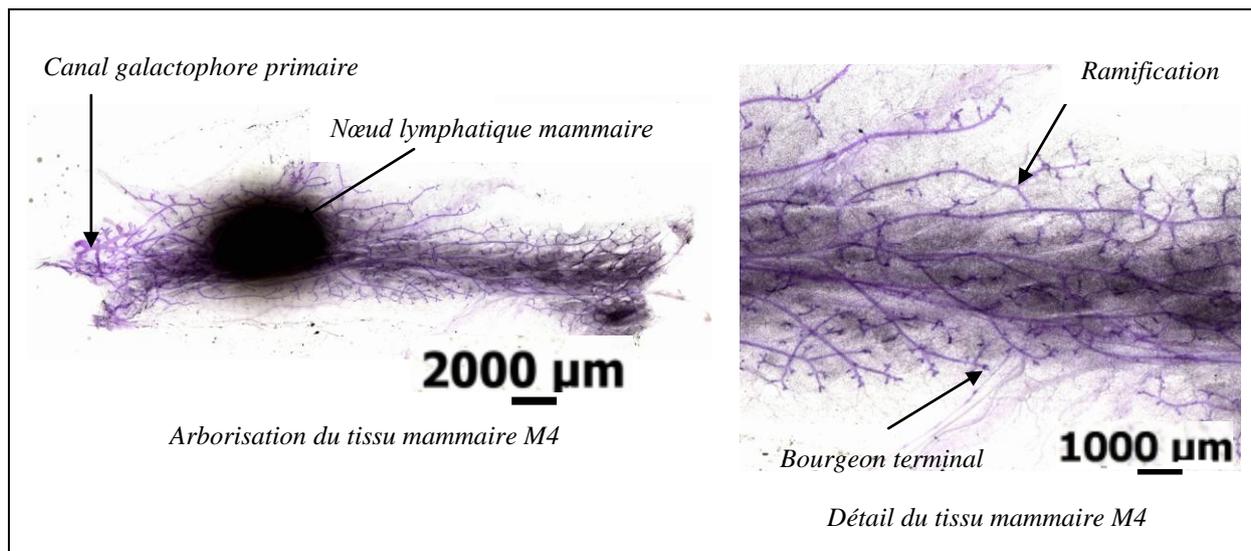
1.3.2.2.1 Le traitement des prélèvements

Après avoir laissé sécher les prélèvements pendant 20 minutes à l'air libre, les différentes étapes qui suivent sont :

- (1) Fixation dans un bain de méthacarne pendant toute une nuit. Le méthacarne est un mélange de méthanol, de chloroforme et d'acide acétique à dilution 6 :3 :1.
- (2) Rinçage dans un bain d'éthanol à 70° pendant 15 minutes puis dans un bain d'eau distillée pendant 5 minutes.
- (3) Coloration dans un bain de carmin pendant toute une nuit (le prélèvement peut rester plusieurs jours dans ce colorant). Le carmin est préparé de la façon suivante : 1 gramme de carmin SIGMA C1022 et 2.5 grammes de sulfate d'aluminium et de potassium SIGMA A7167 dans 500 ml d'eau distillée. Ce mélange est ensuite amené à ébullition et maintenu tel quel pendant 20 minutes. Le volume est ensuite ajusté à 500 ml et le mélange est filtré.
- (4) Rinçage du prélèvement à l'eau distillée.
- (5) Déshydratation par passage successifs dans 3 bains d'alcool éthylique à 70°, 96.5°, 100°, chaque bain ayant une durée de 15 minutes.
- (6) Passage dans deux bains successifs de toluène pendant 45 minutes chaque, afin d'éclaircir le tissu adipeux. Le dernier bain peut être prolongé pendant toute une nuit, l'éclaircissement n'en sera que meilleur.

À la suite de ces étapes, l'arborisation du tissu mammaire est visualisable et une photographie à l'aide d'un microscope muni d'une caméra numérique peut être réalisée afin de visualiser l'arborisation du tissu mammaire. Un détail de l'image permet de noter la présence de bourgeons terminaux. La figure 11 montre l'arborisation du tissu mammaire M4 ainsi qu'un détail de ce même tissu.

Figure 11 : Arborisation du tissu mammaire M4 d'une souris femelle et détail de ce même tissu (Source : Unité d'anatomie pathologique ENVA)



- (7) Décollement de l'échantillon de la lame à l'aide d'un scalpel ou d'une pince en prenant garde à ne pas sectionner le tissu. Celui-ci est placé dans un tube en polypropylène contenant du toluène pendant 2 heures.
- (8) Imprégnation dans un premier bain de paraffine à 60° pendant 1 heure, puis dans un second pendant toute une nuit.

L'ensemble des étapes décrites précédemment est résumé dans le tableau 7:

Tableau 7 : Chronologie des différents bains nécessaires au protocole « Whole Mount »

	PRODUITS	TEMPS	TEMPÉRATURES
1	Méthacarne	OVN	Ambiante
2	Ethanol 70°	15 min	Ambiante
3	Eau distillée	5 min	Ambiante
4	Carmin	OVN	Ambiante
5	Eau distillée	Passage	Ambiante
6	Ethanol 70°	15 min	Ambiante
7	Ethanol 96.5°	15 min	Ambiante
8	Ethanol 100°	15 min	Ambiante
9	Toluène	45 min	Ambiante
10	Toluène	45 min	Ambiante
11	Décollement de l'échantillon de son support		
12	Toluène	2 h	Ambiante
13	Paraffine	1 h	60°C
14	Paraffine	OVN	60°

OVN : Over the night

1.3.2.2.2 L'enrobage

Les tissus sont orientés à plat. Cette étape est identique à celle décrite dans la partie II.1.3.1.2.3.

1.3.2.2.3 La réalisation des coupes

Le bloc de paraffine est dégrossi jusqu'au tissu, puis est placé sur de la glace fondue de façon à faciliter la coupe au microtome en rendant l'échantillon plus tendre. En effet, le tissu renferme un nœud lymphatique qui est une structure friable.

Une première coupe est effectuée. Le bloc est ensuite dégrossi de 100 µm puis une seconde coupe est effectuée. Cette manipulation est répétée jusqu'à épuisement du bloc.

1.3.2.2.4 La coloration des lames

Cette étape est identique à celle décrite dans la partie 1.3.1.2.5.

1.4 Lecture des lames histologiques

1.4.1 Sélection des lames

Les lames obtenues sont réparties en deux catégories : incluses et non incluses dans l'étude.

Les lames exclues de l'étude sont celles pour lesquelles :

- Le tissu est détérioré.
- Le bourrelet adipeux brun, qui signe la localisation anatomique visée, est absent.

Les lames incluses dans l'étude sont celles pour lesquelles :

- Du tissu mammaire est présent.
- Il y a absence de tissu mammaire alors que la coupe semi-sériee visée est comprise dans une zone où il devrait y en avoir.

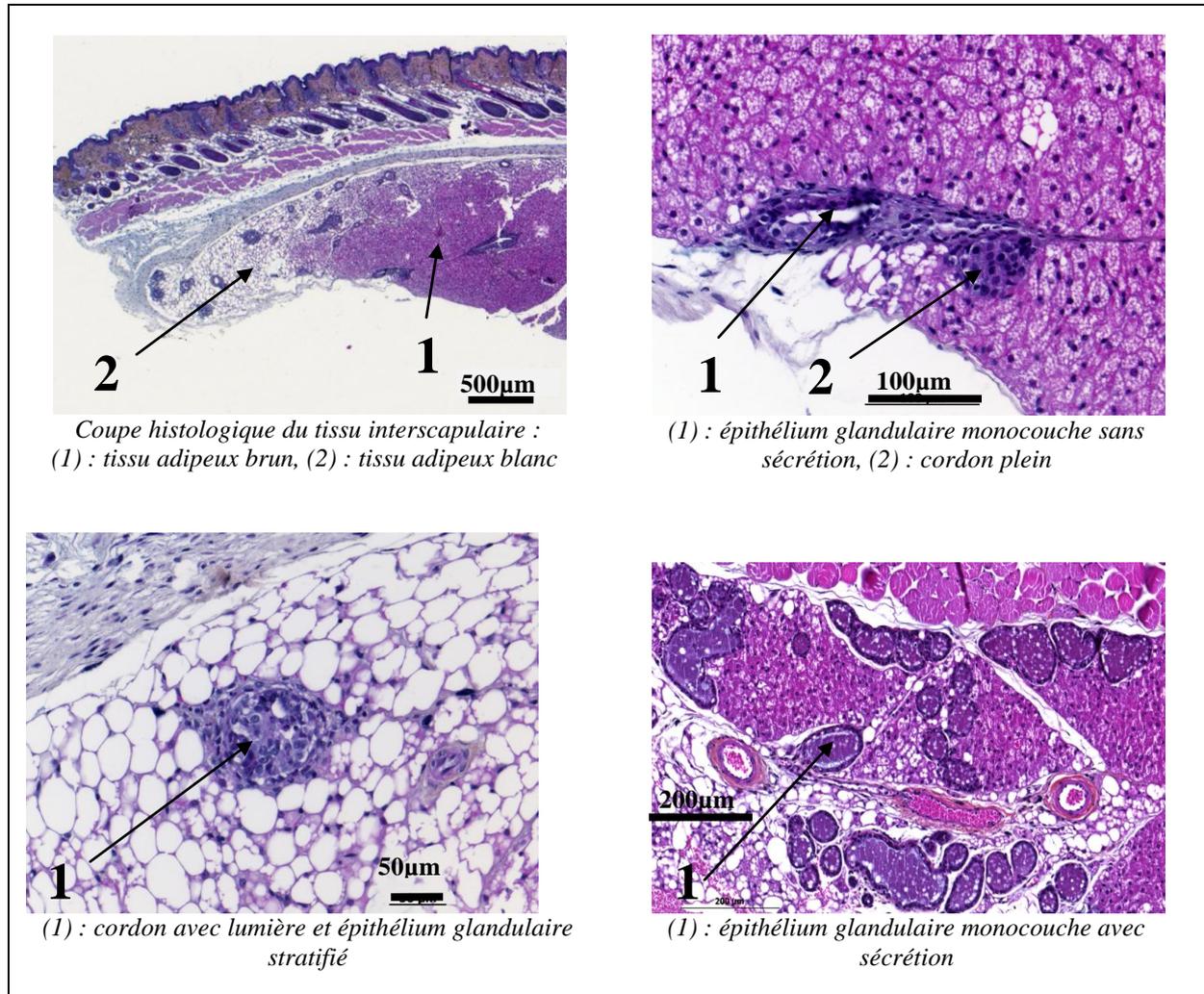
1.4.2 Lecture des lames de tissu mammaire de la région abdominale et de tissu interscapulaire

L'observation des lames histologiques obtenues par le protocole classique et le protocole « Whole Mount » permet une analyse de l'ensemble des structures mammaires visibles microscopiquement. Le protocole « Whole Mount » permet aussi de réaliser une analyse macroscopique de l'étendue du tissu mammaire avant la réalisation des coupes et de pouvoir noter la présence de bourgeons mammaires terminaux.

Les structures mammaires qui nous intéressent au cours de cette étude sont la présence de cordons pleins, de cordons avec lumière et épithélium glandulaire stratifié, d'épithélium glandulaire monocouche sans sécrétion et d'épithélium glandulaire monocouche avec sécrétion.

La figure 12 présente l'ensemble des structures mammaires visualisables au sein d'un tissu interscapulaire chez une souris femelle.

Figure 12 : Coupe histologique au sein du tissu interscapulaire murin femelle et détails de ce même tissu
(Source : Unité d'anatomie pathologique ENVA)



On appelle s le nombre de souris à chaque étape de l'étude. Pour chaque souris, il existe un nombre défini de coupes histologiques. Toutes les lames histologiques n'étant pas interprétables, on appelle n le numéro de coupe à partir duquel on commence à observer des structures mammaires et p le numéro de coupe à partir duquel on n'en observe plus. Seules les lames contenues dans cet intervalle, bornes incluses, sont lues. Les structures mammaires définies précédemment sont comptabilisées pour chaque souris du protocole de prélèvement, les résultats sont visibles en annexe de cette étude, pour chaque étape du cycle sexuel et pour chaque étape de l'étude sur la supplémentation puis la privation en œstrogènes.

À chaque étape, une moyenne des résultats obtenus est effectuée. Cette valeur correspond à la variable IDTM (Index de Développement du Tissu Mammaire).

Dans le cas où une lame non interprétable est incluse dans l'intervalle d'étude, une extrapolation est alors réalisée en appliquant la formule suivante :

$$\frac{\sum_{i=n}^p \text{nombre de structures}}{\text{nombre de lames lues}}$$

De l'IDTM, on détermine la proportion (%) des différentes structures mammaires visibles à chaque étape du protocole.

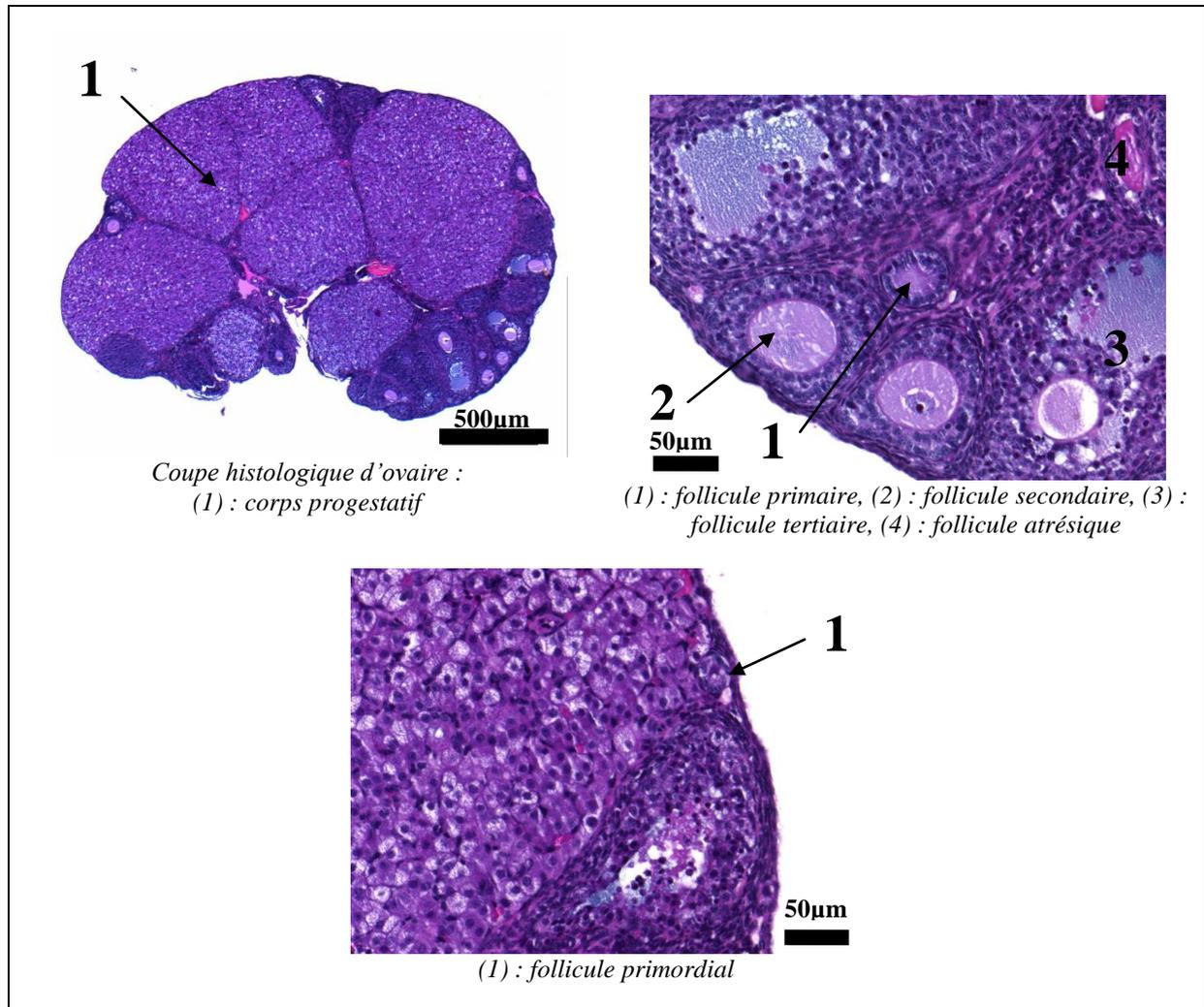
L'étendue du tissu mammaire en région interscapulaire au sein du tissu adipeux brun et du tissu adipeux blanc a aussi été analysée. Le nombre de structures mammaires visibles au sein du tissu adipeux blanc et du tissu adipeux brun et aux marges du tissu adipeux brun et du tissu adipeux blanc a été comptabilisé à chaque étape de l'étude. À partir des résultats obtenus on a déterminé une proportion (%) de l'étendue du tissu mammaire au sein des différents types de tissus adipeux, à chaque étape de l'étude.

1.4.3 Lecture des lames des ovaires

Les structures ovariennes qui nous intéressent au cours de cette étude sont la présence de follicules primordiaux, primaires, secondaires, tertiaires, atrésiques et de corps progestatifs.

La figure 13 présente l'ensemble des structures ovariennes observables chez une souris femelle.

Figure 13 : Coupe histologique au sein du tissu ovarien murin et détails de ce même tissu
(Source : Unité d'anatomie pathologique ENVA)



Les structures ovariennes ne seront pas dénombrées. Seules leur présence ou leur absence seront notées.

2. Résultats

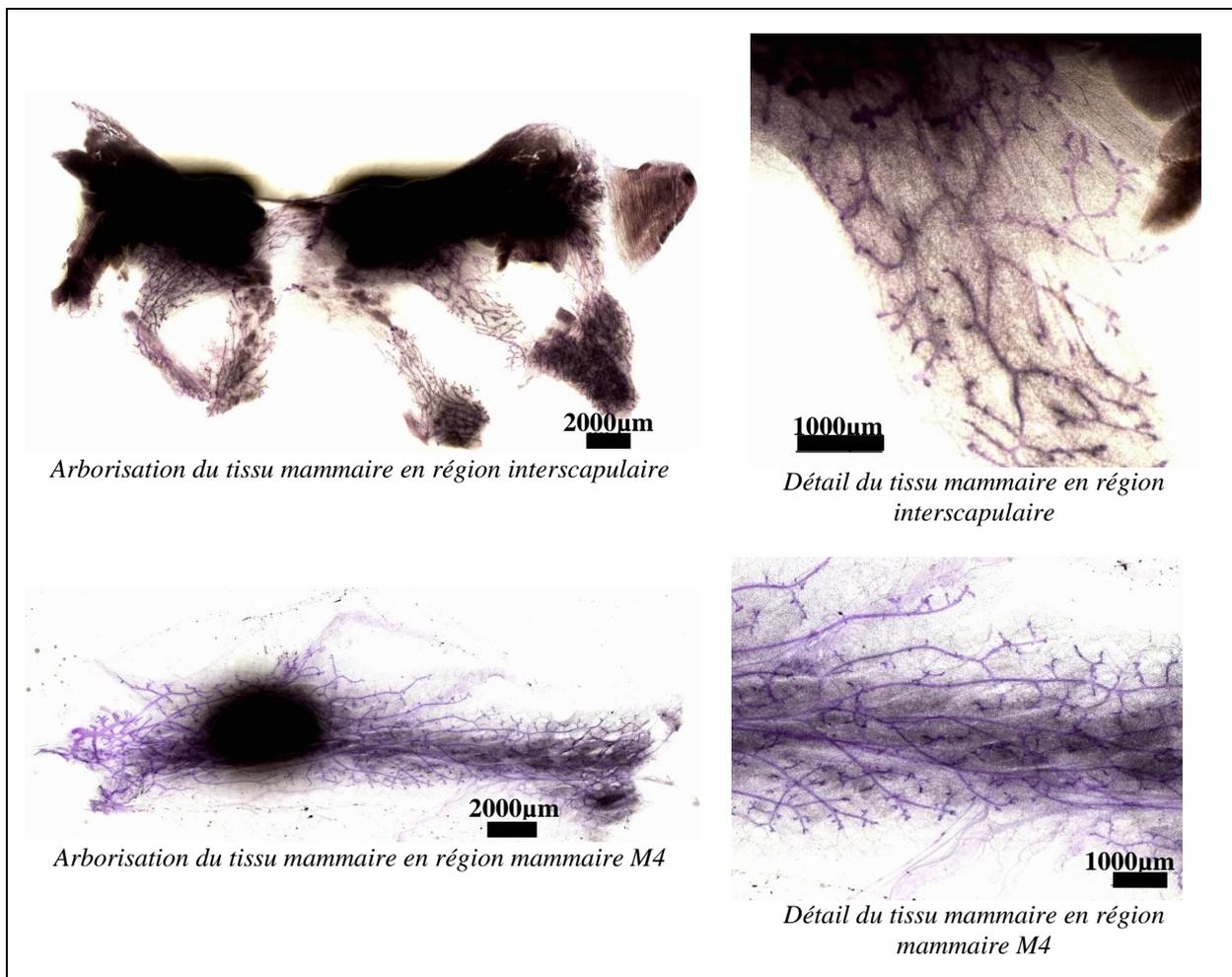
Les valeurs fournies dans les tableaux de résultats sont les IDTM. Le détail du dénombrement pour chaque souris du protocole est fourni en annexe.

2.1 En fonction du cycle sexuel (lot 1)

2.1.1 En præstrus

La figure 14 montre l'arborisation du tissu mammaire en région interscapulaire et en région mammaire M4, à l'étape præstrus du cycle sexuel de la souris.

Figure 14 : Arborisation du tissu mammaire en région interscapulaire et en région mammaire M4, à l'étape præstrus du cycle sexuel de la souris
(Source : Unité d'anatomie pathologique ENVA)



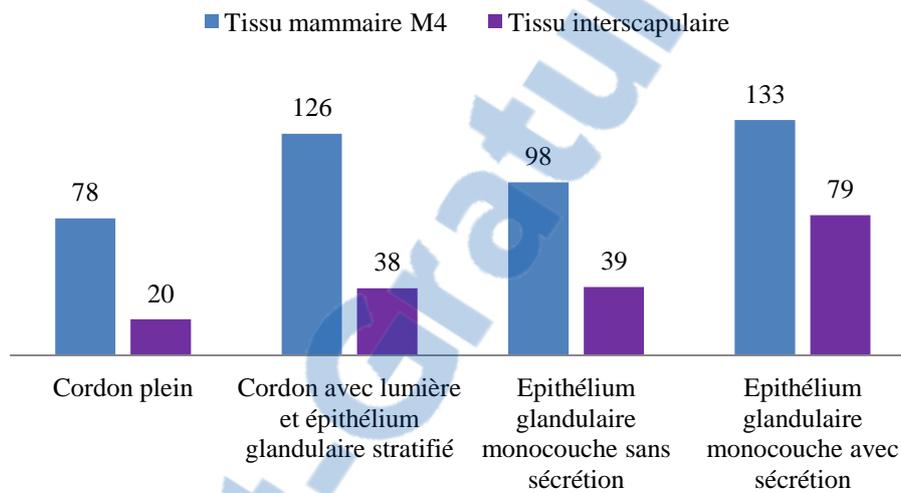
En région interscapulaire, le tissu mammaire thoracique crânial est dense et envahit la région des bourrelets adipeux bruns. Des bourgeons terminaux sont observables.

