



# Etude du rôle des intégrines liant la laminine dans le développement et la tumorigenèse mammaires

Stéphanie Cagnet

## ► To cite this version:

Stéphanie Cagnet. Etude du rôle des intégrines liant la laminine dans le développement et la tumorigenèse mammaires. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2013. Français. NNT : 2013PA11T079 . tel-01087869

HAL Id: tel-01087869

<https://theses.hal.science/tel-01087869>

Submitted on 27 Nov 2014

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Comprendre le monde,  
construire l'avenir®



## UNIVERSITE PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE : *Cancérologie, Biologie, Médecine, Santé*  
Laboratoire : Mécanismes moléculaires du développement de la glande mammaire

*DISCIPLINE : Médecine*

### THÈSE DE DOCTORAT

soutenue le 26 Novembre 2013

par

**Stéphanie CAGNET**

**Etude du rôle des intégrines liant la laminine  
dans le développement et la tumorigénèse  
mammaires**

**Directeur de thèse :**

Marina GLUKHOVA

DR1 INSERM (Institut Curie - UMR144)

**Composition du jury :**

*Président du jury :*  
*Rapporteurs :*

Sandrine HUMBERT  
Marc BLOCK

DR2 INSERM (Institut Curie - UMR3306/U1005)  
Professeur (Institut Albert Bonniot de Grenoble -  
U823)

*Examinateurs :*

Keltouma DRIOUCH  
Adèle DE ARCANGELIS  
Karine RAYMOND

Cadre de Biologie (Institut Curie - U735)  
CR1 CNRS (Institut de Génétique et de Biologie  
Moléculaire et Cellulaire de Illkirch - U381)  
CR1 INSERM (Saint Antoine Research Center, UPMC  
Université Paris 6 - U938)

**Etude du rôle des intégrines liant la laminine  
dans le développement et la tumorigenèse mammaires**

## RESUMES

---

Le développement de traitements thérapeutiques du cancer du sein reste limité par le niveau de connaissance des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués lors du développement normal et tumoral de la glande mammaire. L'épithélium mammaire est entouré d'une matrice extracellulaire (MEC) organisée, la membrane basale, dont le constituant principal est la laminine. Des études ont montré que les interactions entre les cellules mammaires et la MEC, dépendantes des intégrines, jouent un rôle majeur dans le développement et la tumorigénèse mammaires. Ces études n'ont cependant pas permis de déterminer les hétérodimères d'intégrine spécifiquement impliqués. Dans ce contexte, mon projet de thèse a visé à définir le rôle joué par les intégrines liant la laminine (dimères contenant les sous-unités  $\alpha 3$  et/ou  $\alpha 6$ ) dans le développement mammaire, dans le maintien de cellules souches mammaires fonctionnelles dans la glande adulte et dans le développement tumoral.

Les résultats de mon travail suggèrent que :

- (i) l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  présente une fonction unique au cours de la lactation. Les mécanismes moléculaires impliqués en aval de  $\alpha 3\beta 1$  font intervenir la voie FAK/Rac1/PAK1 menant à l'inhibition de la MLCK, nécessaire à la relaxation des cellules myoépithéliales mammaires et permettant de nouveaux cycles de contraction.
- (ii) les interactions régulées par les intégrines entre les cellules basales mammaires et la laminine sont essentielles pour régénérer l'épithélium mammaire. Cependant, les intégrines  $\alpha 3$  et  $\alpha 6$  présentent des fonctions redondantes dans les cellules souches mammaires.
- (iii) l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  joue un rôle clef dans le développement tumoral mammaire. L'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  active des voies de signalisation intracellulaires FAK/Rac1/PAK1, MAPK et JNK qui favorisent la survie et la prolifération des cellules tumorales.

Ensembles, ces données permettent une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans le développement mammaire, la fonction de la glande adulte et la tumorigénèse.

The improvement of breast cancer therapy requires thorough analysis of the pathways leading to tumorigenesis and clear understanding of the molecular and cellular mechanisms involved in normal mammary gland development. Mammary epithelium is surrounded by a specifically organized extracellular matrix (ECM), basement membrane, and secreted glycoproteins, laminins, are among its major constituents. Integrin-mediated interactions between mammary epithelial cells and ECM have been shown to play an essential role in the control of mammary development and tumorigenesis. However, specific roles played by distinct integrin heterodimers are yet poorly understood. My thesis project aimed to define the functions of laminin-binding integrins, i.e., heterodimers, containing  $\alpha 3$  or  $\alpha 6$  subunits, in normal mammary gland development, in control of mammary stem and progenitor cell functions in adult gland, and in mammary tumorigenesis.

The results of my work suggest that:

- (i)  $\alpha 3\beta 1$  integrin has a unique function in the control of the myoepithelial cell contractile activity during lactation; it contributes to the activation of the FAK/Rac1/PAK1 pathway leading to MLCK inhibition required for myoepithelial cell relaxation, thereby, permitting further contractile cycles.
- (ii) integrin-mediated interactions of mammary basal cells with laminins are essential for the regeneration of the mammary epithelium. However,  $\alpha 3\beta 1$  and  $\alpha 6$ -containing integrins have redundant functions in mammary stem cells.
- (iii) the  $\alpha 3\beta 1$  integrin plays a major role in mammary tumorigenesis, it promotes survival and proliferation of tumor cells activating intracellular signaling pathways involving FAK/Rac1/PAK1, MAPK and JNK pathways.

Altogether, these data provide new insights into the molecular mechanisms of mammary development, adult gland function and tumorigenesis.

## REMERCIEMENTS

---

Je tiens tout d'abord à remercier très sincèrement le Dr Marina Glukhova, ma directrice de thèse, pour la qualité de son encadrement tout au long de mon stage de Master, puis de ma thèse. Je la remercie de m'avoir accueilli dans l'équipe et de m'avoir soutenue et apporté de précieux conseils tout au long de ces années. Elle a su me transmettre sa passion de la science et m'a appris la rigueur scientifique et le sens de synthèse essentiels dans ce métier.

Je remercie chaleureusement le Dr Sandrine Humbert d'avoir accepté de présider le jury de thèse. J'adresse également toute ma reconnaissance aux Drs Marc Block, Keltouma Driouch, Adèle De Arcangelis et Karine Raymond pour avoir accepté de lire et d'évaluer mon travail.

Je tiens à remercier à nouveau tout particulièrement Karine Raymond, pour avoir partagé avec moi son savoir et ses astuces techniques, et pour m'avoir apporté son aide et son soutien durant toutes ces années. Je la remercie pour sa disponibilité et sa patience qui m'ont permis de mener à bien ce projet.

Je souhaite également remercier tous mes collègues présents et partis avec qui j'ai eu la chance de travailler durant ces années : Marisa, Marie-Ange, Valérie, Karine, Amandine, Aurélie, Mejdi, Dan, Monique, Guillaume, Nancy, Clément et Samy. Je les remercie pour tous les moments que nous avons partagés ensemble.

Je remercie l'ensemble de l'équipe « animalerie » de l'Institut Curie, et plus particulièrement Sonia Jannet, Isabelle Grandjean, Mickaël Garcia, et André Nennot pour avoir pris soin de nos souris. J'adresse également un grand merci aux collègues de la plate-forme de cytométrie de l'Institut Curie : Annick Viguier, Sophie Grondin et Zosia Maciorowski, et à ceux de la plateforme Imagerie PICT-IBISA : Lucie Sengmanivong, Vincent Fraisier et François Waharte.

Je remercie sincèrement Michèle Colineau, notre secrétaire responsable du 1<sup>er</sup> étage, pour sa disponibilité et sa grande efficacité, ainsi que Fatima dont le passage quotidien dans le labo représentait un rayon de soleil et une bouffée d'air frais.

De plus, je souhaite remercier toutes les autres personnes de l’Institut Curie que j’ai côtoyé durant toutes ces années : Lili, Natacha, Christine, Mélanie, Henry, Catalina, Edwige, FX, tout le personnel de l’UMR144 et tous ceux que j’oublie.

Pour finir, et surtout, je souhaite remercier mes parents et ma sœur pour leur soutien sans faille et leurs encouragements durant toutes ces années. Cette thèse n’est pas seulement la mienne, elle leur appartient un peu aussi.

## LISTE DES ABREVIATIONS

---

ADMIDAS	adjacent to MIDAS
AP-1	activator protein-1
APC	adenomatous polyposis coli
$\alpha$ SMA	$\alpha$ -smooth muscle actine
CAMKII	calcium and calmodulin-dependent serine/threonine protein kinase type II
CDK	cyclin dependent kinase
CSC	cellule souche cancéreuse
DOK1	docking protein 1
Dsc	desmocolline
Dsg	desmoglycine
Dsh	dishevelled
EGF	epidermal growth factor
EMT	epithelial-mesenchymal transition
Eph	récepteur à l'éphrine
ER $\alpha$	récepteur $\alpha$ à l'oestrogène
ErbB	récepteur de la famille EGF
FAK	focal adhesion kinase
Fz	frizzled
GPI	glycosylphosphatidylinositol

GSK3- $\beta$	glycogene synthase kinase 3 $\beta$
IAP	integrin associated protein
ICAM	intercellular cell adhesion molecule
ICAP-1	integrin cytoplasmic domain-associated protein 1
ILK	integrin linked kinase
IMD	integrin-mediated death
K	kératine
LIMBS	ligand-associated metal binding site
LIMK	LIM kinase
MaSC	mammary stem cell (ou cellule souche mammaire)
MB	membrane basale
MEC	matrice extracellulaire
MIDAS	metal ion-dependent adhesion site
MLC	myosin light chain (ou chaine légère de myosine)
MLCK	myosin light chain kinase
MLCP	myosin light chain phosphatase
MMP	matrix métalloprotéase (ou métalloprotéase dégradatrice de la MEC)
MOI	multiplicity of infection
OT	oxytocine
OT-R	récepteur à l'oxytocine
PAK	p21 activated kinase

PKA	protein kinase A
PR	récepteur à la progesterone
PrL	prolactine
PrL-R	récepteur à la prolactine
PyMT	polymavirus middle antigen
ROCK	Rho kinase
RTK	récepteur à activité tyrosine kinase
TDLU	terminal ductal lobular unit (ou unité lobulo-canalaire terminale)
TEB	terminal end bud (ou bourgeon terminal)
uPAR	urokinase plasminogen activator receptor
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
WAP	whey acidic protein