En région mammaire M4, l'arborisation de la glande mammaire est dense. Des bourgeons terminaux sont observables.

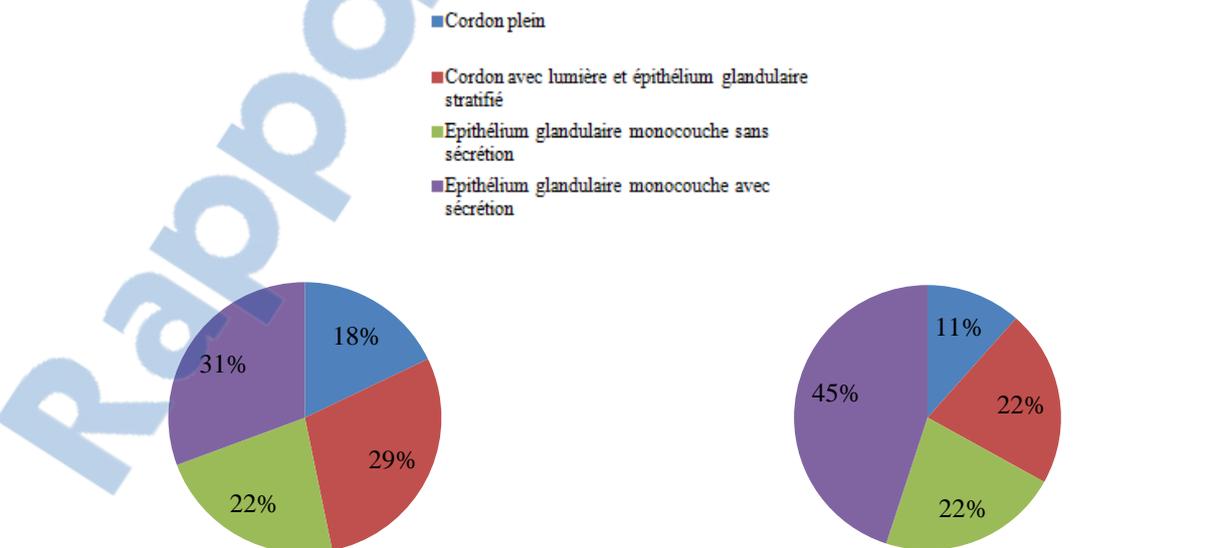
La figure 15 indique les résultats du dénombrement des structures mammaires en région interscapulaire et en région mammaire M4, à l'étape prœstrus du cycle sexuel.

Figure 15 : IDTM et répartition des différentes structures mammaires visibles microscopiquement au sein du tissu interscapulaire et du tissu mammaire M4, à l'étape præstrus du cycle sexuel de la souris

IDTM s=3	Cordon plein	Cordon avec lumière et épithélium glandulaire stratifié	Epithélium glandulaire monocouche sans sécrétion	Epithélium glandulaire monocouche avec sécrétion	Total
Tissu mammaire M4	78 (18%)	126 (29%)	98 (22%)	133 (31%)	435 (100%)
Tissu interscapulaire	20 (11%)	38 (22%)	39 (22%)	79 (45%)	176 (100%)



IDTM des différentes structures mammaires visibles microscopiquement au sein du tissu interscapulaire et du tissu mammaire M4, à l'étape præstrus du cycle sexuel



Répartition des structures mammaires au sein du tissu mammaire M4, à l'étape præstrus du cycle sexuel

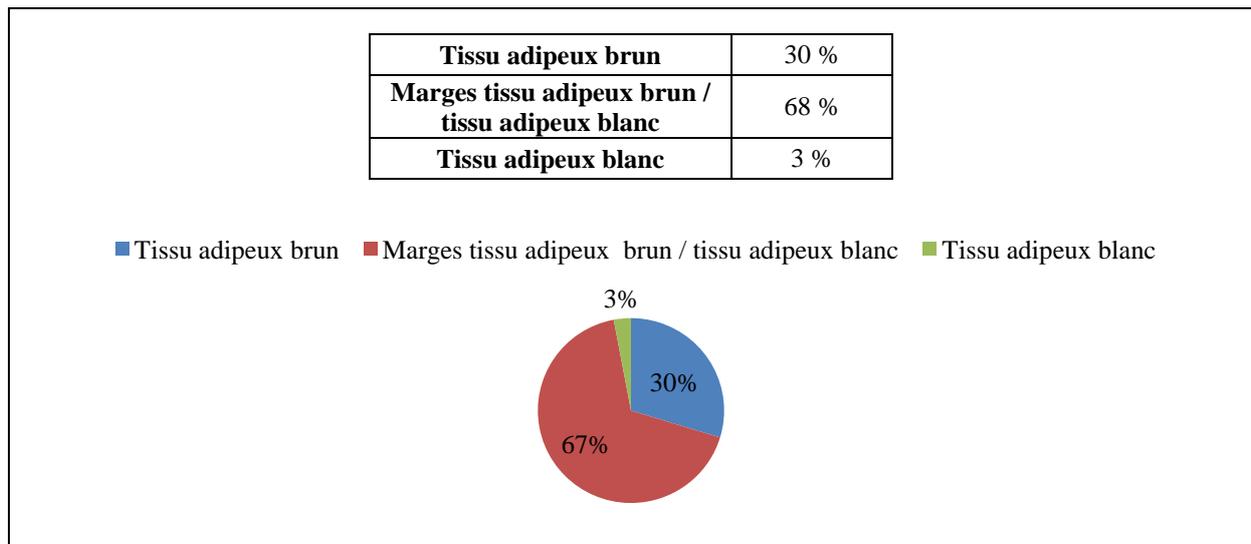
Répartition des structures mammaires au sein du tissu interscapulaire, à l'étape præstrus du cycle sexuel

Compte tenu de l'effectif du lot d'animaux (trois souris), il n'apparaît pas de différences dans la répartition des différentes structures mammaires entre la région mammaire M4 et la région interscapulaire.

Dans les deux régions d'intérêt, ce sont les structures épithéliales glandulaires monocouches avec sécrétion qui sont majoritairement représentées

La figure 16 indique la répartition du tissu mammaire au sein des différents types de tissus adipeux en région interscapulaire, à l'étape proœstrus du cycle sexuel.

Figure 16 : Répartition du tissu mammaire au sein des différents types de tissus adipeux en région interscapulaires, à l'étape proœstrus du cycle sexuel de la souris



30% des structures mammaires observées en région interscapulaire sont situées au sein du tissu adipeux brun et 67% sont aux marges du tissu adipeux brun et du tissu adipeux blanc.

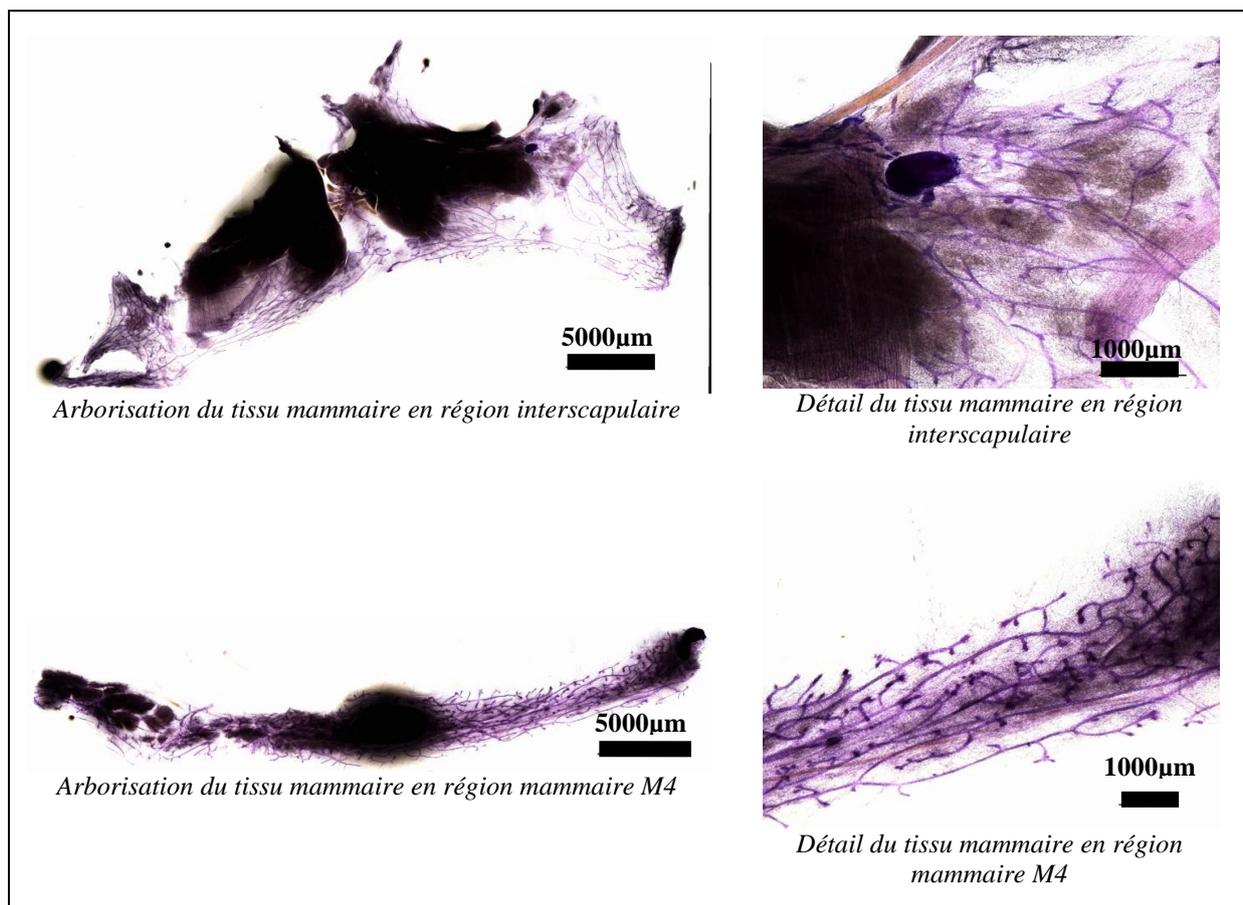
En résumé, au stade proœstrus :

- Le tissu mammaire est dense et se développe.
- Il n'apparaît pas de différences dans la répartition des différentes structures mammaires entre les deux régions d'intérêt et ce sont les structures épithéliales glandulaires monocouches avec sécrétion qui sont majoritairement représentées.
- Des structures mammaires sont présentes au sein du tissu adipeux brun interscapulaire.
- Au sein des coupes d'ovaires, on observe à la fois des follicules primordiaux, primaires, secondaires, tertiaires, atrophiques et des corps progestatifs.

2.1.2 En œstrus

La figure 17 montre l'arborisation du tissu mammaire en région interscapulaire et en région mammaire M4, à l'étape œstrus du cycle sexuel de la souris.

*Figure 17 : Arborisation du tissu mammaire en région interscapulaire et en région mammaire M4, à l'étape œstrus du cycle sexuel de la souris
(Source : Unité d'anatomie pathologique ENVA)*



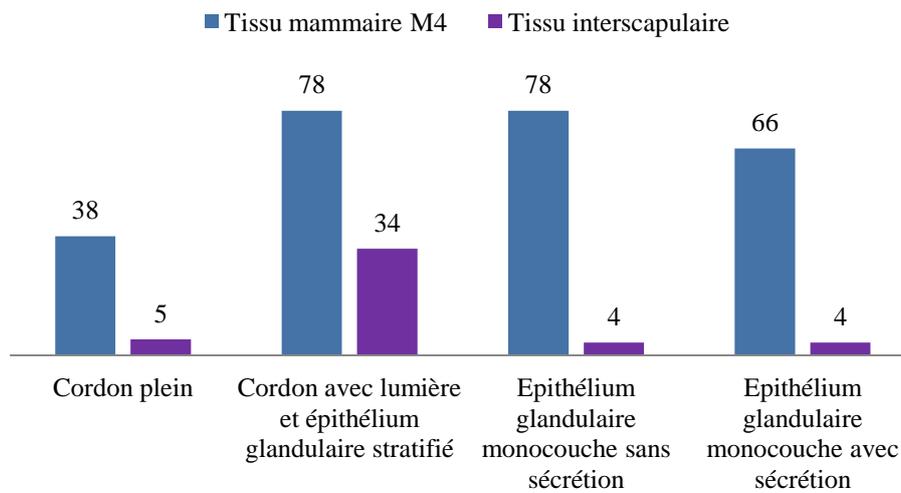
En région interscapulaire, le tissu mammaire thoracique crânial envahit la région des bourrelets adipeux bruns. Des bourgeons terminaux sont observables.

En région mammaire M4, l'arborisation de la glande mammaire est dense. Des bourgeons terminaux sont observables.

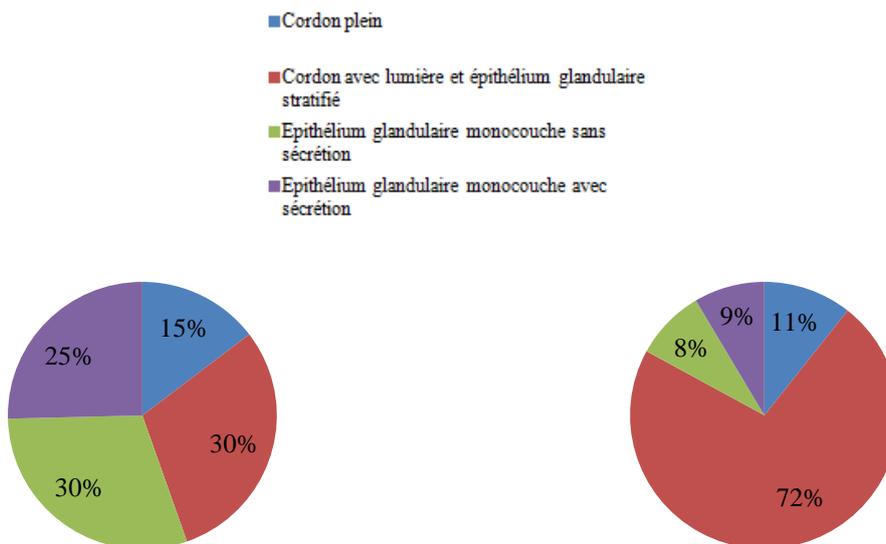
La figure 18 indique les résultats du dénombrement des structures mammaires en région interscapulaire et en région mammaire M4, à l'étape œstrus du cycle sexuel.

Figure 18 : IDTM et répartition des différentes structures mammaires visibles microscopiquement au sein du tissu interscapulaire et du tissu mammaire M4, à l'étape œstrus du cycle sexuel de la souris

IDTM s=1	Cordon plein	Cordon avec lumière et épithélium glandulaire stratifié	Epithélium glandulaire monocouche sans sécrétion	Epithélium glandulaire monocouche avec sécrétion	Total
Tissu mammaire M4	38 (15 %)	78 (30%)	78 (30%)	66 (25%)	260 (100%)
Tissu interscapulaire	5 (11%)	34 (72%)	4 (9%)	4 (9%)	47 (100%)



IDTM des différentes structures mammaires visibles microscopiquement au sein du tissu interscapulaire et du tissu mammaire M4, à l'étape œstrus du cycle sexuel



Répartition des structures mammaires au sein du tissu mammaire M4, à l'étape œstrus du cycle sexuel

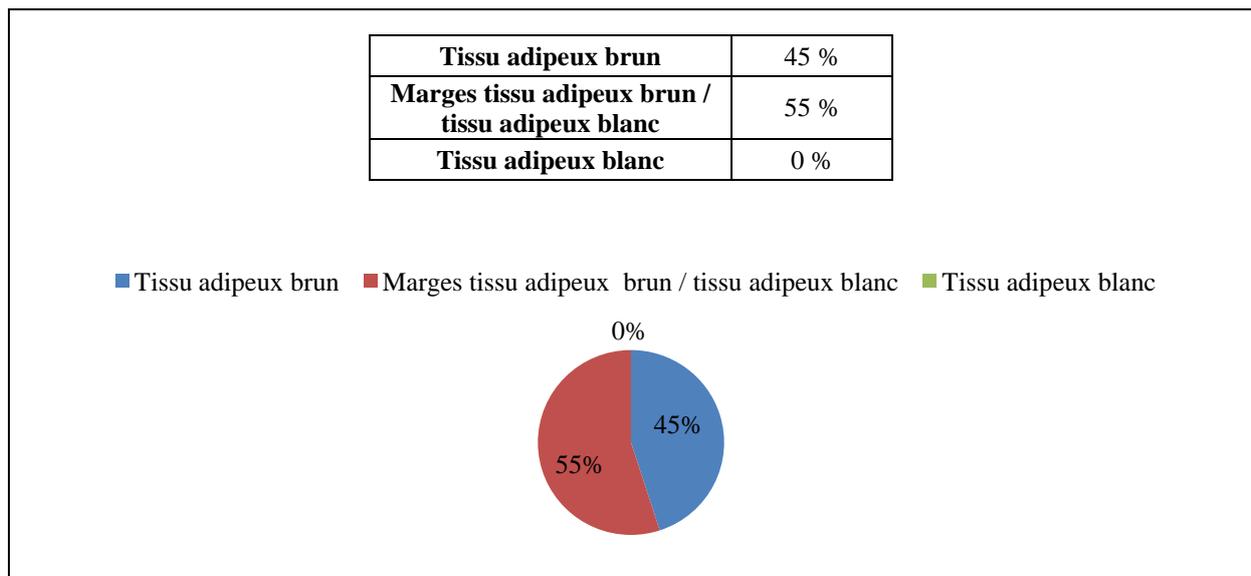
Répartition des structures mammaires au sein du tissu interscapulaire, à l'étape œstrus du cycle sexuel

Compte tenu de l'effectif du lot d'animaux (une souris), il n'apparaît pas de différences entre la région mammaire M4 et la région interscapulaire.

Dans les deux régions d'intérêt, une proportion élevée en structures épithéliales glandulaires monocouche avec sécrétion est observable.

La figure 19 indique la répartition du tissu mammaire au sein des différents types de tissus adipeux en région interscapulaire, à l'étape œstrus du cycle sexuel.

Figure 19 : Répartition du tissu mammaire au sein des différents types de tissus adipeux en région interscapulaires, à l'étape œstrus du cycle sexuel de la souris



45% des structures mammaires observées en région interscapulaire sont situées au sein du tissu adipeux brun et 55% sont aux marges du tissu adipeux brun et du tissu adipeux blanc.

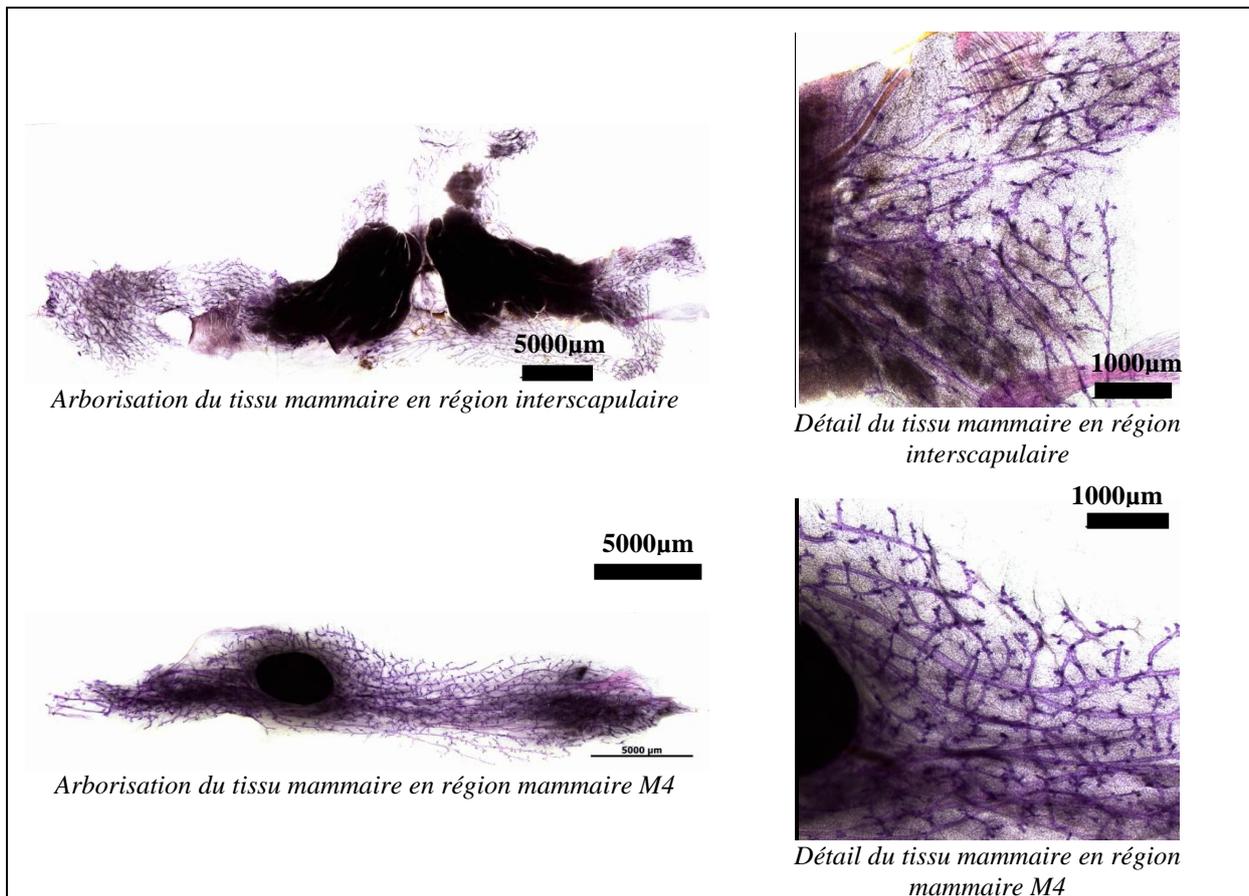
En résumé, au stade œstrus :

- Le tissu mammaire est dense et se développe.
- Il n'apparaît pas de différences dans la répartition des différentes structures mammaires entre les deux régions d'intérêt et ce sont les structures épithéliales glandulaires monocouches avec sécrétion qui sont majoritairement représentées.
- Des structures mammaires sont présentes au sein du tissu adipeux brun interscapulaire.
- Au sein des coupes d'ovaires, on observe à la fois des follicules primordiaux, primaires, secondaires, tertiaires, atrésiques et des corps progestatifs.

2.1.3 En metœstrus

La figure 20 montre l'arborisation du tissu mammaire en région interscapulaire et en région mammaire M4, à l'étape metœstrus du cycle sexuel de la souris.