# TABLE DES MATIERES

---

<b>RÉSUMÉS .....</b>	2
<b>REMERCIEMENTS .....</b>	3
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS .....</b>	5
<b>TABLE DES MATIÈRES .....</b>	8
<b>PARTIE 1 – INTRODUCTION .....</b>	12
<b>I. LA GLANDE MAMMAIRE .....</b>	13
<b>    1.1. Organisation de la glande mammaire.....</b>	13
1.1.1. L'épithélium mammaire.....	15
1.1.2. La membrane basale et la stroma mammaire environnant.....	18
<b>    1.2. Etapes clefs de la morphogenèse mammaire.....</b>	20
1.2.1. Développement embryonnaire de la glande mammaire.....	20
1.2.2. Croissance et ramification canalaire pendant la puberté.....	22
1.2.3. Développement lobulo-alvéolaire et différenciation lactogénique pendant la gestation.....	26
1.2.4. Involution de la glande mammaire en fin de lactation.....	29
<b>    1.3. Cellules souches/progénitrices mammaires.....</b>	31
1.3.1. Potentiel régénératif de l'épithélium mammaire de la population de cellules épithéliales basales.....	32
1.3.2. Capacités clonogéniques des cellules épithéliales mammaires.....	33
1.3.3. Modèle hiérarchique de lignage cellulaire dans l'épithélium mammaire..	34
1.3.4. Mécanismes de contrôle de la fonction des cellules souches et progénitrices mammaires.....	36
1.3.5. Rôle de la transition épithélium-mésenchyme dans l'acquisition des propriétés de cellules souches mammaires.....	38
<b>    1.4. Tumorigenèse mammaire.....</b>	39
1.4.1. Mécanismes de développement.....	39
1.4.2. Classification moléculaire.....	41
1.4.3. Les tumeurs mammaires de type basal.....	43
1.4.4. Théories menant à l'hétérogénéité tumorale.....	44
a) <i>Modèle stochastique ou dit d'évolution clonale</i> .....	44
b) <i>Modèle hiérarchique ou dit des cellules souches cancéreuses</i> .....	45
c) <i>Modèle stochastique ou hiérarchique ?</i> .....	46
1.4.5. Rôle de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine au cours du développement et de la tumorigenèse mammaire.....	48
<b>II. LES INTÉGRINES.....</b>	51
<b>    2.1. Généralités.....</b>	51
2.1.1. Dimères d'intégrines : classification et structure.....	51
2.1.2. Conformations et activation.....	54

2.1.3. Points d’ancrage des complexes de signalisation.....	55
a) Partenaires membranaires.....	56
b) Partenaires cytoplasmiques.....	57
c) Signalisation “inside-out” et “outside-in” .....	57
d) Plateformes de signalisation.....	59
e) Interactions cellule-cellule.....	60
2.1.4. Pathologies associées à la perte des intégrines.....	63
2.1.5. Régulation des fonctions cellulaires par les intégrines.....	64
a) Migration cellulaire.....	64
b) Prolifération cellulaire.....	65
c) Survie cellulaire.....	67
d) Différenciation.....	68
2.1.6. Dérégulation des intégrines dans le cancer.....	69
a) Les intégrines dans la transformation et la progression tumorale.....	69
b) Les intégrines dans la dissémination métastatique.....	69
c) Les intégrines dans les cellules initiatrices de tumeur.....	71
<b>2.2. Les intégrines dans la glande mammaire.....</b>	<b>71</b>
2.2.1. Répertoire des intégrines dans la glande mammaire.....	71
2.2.2. Les laminines exprimées dans la glande mammaire.....	72
2.2.3. Rôle des intégrines dans la glande mammaire.....	72
a) Rôle des intégrines pendant la morphogenèse mammaire.....	73
b) Rôle des intégrines dans la différenciation des cellules épithéliales mammaires.....	74
c) Rôle des intégrines dans le maintien des cellules souches et progénitrices mammaires.....	75
2.2.4. Rôle des intégrines dans la tumorigénèse mammaire.....	76
<b>III. BUT DE L’ÉTUDE ET APPROCHES EXPÉRIMENTALES.....</b>	<b>79</b>
<b>PARTIE 2 – MATÉRIELS ET MÉTHODES .....</b>	<b>81</b>
<b>I. SOURIS TRANSGÉNIQUES .....</b>	<b>82</b>
<b>II. ISOLEMENT DES CELLULES ÉPITHELIALES BASALES MAMMAIRES.....</b>	<b>82</b>
<b>III. TRANSDUCTION LENTIVIRALE .....</b>	<b>83</b>
<b>IV. ESSAI DE FORMATION DE MAMMOSPHÈRES.....</b>	<b>84</b>
<b>V. ESSAI DE TRANSPLANTATION DE CELLULES ISOLÉES .....</b>	<b>85</b>
<b>PARTIE 3 – RÉSULTATS .....</b>	<b>86</b>
<b>I. LES ÉVÉNEMENTS DE SIGNALISATION RÉGULÉS PAR L’INTÉGRINE <math>\alpha 3\beta 1</math> SONT ESSENTIELS À LA LACTATION .....</b>	<b>87</b>
<b>1.1. Contexte et justification de la recherche.....</b>	<b>87</b>
<b>1.2. Résumé des principaux résultats.....</b>	<b>87</b>
1.2.1. La perte de l’intégrine $\alpha 3\beta 1$ du compartiment basal mammaire mène à un défaut de lactation.....	87
1.2.2. La contractilité des cellules myoépithéliales mammaires nécessite	87

l'activation de la voie de signalisation RhoA/ROCK.....	88
1.2.3. La perte de l'intégrine $\alpha 3\beta 1$ des cellules myoépithéliales mammaires empêche l'accomplissement des cycles de contraction/relaxation.....	88
1.2.4. L'engagement de l'intégrine $\alpha 3\beta 1$ active la voie de signalisation FAK/Rac/PAK menant à l'inhibition de la MLCK, nécessaire à l'accomplissement des cycles de contraction/relaxation.....	89
<b>1.3. Conclusion de l'article.....</b>	89
<b>II. LES ÉVÉNEMENTS DE SIGNALISATION RÉGULÉS PAR L'INTÉGRINE <math>\alpha 3\beta 1</math> SONT ESSENTIELS À LA TUMORIGENÈSE MAMMAIRE .....</b>	115
<b>2.1. Contexte et justification de la recherche.....</b>	115
<b>2.2. Résumé des principaux résultats.....</b>	116
2.2.1. La perte d'expression de l'intégrine $\alpha 3\beta 1$ du compartiment basal mammaire empêche le développement tumoral dans le modèle murin de carcinogénèse mammaire de type basal.....	116
2.2.2. Les événements de signalisation contrôlés par l'intégrine $\alpha 3\beta 1$ sont nécessaires au développement tumoral après injection orthotopique de cellules mammaires transformées et à la formation de colonies en "soft agar" .....	116
2.2.3. La stimulation de la voie Rac1/PAK1 par l'intégrine $\alpha 3\beta 1$ permet le développement tumoral et la formation de colonies en "soft agar" .....	116
2.2.4. La perte d'expression de l'intégrine $\alpha 3\beta 1$ réduit l'activation des kinases FAK, MAPK et JNK, inhibant la prolifération et la survie des cellules épithéliales basales mammaires tumorales.....	117
<b>2.3. Conclusion de l'article.....</b>	117
<b>III. LES INTÉGRINES LIANT LA LAMININE CONTROLENT L'ACTIVITÉ DES CELLULES SOUCHES/PROGÉNITRICES MAMMAIRES .....</b>	132
<b>3.1. Contexte et justification de la recherche.....</b>	132
<b>3.2. Résumé des principaux résultats.....</b>	133
3.2.1. La perte de l'intégrine $\alpha 3\beta 1$ du compartiment basal mammaire réduit le potentiel régénératif des cellules souches/progénitrices mammaires contenues dans le compartiment basal.....	133
3.2.2. La délétion du gène <i>itga6</i> des cellules épithéliales basales mammaires isolées diminue le potentiel régénératif de l'épithélium mammaire.....	133
3.2.3. La délétion des gènes <i>itga3</i> et <i>itga6</i> des cellules épithéliales basales mammaires isolées réduit de façon drastique le potentiel régénératif de l'épithélium mammaire.....	134
<b>3.3. Conclusion de l'article.....</b>	134
3.2.4. L'activité des cellules souches/progénitrices mammaires est contrôlée par l'activité de FAK.....	149
<b>PARTIE 4 – DISCUSSION ET PERSPECTIVES .....</b>	152
<b>I. LES ÉVÉNEMENTS DE SIGNALISATION RÉGULÉS PAR L'INTÉGRINE <math>\alpha 3\beta 1</math> SONT ESSENTIELS À LA LACTATION .....</b>	153

<b>II. LES ÉVÉNEMENTS DE SIGNALISATION RÉGULÉS PAR L'INTÉGRINE <math>\alpha 3\beta 1</math> SONT ESSENTIELS À LA TUMORIGENÈSE MAMMAIRE .....</b>	<b>155</b>
<b>III. LES INTÉGRINES LIANT LA LAMININE CONTROLENT L'ACTIVITÉ DES CELLULES SOUCHE/PROGÉNITRICES MAMMAIRES .....</b>	<b>158</b>
<b>IV. CONCLUSIONS .....</b>	<b>160</b>
<b>PARTIE 5 – ANNEXES .....</b>	<b>162</b>
<b>PARTIE 6 – RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>172</b>

## **INTRODUCTION**

## I. LA GLANDE MAMMAIRE

La glande mammaire est une glande exocrine composée d'un épithélium qui se développe au sein d'un stroma fibro-adipeux, par ramification. De nombreux autres organes utilisent ce mécanisme morphogénétique comme par exemple la glande salivaire, le poumon et le rein (Lu & Werb, 2008). Cependant, contrairement aux autres organes ramifiés, la majeure partie de la morphogenèse mammaire a lieu après la naissance, facilitant ainsi l'étude des gènes impliqués dans les différentes étapes du développement et faisant de la glande mammaire un modèle d'étude de choix (Gray et al., 2010). La glande mammaire a pour fonction principale la production et la sécrétion des protéines et lipides du lait qui sont essentiels pour nourrir la descendance, pendant la lactation. Elle permet également d'apporter une protection immunitaire efficace contre les pathogènes grâce aux facteurs immunitaires présents dans le lait.