*Figure 20 : Arborisation du tissu mammaire en région interscapulaire et en région mammaire M4, à l'étape metœstrus du cycle sexuel de la souris
(Source : Unité d'anatomie pathologique ENVA)*



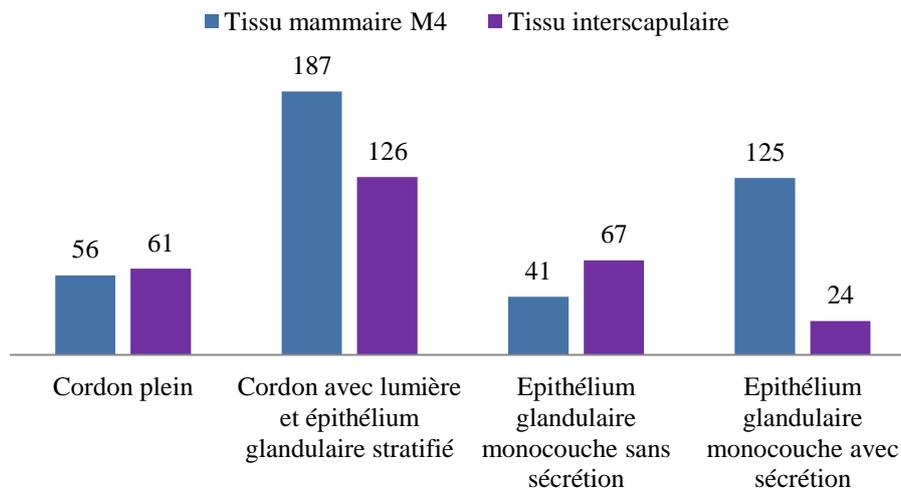
En région interscapulaire, le tissu mammaire thoracique crânial envahit la région des bourrelets adipeux bruns. L'arborisation du tissu mammaire est très dense et des bourgeons terminaux sont observables.

En région mammaire M4, l'arborisation de la glande mammaire est très dense. Des bourgeons terminaux sont observables.

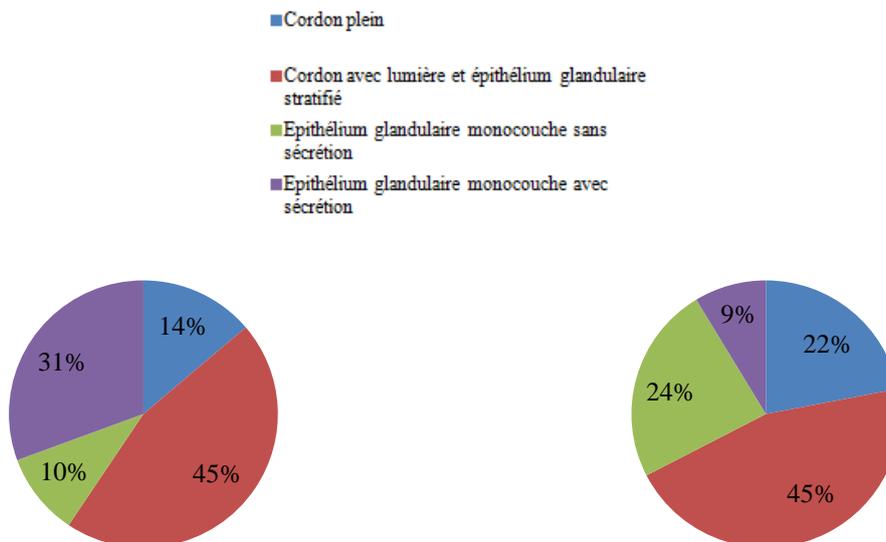
La figure 21 indique les résultats du dénombrement des structures mammaires en région interscapulaire et en région mammaire M4, à l'étape metœstrus du cycle sexuel.

Figure 21 : Résultats du dénombrement des structures mammaires en région interscapulaire et en région mammaire M4, à l'étape métœstrus du cycle sexuel de la souris

IDTM s=3	Cordon plein	Cordon avec lumière et épithélium glandulaire stratifié	Epithélium glandulaire monocouche sans sécrétion	Epithélium glandulaire monocouche avec sécrétion	Total
Tissu mammaire M4	56 (14%)	187 (46%)	41 (10%)	125 (31%)	409 (100%)
Tissu interscapulaire	61 (22%)	126 (45%)	67 (24%)	24 (9%)	278 (100%)



IDTM des différentes structures mammaires visibles microscopiquement au sein du tissu interscapulaire et du tissu mammaire M4, à l'étape métœstrus du cycle sexuel



Répartition des structures mammaires au sein du tissu mammaire M4, à l'étape métœstrus du cycle sexuel

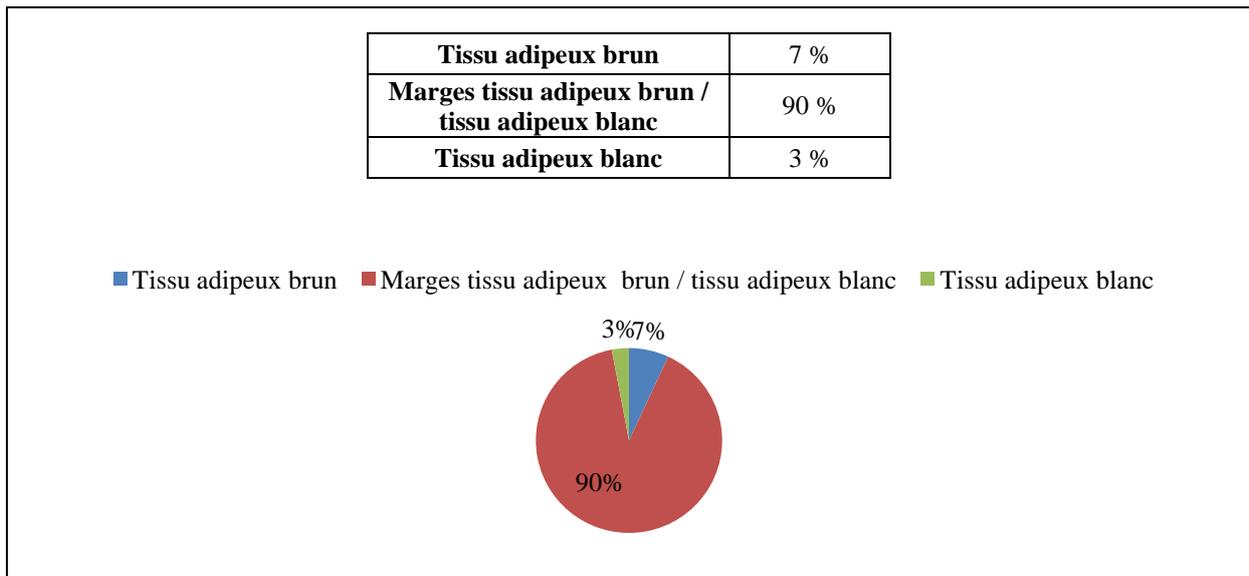
Répartition des structures mammaires au sein du tissu interscapulaire, à l'étape métœstrus du cycle sexuel

Compte tenu de l'effectif du lot d'animaux (trois souris), il n'apparaît pas de différences entre la région mammaire M4 et la région interscapulaire.

Dans les deux régions d'intérêt, une proportion élevée en cordons avec lumière et épithélium glandulaire stratifié est observable.

La figure 22 indique la répartition du tissu mammaire au sein des différents types de tissus adipeux en région interscapulaire, à l'étape métœstrus du cycle sexuel.

Figure 22 : Répartition du tissu mammaire au sein des différents types de tissus adipeux en région interscapulaires, à l'étape métœstrus du cycle sexuel de la souris



7% des structures mammaires observées en région interscapulaire sont situées au sein du tissu adipeux brun et 90% des structures aux marges du tissu adipeux brun et du tissu adipeux blanc.

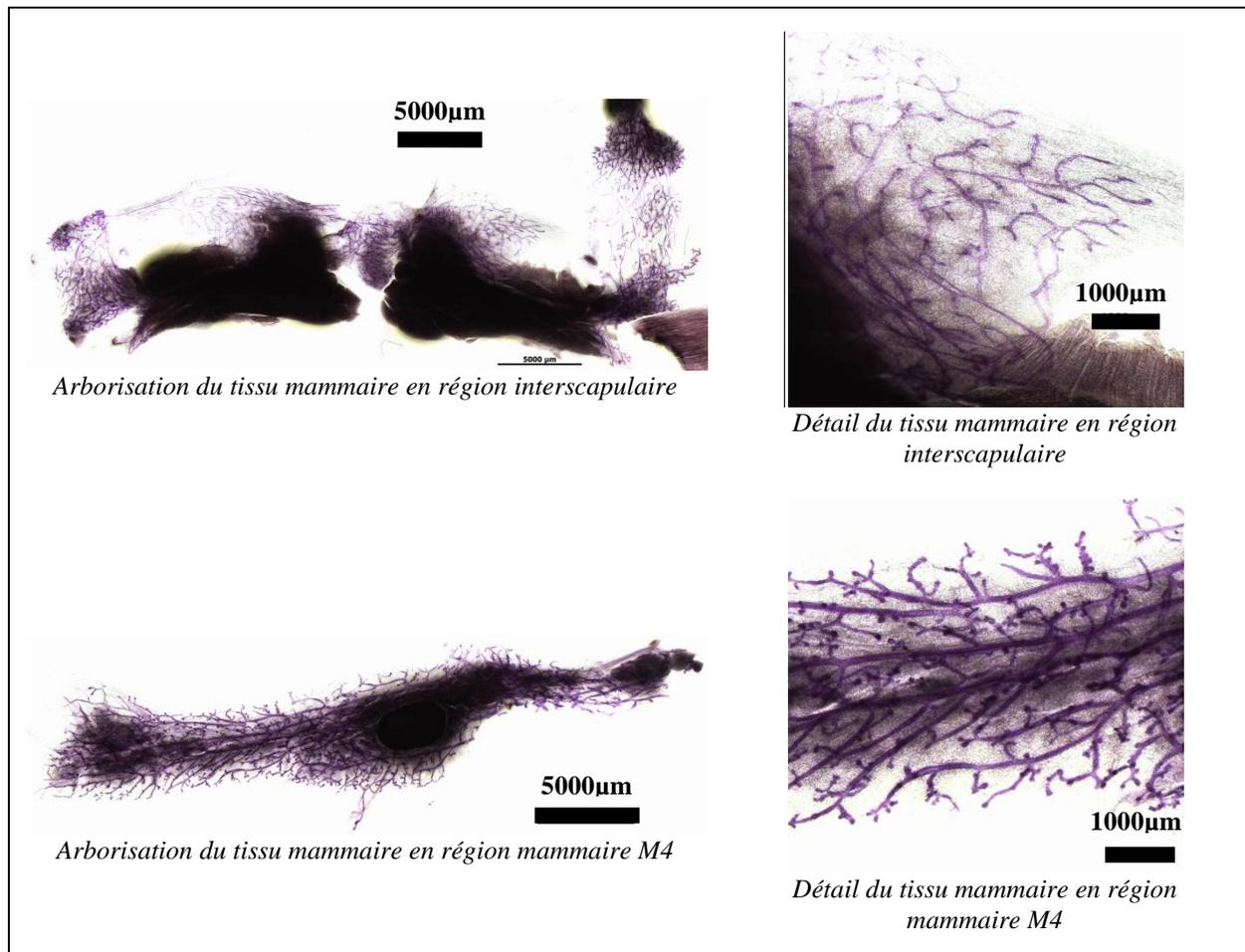
En résumé, au stade métœstrus :

- Le tissu mammaire est dense.
- Il n'apparaît pas de différences dans la répartition des différentes structures mammaires entre les deux régions d'intérêt et ce sont les cordons avec lumière et épithélium glandulaire stratifié qui sont majoritairement représentés.
- Moins de structures mammaires sont visualisables au sein du tissu adipeux brun interscapulaire.
- Au sein des coupes d'ovaires, on observe à la fois des follicules primordiaux, primaires, secondaires, tertiaires, atresiques et des corps progestatifs.

2.1.4 En début de diœstrus

La figure 23 montre l'arborisation du tissu mammaire en région interscapulaire et en région mammaire M4, au début de l'étape diœstrus du cycle sexuel.

*Figure 23 : Arborisation du tissu mammaire en région interscapulaire et en région mammaire M4, au début de l'étape diœstrus du cycle sexuel de la souris
(Source : Unité d'anatomie pathologique ENVA)*



En région interscapulaire, le tissu mammaire thoracique crânial envahit peu la région des bourrelets adipeux bruns. L'arborisation du tissu mammaire est peu dense et peu de bourgeons terminaux sont observables.

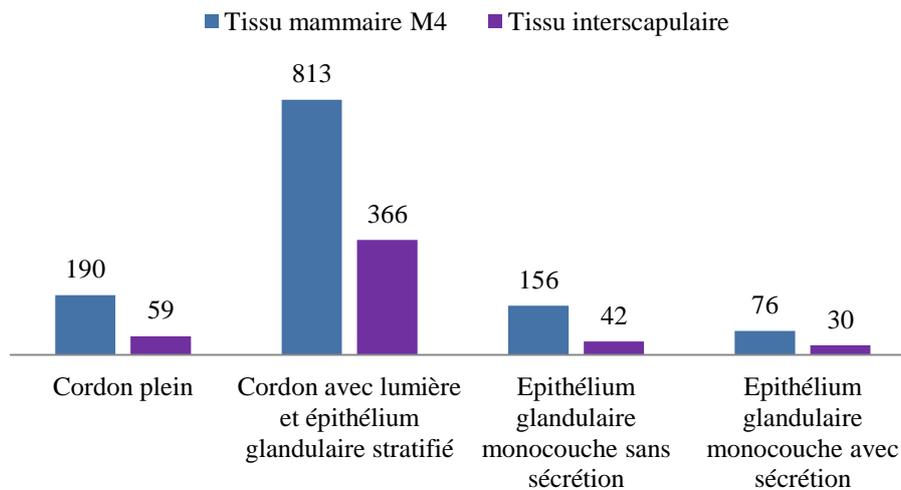
En région mammaire M4, l'arborisation du tissu mammaire reste dense. Quelques bourgeons terminaux sont observables.

Dans les deux régions d'intérêt, il y a une diminution de la densité de l'arborisation du tissu mammaire et du nombre de bourgeons terminaux.

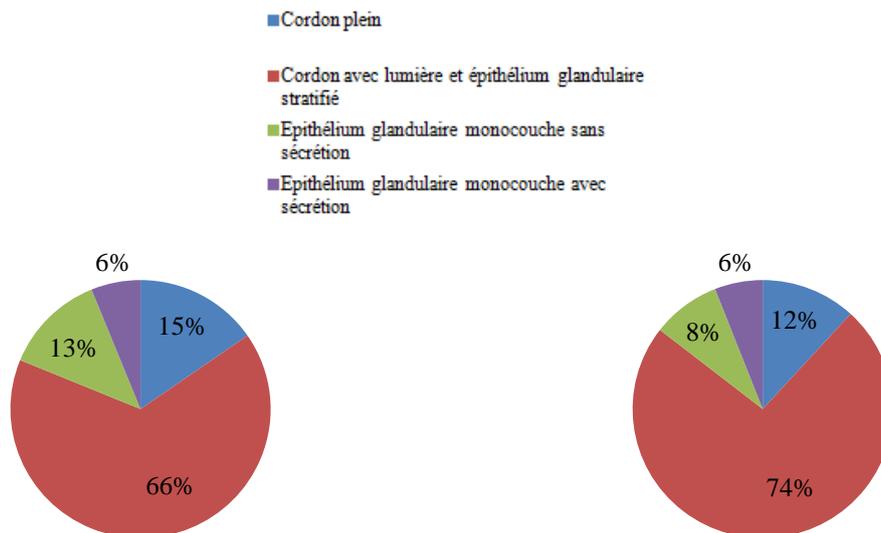
La figure 24 indique les résultats du dénombrement des structures mammaires en région interscapulaire et en région mammaire M4, au début de l'étape diœstrus du cycle sexuel.

Figure 24 : Résultats du dénombrement des structures mammaires en région interscapulaire et en région mammaire M4, au début de l'étape diœstrus du cycle sexuel de la souris

IDTM s=3	Cordon plein	Cordon avec lumière et épithélium glandulaire stratifié	Epithélium glandulaire monocouche sans sécrétion	Epithélium glandulaire monocouche avec sécrétion	Total
Tissu mammaire M4	190 (15%)	813 (66%)	156 (13%)	76 (6%)	1235 (100%)
Tissu interscapulaire	59 (12%)	366 (74%)	42 (8%)	30 (6%)	497 (100%)



IDTM des différentes structures mammaires visibles microscopiquement au sein du tissu interscapulaire et du tissu mammaire M4, au début de l'étape diœstrus du cycle sexuel



Répartition des structures mammaires au sein du tissu mammaire M4, au début de l'étape diœstrus du cycle sexuel

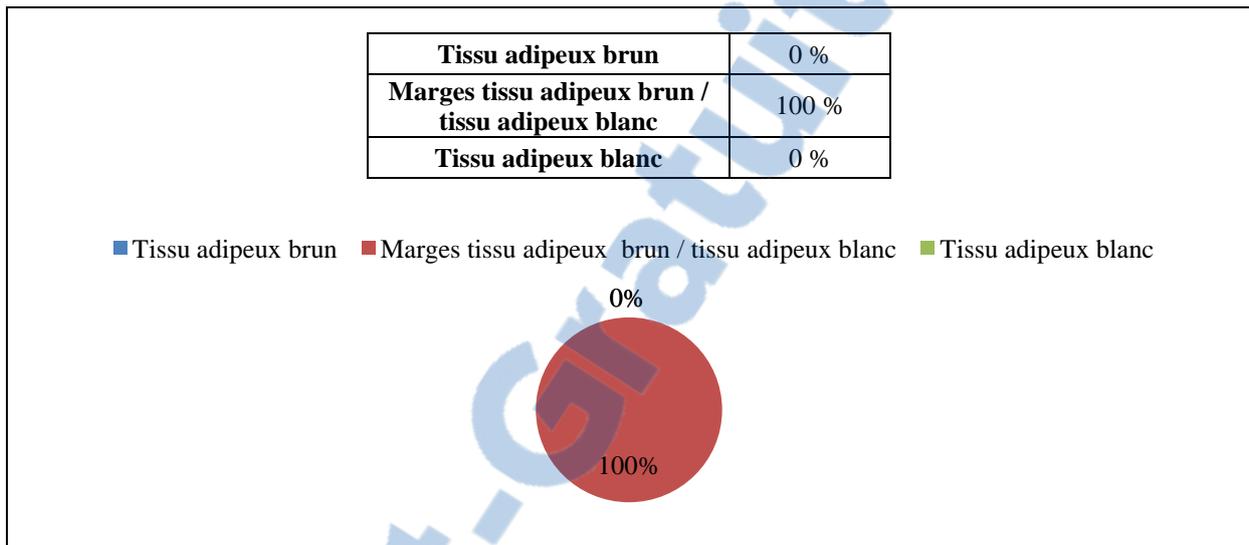
Répartition des structures mammaires au sein du tissu interscapulaire, au début de l'étape diœstrus du cycle sexuel

Compte tenu de l'effectif du lot d'animaux (trois souris), il n'apparaît pas de différences entre la région mammaire M4 et la région interscapulaire.

Dans les deux régions d'intérêt, une proportion élevée en cordons avec lumière et épithélium glandulaire stratifié est observable.

La figure 25 indique la répartition du tissu mammaire au sein des différents types de tissus adipeux en région interscapulaire, au début de l'étape diœstrus du cycle sexuel.

Figure 25 : Répartition du tissu mammaire au sein des différents types de tissus adipeux en région interscapulaires, au début de l'étape diœstrus du cycle sexuel



Aucune des structures mammaires observées en région interscapulaire n'est située au sein du tissu adipeux brun. L'ensemble des structures mammaires observables sont situées aux marges du tissu adipeux brun et du tissu adipeux blanc.

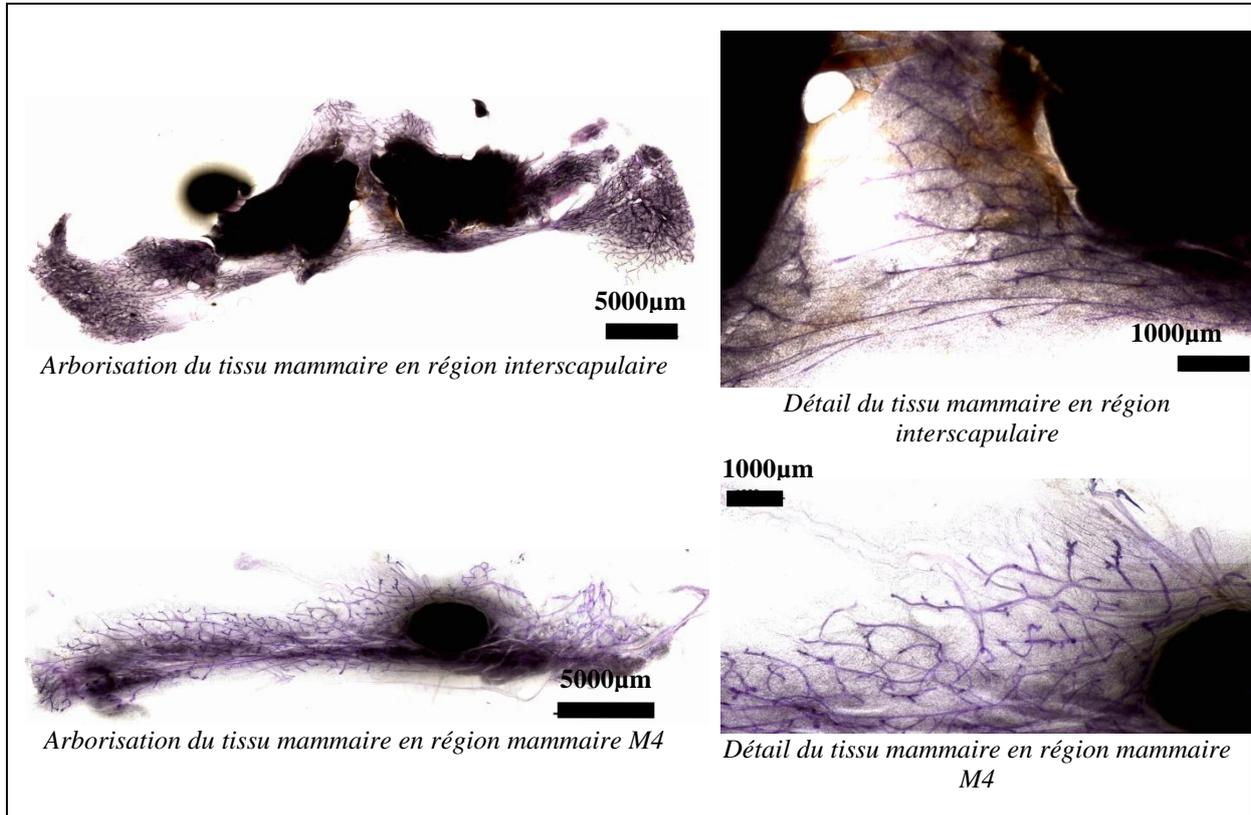
En résumé, au début du stade diœstrus :

- Le tissu mammaire s'involue.
- Il n'apparaît pas de différences dans la répartition des différentes structures mammaires entre les deux régions d'intérêt et ce sont les cordons avec lumière et épithélium glandulaire stratifié qui sont majoritairement représentés.
- Le tissu adipeux brun ne présente pas de structures mammaires.
- Au sein des coupes d'ovaires, on observe à la fois des follicules primordiaux, primaires, secondaires, tertiaires, atrésiques et des corps progestatifs.