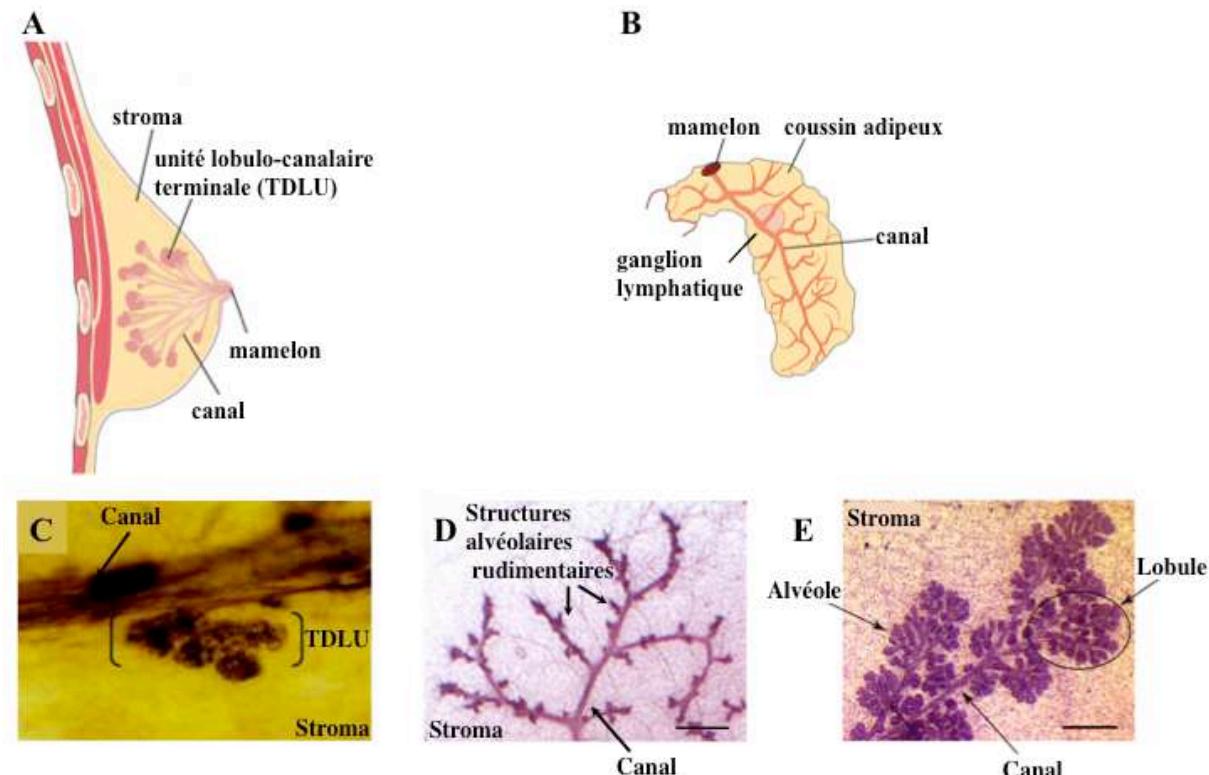
D'un point de vue évolutif, l'apparition de la glande mammaire est un événement tardif qui constitue la caractéristique principale des mammifères. L'origine de la glande mammaire est ectodermique (Hennighausen & Robinson, 1998 ; Lu & Werb, 2008 ; Gray et al., 2010).

### 1.1. Organisation de la glande mammaire

D'un point de vue morphologique, la glande mammaire est constituée d'un réseau de canaux ramifiés composé d'un épithélium pseudostratifié séparé d'un stroma fibro-adipeux environnant par une matrice extracellulaire (MEC) spécialisée, la membrane basale (Deugnier et al., 2002 ; Sleeman et al., 2007 ; Muschler & Streuli, 2010 ; Maller et al., 2010).

Il existe des différences architecturales notables entre la glande mammaire murine et humaine. La glande mammaire humaine est caractérisée par un réseau de canaux ramifiés dont les extrémités constituent des grappes de petites alvéoles nommées unités lobulo-canalaires terminales (« terminal ductal lobular units » ou TDLUs) ([Fig 1A, C](#)). La glande mammaire murine adulte ne contient pas de grappes lobulo-canalaires. Elle présente majoritairement une structure canalaire et ne développe des structures alvéolaires rudimentaires qu'au cours des différents cycles de l'œstrus ([Fig 1B, D](#)). C'est seulement au cours de la gestation qu'a lieu le développement lobulo-alvéolaire. La glande mammaire est alors constituée d'alvéoles sécrétoires

connectées à un système collecteur de canaux ramifiés qui transportent le lait des structures lobulo-alvéolaires vers le mamelon (**Fig 1E**) (Deugnier et al., 2002 ; Gudjonsson et al., 2005 ; Kendrick et al., 2008 ; Muschler & Streuli, 2010 ; Maller et al., 2010). De plus, la glande mammaire murine contient moins de tissu conjonctif fibreux que la glande mammaire humaine. Son stroma est constitué de beaucoup plus de cellules adipeuses (Nelson & Bissell, 2006 ; Visvader, 2009 ; Maller et al., 2010).

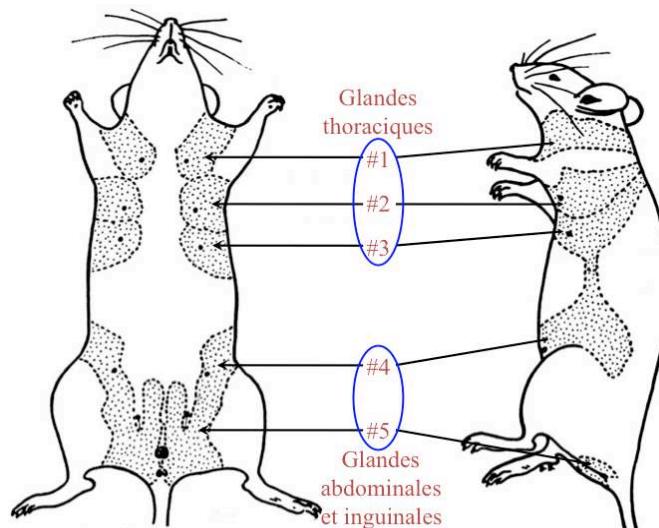


**Figure 1. Organisation architecturale des glandes mammaires humaine et murine.**

(A,B) Représentations schématiques des glandes mammaires humaine (A) et murine (B). Chez l'Homme, le stroma fibro-adipeux contient l'épithélium qui est organisé en unités lobulo-canalaires terminales reliées via un réseau de canaux au mamelon. Chez la souris, le stroma fibro-adipeux enveloppe un réseau de canaux ramifiés constitué d'un canal primaire traversant toute la glande jusqu'au mamelon et sur lequel débouchent de plus courtes ramifications secondaires et tertiaires. Ces dernières donnent naissance aux alvéoles sécrétrices au cours de la gestation. (C-E) Marquage *in toto* de glandes mammaires humaine (C) et murines (D,E). La coloration à l'hématoxyline de glandes mammaires humaines isolées à partie de mammoplasties révèle la présence de structures canalaires et de TDLU (C). La coloration à l'aide de carmine de glandes mammaires de souris adultes vierges en œstrus illustre la présence de canaux portant des structures alvéolaires rudimentaires (D) alors qu'au cours de la gestation se développent des structures lobulo-alvéolaires (E). Echelle : (D,E) 0.5 mm. Adapté de Visvader, 2009, Kuperwasser et al., 2004 et Glukhova & Streuli, 2013b.

Malgré ces différences architecturales, de nombreuses similitudes ont été mises en évidence entre les glandes mammaires humaine et murine. La hiérarchie et l'organisation cellulaire ainsi que les mécanismes moléculaires et cellulaires qui régissent le développement et

le fonctionnement de la glande mammaire sont très similaires chez l'humain et chez la souris (Nelson & Bissell, 2006 ; Visvader, 2009 ; Maller et al., 2010). Ainsi, la souris représente un modèle d'étude de choix de la glande mammaire. La suite de mon introduction décrira plus particulièrement les connaissances obtenues à l'aide des études réalisées chez la souris qui possède cinq paires de glandes mammaires, situées sous la peau en position ventrale : les paires 1 à 3 en position thoracique, les paires 4 et 5 en position inguinale ([Fig 2](#)) (Deugnier et al., 2002 ; Sleeman et al., 2007 ; Muschler & Streuli, 2010 ; Maller et al., 2010).



**Figure 2. Localisation anatomique des cinq paires de glandes mammaires murines adultes.**

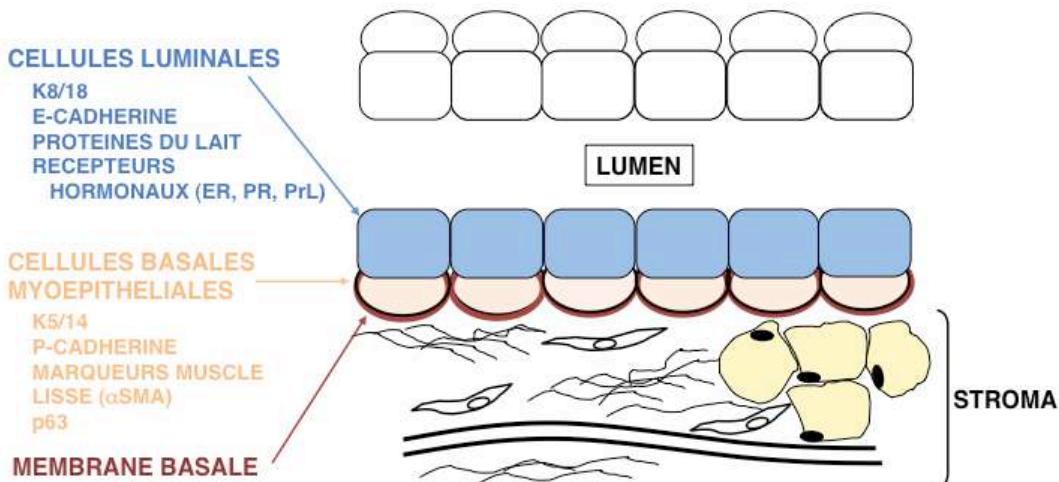
Selon l'axe crâneo-caudal, on distingue trois paires de glandes thoraciques (glandes #1, #2 et #3), deux paires de glandes inguinales (#4 et #5).

### 1.1.1. L'épithélium mammaire

L'épithélium mammaire est un épithélium pseudostratifié composé de deux couches de cellules épithéliales distinctes : une couche de cellules luminales cuboïdales qui produisent et sécrètent le lait et une couche de cellules basales myoépithéliales de forme aplatie dont l'activité contractile permet l'expulsion du lait des canaux vers le mamelon. Ces deux types cellulaires expriment des marqueurs spécifiques permettant de les distinguer ([Fig 3](#)) (Deugnier et al., 2002 ; Faraldo et al., 2005 ; Muschler & Streuli, 2010 ; Moumen et al., 2011).

La couche de cellules luminales exprime les kératines (K) 8 et 18, la E-cadhéchine ainsi que les cadhérines desmosomiques desmocolline-2 (Dsc2) et desmoglaine-2 (Dsg2) (Deugnier et al., 2002 ; Gudjonsson et al., 2005 ; Faraldo et al., 2005 ; Kendrick et al., 2008 ; Sun et al., 2010 ;

Muschler & Streuli, 2010). Deux types de cellules luminales ont été décrits : les cellules exprimant le récepteur  $\alpha$  à l'œstrogène (ER $\alpha$ ) ainsi que les récepteurs à la prolactine (PrL-R) et à la progestérone (PR), les cellules luminales ER+, et celles qui n'expriment pas ces mêmes récepteurs, les cellules luminales ER-. Pendant la gestation et la lactation, les cellules luminales situées au niveau des alvéoles synthétisent les protéines du lait (comme la  $\beta$ -caséine, WAP, « Whey Acidic Protein » et la  $\beta$ -lactoglobuline) et présentent des gouttelettes lipidiques dans leur cytoplasme (Kendrick et al., 2008). Une étude récente suggère la présence d'une sous-population de cellules luminales ER- qui jouerait le rôle de cellules immunitaires « non-professionnelles» chargées de détecter les contaminations bactériennes éventuelles du lait. Les deux types de cellules luminales ER+ et ER- expriment un grand nombre de gènes en commun qui ne sont pas exprimés par les cellules basales myoépithéliales (Kendrick et al., 2008).



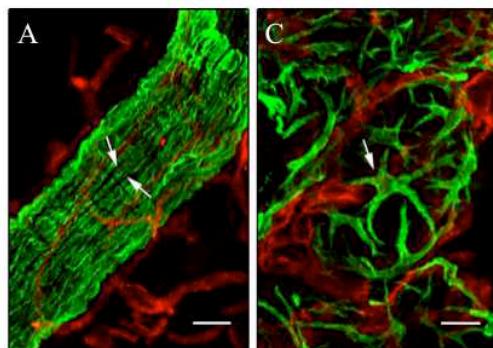
**Figure 3.** Représentation schématique de l'épithélium mammaire murin.

La bicouche épithéliale mammaire est constituée de cellules luminales et de cellules basales myoépithéliales, chaque type de cellules exprimant des marqueurs spécifiques. La membrane basale, formée de glycoprotéines et de protéoglycans, entoure complètement l'épithélium mammaire, le séparant du stroma environnant. Adapté de Faraldo et al., 2005.

La couche de cellules basales est principalement composée de cellules myoépithéliales hautement contractiles. Elle exprime ainsi les marqueurs spécifiques des cellules basales des épithélia stratifiés tels que les K5 et K14 et le facteur de transcription p63, et ceux de muscle lisse comme l'isoforme  $\alpha$  de l'actine de muscle lisse,  $\alpha$ SMA («  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin »). Elle présente l'expression de P-cadhérine et en plus des cadhérines desmosomiques Dsg2 et Dsc2, de Dsg3 et Dsc3. Elle est enrichie en intégrines, notamment de la famille  $\beta$ 1 et  $\alpha$ 6 $\beta$ 4, qui représentent les récepteurs majeurs aux protéines de la MEC (Deugnier et al., 2002 ; Gudjonsson

et al., 2005 ; Faraldo et al., 2005 ; Kendrick et al., 2008 ; Muschler & Streuli, 2010 ; Sun et al., 2010 ; Moumen et al., 2011).

Les cellules basales myoépithéliales canalaires et alvéolaires présentent une organisation différente. Au niveau des canaux, les cellules myoépithéliales sont aplatis et forment une couche quasi continue en contact direct avec la membrane basale. Au niveau des alvéoles, les cellules basales myoépithéliales sont en forme d'étoile et forment une structure en filet autour de l'acinus (Fig 4) (Deugnier et al., 2002 ; Faraldo et al., 2005 ; Gudjonsson et al., 2005 ; Moumen et al., 2011). De ce fait, les contacts directs entre les cellules luminales et la membrane basale sont limités au niveau des canaux alors qu'ils sont plus étendus au niveau des alvéoles (Fig 4) (Deugnier et al., 2002 ; Faraldo et al., 2005 ; Gudjonsson et al., 2005 ; Moumen et al., 2011).



**Figure 4. Morphologie des cellules myoépithéliales canalaires et alvéolaires.**

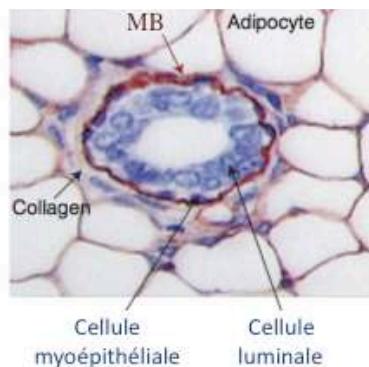
Double immunofluorescence de sections de glandes mammaires de souris vierge de 10 semaines (A) et à jour 2 de lactation (B) avec des anticorps dirigés contre K5 (vert) et CD31 (rouge), qui marquent respectivement les cellules myoépithéliales et les capillaires sanguins. Les flèches indiquent les cellules myoépithéliales qui sont de forme aplatie dans les canaux (A), formant une couche quasi continue limitant les contacts des cellules luminales avec la membrane basale et de forme étoilée dans les alvéoles (B), permettant aux cellules luminales d'interagir directement avec la membrane basale dans les espaces libres entre les cellules basales myoépithéliales. Echelle : 10 µM. Adapté de Moumen et al., 2011.

De par leur position au sein de la glande mammaire, les cellules basales myoépithéliales mammaires sont capables d'intégrer les signaux provenant des cellules luminales, de la membrane basale sous-jacente et du stroma. Elles pourraient ainsi représenter un médiateur clef de la signalisation du stroma vers les cellules luminales. La présence de cavéoles à la surface des cellules basales indique que ces cellules pourraient contrôler le transport et le métabolisme de molécules entre les cellules luminales et la membrane basale (Gudjonsson et al., 2005).

De plus, de nombreux signaux paracrines entre les cellules luminales et basales ont été mis en évidence. Il existe de nombreux exemples de récepteurs présents sélectivement sur les cellules basales alors que le ligand correspondant est produit par les cellules luminales, et inversement. C'est le cas du récepteur de l'éphrine EphB4 et de son ligand éphrine-B2 qui sont spécifiquement exprimés par les cellules basales et les cellules luminales, respectivement (Deugnier et al., 2002 ; Kendrick et al., 2008 ; Moumen et al., 2011). De nombreuses études ont permis de mettre en évidence les conséquences majeures de l'altération de la fonction des cellules basales sur la croissance et la différenciation des cellules luminales. Par exemple, les souris déficientes pour la P-cadhérine basale développent, à l'état vierge, des structures lobulo-alvéolaires semblables à celles trouvées pendant la gestation, leurs cellules luminales présentant des signes de différenciation lactogénique (Moumen et al., 2011). En retour, les cellules luminales peuvent affecter l'homéostasie des cellules basales. C'est le cas notamment pendant la gestation où l'amplification des cellules basales (qui n'expriment pas les récepteurs ER $\alpha$  et PR) est induite par les cellules luminales ER+ et PR+, via des signaux paracrines impliquant les voies Wnt et RANK (Brisken et al., 2000 ; Asselin-Labat et al., 2010 ; Joshi et al., 2010).

### 1.1.2. La membrane basale et le stroma mammaire environnant

L'épithélium mammaire est séparé du stroma fibro-adipeux environnant par une MEC spécialisée appelée membrane basale (Fig 3 et 5).



**Figure 5. Architecture de l'épithélium mammaire canalaire.**

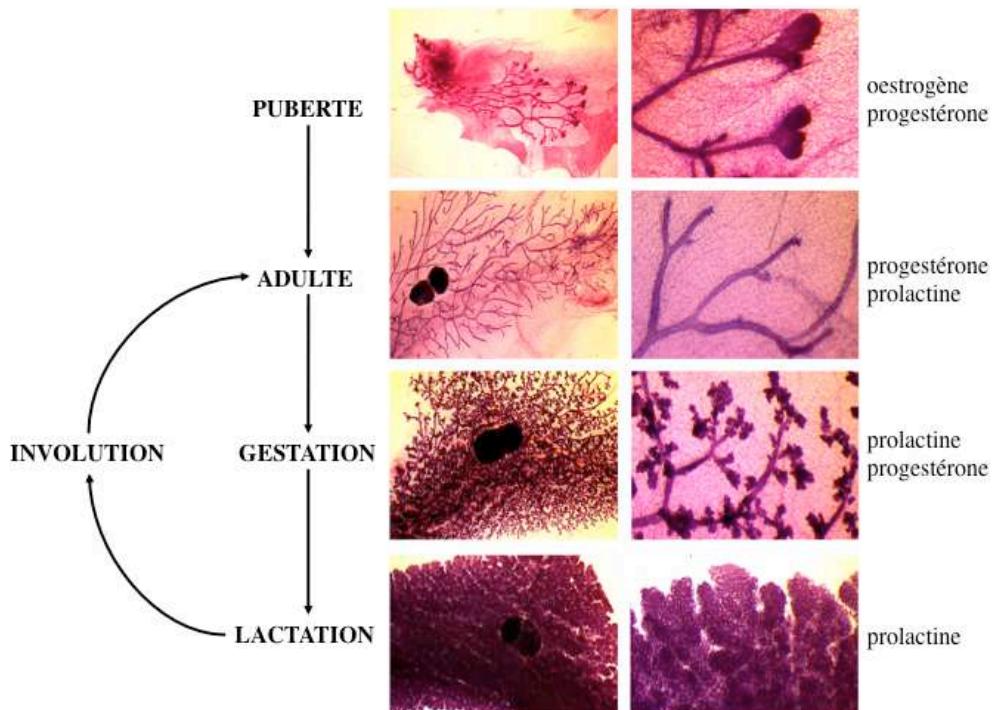
Image histologique en H&E montrant un canal dans un glande pubère vierge. La membrane basale (MB) est marquée grâce à un anticorps dirigé contre la laminine (marron). La membrane basale entoure complètement l'épithélium mammaire, la séparant du tissu connectif environnant et des adipocytes. Adapté de Muschler & Streuli, 2010.

La membrane basale est une MEC d'environ 100 nm d'épaisseur constituée principalement de glycoprotéines et protéoglycans organisées autour d'un assemblage de polymères de laminines et d'un réseau de fibrilles de collagène IV, reliés par le nidogène et le perlécan (Yurchenco & Patton, 2009 ; Muschler & Streuli, 2010 ; Maller et al., 2010). La glande mammaire montre quatre isoformes de trimères de laminines, les laminines -111, -322, -511 et -521, et plusieurs protéoglycans dont la complexité varie avec le développement de la glande mammaire, l'espèce majoritaire étant le perlécan (Prince et al., 2002 ; Aumailley et al., 2005). La synthèse et l'assemblage de la membrane basale sont principalement réalisés par les cellules épithéliales mais les cellules stromales, et en particulier les fibroblastes, participent à la synthèse du collagène IV et sont responsables de la synthèse du nidogène (Nelson & Bissell, 2006 ; Maller et al., 2010). Les récepteurs majeurs permettant l'adhésion des cellules épithéliales à la membrane basale sont les intégrines et les protéoglycans transmembranaires dystroglycane et syndécane qui s'associent au cytosquelette et permettent l'assemblage de plateformes moléculaires de signalisation qui jouent un rôle clef dans le contrôle du destin cellulaire. Ainsi, la membrane basale est un régulateur important du phénotype épithelial mammaire (Maller et al., 2010 ; Muschler & Streuli, 2010).