2.1.5 En fin de diœstrus

La figure 26 montre l'arborisation du tissu mammaire en région interscapulaire et en région mammaire M4, en fin de l'étape diœstrus du cycle sexuel de la souris.

*Figure 26 : Arborisation du tissu mammaire en région interscapulaire et en région mammaire M4, en fin de l'étape diœstrus du cycle sexuel de la souris
(Source : Unité d'anatomie pathologique ENVA)*



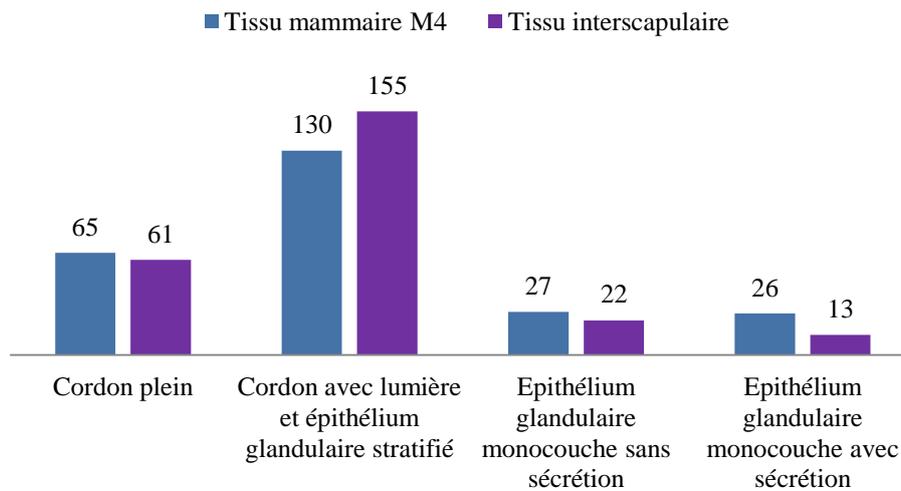
En région interscapulaire, le tissu mammaire thoracique crânial envahit peu la région des bourrelets adipeux bruns. L'arborisation du tissu mammaire est peu dense et peu de bourgeons terminaux sont observables.

En région mammaire M4, il y a une diminution de la densité de l'arborisation de la glande mammaire, par rapport au début de l'étape diœstrus. Quelques bourgeons terminaux sont observables.

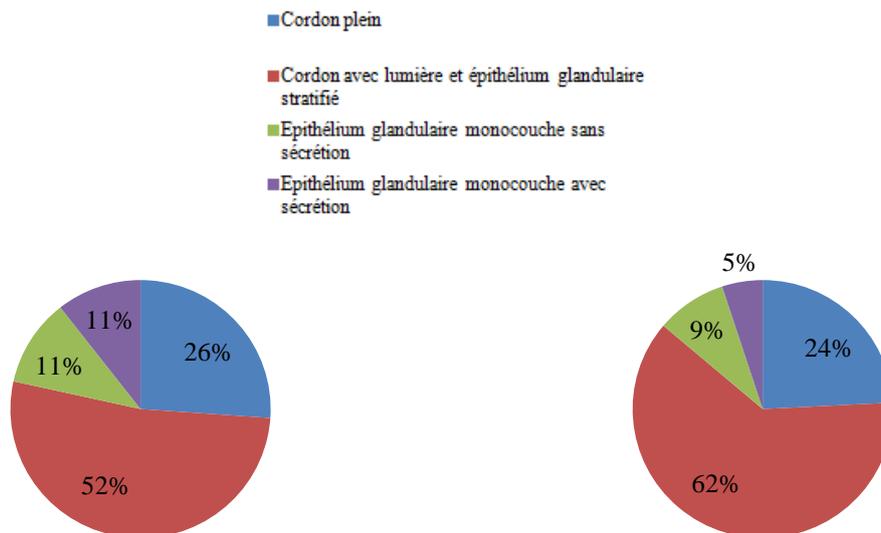
La figure 27 indique les résultats du dénombrement des structures mammaires en région interscapulaire et en région mammaire M4, en fin de l'étape diœstrus du cycle sexuel de la souris.

Figure 27 : Résultats du dénombrement des structures mammaires en région interscapulaire et en région mammaire M4, en fin de l'étape diœstrus du cycle sexuel de la souris

IDTM s=3	Cordon plein	Cordon avec lumière et épithélium glandulaire stratifié	Epithélium glandulaire monocouche sans sécrétion	Epithélium glandulaire monocouche avec sécrétion	Total
Tissu mammaire M4	65 (26%)	130 (52%)	27 (11%)	26 (11%)	248 (100%)
Tissu interscapulaire	61 (24%)	155 (62%)	22 (9%)	13 (5%)	251 (100%)



IDTM des différentes structures mammaires visibles microscopiquement au sein du tissu interscapulaire et du tissu mammaire M4, en fin de l'étape diœstrus du cycle sexuel



Répartition des structures mammaires au sein du tissu mammaire M4, en fin de l'étape dioestrus du cycle sexuel

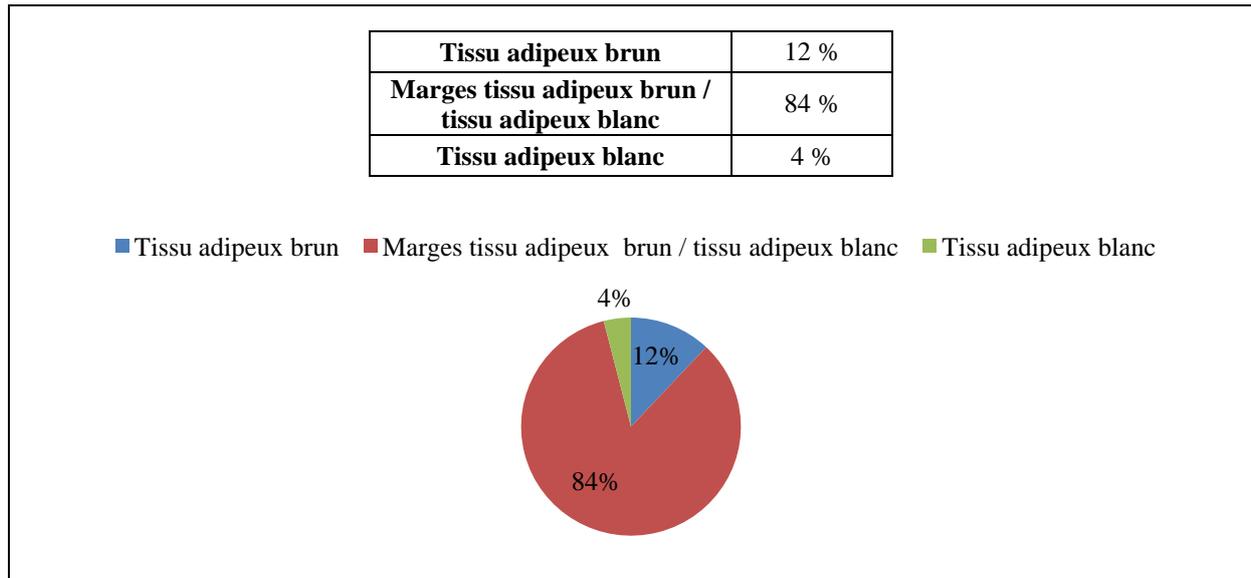
Répartition des structures mammaires au sein du tissu interscapulaire, en fin de l'étape dioestrus du cycle sexuel

Compte tenu de l'effectif du lot d'animaux (trois souris), il n'apparaît pas de différences entre la région mammaire M4 et la région interscapulaire.

Dans les deux régions d'intérêt, une proportion élevée en cordons avec lumière et épithélium glandulaire stratifié est observable.

La figure 28 indique la répartition du tissu mammaire au sein des différents types de tissus adipeux en région interscapulaire, en fin de l'étape diœstrus du cycle sexuel.

Figure 28 : Répartition du tissu mammaire au sein des différents types de tissus adipeux en région interscapulaires, en fin de l'étape diœstrus du cycle sexuel



12% des structures mammaires observées en région interscapulaire sont situées au sein du tissu adipeux brun et 84% sont situées aux marges du tissu adipeux brun et du tissu adipeux blanc.

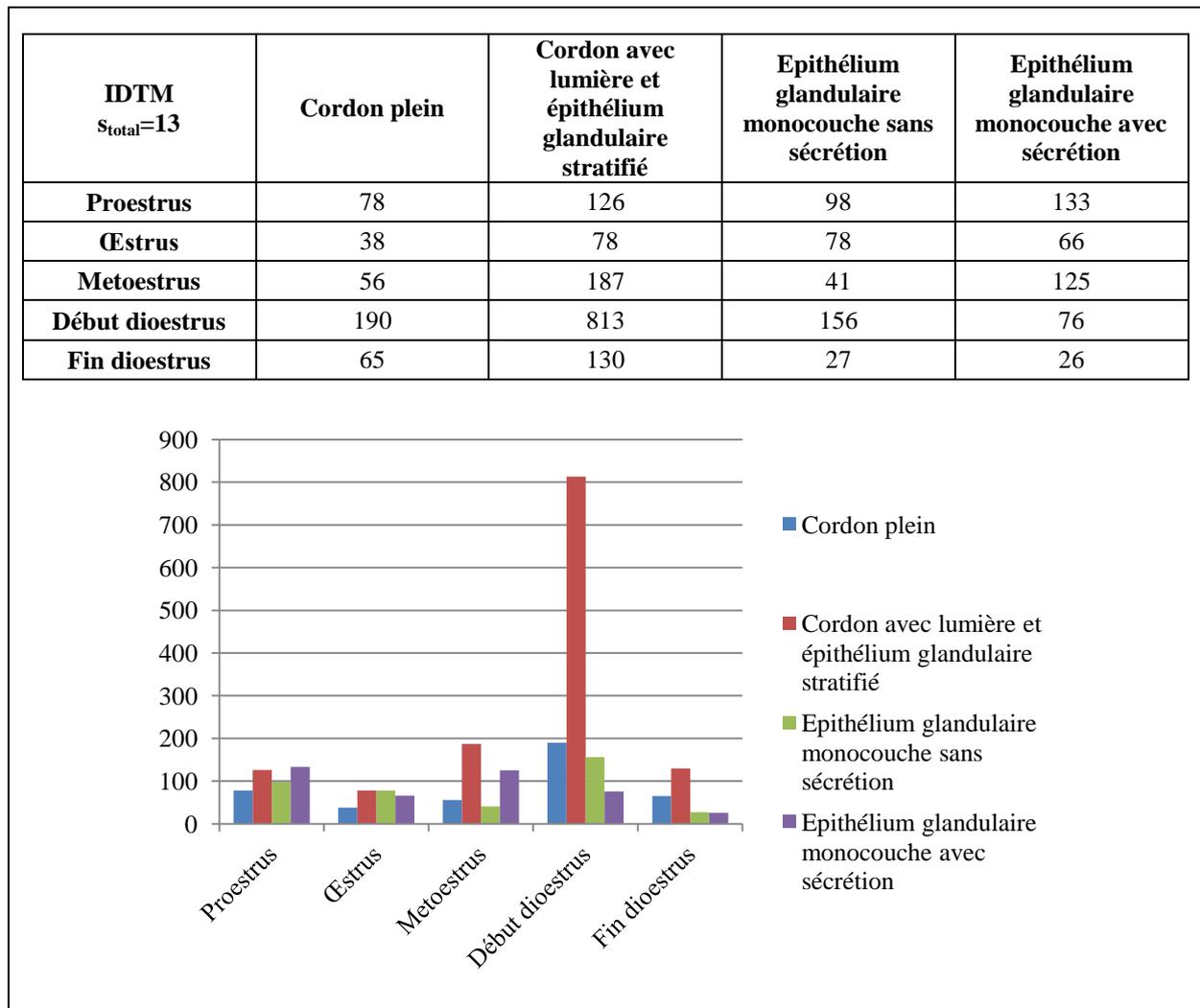
En résumé, à la fin du stade diœstrus :

- Le tissu mammaire est peu différencié.
- Il n'apparaît pas de différences dans la répartition des différentes structures mammaires entre les deux régions d'intérêt et ce sont les cordons avec lumière et épithélium glandulaire stratifié qui sont majoritairement représentés.
- Des structures mammaires sont visibles au sein du tissu adipeux brun interscapulaire.
- Au sein des coupes d'ovaires, on observe à la fois des follicules primordiaux, primaires, secondaires, tertiaires, atresiques et des corps progestatifs.

2.1.6 Bilan de l'étude du développement du tissu mammaire au cours du cycle sexuel

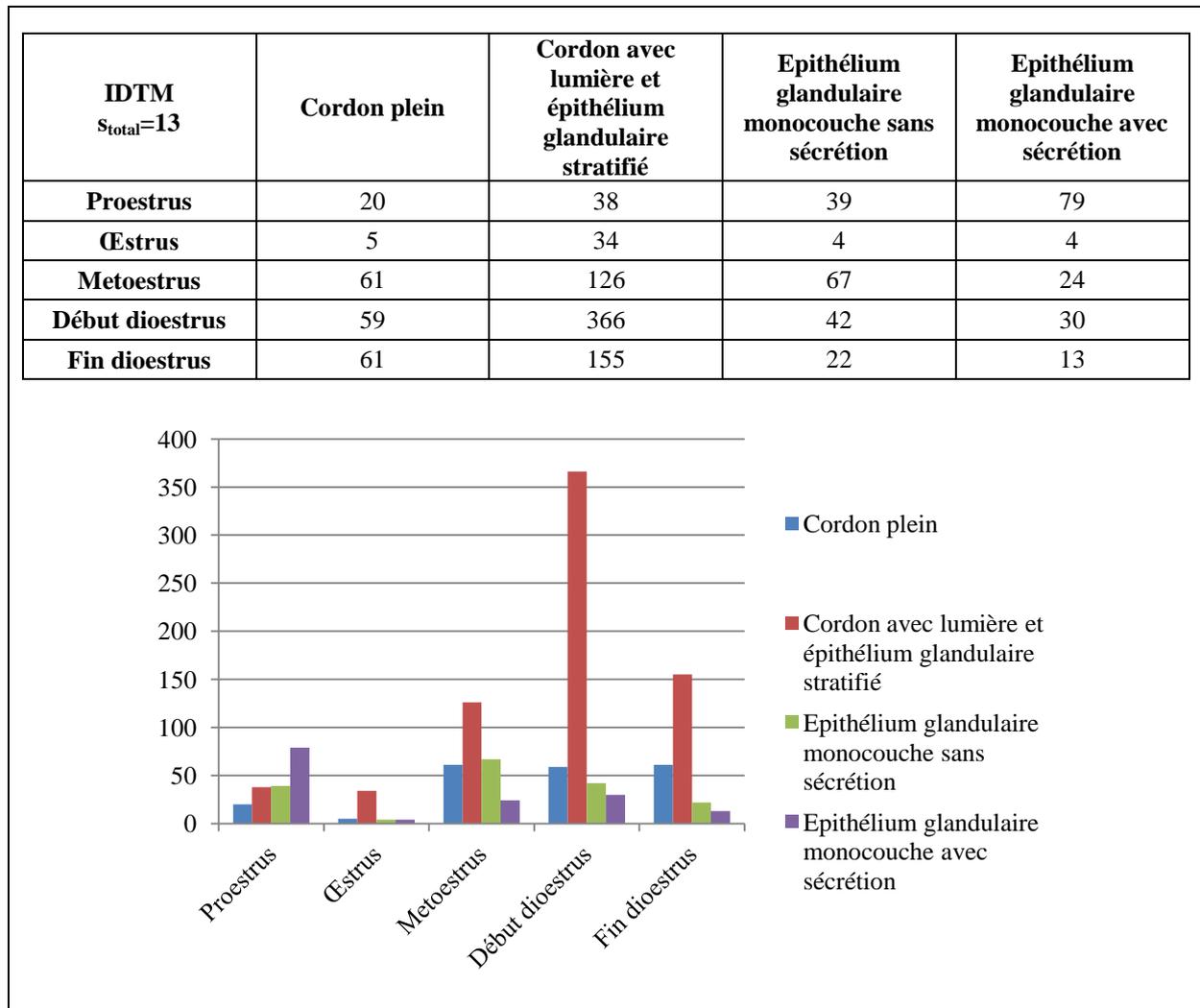
La figure 29 présente l'évolution en valeur absolue de chaque type de structure mammaire au sein du tissu mammaire M4 au cours des différentes étapes du cycle sexuel.

Figure 29 : Évolution en valeur absolue de chaque structure mammaire au sein du tissu mammaire M4 au cours des différentes étapes du cycle sexuel



La figure 30 présente l'évolution en valeur absolue de chaque type de structure mammaire au sein du tissu mammaire interscapulaire au cours des différentes étapes du cycle sexuel.

Figure 30 : Évolution en valeur absolue de chaque structure mammaire au sein du tissu interscapulaire au cours des différentes étapes du cycle sexuel



Si on compare l'évolution en valeur absolue des différentes structures mammaires au sein du tissu mammaire M4 et au sein du tissu interscapulaire au cours des différentes étapes du cycle sexuel, on constate, compte tenu des effectifs en souris à chaque étape du cycle que celle-ci est comparable dans les deux zones d'intérêt. Ainsi il y a une bonne corrélation entre le développement du tissu mammaire en région mammaire M4 et celui en région interscapulaire au cours des différentes étapes du cycle sexuel.

La répartition du tissu mammaire en région interscapulaire, au sein des différents types de tissus adipeux, est modifiée au cours du cycle sexuel.

Deux hypothèses peuvent être envisagées. La première consiste en une différenciation du tissu adipeux brun en tissu adipeux blanc induite par les bourgeons mammaires ce qui explique l'augmentation de la proportion de structures mammaires visibles aux marges du tissu adipeux blanc et du tissu adipeux brun. La seconde hypothèse consiste en une infiltration

ou une exfiltration du tissu adipeux brun par le tissu mammaire thoracique crânial suivant l'étape du cycle sexuel.

En résumé, au cours du cycle sexuel de la souris :

- Il y a une bonne corrélation entre le développement du tissu mammaire en région mammaire M4 et celui en région interscapulaire au cours des différentes étapes du cycle sexuel
- La répartition du tissu mammaire en région interscapulaire, au sein des différents types de tissus adipeux, est modifiée au cours du cycle sexuel
- Au sein des coupes d'ovaires, on observe à la fois des follicules primordiaux, primaires, secondaires, tertiaires, atrésiques et des corps progestatifs.

2.2 En fonction de la supplémentation puis de la privation en œstrogènes (lots 2 et 3)

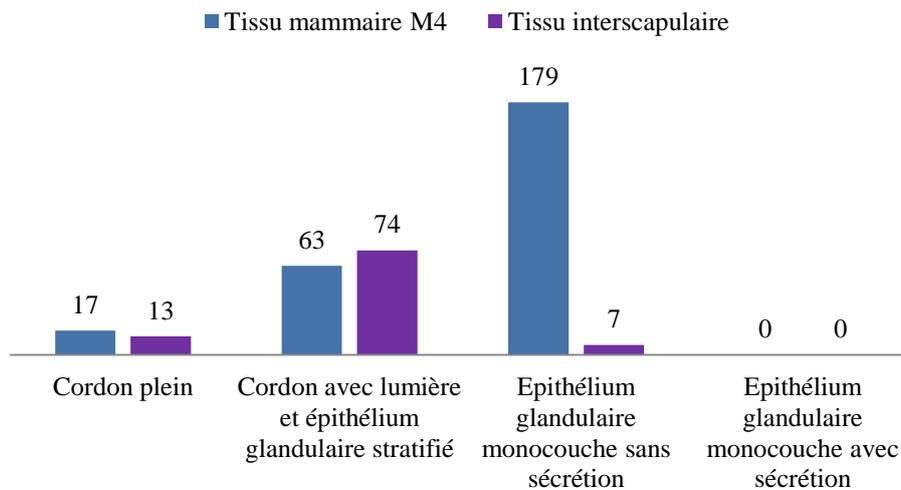
2.2.1 À J₀

Les souris ne sont pas supplémentées en œstrogènes et par conséquent seuls les œstrogènes endogènes sont impliqués dans la régulation hormonale du tissu mammaire.

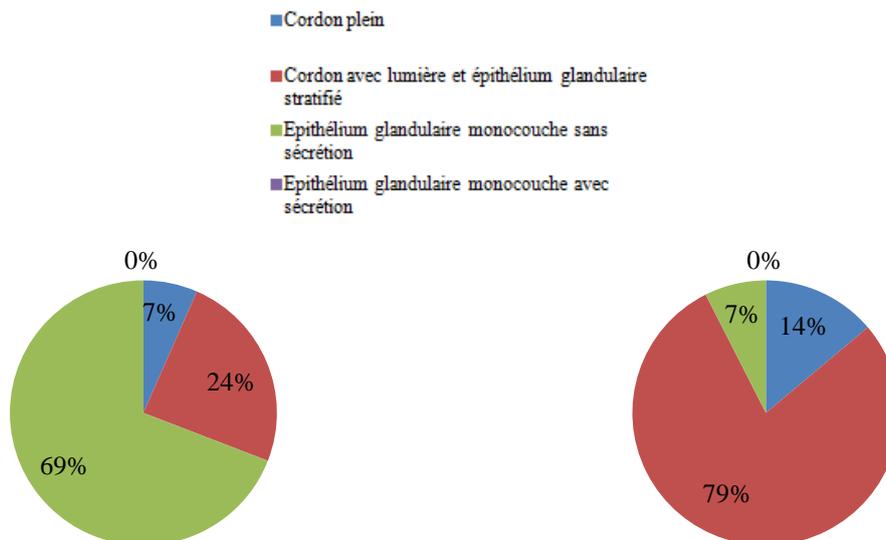
La figure 31 indique les résultats du dénombrement des structures mammaires en région interscapulaire et en région mammaire M4, à J₀.