Le stroma mammaire fibro-adipeux est composé de constituants de la MEC (charpente fibreuse) dans lesquels se trouvent une grande variété de type cellulaires, les adipocytes représentant les cellules majoritaires du stroma mammaire et étant à l'origine du terme « coussin adipeux ». Les composants de la MEC incluent principalement les collagènes de type I, III et V mais comprennent également des protéoglycans, de la fibronectine et des tenascines. La composition, la densité et la rigidité de la MEC varient avec le stade du développement mammaire (Schedin et al., 2004). En plus des adipocytes, la composante cellulaire du stroma inclue des fibroblastes, des cellules immunitaires (macrophages et mastocytes), des vaisseaux sanguins et lymphatiques et des fibres nerveuses (Richert et al., 2000 ; Maller et al., 2010 ; Muschler & Streuli, 2010). Ainsi, en plus de jouer un rôle de soutien, le stroma fournit à l'épithélium mammaire les nutriments et les défenses immunitaires. Chacun des types cellulaires du stroma sécrète des facteurs paracrines qui instruisent le développement et la fonctionnalité de l'épithélium, au cours par exemple de la croissance canalaire de la glande mammaire pendant la puberté ou du développement lobulo-alvéolaire pendant de la gestation (Tanos & Brisken, 2008 ; Maller et al., 2010 ; Muschler & Streuli, 2010).

## 1.2. Etapes clefs de la morphogenèse mammaire

Le développement de la glande mammaire est essentiellement post-natal. Il débute au cours de l'embryogenèse autour du stade E10.5 chez la souris, pour aboutir à la formation d'ébauches mammaires, à la naissance. Après la naissance, sous l'influence des signaux hormonaux, trois étapes successives de développement sont observées : la croissance et ramification canalaire pendant la puberté, le développement lobulo-alvéolaire et la différenciation lactogénique pendant la gestation et l'involution en fin de lactation (Fig 6, 7) (Hennighausen & Robinson, 1998 ; Richert et al., 2000 ; Sun et al., 2010 ; Spencer et al., 2010).



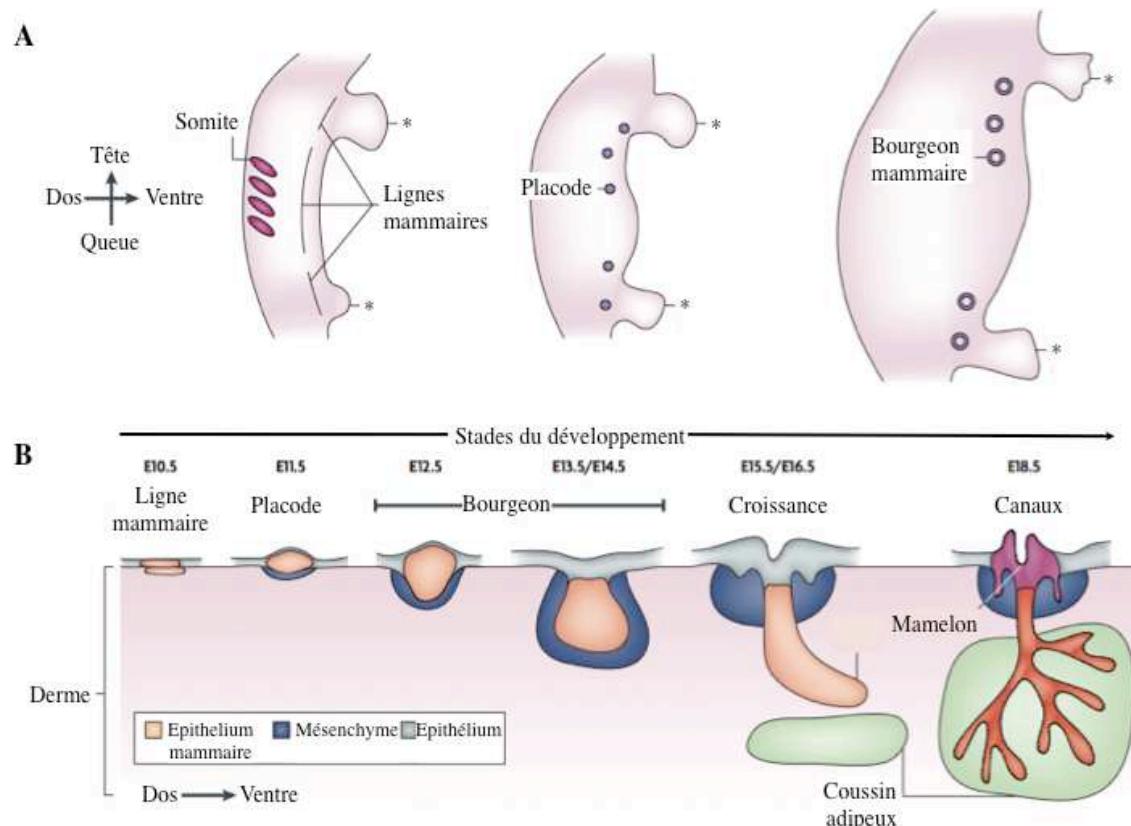
**Figure 6. Développement post-natal de la glande mammaire murine.**

A la naissance, l'épithélium mammaire est formé d'un réseau de canaux primitif. A la puberté (environ 4 semaines chez la souris), le développement de bourgeons terminaux à l'apex des canaux permet l'elongation et la ramification canalaire. Au cours de la gestation, la différenciation lobulo-alvéolaire mène à la formation du tissu sécrétoire nécessaire à la lactation. A la fin de la lactation, un processus massif d'apoptose mène à la régression de la glande (involution) vers un stade similaire à celui de la femelle vierge adulte. Un nouveau cycle de morphogenèse lobulo-alvéolaire prend place à la gestation suivante.

### 1.2.1. Développement embryonnaire de la glande mammaire

Le développement embryonnaire de la glande mammaire débute autour du stade E10.5 par l'apparition de deux lignes mammaires le long de l'axe crânio-caudal puis autour de E11.5, par la formation de cinq paires de placodes localisées aux sites des futurs mamelons. Au niveau des

placodes, l'épithélium s'invagine et envahie le mésenchyme sous-jacent (futur coussin adipeux) pour former un rudiment mammaire au stade E14.5. L'épithélium se développe alors en un nombre limité de branches pour former à la naissance une arborescence canalaire rudimentaire ([Fig 7](#)). La glande reste alors quiescente jusqu'à la puberté (Richert et al., 2000 ; Veltmaat et al., 2003 ; Robinson, 2007).



**Figure 7. Développement embryonnaire de la glande mammaire.**

(A) Représentation schématique de la position des lignes mammaires, placodes et bourgeons mammaires, chez l'embryon de souris. Les astérisques indiquent les ébauches des membres supérieurs et inférieurs. (B) Représentation schématique des différentes étapes du développement embryonnaire mammaire. Au stade E18.5, le mamelon est formé et l'épithélium mammaire est organisé en une arborescence canalaire rudimentaire présente au sein du coussin adipeux. Adapté de Robinson, 2007.

Contrairement aux étapes post-natales, la phase embryonnaire du développement mammaire est régulée indépendamment des hormones œstrogène et progestérone (Veltmaat et al., 2003 ; Sternlicht, 2006 ; Robinson, 2007 ; Brisken & O'Malley, 2010). Chez le mâle, le développement mammaire embryonnaire précoce est identique à celui de la femelle. Cependant, à partir de E13, la sécrétion d'androgène par les testicules mène à la réduction de la taille de

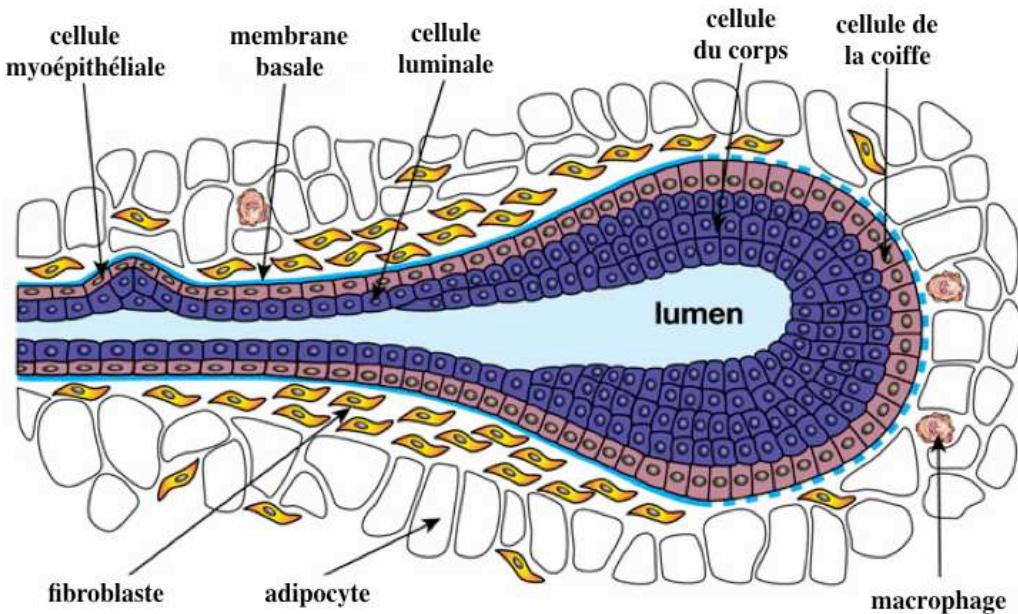
l'épithélium mammaire rudimentaire qui se détache de l'épiderme et donc du mamelon et soit régresse soit reste ainsi au sein du coussin adipeux (Richert et al., 2000).

Dès que l'épithélium émerge de l'épiderme, une membrane basale continue est maintenue à l'interface épithélium/mésenchyme (Muschler & Streuli, 2010). Les signaux transmis par les protéines solubles des familles Wnt, FGF et PTHrP jouent un rôle clef dans le développement embryonnaire (Mailleux et al., 2002 ; Hovey et al., 2002 ; Veltmaat et al., 2004 ; Hens & Wysolmerski, 2005 ; Hiremath & Wysolmerski, 2013).

### 1.2.2. Croissance et ramifications canalaire pendant la puberté

Au moment de la puberté, autour de 4 semaines chez la souris, sous l'influence des hormones systémiques, et en particulier de l'oestrogène, le développement mammaire reprend. L'extrémité distale de chaque canal est le siège d'une intense prolifération qui mène à la formation de larges structures multicellulaires appelées bourgeons terminaux (ou TEBs, pour « Terminal End Buds ») qui permettent l'elongation et la ramification canalaire à travers le stroma, jusqu'à atteindre les limites du coussin adipeux (Fig 8, 9).