Figure 31 : Résultats du dénombrement des structures mammaires en région interscapulaire et en région mammaire M4, à J₀

IDTM s=3	Cordon plein	Cordon avec lumière et épithélium glandulaire stratifié	Epithélium glandulaire monocouche sans sécrétion	Epithélium glandulaire monocouche avec sécrétion	Total
Tissu mammaire M4	17 (7%)	63 (24%)	179 (69%)	0 (0%)	259 (100%)
Tissu interscapulaire	13 (14%)	74 (79%)	7 (7%)	0 (0%)	94 (100%)



IDTM des différentes structures mammaires visibles microscopiquement au sein du tissu interscapulaire et du tissu mammaire M4, à J₀



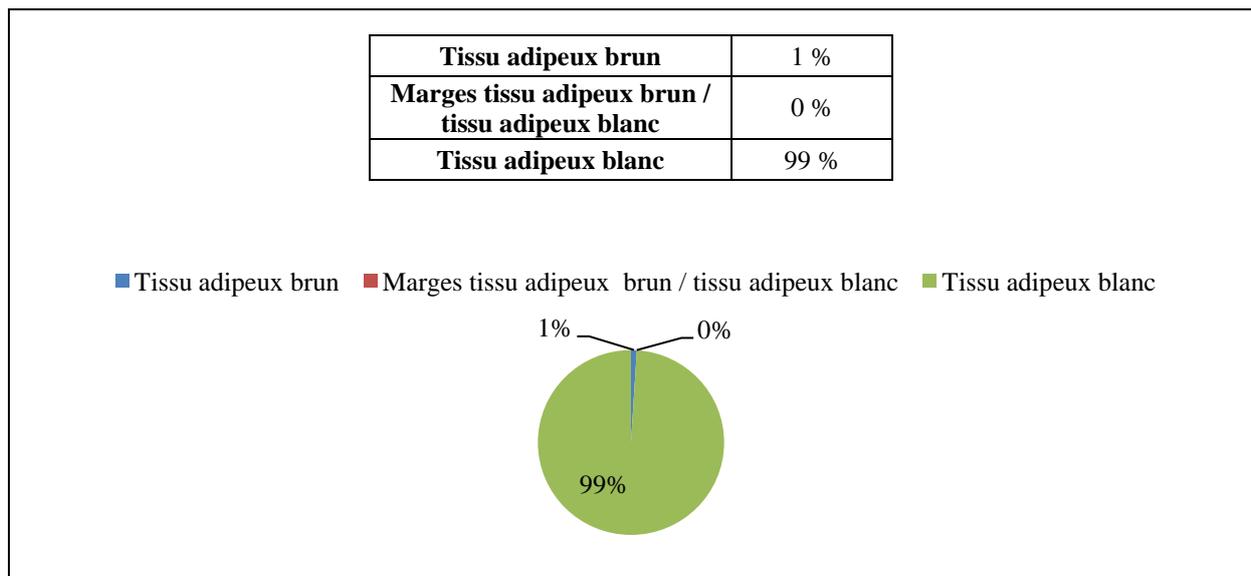
Répartition des structures mammaires au sein du tissu mammaire M4, à J₀

Répartition des structures mammaires au sein du tissu interscapulaire, à J₀

Compte tenu de l'effectif du lot d'animaux (trois souris), les souris ne recevant aucune supplémentation en œstrogènes, il aurait été intéressant de déterminer à quel stade du cycle sexuel elles se trouvaient au moment de leur sacrifice, sachant qu'il existe une variabilité individuelle. L'hétérogénéité est donc relative à un biais d'expérimentation dans le nombre d'animaux utilisé.

La figure 32 indique la répartition du tissu mammaire au sein des différents types de tissus adipeux en région interscapulaire, à J_0 .

Figure 32 : Répartition du tissu mammaire au sein des différents types de tissus adipeux en région interscapulaires, à J_0



Seules 1% des structures mammaires observées en région interscapulaire sont situées au sein du tissu adipeux brun. De même que pour la répartition des différentes structures mammaires au sein du tissu mammaire M4 et du tissu interscapulaire, l'étape du cycle auquel se trouvaient les souris au moment de leur sacrifice n'ayant pas été déterminée, ce résultat n'est pas interprétable.

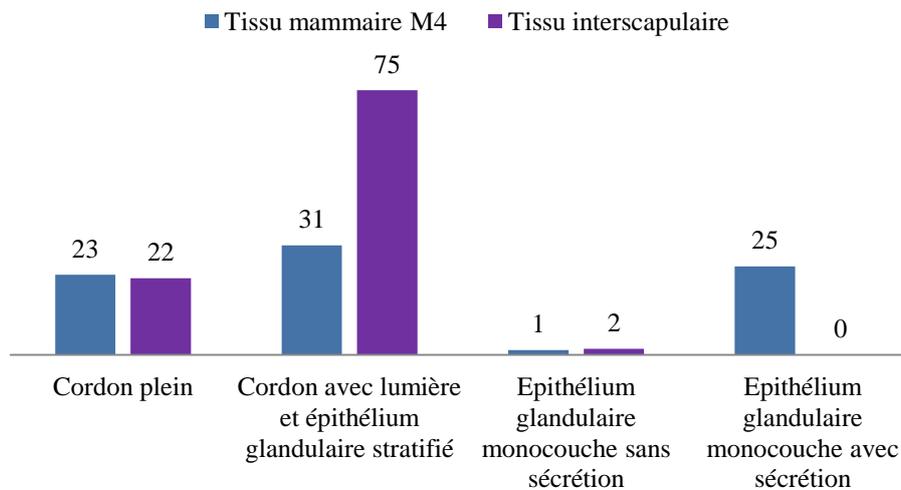
2.2.2 Chez les souris supplémentées en œstrogènes

2.2.2.1 Après cinq jours de supplémentation

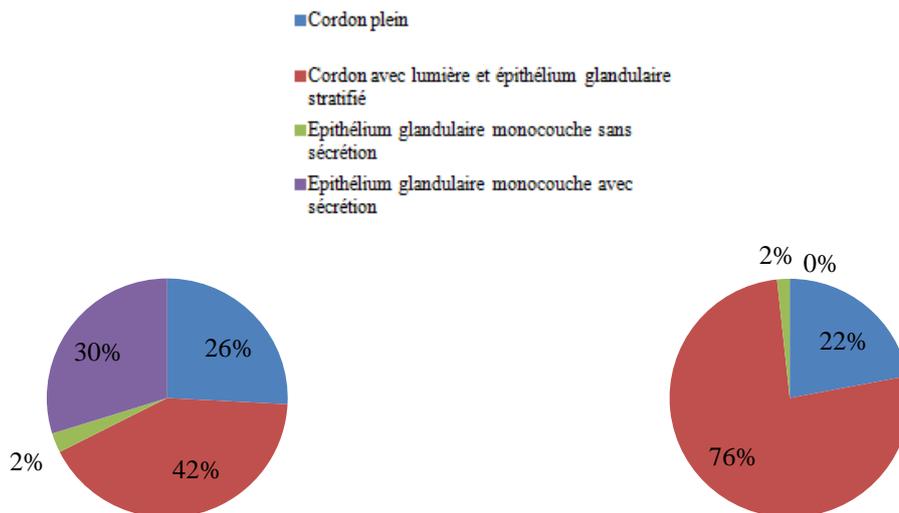
La figure 33 indique les résultats du dénombrement des structures mammaires en région interscapulaire et en région mammaire M4, après cinq jours de supplémentation en œstrogènes.

Figure 33 : Résultats du dénombrement des structures mammaires en région interscapulaire et en région mammaire M4, après cinq jours de supplémentation en œstrogènes.

IDTM s=3	Cordon plein	Cordon avec lumière et épithélium glandulaire stratifié	Epithélium glandulaire monocouche sans sécrétion	Epithélium glandulaire monocouche avec sécrétion	Total
Tissu mammaire M4	13 (26%)	21 (42%)	1 (3%)	15 (30%)	50 (100%)
Tissu interscapulaire	22 (22%)	75 (76%)	2 (2%)	0 (0%)	99 (100%)



IDTM des différentes structures mammaires visibles microscopiquement au sein du tissu interscapulaire et du tissu mammaire M4, après cinq jours de supplémentation en œstrogènes



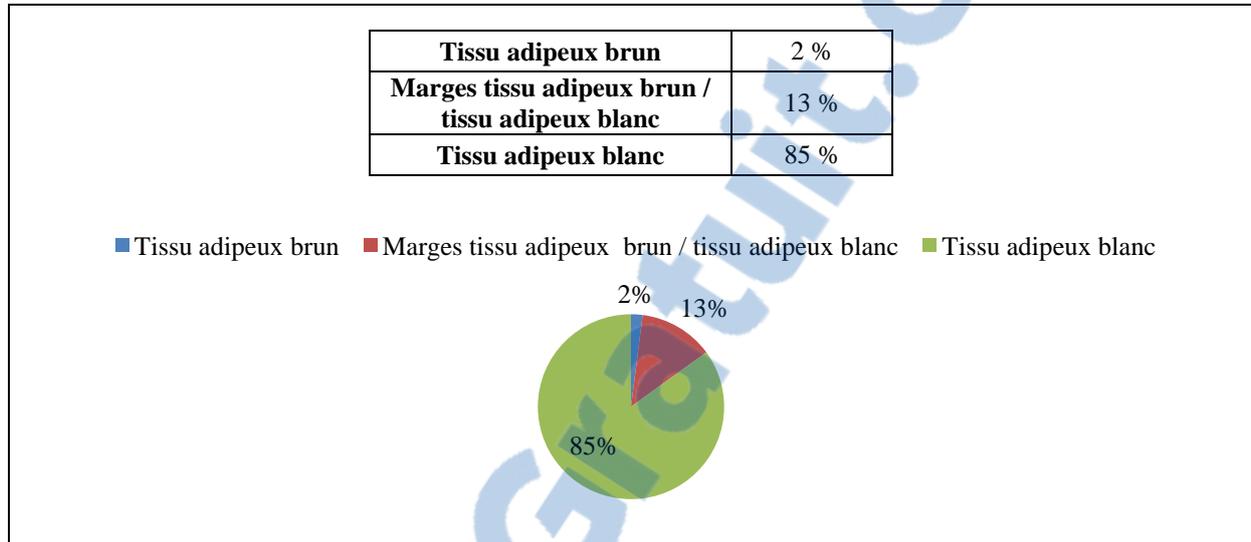
Répartition des structures mammaires au sein du tissu mammaire M4, après cinq jours de supplémentation en œstrogènes

Répartition des structures mammaires au sein du tissu interscapulaire, après cinq jours de supplémentation en œstrogènes

Compte tenu de l'effectif du lot d'animaux (trois souris), il n'apparaît pas de différences entre la région mammaire M4 et la région interscapulaire.

La figure 34 indique la répartition du tissu mammaire au sein des différents types de tissus adipeux en région interscapulaire, après cinq jours de supplémentation en œstrogènes.

Figure 34 : Répartition du tissu mammaire au sein des différents types de tissus adipeux en région interscapulaires, après cinq jours de supplémentation en œstrogènes



Seules 2% des structures mammaires observées en région interscapulaire sont situées au sein du tissu adipeux brun et 13% au sein des marges du tissu adipeux brun et du tissu adipeux blanc.

En résumé, après cinq jours de supplémentation en œstrogènes :

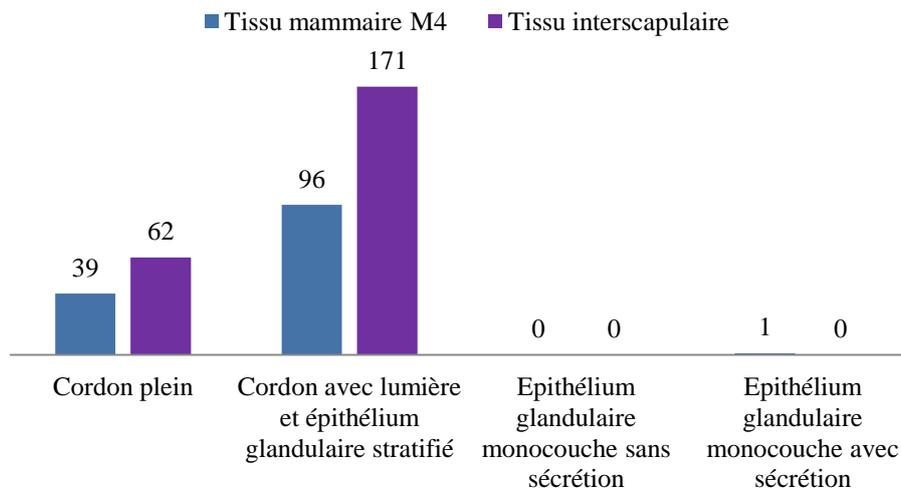
- Il n'apparaît pas de différences entre la région mammaire M4 et la région interscapulaire.
- Des structures mammaires sont visualisables au sein du tissu adipeux brun interscapulaire.
- Au sein des coupes d'ovaires, on observe à la fois des follicules primordiaux, primaires, secondaires, tertiaires, atrophiques et des corps progestatifs.

2.2.2.2 Après dix jours de supplémentation

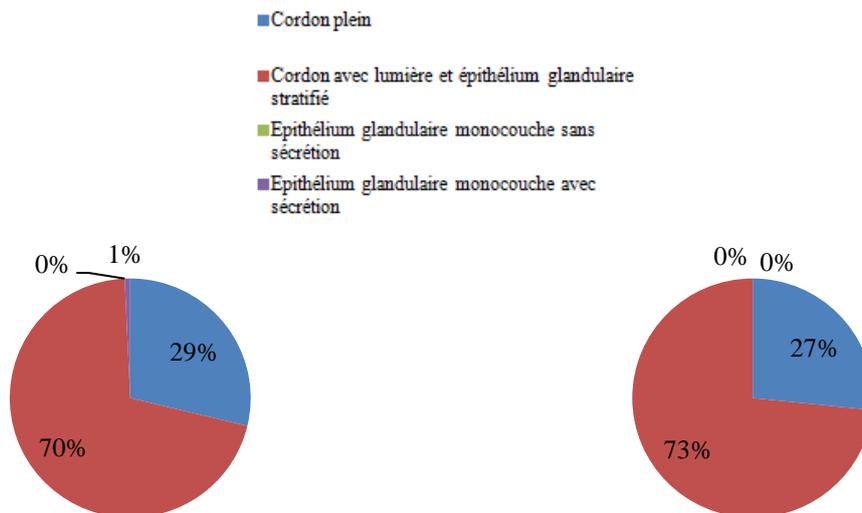
La figure 35 indique les résultats du dénombrement des structures mammaires en région interscapulaire et en région mammaire M4, après dix jours de supplémentation en œstrogènes.

Figure 35 : Résultats du dénombrement des structures mammaires en région interscapulaire et en région mammaire M4, après dix jours de supplémentation en œstrogènes.

IDTM s=3	Cordon plein	Cordon avec lumière et épithélium glandulaire stratifié	Epithélium glandulaire monocouche sans sécrétion	Epithélium glandulaire monocouche avec sécrétion	Total
Tissu mammaire M4	39 (29%)	96 (71%)	0 (0%)	1 (1%)	136 (100%)
Tissu interscapulaire	62 (27%)	171 (73%)	0 (0%)	0 (0%)	233 (100%)



IDTM des différentes structures mammaires visibles microscopiquement au sein du tissu interscapulaire et du tissu mammaire M4, après dix jours de supplémentation en œstrogènes



Répartition des structures mammaires au sein du tissu mammaire M4, après dix jours de supplémentation en œstrogènes

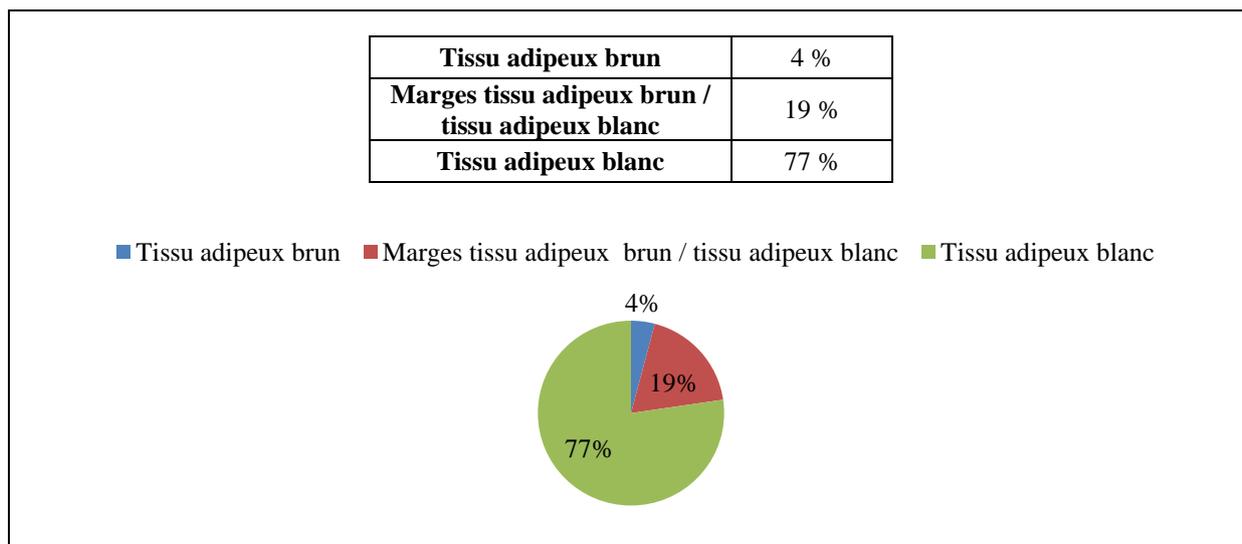
Répartition des structures mammaires au sein du tissu interscapulaire, après dix jours de supplémentation en œstrogènes

Compte tenu de l'effectif du lot d'animaux (trois souris), il n'apparaît pas de différences entre la région mammaire M4 et la région interscapulaire.

Dans les deux régions d'intérêt, ce sont les cordons avec lumière et épithélium glandulaire stratifié qui sont majoritairement représentés.

La figure 36 indique la répartition du tissu mammaire au sein des différents types de tissus adipeux en région interscapulaire, après dix jours de supplémentation en œstrogènes.

Figure 36 : Répartition du tissu mammaire au sein des différents types de tissus adipeux en région interscapulaires, après dix jours de supplémentation en œstrogènes



Seules 4% des structures mammaires observées en région interscapulaire sont situées au sein du tissu adipeux brun et 19% (contre 13% après cinq jours de supplémentation) des structures se trouvent aux marges du tissu adipeux brun et du tissu adipeux blanc.

En résumé, après 10 jours de supplémentation en œstrogènes :

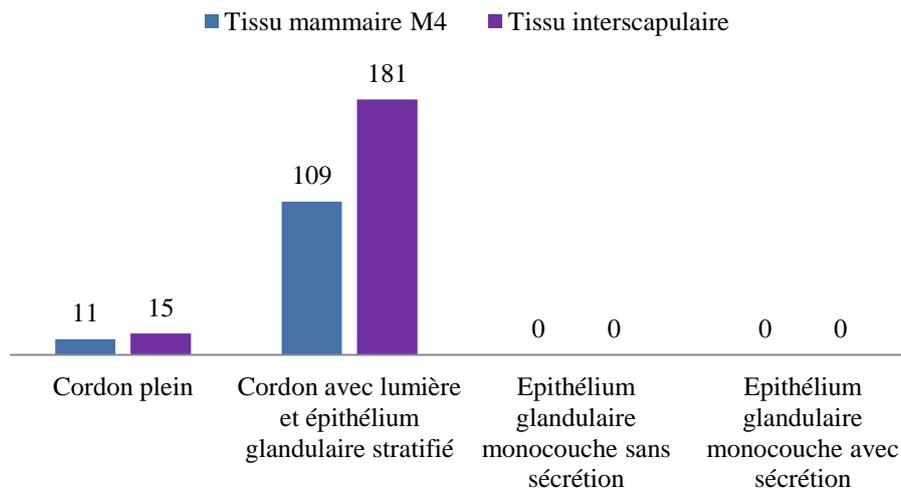
- Il n'apparaît pas de différences entre la région mammaire M4 et la région interscapulaire et ce sont les cordons avec lumière et épithélium glandulaire stratifié qui sont majoritairement représentés.
- Des structures mammaires sont visualisables au sein du tissu adipeux brun interscapulaire.
- Au sein des coupes d'ovaires, on observe à la fois des follicules primordiaux, primaires, secondaires, tertiaires, atrésiques et des corps progestatifs

2.2.2.3 Après 28 jours de supplémentation

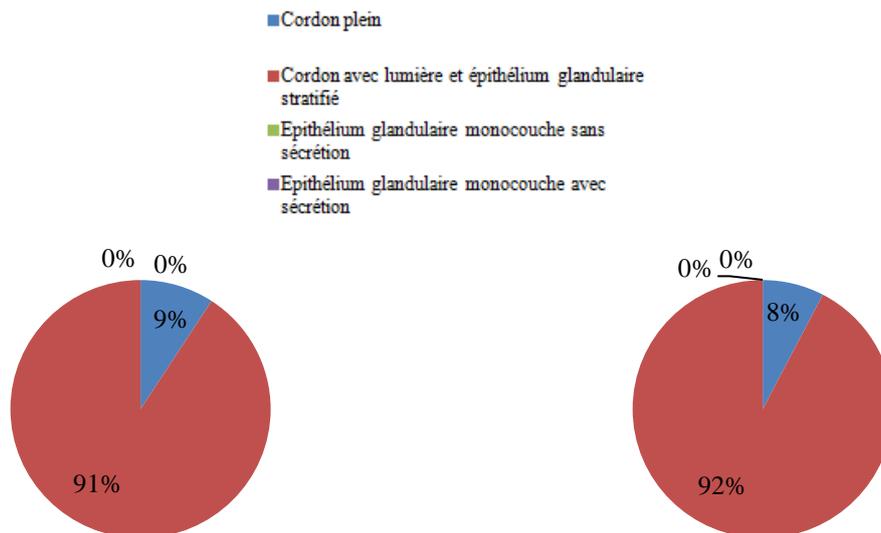
La figure 37 indique les résultats du dénombrement des structures mammaires en région interscapulaire et en région mammaire M4, après 28 jours de supplémentation en œstrogènes.

Figure 37 : Résultats du dénombrement des structures mammaires en région interscapulaire et en région mammaire M4, après 28 jours de supplémentation en œstrogènes

IDTM s=3	Cordon plein	Cordon avec lumière et épithélium glandulaire stratifié	Epithélium glandulaire monocouche sans sécrétion	Epithélium glandulaire monocouche avec sécrétion	Total
Tissu mammaire M4	11 (9%)	109 (91%)	0 (0%)	0 (0%)	120 (100%)
Tissu interscapulaire	15 (8%)	181 (92%)	0 (0%)	0 (0%)	196 (100%)



IDTM des différentes structures mammaires visibles microscopiquement au sein du tissu interscapulaire et du tissu mammaire M4, après 28 jours de supplémentation en œstrogènes



Répartition des structures mammaires au sein du tissu mammaire M4, après 28 jours de supplémentation en œstrogènes

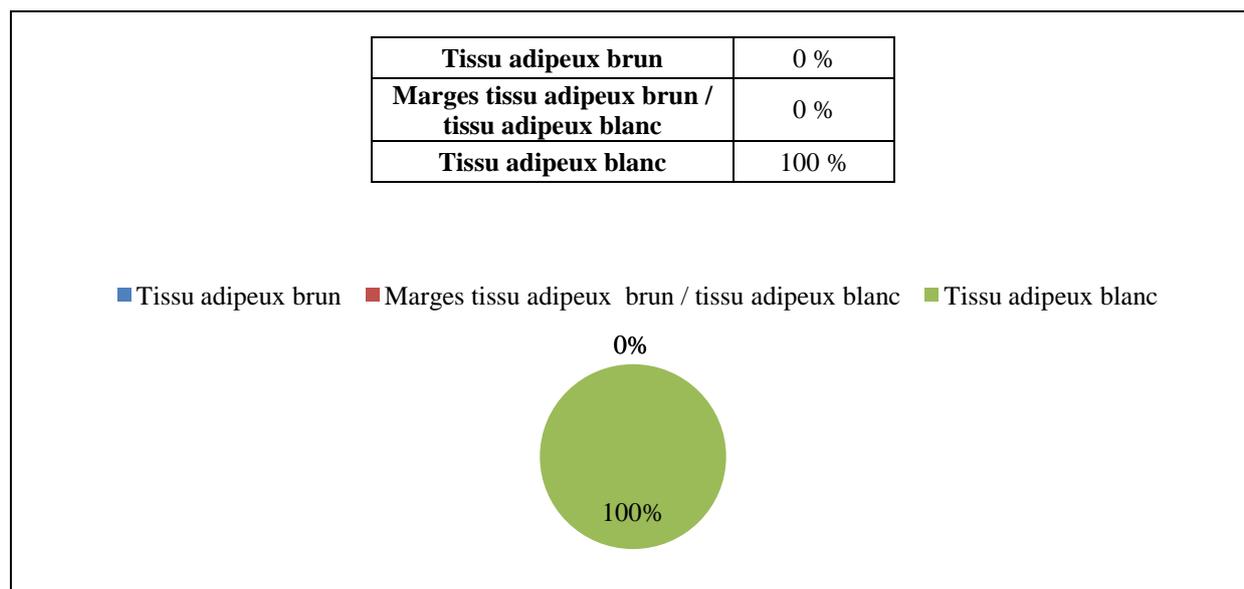
Répartition des structures mammaires au sein du tissu interscapulaire, après 28 jours de supplémentation en œstrogènes

Compte tenu de l'effectif du lot d'animaux (trois souris), il n'apparaît pas de différences entre la région mammaire M4 et la région interscapulaire.

Les deux régions d'intérêt comportent majoritairement des cordons avec lumière et épithélium glandulaire stratifié.

La figure 38 indique la répartition du tissu mammaire au sein des différents types de tissus adipeux en région interscapulaire, après 28 jours de supplémentation en œstrogènes.

Figure 38 : Répartition du tissu mammaire au sein des différents types de tissus adipeux en région interscapulaires, après 28 jours de supplémentation en œstrogènes



Aucune des structures mammaires observées en région interscapulaire n'est située au sein du tissu adipeux brun.

En résumé, après 28 jours de supplémentation en œstrogènes :

- Il n'apparaît pas de différences entre la région mammaire M4 et la région et les deux régions d'intérêt comportent majoritairement des cordons avec lumière et épithélium glandulaire stratifié
- Aucune structure mammaire n'est retrouvée au sein du tissu adipeux brun interscapulaire.
- Au sein des coupes d'ovaires, on observe à la fois des follicules primordiaux, primaires, secondaires, tertiaires, atrophiques et des corps progestatifs.

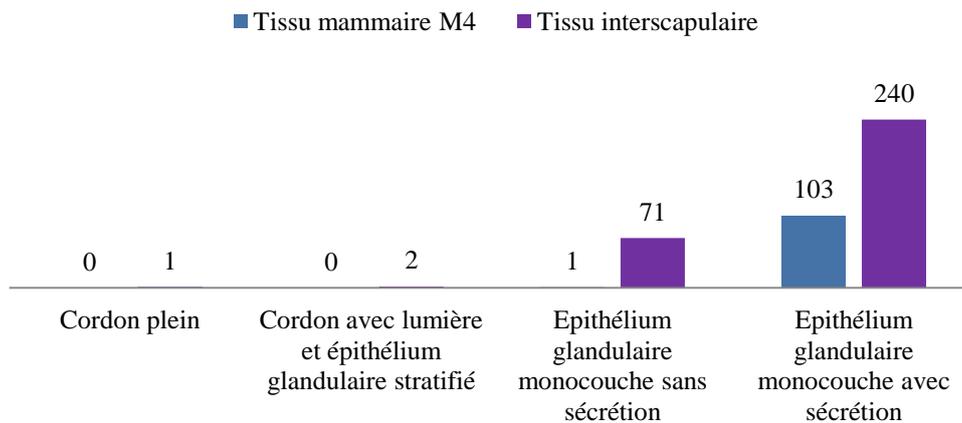
2.2.3 Chez les souris supplémentées puis privées en œstrogènes

2.2.3.1 Après 28 jours de supplémentation et cinq jours de privation

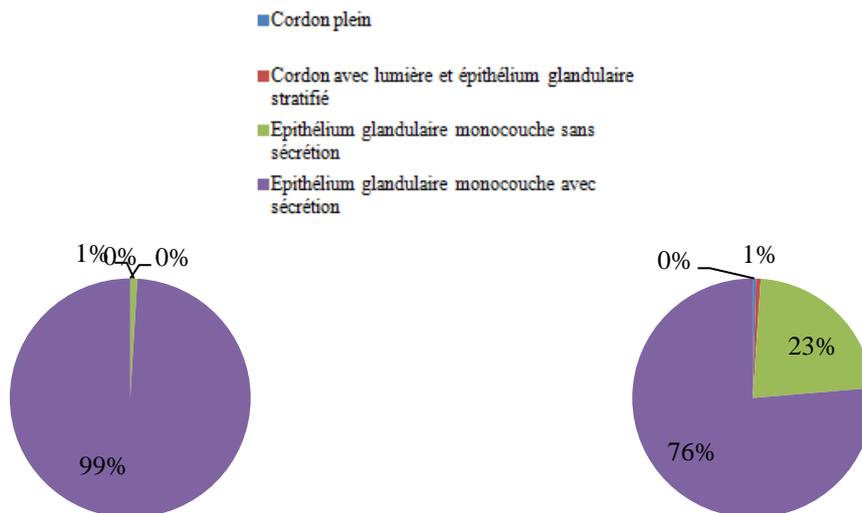
La figure 39 indique les résultats du dénombrement des structures mammaires en région interscapulaire et en région mammaire M4, après 28 jours de supplémentation en œstrogènes et cinq jours de privation.

Figure 39 : Résultats du dénombrement des structures mammaires en région interscapulaire et en région mammaire M4, après 28 jours de supplémentation en œstrogènes et cinq jours de privation

IDTM s=3	Cordon plein	Cordon avec lumière et épithélium glandulaire stratifié	Epithélium glandulaire monocouche sans sécrétion	Epithélium glandulaire monocouche avec sécrétion	Total
Tissu mammaire M4	0 (0%)	0 (0%)	1 (1%)	103 (99%)	104 (100%)
Tissu interscapulaire	1 (0%)	2 (1%)	71 (23%)	240 (76%)	314 (100%)



IDTM des différentes structures mammaires visibles microscopiquement au sein du tissu interscapulaire et du tissu mammaire M4, après 28 jours de supplémentation en œstrogènes et cinq jours de privation



Répartition des structures mammaires au sein du tissu mammaire M4, après 28 jours de supplémentation en œstrogènes et cinq jours de privation

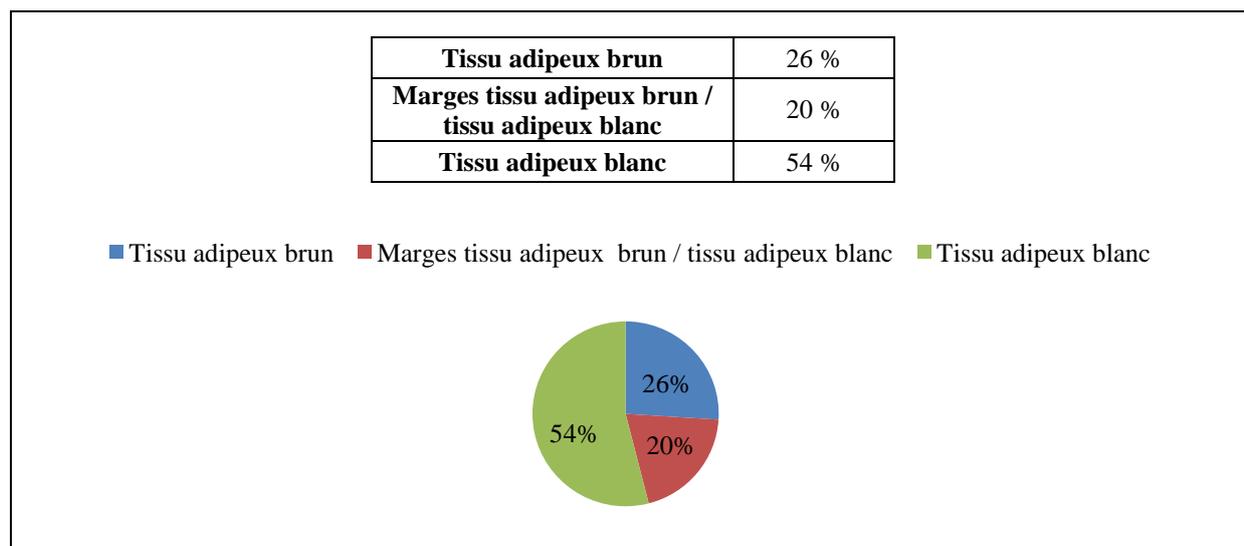
Répartition des structures mammaires au sein du tissu interscapulaire, après 28 jours de supplémentation en œstrogènes et cinq jours de privation

Compte tenu de l'effectif du lot d'animaux (trois souris), il n'apparaît pas de différences entre la région mammaire M4 et la région interscapulaire.

Les deux régions d'intérêt comportent majoritairement des structures épithéliales glandulaires avec sécrétions.

La figure 40 indique la répartition du tissu mammaire au sein des différents types de tissus adipeux en région interscapulaire, après 28 jours de supplémentation en œstrogènes et cinq jours de privation.

Figure 40 : Répartition du tissu mammaire au sein des différents types de tissus adipeux en région interscapulaires, après 28 jours de supplémentation en œstrogènes et cinq jours de privation



26% des structures mammaires observées en région interscapulaire sont situées au sein du tissu adipeux brun et 20% sont situées au sein des marges du tissu adipeux brun et du tissu adipeux blanc.

En résumé, après 28 jours de supplémentation en œstrogènes et cinq jours de privation :

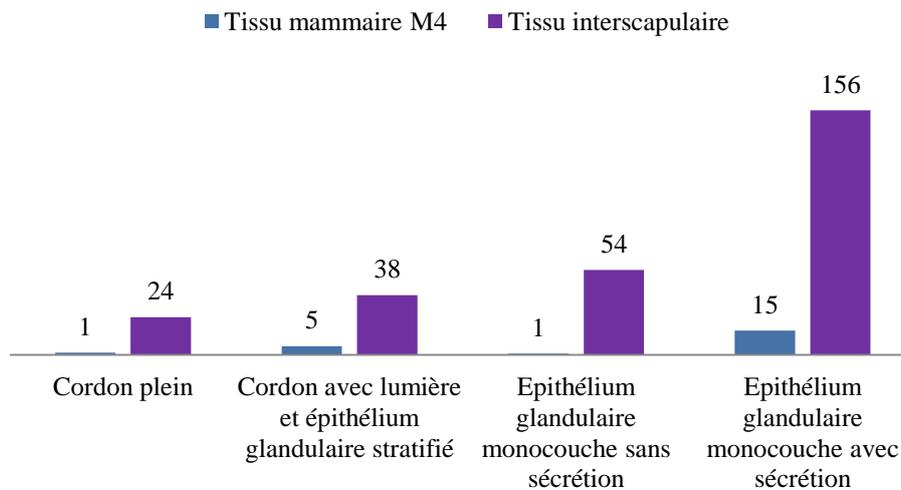
- Il n'apparaît pas de différences entre la région mammaire M4 et la région interscapulaire et les deux régions d'intérêt comportent majoritairement des structures épithéliales glandulaires avec sécrétions.
- Des structures mammaires sont visualisables au sein du tissu adipeux brun interscapulaire.
- Au sein des coupes d'ovaires, on observe à la fois des follicules primordiaux, primaires, secondaires, tertiaires, atrésiques et des corps progestatifs.

2.2.3.2 Après 28 jours de supplémentation et dix jours de privation

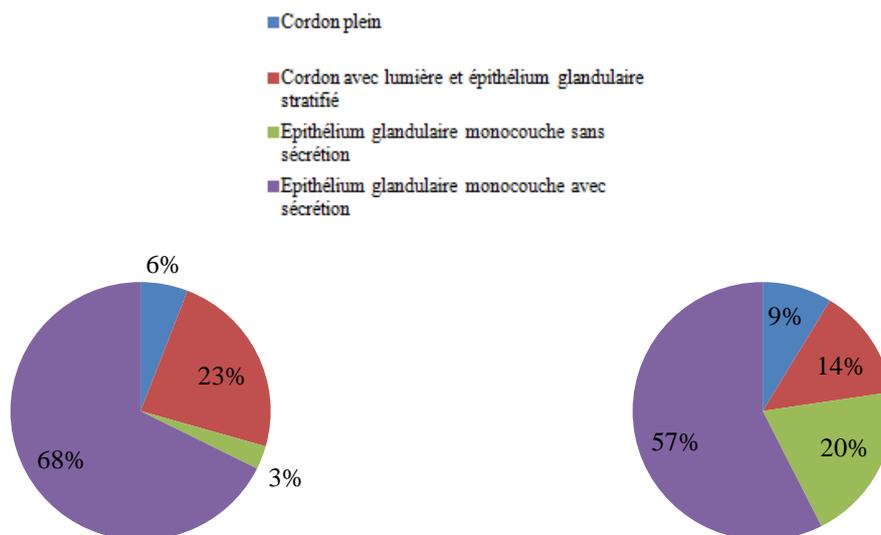
La figure 41 indique les résultats du dénombrement des structures mammaires en région interscapulaire et en région mammaire M4, après 28 jours de supplémentation en œstrogènes et dix jours de privation.

Figure 41 : Résultats du dénombrement des structures mammaires en région interscapulaire et en région mammaire M4, après 28 jours de supplémentation en œstrogènes et dix jours de privation

IDTM s=3	Cordon plein	Cordon avec lumière et épithélium glandulaire stratifié	Epithélium glandulaire monocouche sans sécrétion	Epithélium glandulaire monocouche avec sécrétion	Total
Tissu mammaire M4	1 (6%)	5 (24%)	1 (3%)	15 (68%)	22 (100%)
Tissu interscapulaire	24 (9%)	38 (14%)	54 (20%)	156 (57%)	272 (100%)



IDTM des différentes structures mammaires visibles microscopiquement au sein du tissu interscapulaire et du tissu mammaire M4, après 28 jours de supplémentation en œstrogènes et dix jours de privation



Répartition des structures mammaires au sein du tissu mammaire M4, après 28 jours de supplémentation en œstrogènes et dix jours de privation

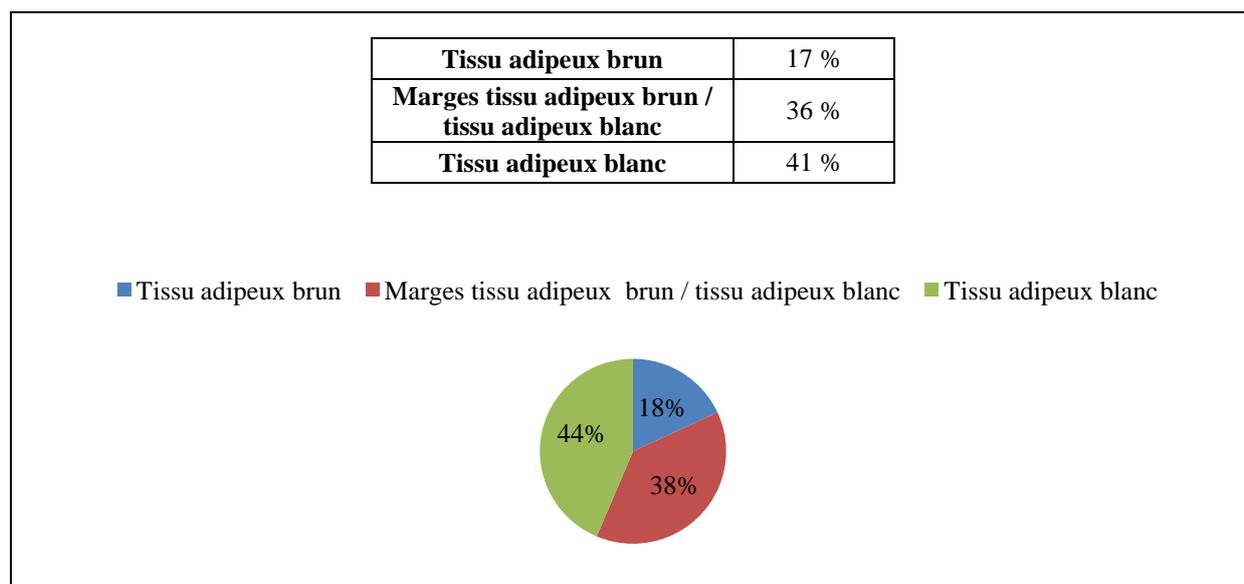
Répartition des structures mammaires au sein du tissu interscapulaire, après 28 jours de supplémentation en œstrogènes et dix jours de privation

Compte tenu de l'effectif du lot d'animaux (trois souris), il n'apparaît pas de différences entre la région mammaire M4 et la région interscapulaire.

Les deux régions d'intérêt comportent majoritairement des structures épithéliales glandulaires avec sécrétions.

La figure 42 indique la répartition du tissu mammaire au sein des différents types de tissus adipeux en région interscapulaire, après 28 jours de supplémentation en œstrogènes et dix jours de privation.

Figure 42 : Répartition du tissu mammaire au sein des différents types de tissus adipeux en région interscapulaires, après 28 jours de supplémentation en œstrogènes et dix jours de privation



18% des structures mammaires observées en région interscapulaire sont situées au sein du tissu adipeux brun (contre 26% à l'étape précédente) et 35% sont au sein des marges de tissu adipeux brun et du tissu adipeux blanc.

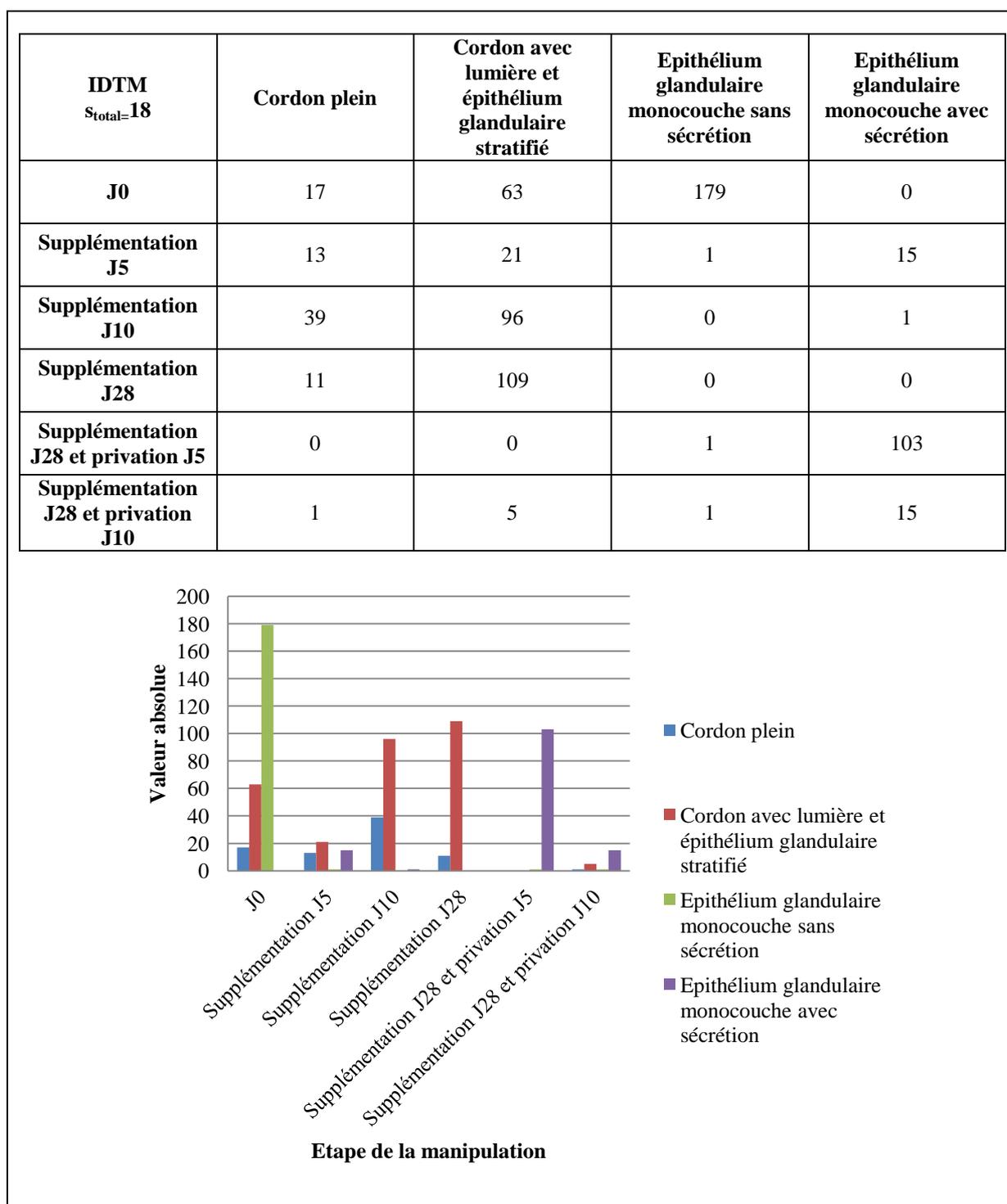
En résumé, après 28 jours de supplémentation en œstrogènes et dix jours de privation :

- Il n'apparaît pas de différences entre la région mammaire M4 et la région interscapulaire et les deux régions d'intérêt comportent majoritairement des structures épithéliales glandulaires avec sécrétions.
- Des structures mammaires sont visualisables au sein du tissu adipeux brun interscapulaire.
- Au sein des coupes d'ovaires, on observe à la fois des follicules primordiaux, primaires, secondaires, tertiaires, atrésiques et des corps progestatifs.