Les TEBs sont constitués de deux types de cellules : (i) une couche externe de cellules dites de la coiffe qui expriment les marqueurs de cellules basales ( $\alpha$ SMA, P-cadhérine, p63, et faiblement les kératines 5 et 14) et sont les précurseurs des cellules myoépithéliales et (ii) une multicouche de cellules dites du corps du bourgeon qui expriment les kératines luminales et sont à l'origine du lignage luminal (Hennighausen & Robinson, 1998 ; Richert et al., 2000 ; Deugnier et al., 2002 ; Sternlicht, 2006 ; Lu & Werb, 2008 ; Gray et al., 2010 ; Muschler & Streuli, 2010 ; Moumen et al., 2011).



**Figure 8. Représentation schématique de l'organisation d'un bourgeon terminal (ou TEB).**

Pendant la puberté, les TEBs poussent à travers le stroma jusqu'à atteindre les extrémités du coussin adipeux. Les cellules de la coiffe expriment notamment le marqueur p63 et constituent les précurseurs des cellules basales myoépithéliales. Les cellules du corps du bourgeon sont organisées en plusieurs couches, expriment les marqueurs luminaux K8/K18 et sont à l'origine des cellules luminales. Adapté de Visvader, 2009.

La morphogenèse canalaire requiert la coordination des processus de prolifération, migration et apoptose des cellules épithéliales, au niveau des TEBs. L'oestrogène, notamment via son récepteur  $\alpha$  (ER $\alpha$ ), est le régulateur principal de la prolifération des cellules épithéliales mammaires. En effet, l'inactivation du gène codant pour ER $\alpha$  empêche la formation des TEBs et l'elongation canalaire (Daniel et al., 1987 ; Bocchinfuso et al., 2000 ; Mueller et al., 2002 ; Forster et al., 2002 ; Mallepell et al., 2006 ; Feng et al., 2007 ; Brisken & O'Malley, 2010). L'activation de ER $\alpha$  par l'oestrogène induit la sécrétion d'amphiréguline dans le stroma, ligand appartenant à la famille EGF, qui favorise la prolifération des cellules épithéliales (Luetteke et al., 1999 ; Hovey et al., 2002 ; Sternlicht, 2006 ; Ciarloni et al., 2007 ; Tanos et al., 2012). Le deuxième régulateur majeur de la prolifération des cellules épithéliales au cours de la puberté est l'hormone de croissance. Cette hormone, sécrétée par l'hypophyse, active son récepteur dans le stroma mammaire, entraînant la production d'IGF-1 qui stimule de manière locale, la prolifération des cellules épithéliales mammaires (Ruan et al., 1992 ; Kleinberg et al., 2000). Enfin, des approches génétiques chez la souris ont révélé le rôle joué par GATA-3 et FGF10/FGFR2, d'origine épithéliale ou stromale, sur la morphogenèse canalaire. En effet, la perte de fonction de *Fgf10* et *Fgfr2b* dans la glande mammaire de souris pubères mène au

développement d'un réseau canalaire rudimentaire dépourvu de TEBs. De manière similaire, la perte de fonction du gène *Gata-3* abolit la croissance canalaire (Sternlicht, 2006 ; Kouros-Mehr et al., 2006 ; Asselin-Labat et al., 2007 ; Parsa et al., 2008).

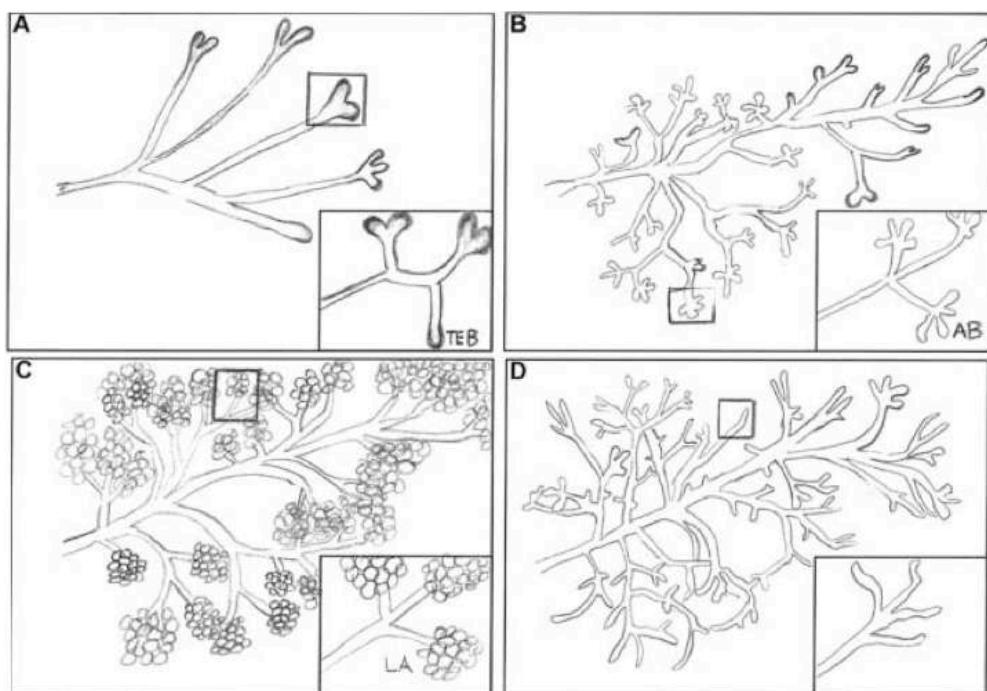
La migration collective des cellules épithéliales au niveau des TEBs requiert l'intégrité de la structure des bourgeons terminaux. Ainsi, des perturbations des systèmes d'adhésion tels que les cadhérines, les intégrines ou les composants de la MEC inhibent l'extension canalaire. Par exemple, la protéine diffusible nétrine-1, sécrétée par les cellules du corps du bourgeon et son récepteur, la néogénine, exprimée par les cellules de la coiffe, jouent un rôle clef dans le développement canalaire. Leur perte de fonction mène à la séparation des cellules de la coiffe et du corps du bourgeon terminal et résulte en un défaut de migration des TEBs (Hinck & Silberstein, 2005 ; Sternlicht, 2006 ; Visvader, 2009 ; Muschler & Streuli, 2010). De plus, au niveau du front d'elongation, les TEBs sont entourés d'une fine membrane basale qui est remodelée au fur et à mesure que les cellules envahissent le stroma adjacent. En particulier, la métalloprotéase MMP-2 favorise l'invasion des TEBs dans le stroma, en inhibant l'apoptose des cellules épithéliales, au début de la puberté (Wiseman et al., 2003; Hinck & Silberstein, 2005 ; Green & Lund, 2005 ; Sternlicht, 2006 ; Muschler & Streuli, 2010).

Les ramifications canalaires apparaissent le long des canaux de manière intermittente. L'espacement entre les ramifications dépendrait de celui des cellules progénitrices épithéliales et serait contrôlé par des signaux d'inhibition latérale induit par des molécules telle que la cytokine TGF $\beta$ 1. En effet, la surexpression de TGF $\beta$ 1 par les cellules épithéliales mène à l'absence de formation de ramifications canalaires, mettant en évidence son action inhibitrice locale de la ramification (Ewan et al., 2002 ; Sternlicht, 2006 ; Muschler & Streuli, 2010). La formation de ramifications canalaires est également régulée par le facteur soluble MMP-3 et par le facteur de transcription C/EBP $\beta$ . En effet, la délétion des gènes correspondants bloque l'apparition de ramifications canalaires (Seagroves et al., 1998 ; Wiseman et al., 2003 ; Hinck & Silberstein, 2005 ; Green & Lund, 2005 ; Sternlicht, 2006 ; Muschler & Streuli, 2010).

Enfin, la progestérone participe également, dans une moindre mesure, au développement canalaire. A la fin de la puberté, lorsque l'épithélium mammaire est complètement développé, la progestérone agit via les facteurs solubles Wnt4 et RANKL pour induire la formation de branches latérales ([Fig 9](#)) (Atwood et al., 2000 ; Hovey et al., 2002 ; Sternlicht, 2006 ; Brisken &

O'Malley, 2010). Le mécanisme d'action de la progestérone, qui joue un rôle essentiel dans le développement mammaire au cours de la gestation, sera détaillé par la suite.

La formation du lumen requiert l'apoptose des cellules du corps du bourgeon lors de la croissance des TEBs. La protéine pro-apoptotique Bim joue un rôle clef dans ce processus (Mailleux et al., 2007). A la fin de la puberté, vers 8 semaines chez la souris, les TEBS régressent. La glande mammaire est alors constituée d'un système canalaire ramifié mature qui remplit le coussin adipeux et reste dans un état quiescent jusqu'à la gestation.



**Figure 9. Représentation schématique du développement de la glande mammaire murine.**

(A) A la naissance, la glande mammaire consiste en un canal principal présentant seulement 3 à 5 ramifications. A la puberté, les TEBs se forment à l'extrémité des canaux et prolifèrent afin de coloniser le coussin adipeux. (B) A la fin de la puberté, la glande mammaire mature est alors constituée d'un système de canaux ramifiés aux extrémités desquels se sont développés un grand nombre de bourgeons alvéolaires (AB). Les TEBs ont alors régressé. (C) Au cours de la gestation, les cellules épithéliales prolifèrent intensément et des structures lobulo-alvéolaires (LA) se forment à partir des bourgeons alvéolaires. (D) Après la lactation, la glande est remodelée, principalement par apoptose des cellules épithéliales et leur phagocytose. La glande ressemble à celle d'une souris vierge. Adapté de Britt et al., 2007.

### 1.2.3. Développement lobulo-alvéolaire et différenciation lactogénique pendant la gestation

Au cours de la gestation, sous l'influence de la progestérone et de la prolactine (PrL), le développement de la glande mammaire reprend pour aboutir à la formation du tissu sécrétoire nécessaire à la lactation. Ce développement dit lobulo-alvéolaire comprend deux phases : une morphogenèse lobulo-alvéolaire contrôlée par la progestérone suivi de la différenciation PrL-dépendante des cellules luminales alvéolaires en cellules sécrétrices de lait (Hennighausen & Robinson, 1998 ; Brisken & O'Malley, 2010).

Le développement lobulo-alvéolaire consiste en une expansion du compartiment épithélial à partir de branches latérales additionnelles et s'accompagne de la formation de bourgeons alvéolaires latéraux. Pendant la seconde moitié de gestation, les bourgeons alvéolaires latéraux se séparent progressivement et se différencient en alvéoles individuelles regroupées en lobules. En fin de gestation, des alvéoles sécrétrices de lait remplissent le coussin adipeux ([Fig 9](#)) (Richert et al., 2000). Des modifications importantes du stroma mammaire s'opèrent pendant la gestation : les adipocytes perdent leur contenu lipidique et le réseau vasculaire se développe afin d'apporter l'énergie et les nutriments nécessaires à la production du lait (Neville et al., 1998 ; Richert et al., 2000 ; Djonov et al., 2001).