2.2.4 Bilan de l'étude du développement du tissu mammaire au cours de la supplémentation puis de la privation en œstrogènes

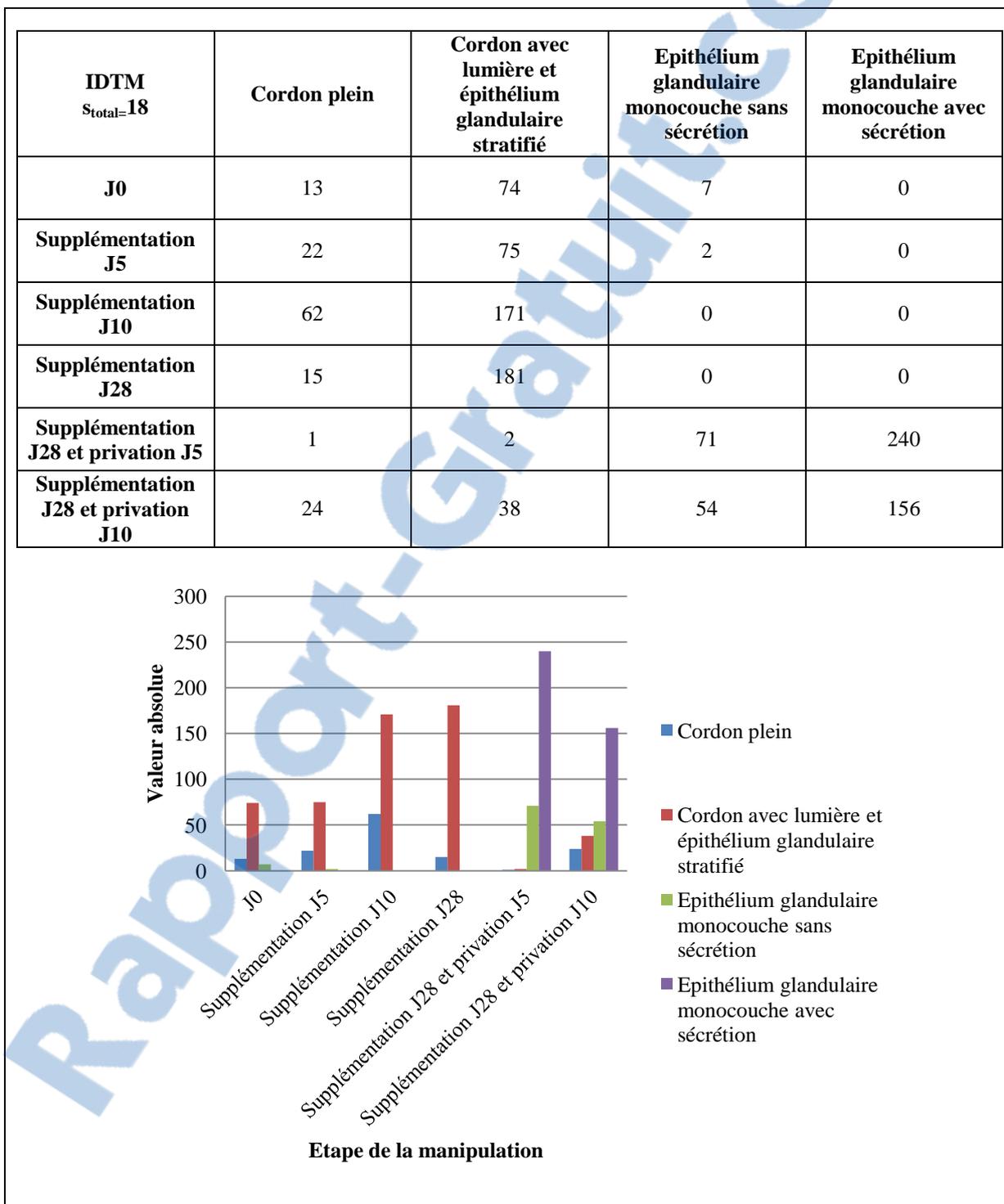
La figure 43 présente l'évolution en valeur absolue de chaque type de structure mammaire au sein du tissu mammaire M4 au cours des différentes étapes du protocole de supplémentation puis de privation en œstrogènes.

Figure 43 : Évolution en valeur absolue de chaque structure mammaire au sein du tissu mammaire M4 au cours des différentes étapes de supplémentation en œstrogènes, puis de privation



La figure 44 présente l'évolution en valeur absolue de chaque type de structure mammaire au sein du tissu mammaire interscapulaire au cours des différentes étapes du protocole de supplémentation puis de privation en œstrogènes.

Figure 44 : Évolution en valeur absolue de chaque structure mammaire au sein du tissu interscapulaire au cours des différentes étapes de supplémentation en œstrogènes, puis de privation



La variabilité individuelle des souris composant J₀ fait que les résultats obtenus à cet instant ne sont pas représentatifs. Pour cela il aurait fallu déterminer au préalable leur

position au sein du cycle sexuel au moment de leur sacrifice. On ne s'intéressera à interpréter le graphe qu'à partir de la supplémentation en œstrogènes.

Si on compare l'évolution en valeur absolue des différentes structures mammaires au sein du tissu mammaire M4 et au sein du tissu interscapulaire au cours des différentes étapes de supplémentation puis de privation en œstrogènes, on constate, compte tenu des effectifs en souris à chaque étape que celle-ci est comparable dans les deux zones d'intérêt. Ainsi il y a une bonne corrélation entre le développement du tissu mammaire en région mammaire M4 et celui en région interscapulaire au cours des différentes étapes de supplémentation puis de privation en œstrogènes.

La répartition du tissu mammaire en région interscapulaire, au sein des différents types de tissus adipeux, est modifiée au cours du cycle sexuel.

Deux hypothèses peuvent être envisagées. La première consiste en une différenciation du tissu adipeux brun en tissu adipeux blanc induite par les bourgeons mammaires ce qui explique l'augmentation de la proportion de structures mammaires visibles aux marges du tissu adipeux blanc et du tissu adipeux brun. La seconde hypothèse consiste en une infiltration ou une exfiltration du tissu adipeux brun par le tissu mammaire thoracique crânial suivant l'étape de supplémentation ou de privation en œstrogènes.

En résumé, au cours de la supplémentation puis de la privation en œstrogènes :

- Il y a une bonne corrélation entre le développement du tissu mammaire en région mammaire M4 et celui en région interscapulaire au cours des différentes étapes de supplémentation et de privation en œstrogènes.
- La répartition du tissu mammaire en région interscapulaire, au sein des différents types de tissus adipeux, est modifiée au cours des différentes étapes de supplémentation et de privation en œstrogènes.
- Au sein des coupes d'ovaires, on observe à la fois des follicules primordiaux, primaires, secondaires, tertiaires, atrésiques et des corps progestatifs.

III. Discussion

1. En fonction du cycle sexuel

Compte tenu des effectifs des lots d'animaux à chaque étape du cycle sexuel, il y a une bonne corrélation entre le développement du tissu mammaire observé en région mammaire M4 et celui observé en région interscapulaire.

Le tissu mammaire ventral se développe à partir du stade præstrus jusqu'au stade metœstrus puis s'involve au cours du stade diœstrus. Les bourrelets adipeux bruns de la région interscapulaire sont infiltrés par le tissu mammaire thoracique crânial au cours des étapes de præstrus et d'œstrus. Cela indique qu'il existe une croissance extensive du tissu mammaire thoracique crânial au sein du tissu adipeux brun. Celui-ci est cependant dépourvu de structures mammaires au cours des étapes de metœstrus et de diœstrus (quelques structures sont tout de même visualisables) ce qui laisse penser à une involution progressive du tissu mammaire thoracique crânial au cours de ces étapes ou bien à une différenciation du tissu adipeux brun en tissu adipeux blanc induite par les bourgeons mammaires.

En accord avec ce qui a été décrit dans la partie I.2.2.1, chez la souris vierge pubère, la croissance des glandes mammaires suit le cycle sexuel. Cependant, il est indiqué que la prolifération des canaux galactophores a lieu au cours des étapes de præstrus et d'œstrus et que ceux-ci régressent au moment des étapes de metœstrus et de diœstrus ; or nous avons noté la présence d'un tissu mammaire ventral actif à l'étape metœstrus (associé cependant à une diminution de l'infiltration interscapulaire). Ce décalage dans les résultats peut provenir du fait que d'après CRISPENS (1975), le cycle sexuel de la souris est compris entre quatre et cinq jours et la durée de chaque étape du cycle est comprise dans un intervalle de temps relativement large. Il se peut donc que le cycle que nous avons déterminé soit anticipé par rapport au cycle réel de nos souris.

Afin de déterminer avec certitude l'étape exacte du cycle dans laquelle se trouvent nos souris, il aurait été intéressant de réaliser des frottis vaginaux réguliers sur l'ensemble de nos souris ou un prélèvement du corps utérin au moment du sacrifice de l'animal. En effet, l'absence du bouchon muqueux ne révèle pas l'absence de coït. Le bouchon muqueux a pu tomber pendant la nuit.

Un dosage de l'œstrogénémie au moment du sacrifice de l'animal aurait permis de connaître la concentration plasmatique en œstrogènes de nos souris à chaque étape du cycle sexuel et donc à chaque étape du cycle de développement du tissu mammaire.

2. En fonction de la supplémentation puis de la privation en œstrogènes

Compte tenu des effectifs des lots d'animaux à chaque étape du cycle sexuel, il y a une bonne corrélation entre le développement du tissu mammaire observé en région mammaire M4 et celui observé en région interscapulaire.

En l'absence de supplémentation en œstrogènes, le tissu mammaire ventral du lot témoin n'a pas montré de différenciation marquée à J₀. Un faible nombre de structures épithéliales monocouches sans sécrétion ont cependant été visualisées. La différenciation du tissu mammaire des souris du lot témoin est régulée suivant le cycle sexuel des souris. Il y a donc un cycle de multiplication/différenciation/involution. Or les souris n'ayant pas été mises en présence de mâles vasectomisés ou des prélèvements vaginaux ou utérins n'ayant pas été

réalisés, les résultats obtenus ne sont pas représentatifs d'un instant donné du fait de la variabilité individuelle de chaque souris.

La différenciation du tissu mammaire au cours de la supplémentation en œstrogènes est faible. En effet le nombre de structures mammaires différenciées, ainsi que l'infiltration de la région interscapulaire par le tissu mammaire thoracique crânial est faible. On note tout de même une augmentation du nombre de cordons avec lumière et épithélium glandulaire stratifié jusqu'à 28 jours de supplémentation ce qui laisse penser à la mise en place d'une différenciation progressive du tissu mammaire dans les deux régions d'intérêt. Pour confirmer cela, il aurait été intéressant de réaliser des prélèvements dans les deux régions d'intérêt entre J₁₀ et J₂₈. De plus, l'utilisation du protocole « Whole Mount » comme méthode de prélèvement nous aurait permis de mieux visualiser l'arborisation et surtout l'infiltration du tissu mammaire thoracique crânial au sein des bourrelets de tissu adipeux brun.

La différenciation du tissu mammaire est remarquable après cinq jours de privation en œstrogènes. Cela se manifeste par l'apparition de structures différenciées actives telles que des structures épithéliales glandulaires monocouches avec sécrétion. De plus à ce stade le bourrelet adipeux brun interscapulaire est infiltré par le tissu mammaire thoracique crânial.

Un processus d'involution se met en place par la suite. En effet après dix jours de privation, le nombre de structures mammaires différenciées diminue en faveur de structures peu différenciées. De plus à ce stade il y a une régression de l'infiltration du tissu adipeux brun par le tissu mammaire thoracique crânial ou une dédifférenciation du tissu adipeux brun en tissu adipeux blanc induite par les cellules mésenchymateuses mammaires.

On peut supposer que la supplémentation à forte concentration en œstrogènes, ainsi que la privation (suite à une supplémentation à forte concentration), ont un rôle dans le cycle de développement du tissu mammaire murin.

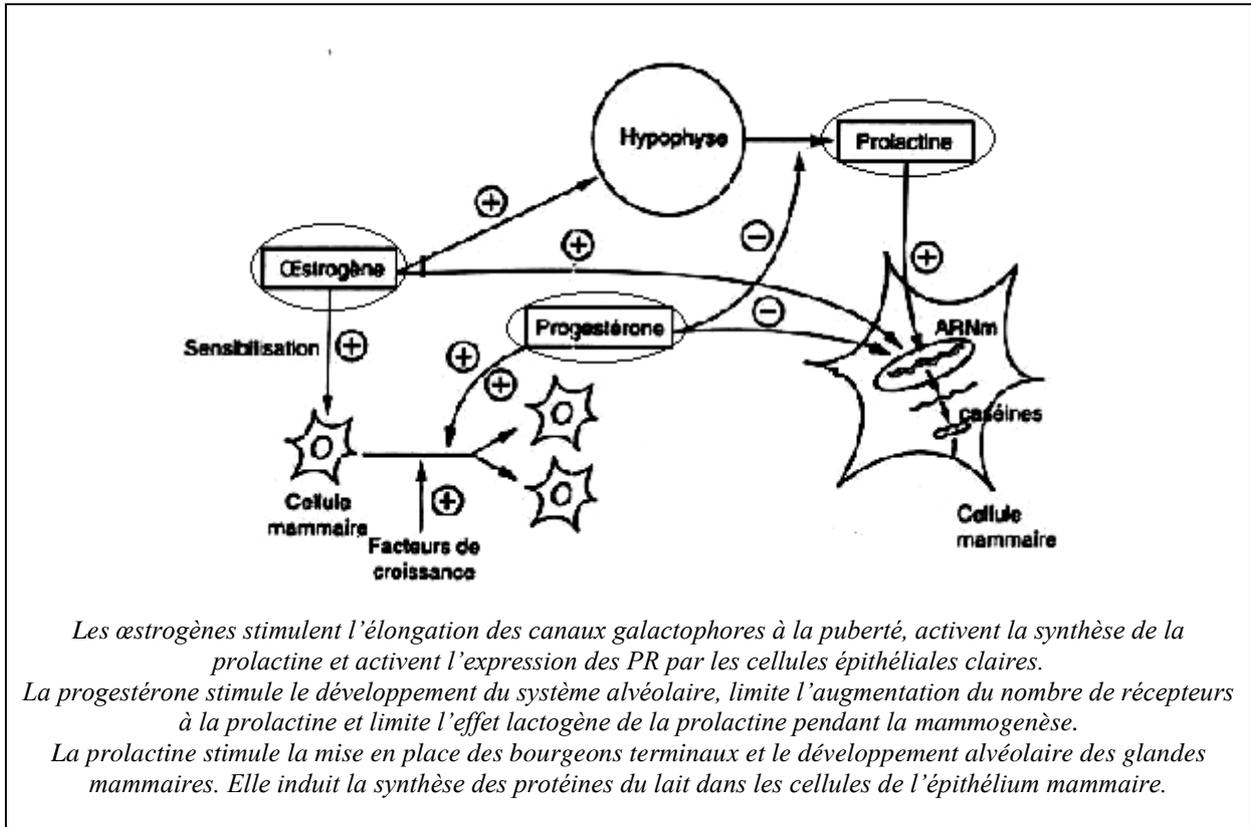
Une supplémentation en œstrogènes à 8.5 ng/ml induit une multiplication et la mise en place d'une différenciation lentes et progressives du tissu mammaire ventral, les structures mammaires restant non fonctionnelles, et une infiltration progressive de la région interscapulaire par le tissu mammaire thoracique crânial.

Une privation en œstrogènes (suite à une supplémentation de 28 jours à 8.5 ng/ml), induit une différenciation du tissu mammaire ventral en structures fonctionnelles avec une infiltration marquée de la région interscapulaire par le tissu mammaire thoracique crânial pendant au moins 5 jours puis s'ensuit une involution du tissu mammaire au maximum dix jours après privation. Il aurait été intéressant de réaliser des prélèvements plus rapprochés sur cette période de dix jours afin de définir plus précisément le comportement du tissu mammaire à l'arrêt de la supplémentation en œstrogènes.

Afin de mieux comprendre le phénomène physiologique sous jacent dont nos résultats découlent, il aurait été intéressant de doser l'œstrogénémie des souris au moment de leur sacrifice afin de s'assurer qu'elles aient toutes consommées une quantité équivalente d'œstrogènes selon leur date de prélèvement et de pouvoir comparer leur concentration plasmatique en œstrogènes à des valeurs de références.

Comme il a été vu dans la partie I.5, plusieurs facteurs interviennent dans le développement du tissu mammaire chez la souris adulte. Parmi ces facteurs, les plus importants restent les œstrogènes, la progestérone et la prolactine. Ces trois hormones agissent directement sur les cellules mammaires par l'intermédiaire de leurs récepteurs. La figure 45 illustre leur mode d'action.

Figure 45 : Mode d'action des œstrogènes, de la progestérone et de la prolactine sur les cellules mammaires
D'après HOUDEBINE (1986)



Il sera intéressant de mesurer le nombre de récepteurs à ces trois hormones présents en région interscapulaire et en région mammaire ventrale à chaque étape de l'étude, que ce soit sur le cycle sexuel ou au cours de la supplémentation puis de la privation en œstrogènes. Cette quantification est prévue, à l'aide d'immunomarquages, et doit être réalisée en prolongation de cette thèse.

CONCLUSION

En conclusion, l'étude du développement du tissu mammaire chez la souris adulte en région interscapulaire comparée à la région ventrale pérिमamelonnaire sous l'influence des œstrogènes avait pour problématique de déterminer si la région des bourrelets adipeux bruns interscapulaires pouvait être considérée comme une zone de greffe orthotopique en vue de l'implantation de tumeurs mammaires humaines. On rappelle qu'une greffe est dite orthotopique si elle est réalisée dans son tissu habituel.

Les résultats obtenus au cours de l'étude montrent que le développement du tissu mammaire est voisin en région mammaire M4 et en région interscapulaire et que l'infiltration du tissu mammaire thoracique crânial en région interscapulaire varie en fonction des étapes du cycle ou des conditions expérimentales (supplémentation en œstrogènes, arrêt de cette supplémentation).

Ainsi les variations œstrogéniques au cours du cycle sexuel et celles induites expérimentalement ont un effet sur le développement du tissu mammaire et sur la prolifération du tissu mammaire thoracique crânial à proximité des bourrelets de tissu adipeux bruns.

Compte tenu de la taille des effectifs des lots d'animaux utilisés, aucune différence n'a été prouvée entre le développement du tissu mammaire observé en région pérिमamelonnaire et celui observé en région interscapulaire. La région interscapulaire peut donc être considérée comme une zone de greffe orthotopique.

BIBLIOGRAPHIE

AUPPERLEE M.D., HASLAM S.Z. (2007). Differential Hormonal Regulation and Function of Progesterone Receptor Isoforms in Normal Adult Mouse Mammary Gland, *Endocrinology*, **148**, 2290-2300

BINGEL A.S, SCHWARTZ N.B (1969). Timing of LH release and ovulation in the cyclic mouse. *J. Reprod. Fertil.*, **19**, 223-229

BOCCHINFUSO W.P., LINDZEY J.K., HEWITT S.C., CLARK J.A., MYERS P.H., COOPER R., *et al.* (2000). Induction of mammary gland development in estrogen receptor α knockout mice. *Endocrinology*, **141**, 2982-2994

BORELLINI F., OKA T. (1989). Growth control and differentiation in mammary epithelial cells. *Environmental health perspectives*, **80**, 85-99

BRONSON F.H, CHANNING C.P (1978). Suppression of serum follicle-stimulating hormone by follicular fluid in the maximally oestrogenized ovariectomized mouse. *Endocrinology*, **103**, 1894-1898

CERIANI R.L. (1974). Hormones and other factors controlling growth in the mammary gland: a review. *Journal of investigative Dermatology*, **63**, 93-108

CONLEY A. and HINSHELWOOD M. (2011). Mammalian aromatases. *Reproduction*, **121**, 685-695

CONNELY O.M., MULAC-JERICEVIC B., LYDON JP. (2003). Progesterone-dependant regulation of female reproductive activity by two distinct progesterone receptor isoforms. *Steroids*, **68**, 771-778

CORDONNIER N., FONTAINE J.J. (2006). *Histologie de l'appareil génital*. Polycopié. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Unité Pédagogique d'Histologie, Embryologie et Anatomie-Pathologique vétérinaires, 1-7

CRABTREE J.S., PEANO B.J., ZHANG X., KOMM B.S., WINNEKER R.C., HARRIS H.A. (2008). Activity of three selective estrogen receptor modulators on hormone-dependent responses in the mouse uterus and mammary gland, *Molecular and Cellular Endocrinology*, **287**, 40-46

CREASY D., CARTWRIGHT J., MORELAND S., WILLOUGHBY C., COLLIER M., ODUM J. (2003). *Endocrine disruption: a guidance document for histologic evaluation of endocrine and reproductive tests*. Draft 3, Part 3

CRISPENS C.G. (1975). Handbook on the Laboratory Mouse, Springfield, Illinois, USA, Charles C. Thomas Publisher, 63

DE ASSIS S., WARRI A., IDALIA CRUZ M., HILAKIVI-CLARKE L. (2010). Changes in mammary gland morphology and breast cancer risk in rats. *J. Vis. Exp.*, **44**, 1-3

FAULDS M.H., OLSEN H., HELGUERO L.A., GUSTAFSSON J.A., HALDOSEN L.A. (2003). Estrogen receptor functional activity changes during differentiation of mammary epithelial cells. *Molecular endocrinology*, **18**, 412-421

GAYRARD V. (2007). *Physiologie de la reproduction des mammifères*. Polycopié. Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, Unité Pédagogique de Physiologie et Thérapeutique, 183

GOLOVINE K., SCHWERIN M., VANSELOW J. (2003). Three different promoters control expression of the aromatase cytochrome P450 gene (CYP 19) in mouse gonads and brain. *Biology of reproduction*, **68**, 978-984

GREGG RICHARDS R., KLOTZ D.M., WALKER M.P., DIUGUSTINE R.P. (2004). Mammary gland branching morphogenesis is diminished in mice with a deficiency of insulin-like growth factor-I (IGF-I), but not in mice with a liver-specific deletion of IGF-I. *Endocrinology*, **145**, 3106-3110

HEWITT S.C., KORACH K.S. (2003). Oestrogen receptor knockout mice: roles for oestrogen receptor α and β in reproductive tissues. *Reproduction*, **125**, 143-149

HICKEY G.J., CHEN S.A., BESMAN M.J., SHIVELY J.E., HALL P.F., GADDY-KURTEN D. *et al.* (1988). Hormonal regulation, tissue distribution and content aromatase cytochrome P450 messenger ribonucleic acid and enzyme in rat ovarian follicles and corpora lutea: relationship to estradiol biosynthesis. *Endocrinology*, **122**, 1426-1436

HOUDEBINE L.M. (1986). La physiologie de la lactation humaine, la lactation et ses troubles. *La Revue du Praticien*, **36** (27), 1495-1507

JAUZEIN F. (mise à jour le 10 Juillet 2006). Métabolisme des œstrogènes. Épidémiologie et santé, Cancers du sein : acces [http://acces.ens-lyon.fr/acces/ressources/sante/epidemiologie/cancersein/risq_cancer_sein/MetabOestrog.jpg/view] (consultée le 29 avril 2012)