Le rôle joué par la progestérone au cours de la gestation est illustré par l'inactivation du gène codant pour l'isoforme B du récepteur à la progestérone (PR-B) qui mène à un défaut de développement alvéolaire, alors que l'inactivation de PR-A n'a pas d'effet significatif sur le développement mammaire (Lydon et al., 1995 ; Brisken et al., 1998 ; Mulac-Jericevic et al., 2000 ; Mulac-Jericevic et al., 2003 ; Brisken, 2002; Conneely et al., 2003). Comme évoqué précédemment, uniquement 30% des cellules luminales expriment les récepteurs hormonaux (Brisken et al., 1998 ; Tanos et al., 2012). Des expériences de formation de glandes mammaires chimériques à partir de cellules PR-positives et -négatives montrent que les cellules PR-négatives sont capables de proliférer en réponse à la progestérone. Ces données indiquent que les cellules PR-positives agissent de façon paracrine sur les cellules PR-négatives pour stimuler leur prolifération. Parmi les facteurs paracrines identifiés, Wnt4 stimule la formation de branches latérales en début de gestation alors que la cytokine RANKL, via l'activation du facteur de transcription NFκB, stimule l'expression de la Cycline-D1, essentielle à la formation et au

maintien des alvéoles (Hennighausen & Robinson, 1998 ; Brisken et al., 2000 ; Fata et al., 2000 ; Cao et al., 2001 ; Mulac-Jericevic et al., 2003 ; Conneely et al., 2003 ; Tanos et al., 2012).

La PrL joue un rôle clef dans la prolifération et la différenciation alvéolaires durant la deuxième partie de la gestation (Ormandy et al., 1997). La signalisation PrL opère largement dans la glande mammaire via la voie JAK-STAT. La tyrosine kinase JAK2 est recrutée au niveau du récepteur de la prolactine et phosphoryle les deux isoformes du facteur de transcription STAT5 (STAT5a et STAT5b). Malgré leurs similitudes structurales, ces deux isoformes présentent des fonctions différentes puisque les souris déficientes pour STAT5a ou STAT5b ne présentent pas les mêmes phénotypes. En effet, alors que la perte de fonction de STAT5a mène à un défaut de différenciation de la glande pendant la gestation conduisant à un défaut de lactation, la perte d'expression de STAT5b n'a pas d'effet significatif sur le développement mammaire, à ce stade (Hennighausen & Robinson, 1998 ; Miyoshi et al., 2001 ; Yamaji et al., 2009). L'activation de STAT5 induit l'expression de gènes impliqués dans la prolifération et la différenciation alvéolaires tels que RANKL, IGF-2, le facteur de transcription Elf5 ou encore les protéines du lait telles que WAP et  $\beta$ -caséine (Brisken, 2002 ; Srivastava et al., 2003 ; Oakes et al., 2008 ; Brisken & O'Malley, 2010).

Les souris déficientes pour PR et PrL-R présentent un phénotype similaire caractérisé par une absence de compartiment alvéolaire fonctionnel. Bien que l'action de la PrL semble plus tardive, progestérone et PrL semblent interagir de façon synergique dans le contrôle du développement lobulo-alvéolaire. En effet, des études ont montré que la progestérone induit l'expression de la PrL et inversement (Lydon et al., 1995 ; Ormandy et al., 1997).

A côté des voies de signalisation progestérone- et PrL-dépendantes, des signaux additionnels ont été mis en évidence, intervenant dans le contrôle de la morphogenèse et de la différenciation alvéolaires. C'est le cas par exemple des récepteurs tyrosine kinase de la famille EGF (ErbB) et de leurs ligands, l'amphiréguline, l'EGF et le TGF $\alpha$  (Luetteke et al., 1999) ou encore du facteur de transcription GATA-3. L'inactivation de la signalisation dépendante de ErbB4, par exemple, mène à un défaut de prolifération et de différenciation fonctionnelle des cellules luminales mammaires, l'activation de STAT5 et l'induction de ses cibles transcriptionnelles étant largement compromises (Jones et al., 1999 ; Long et al., 2003). Par ailleurs, des approches de perte de fonction de GATA-3 indiquent que ce facteur de transcription

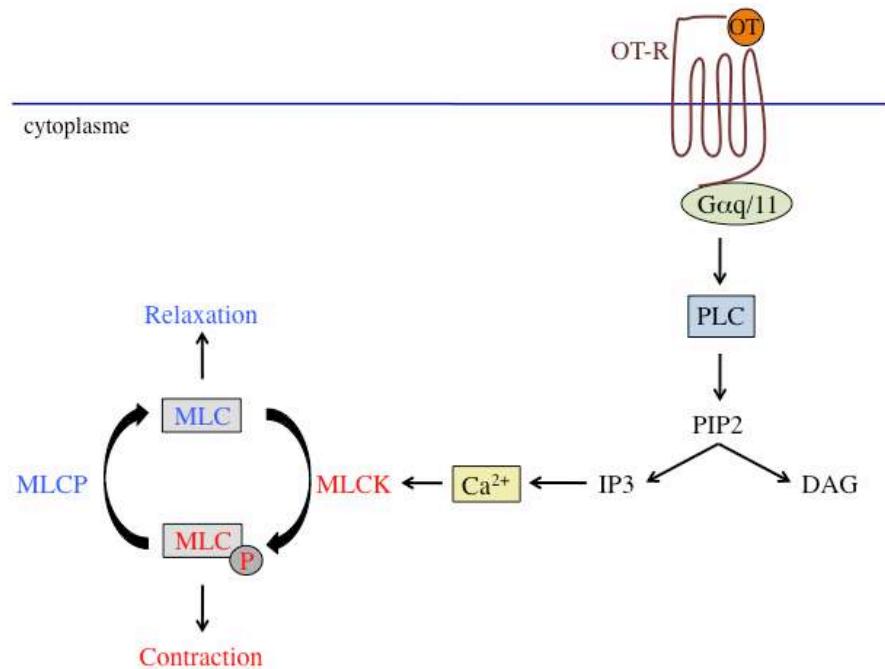
joue un rôle clef dans le contrôle de la différenciation lumineuse (Kouros-Mehr et al., 2006 ; Asselin-Labat et al., 2007).

A la fin de la gestation, la différenciation fonctionnelle de la glande mammaire est atteinte, le coussin adipeux est rempli d'alvéoles contenant du lait. Au moment de la parturition, sous l'influence de l'arrêt de la sécrétion de progestérone, la production des protéines et des lipides du lait augmente et les vésicules contenant le lait sont sécrétées dans la lumière des alvéoles. Les niveaux élevés de Prl permettent de maintenir la voie JAK/STAT active et par là même l'expression des gènes codant pour les protéines du lait (Neville et al., 2002).

En réponse à la succion des mamelons par les nouveaux-nés, l'hormone hypophysaire oxytocine (OT) est produite de façon pulsatile. Les impulsions sensorielles générées au niveau du mamelon sont transmises aux neurones oxytocinergiques et vont conduire à un relâchement massif d'oxytocine dans la circulation sanguine (Reversi et al., 2005 ; Armstrong & Hatton, 2006). Quand l'OT atteint la glande mammaire lactante, elle induit la contraction des cellules myoépithéliales située dans les alvéoles, ce qui mène à l'expulsion du lait des alvéoles vers les canaux jusqu'au mamelon. L'OT est nécessaire pour l'éjection du lait mais pas pour sa production et est requise pour maintenir le développement lobulo-alvéolaire pendant la lactation. L'action de l'OT passe par des récepteurs spécifiques (OT-R) localisés à la surface des cellules myoépithéliales. Ce sont des récepteurs à sept hélices transmembranaires, couplés à une protéine G,  $G\alpha_{q-11}$  dans les cellules myoépithéliales, ([Fig 10](#)) dont l'expression augmente pendant la gestation et reste forte au cours de la lactation (Reversi et al., 2005 ; Haaksma et al., 2011).

Comme dans les cellules de muscle lisse, la contraction des cellules myoépithéliales est régulée par la chaîne légère de myosine (MLC pour « myosin light chain »). La fixation de l'OT sur son récepteur induit l'activation de la phospholipase C, l'hydrolyse des lipides phosphoinositols, le relâchement du calcium des réservoirs intracellulaires et enfin la phosphorylation de la MLC. La phosphorylation de la MLC induit alors l'activité ATPasique de la myosine, la liaison de la myosine à l'actine et la contraction. La déphosphorylation de la MLC par une phosphatase spécifique induit la relaxation ([Fig 10](#)). L'activité contractile des cellules myoépithéliales requière donc l'expression des protéines contractiles de muscle lisse, comme

$\alpha$ SMA et la myosine de muscle lisse, ainsi que des interactions cellule-ECM appropriées (Reversi et al., 2005 ; Haaksma et al., 2011 ; Moumen et al., 2011).



**Figure 10.** Voie de signalisation activée par le récepteur de l'oxytocine (OT-R) conduisant à la contraction des cellules myoépithéliales.

La liaison de l'oxytocine (OT) sur son récepteur active la phospholipase C (PLC), qui va induire l'hydrolyse des lipides phosphoinositols (PIP2) et le relargage de calcium ( $Ca^{2+}$ ) des réservoirs intracellulaires. Le complexe calcium/calmoduline active la kinase de la chaîne légère de myosine (MLCK) menant à la phosphorylation de la MLC et à la contraction. Adapté de Reversi et al., 2005.