JONES T.C., MOHR U., HUNT R.D. (1990). Integument and Mammary Glands. Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Springer-Verlag, 233-252

KARIAGINA A., AUPPERLEE M.D., HASLAM S.Z. (2007). Progesterone Receptor Isoforms and Proliferation in the Rat Mammary Gland during Development. *Endocrinology*, **148**, 2723-2736

LARSEN W.J., SCHOENWOLF G.C., BLEYL S., BRAUER R., FRANCIS-XEST P.H. (2011). Embryologie humaine, 3rd ed. Oxford, de Boeck, 209

LEMMEN J.G., BROEKHOF J.L.M., KUIPER G.G.J.M., GUSTAFSSON J.A., VAN DER SAAG P.T., VAN DER BURG B. (1999). Expression of estrogen receptor alpha and beta during mouse embryogenesis. *Mechanisms of Development* **81**, 163-167

LEPHART E.D. (1996). A review of brain aromatase cytochrome P450. *Brain research reviews*, **22**, 1-26

- LIN Y., LI Q. (2005). The regulation of development and lactation of the mammary gland by leptin. *The journal of American science*, **1**, 63-67
- MARCHLEWSKA-KOJ A., BIALY E. (1978). Modification of the estrous cycle by urinary proteins of male mice. *Folia Bol.*, **26**, 311-314
- MARTINET J., HOUDEBINE L.M. (1993). Biologie de la lactation. Paris, Versailles, Éd. INSERM, Éd. INRA, 174
- McCARTY K.S., McCARTY K.S.Jr. (1975). Early mammary gland responses to hormones. *Journal of Dairy Science*, **58**, 1022-1032
- MUELLER S.O., CLARK J.A., MYERS P.H., KORACH K.S. (2002). Mammary Gland Development in Adult Mice requires Epithelial and Stromal Estrogen Receptor α . *Endocrinology*, **143**, 2357-2365
- MULAC-JERICEVIC B., LYDON J.P., DEMAYO F.J., CONNEELY O.M. (2003). Defective mammary gland morphogenesis in mice lacking the progesterone receptor B isoform. *Proc Natl Acad Sci USA*, **100**, 9744-9749
- MURR S.M., GESCHWIND I.I., BRADFORD G.E. (1973). Plasma LH and FSH during different estrous cycle conditions in mice. *J. Reprod. Fertil*, **32**, 221-230
- NING Y., HOANG B., SCHULLER A.G.P., COMINSKI T.P., HSU M.S., WOOD T.L. *et al.* (2007). Delayed mammary gland involution in mice with mutation of the insulin-like growth factor binding protein 5 gene. *Endocrinology*, **148**, 2138-2147
- PORTER J.C. (1974). Hormonal regulation of breast development and activity. *The Journal of Investigative Dermatology*, **63**, 85-92
- RASMUSSEN S.B., YOUNG L.J.T., SMITH G.H. (2000). Methods in mammary gland biology and breast cancer research, New York, Ip and Asch. Kluwer Academic/Plenum Publishers, 75-83
- RAYNAUD A. (1961). Morphogenesis of the mammary gland, New York and London Academic Press,
- RICHARDS R.G., KLOTZ D.M., WALKER M.P., DIAUGUSTINE R.P. (2004). Mammary Gland Branching Morphogenesis Is Diminished in Mice with a Deficiency of insulin-like Growth factor-I (IGF-I), But Not in Mice with a Liver-Specific Deletion of IGF-I. *Endocrinology*, **145**, 3106-3110
- RUGH R. (1990). The mouse, Its Reproduction and Development, Oxford University Press, 41-43
- SAJI S., JENSEN E.V., NILSSON S., RYLANDER T., WARNER M., GUSTAFSSON J.A. (2000). Estrogen receptors α and β in the rodent mammary gland. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 337-342

SCULLY K.M., GLEIBERMAN A.S., LINDZEY J., LUBAHN D.B., KORACH K.S., ROSENFELD M.G. (1997). Role of estrogen receptor- α in the anterior pituitary gland. *Molecular endocrinology*, 11, 674-681

SHYAMALA G., YANG X., SILBERSTEIN G., BARCELLOS-HOFF M.H., DALE E. (1998). Transgenic mice carrying an imbalance in the native ratio of A to B forms of progesterone receptor exhibit development abnormalities in mammary glands. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**, 696-701

SHYAMALA G., YANG X., CARDIFF R.D., DALE E. (2000). Impact of progesterone receptor on cell-fate decisions during mammary gland development. *Proc Natl Acad Sci USA*, **97**, 3044-3049

SOBOTTA J., WELSCH U. (2004). Précis d'histologie, E. M. Inter.-Lavoisier, 477-486

THE STAFF of THE JACKSON LABORATORY (1989). Biology of the Laboratory Mouse, 2nd ed., New York, Dover Publications, Inc., 267-269

STINGL J. (2011). Estrogen and progesterone in normal mammary gland development and in cancer. *Horm. Cana.*, **2**, 85-90

TIRET L. (2008). *Physiologie de l'appareil reproducteur*. Polycopié. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Unité Pédagogique de Physiologie et Thérapeutique, 16-19

WHITTEN W.K. (1966). Pheromones and mammalian reproduction. *Adv. Reprod. Physiol*, **1**, 155-177

WOLFENSOHN S., LLOYD M. (1998). Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare, 2nd ed., Oxford, Blackwell Science

WOOD T.L., YEE D. (2000). Introduction: IGFs and IGFs in the normal mammary gland and in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, **5**, 1-5

ZHAO H., INNES J., BROOKS D.C., REIERSTAD S., YIMAZ M.B., LIN Z., *et al.* (2009). Novel promoter controls Cyp19a1 gene expression in mouse adipose tissue. *Reproductive biology and endocrinology*, **7**, 1-9

Annexe 1 : En proœstrus

Tableau 8 : Dénombrement des structures mammaires par animal en région mammaire M4, au stade proœstrus du cycle sexuel

	Cordon plein	Cordon avec lumière et épithélium glandulaire stratifié	Epithélium glandulaire monocouche sans sécrétion	Epithélium glandulaire monocouche avec sécrétion
	Valeur absolue			
Souris 1	16	3	24	80
Souris 2	50	23	11	89
Souris 3	167	351	259	231

Tableau 9 : Dénombrement des structures mammaires par animal et répartition du tissu mammaire au sein des différents types de tissu adipeux en région interscapulaire, au stade proœstrus du cycle sexuel

	Cordon plein	Cordon avec lumière et épithélium glandulaire stratifié	Epithélium glandulaire monocouche sans sécrétion	Epithélium glandulaire monocouche avec sécrétion	Tissu adipeux brun	Marge tissu adipeux brun / tissu adipeux blanc	Tissu adipeux blanc
	Valeur absolue				%		
Souris 1	15	2	17	165	3	94	3
Souris 2	1	4	4	5	86	14	0
Souris 3	45	108	95	68	0	95	5

Annexe 2 : En œstrus

Tableau 10 : Dénombrement des structures mammaires par animal en région mammaire M4, au stade œstrus du cycle sexuel

	Cordon plein	Cordon avec lumière et épithélium glandulaire stratifié	Epithélium glandulaire monocouche sans sécrétion	Epithélium glandulaire monocouche avec sécrétion
	Valeur absolue			
Souris 1	38	78	78	66

Tableau 11 : Dénombrement des structures mammaires par animal et répartition du tissu mammaire au sein des différents types de tissu adipeux en région interscapulaire, au stade œstrus du cycle sexuel

	Cordon plein	Cordon avec lumière et épithélium glandulaire stratifié	Epithélium glandulaire monocouche sans sécrétion	Epithélium glandulaire monocouche avec sécrétion	Tissu adipeux brun	Marge tissu adipeux brun / tissu adipeux blanc	Tissu adipeux blanc
	Valeur absolue				%		
Souris 1	5	34	4	4	45	55	0

Annexe 3 : En metœstrus

Tableau 12 : Dénombrement des structures mammaires par animal en région mammaire M4, au stade metœstrus du cycle sexuel

	Cordon plein	Cordon avec lumière et épithélium glandulaire stratifié	Epithélium monocouche sans sécrétion	Epithélium monocouche avec sécrétion
	Valeur absolue			
Souris 1	52	62	43	76
Souris 2	89	389	60	289
Souris 3	28	109	20	11

Tableau 13 : Dénombrement des structures mammaires par animal et répartition du tissu mammaire au sein des différents types de tissu adipeux en région interscapulaire, au stade metœstrus du cycle sexuel

	Cordon plein	Cordon avec lumière et épithélium glandulaire stratifié	Epithélium monocouche sans sécrétion	Epithélium monocouche avec sécrétion	Tissu adipeux brun	Marge tissu adipeux brun / tissu adipeux blanc	Tissu adipeux blanc
	Valeur absolue				%		
Souris 1	Non interprétable				Non interprétable		
Souris 2	76	198	103	41	11	83	6
Souris 3	46	54	30	7	2	98	0

Annexe 4 : En début de diœstrus

Tableau 14 : Dénombrement des structures mammaires par animal en région mammaire M4, au début du stade diœstrus du cycle sexuel

	Cordon plein	Cordon avec lumière et épithélium glandulaire stratifié	Epithélium glandulaire monocouche sans sécrétion	Epithélium glandulaire monocouche avec sécrétion
	Valeur absolue			
Souris 1	71	124	51	43
Souris 2	113	303	55	51
Souris 3	385	2012	363	134

Tableau 15 : Dénombrement des structures mammaires par animal et répartition du tissu mammaire au sein des différents types de tissu adipeux en région interscapulaire, au début du stade diœstrus du cycle sexuel

	Cordon plein	Cordon avec lumière et épithélium glandulaire stratifié	Epithélium glandulaire monocouche sans sécrétion	Epithélium glandulaire monocouche avec sécrétion	Tissu adipeux brun	Marge tissu adipeux brun / tissu adipeux blanc	Tissu adipeux blanc
	Valeur absolue				%		
Souris 1	21	32	13	1	0	100	0
Souris 2	26	37	18	32	1	99	0
Souris 3	129	1029	96	56	0	100	0

Annexe 5 : En fin de diœstrus

Tableau 16 : Dénombrement des structures mammaires par animal en région mammaire M4, à la fin du stade diœstrus du cycle sexuel

	Cordon plein	Cordon avec lumière et épithélium glandulaire stratifié	Epithélium glandulaire monocouche sans sécrétion	Epithélium glandulaire monocouche avec sécrétion
	Valeur absolue			
Souris 1	16	55	11	8
Souris 2	150	256	70	71
Souris 3	29	80	1	0

Tableau 17 : Dénombrement des structures mammaires par animal et répartition du tissu mammaire au sein des différents types de tissu adipeux en région interscapulaire, à la fin du stade diœstrus du cycle sexuel

	Cordon plein	Cordon avec lumière et épithélium glandulaire stratifié	Epithélium glandulaire monocouche sans sécrétion	Epithélium glandulaire monocouche avec sécrétion	Tissu adipeux brun	Marge tissu adipeux brun / tissu adipeux blanc	Tissu adipeux blanc
	Valeur absolue				%		
Souris 1	18	33	26	3	0	100	0
Souris 2	29	71	16	32	13	76	11
Souris 3	135	362	24	3	23	76	2

Annexe 6 : À J₀

Tableau 18 : Dénombrement des structures mammaires par animal en région mammaire M4, à J₀

	Cordon plein	Cordon avec lumière et épithélium glandulaire stratifié	Epithélium glandulaire monocouche sans sécrétion	Epithélium glandulaire monocouche avec sécrétion
	Valeur absolue			
Souris 1	13	54	39	0
Souris 2	3	6	125	0
Souris 3	1	3	15	0

Tableau 19 : Dénombrement des structures mammaires par animal et répartition du tissu mammaire au sein des différents types de tissus adipeux en région interscapulaire, à J₀

	Cordon plein	Cordon avec lumière et épithélium glandulaire stratifié	Epithélium glandulaire monocouche sans sécrétion	Epithélium glandulaire monocouche avec sécrétion	Tissu adipeux brun	Marge tissu adipeux brun / tissu adipeux blanc	Tissu adipeux blanc
	Valeur absolue				%		
Souris 1	2	8	0	0	0	0	100
Souris 2	11	52	7	0	3	0	97
Souris 3	0	14	0	0	0	0	100

Annexe 7 : Après cinq jours de supplémentation en œstrogènes

Tableau 20 : Dénombrement des structures mammaires par animal en région mammaire M4, après cinq jours de supplémentation en œstrogènes

	Cordon plein	Cordon avec lumière et épithélium glandulaire stratifié	Epithélium glandulaire monocouche sans sécrétion	Epithélium glandulaire monocouche avec sécrétion
	Valeur absolue			
Souris 1	0	2	0	0
Souris 2	68	75	4	75
Souris 3	0	16	0	0

Tableau 21 : Dénombrement des structures mammaires par animal et répartition du tissu mammaire au sein des différents types de tissu adipeux en région interscapulaire, après cinq jours de supplémentation en œstrogènes

	Cordon plein	Cordon avec lumière et épithélium glandulaire stratifié	Epithélium glandulaire monocouche sans sécrétion	Epithélium glandulaire monocouche avec sécrétion	Tissu adipeux brun	Marge tissu adipeux brun / tissu adipeux blanc	Tissu adipeux blanc
	Valeur absolue				%		
Souris 3	27	31	0	0	0	7	93
Souris 1	15	67	0	0	2	23	74
Souris 2	23	127	5	0	4	9	87

Annexe 8 : Après dix jours de supplémentation en œstrogènes

Tableau 22 : Dénombrement des structures mammaires par animal en région mammaire M4, après dix jours de supplémentation en œstrogènes

	Cordon plein	Cordon avec lumière et épithélium glandulaire stratifié	Epithélium glandulaire monocouche sans sécrétion	Epithélium glandulaire monocouche avec sécrétion
	Valeur absolue			
Souris 1	61	124	1	2
Souris 2	44	123	0	0
Souris 3	36	103	0	0

Tableau 23 : Dénombrement des structures mammaires par animal et répartition du tissu mammaire au sein des différents types de tissu adipeux en région interscapulaire, après dix jours de supplémentation en œstrogènes

	Cordon plein	Cordon avec lumière et épithélium glandulaire stratifié	Epithélium glandulaire monocouche sans sécrétion	Epithélium glandulaire monocouche avec sécrétion	Tissu adipeux brun	Marge tissu adipeux brun / tissu adipeux blanc	Tissu adipeux blanc
	Valeur absolue				%		
Souris 1	28	266	0	0	3	9	80
Souris 2	Non interprétable				Non interprétable		
Souris 3	97	99	0	0	4	27	69

Annexe 9 : Après 28 jours de supplémentation en œstrogènes

Tableau 24 : Dénombrement des structures mammaires par animal en région mammaire M4, après 28 jours de supplémentation en œstrogènes

	Cordon plein	Cordon avec lumière et épithélium glandulaire stratifié	Epithélium glandulaire monocouche sans sécrétion	Epithélium glandulaire monocouche avec sécrétion
	Valeur absolue			
Souris 1	15	138	0	0
Souris 2	Non interprétable			
Souris 3	7	79	0	0

Tableau 25 : Dénombrement des structures mammaires par animal et répartition du tissu mammaire au sein des différents types de tissu adipeux en région interscapulaire, après 28 jours de supplémentation en œstrogènes

	Cordon plein	Cordon avec lumière et épithélium glandulaire stratifié	Epithélium glandulaire monocouche sans sécrétion	Epithélium glandulaire monocouche avec sécrétion	Tissu adipeux brun	Marge tissu adipeux brun / tissu adipeux blanc	Tissu adipeux blanc
	Valeur absolue				%		
Souris 1	15	181	0	0	0	0	100
Souris 2	Non interprétable				Non interprétable		
Souris 3	Non interprétable				Non interprétable		

Annexe 10 : Après 28 jours de supplémentation et cinq jours de privation en œstrogènes

Tableau 26 : Dénombrement des structures mammaires par animal en région mammaire M4, après 28 jours de supplémentation et cinq jours de privation en œstrogènes

	Cordon plein	Cordon avec lumière et épithélium glandulaire stratifié	Epithélium glandulaire monocouche sans sécrétion	Epithélium glandulaire monocouche avec sécrétion
	Valeur absolue			
Souris 1	0	0	2	270
Souris 2	Non interprétable			
Souris 3	0	0	0	10

Non

Tableau 27 : Dénombrement des structures mammaires par animal et répartition du tissu mammaire au sein des différents types de tissu adipeux en région interscapulaire, après 28 jours de supplémentation et cinq jours de privation en œstrogènes

	Cordon plein	Cordon avec lumière et épithélium glandulaire stratifié	Epithélium glandulaire monocouche sans sécrétion	Epithélium glandulaire monocouche avec sécrétion	Tissu adipeux brun	Marge tissu adipeux brun / tissu adipeux blanc	Tissu adipeux blanc
	Valeur absolue				%		
Souris 1	2	0	115	597	60	16	25
Souris 2	1	6	12	116	12	22	64
Souris 3	1	4	92	65	6	21	73

Annexe 11 : Après 28 jours de supplémentation et dix jours de privation en œstrogènes

Tableau 28 : Dénombrement des structures mammaires par animal en région mammaire M4, après 28 jours de supplémentation et dix jours de privation en œstrogènes

	Cordon plein	Cordon avec lumière et épithélium glandulaire stratifié	Epithélium glandulaire monocouche sans sécrétion	Epithélium glandulaire monocouche avec sécrétion
	Valeur absolue			
Souris 1	2	4	0	24
Souris 2	2	11	0	3
Souris 3	0	1	2	19

Tableau 29 : Dénombrement des structures mammaires par animal et répartition du tissu mammaire au sein des différents types de tissu adipeux en région interscapulaire, après 28 jours de supplémentation et dix jours de privation en œstrogènes

	Cordon plein	Cordon avec lumière et épithélium glandulaire stratifié	Epithélium glandulaire monocouche sans sécrétion	Epithélium glandulaire monocouche avec sécrétion	Tissu adipeux brun	Marge tissu adipeux brun / tissu adipeux blanc	Tissu adipeux blanc
	Valeur absolue				%		
Souris 1	Non interprétable				Non interprétable		
Souris 2	35	35	81	216	14	37	34
Souris 3	12	41	27	96	19	34	48

**ÉTUDE DU DÉVELOPPEMENT DU TISSU MAMMAIRE CHEZ LA SOURIS
ADULTE EN RÉGION INTERSCAPULAIRE COMPARÉE À LA RÉGION
VENTRALE PÉRIMAMELONNAIRE SOUS L'INFLUENCE DES ŒSTROGÈNES**

NOM et Prénom : FERRIER Edwige

Résumé

Le tissu mammaire murin se développe comme dans toutes les espèces de mammifères en région ventrale du tronc et a la particularité de s'étendre en région interscapulaire, à proximité d'un bourrelet adipeux brun, depuis le tissu mammaire thoracique crânial.

L'étude du développement du tissu mammaire murin en région interscapulaire sous l'effet des œstrogènes s'applique dans une dynamique de recherche d'une thérapeutique ciblée contre le cancer du sein chez la femme. Le travail de recherche sur lequel repose cette thèse est réalisé en étroite collaboration avec le Laboratoire d'Investigations Précliniques (LIP) de l'Institut Curie dont les travaux sont dédiés à la lutte contre le cancer. Les chercheurs du LIP travaillent notamment sur des modèles de xéno greffes de cancer du sein entretenues sur des souris immunodéficientes. Les greffes sont effectuées en région interscapulaire, sous le bourrelet adipeux brun. Afin que la greffe prenne, les souris sont complémentées à haute concentration en œstrogènes pendant toute la durée de la prise et de la croissance de la greffe. La supplémentation en œstrogènes est généralement arrêtée lorsque les souris entrent en phase d'essai thérapeutique.

Un des critères considéré comme important dans l'évaluation de la pertinence des modèles de xéno greffes est que la greffe soit en position orthotopique. Il est donc intéressant de connaître l'extension du tissu mammaire murin en région interscapulaire et de caractériser les effets des œstrogènes, qui sont appliqués pendant toute la durée de l'expérimentation. Pour cela des souris nude sont utilisées et l'extension du tissu mammaire en région interscapulaire est étudiée au cours de leur cycle sexuel et au cours d'une supplémentation orale en œstrogènes pendant une période de 28 jours suivie d'une période de privation de 10 jours.

Cette étude montre que les œstrogènes ont un effet similaire sur la prolifération du tissu mammaire en région périmamelonnaire et en région interscapulaire et sur l'infiltration du tissu mammaire thoracique crânial à proximité des bourrelets de tissu adipeux bruns. La région interscapulaire à proximité du bourrelet adipeux brun peut donc être considérée comme une zone de greffe orthotopique.

Mots clés : MAMELLE/ SEIN/ ŒSTROGENE/ XÉNOGREFFE/ CANCER/
EXPERIMENTATION ANIMALE/ RONGEUR/ SOURIS

Jury :

Président : Pr.

Directeur : Pr. Jean-Jacques FONTAINE

Assesseur : Dr. Laurent TIRET

STUDY OF THE DEVELOPMENT OF BREAST TISSUE IN ADULT MICE IN INTERSCAPULAR REGION COMPARED TO VENTRAL REGION UNDER THE INFLUENCE OF ESTROGENS

SURNAME: FERRIER

Given name: Edwige

Summary

The murine mammary tissue develops as in all mammalian species in the ventral trunk and has the characteristic to expand in interscapular region, near a brown fat pad, since the cranial thoracic mammary tissue.

The study of tissue development in murine mammary interscapular region under the effect of estrogens is applied in a dynamic search of a targeted therapy against breast cancer in women. This thesis is conducted in close collaboration with the Laboratory of Preclinical Investigations (LPI) of the Curie Institute, which work is dedicated to the fight against cancer. LPI researchers are working on particular models of breast cancer xenografts maintained in immunodeficient mice. Transplants are performed in the interscapular region, under the bead brown adipose tissue. So that the graft takes, the mice are supplemented with high concentration of estrogens throughout the duration of intake and growth of the graft. Estrogens supplementation is generally stopped when the mice come into phase clinical trial

One of the criteria considered important in assessing the relevance of xenograft models is that the graft is in orthotopic position. It is therefore interesting to know the extension of murine mammary tissue in the interscapular region and to characterize the effects of estrogens applied throughout the experimental period. For that nude mice were used and the extension of breast tissue in the interscapular region was studied during their sexual cycle and during an oral supplementation of estrogens over a period of 28 days followed by a period of deprivation of 10 days.

This study suggests that estrogens have a similar effect on the proliferation of breast tissue in ventral region and interscapular region and on the infiltration of the breast tissue located near the cranial thoracic ribs of brown adipose tissue. The interscapular region near the bead brown adipose tissue may therefore be considered as an orthotopic graft area.

Keywords: MAMMAL/ BREAST/ ESTROGEN/ XENOGRAFT/ CANCER/ ANIMAL EXPERIMENTATION/ RODENT/ MICE

Jury :

President : Pr.

Director : Pr. Jean-Jacques FONTAINE

Assessor : Dr. Laurent TIRET