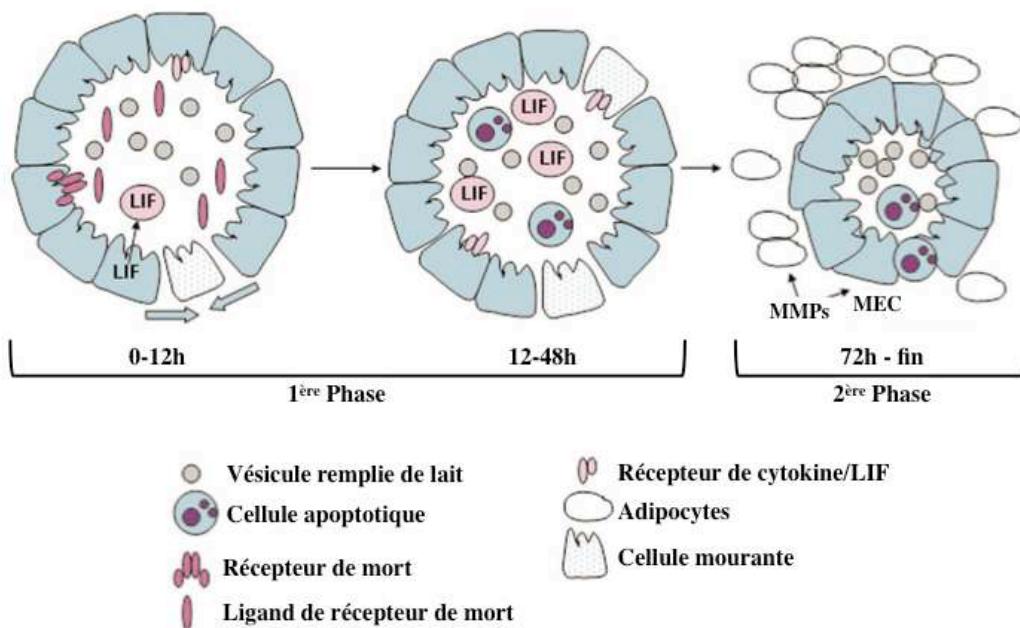
#### 1.2.4. Involution de la glande mammaire en fin de lactation

Au moment du sevrage, environ trois semaines après parturition, les souriceaux cessent leur activité de succion du mamelon. Sous l'effet de la stase du lait, la glande commence un processus de remodelage qui implique l'apoptose massive du tissu sécrétoire. En absence de stimulation, la production des hormones associées à la lactation (Prl et OT) ainsi que celle des protéines du lait et des marqueurs de différenciation épithéliale (caséines- $\alpha$ , - $\beta$  et - $\gamma$ , et lactalbumine- $\alpha$ ) voient leurs taux chuter (Wilde et al., 1999 ; Richert et al., 2000). Le processus d'involution de la glande mammaire se met en place selon deux phases successives.

La première phase consiste en l'apoptose massive des cellules épithéliales alvéolaires qui se détachent dans la lumière des alvéoles (Wilde et al., 1999 ; Richert et al., 2000 ; Watson,

2006). Cette phase est dite réversible puisque la lactation est à nouveau possible en cas de reprise de la succion par les souriceaux dans les deux jours qui suivent son commencement. Cette phase est contrôlée par les cytokines LIF et TGF $\beta$ 3 qui activent le facteur de transcription pro-apoptotique STAT3. D'autres molécules, comme le facteur de transcription p53 et les MMPs, ont été impliquées au cours de ce stade (Fig 11) (Jerry et al., 1998 ; Nguyen & Pollard, 2000 ; Kritikou et al., 2003 ; Schere-Levy et al., 2003 ; Watson, 2006 ; Staniszewska et al., 2012).

La deuxième phase d'involution, dite irréversible, débute au troisième jour d'arrêt du stimulus de succion. Le processus d'apoptose se poursuit de façon irréversible. La membrane basale est dégradée par les MMPs, les cellules épithéliales présentent une apoptose par perte d'ancre et les alvéoles collaborent pour former des grappes de cellules épithéliales. Les cellules adipeuses stromales envahissent à nouveau le coussin adipeux (Fig 11) (Green & Lund, 2005). Le processus d'involution prend approximativement deux semaines pour être complet. La glande mammaire se retrouve alors dans un stade similaire au stade post-pubertaire et reste quiescente jusqu'à la gestation suivante (Fig 9) (Wilde et al., 1999 ; Richert et al., 2000 ; Watson, 2006).



**Figure 11. Représentation schématique des événements survenant dans les alvéoles pendant l'involution.**

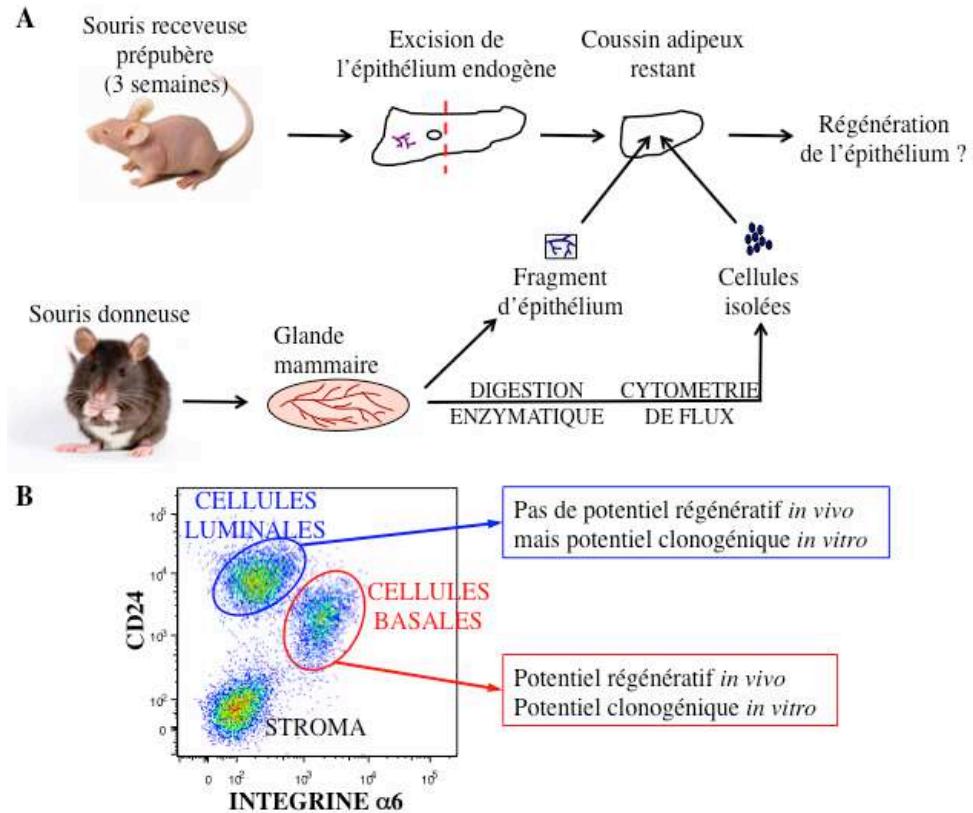
Première phase : la stase du lait induit l'expression de LIF et TGF $\beta$ 3, qui vont phosphoryler et activer le facteur de transcription STAT3. Ceci induit alors l'apoptose et le détachement des cellules apoptotiques dans la lumière des alvéoles. Les cellules voisines se rassètent pour refermer l'espace libéré. Deuxième phase : les MMPs détruisent la MEC environnante induisant une apoptose par perte d'ancre et la collape des alvéoles. Le remodelage de la glande mammaire est achevé par la redifférenciation d'adipocytes afin de reconstituer le coussin adipeux. A la fin de l'involution, la glande est revenue à un état proche de celui de la glande post-pubertaire. Adapté de Watson, 2006.

### **1.3. Cellules souches/progénitrices mammaires**

Les cellules souches adultes sont caractérisées par leur capacité à régénérer, à long terme, leur tissu d'origine. Cette capacité repose sur leurs propriétés d'autorenouvellement et de différenciation vers le ou les lignage(s) de leur tissu d'origine.

L'hypothèse de l'existence de cellules souches mammaires (ou MaSC, pour « Mammary Stem Cell ») remonte à la fin des années cinquante avec la mise en évidence du potentiel de régénération, après transplantation orthotopique, de fragments d'épithélium isolés de différentes régions de la glande mammaire (Deome et al., 1959).

La méthode de transplantation orthotopique représente encore aujourd'hui l'approche expérimentale standard pour analyser les capacités régénératives de l'épithélium mammaire (Visvader, 2009). Cette approche repose sur l'excision chirurgicale de l'épithélium endogène d'une souris prépubère laissant un coussin adipeux vide d'épithélium, dans lequel, les fragments d'épithélium ou les cellules épithéliales mammaires à tester sont transplantés. Le potentiel régénératif du tissu testé est analysé plusieurs semaines après transplantation. L'utilisation des deux coussins adipeux contralatéraux d'un même animal permet de comparer le potentiel régénératif de deux transplants en s'affranchissant des variations dues au contexte hormonal ([Fig 12A](#)) (Deome et al., 1959 ; Daniel et al., 1968). Les essais de transplantations en série permettent de tester la capacité de régénération à long terme d'un épithélium mammaire. Les essais de transplantation d'une population cellulaire en dilution limite permettent de déterminer la fréquence des cellules ayant des capacités régénératives. La méthode de transplantation orthotopique a permis, chez la souris, de mettre en évidence l'existence de cellules ayant un potentiel régénératif à tous les stades du développement mammaire et dans toutes les régions de l'épithélium (Tanos & Brisken, 2008).



**Figure 12.** Analyse du potentiel régénératif de l'épithélium mammaire : principe de la technique de transplantation orthotopique et analyse des populations cellulaires mammaires.

(A) L'épithélium endogène des glandes mammaires #4 d'une souris hôte immunodéficiente prépubère est retiré par microchirurgie. Des fragments d'épithélium ou des cellules épithéliales isolées d'une glande mammaire de souris donneuse sont greffés dans le coussin adipeux de la souris hôte. Les capacités régénératives des greffons sont analysées environ dix semaines après transplantation (B) Les cellules épithéliales basales et luminales sont isolées par cytométrie en flux à l'aide des marqueurs CD24 et intégrine  $\alpha 6$ . La transplantation de ces populations cellulaires isolées a révélé que seul le compartiment basal possède des cellules ayant la capacité de régénérer l'épithélium mammaire. En revanche, les expériences de formation de colonies clonales *in vitro* ont montré que les deux populations, basale et lumineuse, possèdent des cellules présentant un potentiel clonogénique.

### 1.3.1. Potentiel régénératif de l'épithélium mammaire de la population de cellules épithéliales basales

En 2006, des approches de transplantations de populations cellulaires isolées par cytométrie en flux, ont permis d'attribuer le potentiel régénératif de l'épithélium mammaire à la population de cellules épithéliales basales. Sur la base des marqueurs de surface CD24 et intégrines  $\alpha 6$  et  $\beta 1$ , les cellules de la glande mammaire ont pu être séparées en trois populations cellulaires : les cellules stromales (CD24<sup>négatives</sup>), les cellules épithéliales luminales (CD24<sup>fort</sup>,  $\alpha 6$ <sup>faible</sup>,  $\beta 1$ <sup>faible</sup>) et les cellules épithéliales basales (CD24<sup>faible</sup>,  $\alpha 6$ <sup>fort</sup>,  $\beta 1$ <sup>fort</sup>) (Fig 12B) (Shackleton et

al., 2006 ; Stingl et al., 2006 ; Sleeman et al., 2006 ; Bai & Rohrschneider, 2010). Les essais de transplantation de ces différentes populations cellulaires ont révélé que seules les cellules épithéliales basales, à l'état isolé, ont la capacité de régénérer une glande entière, comprenant des canaux et des alvéoles organisés en bicouche (Shackleton et al., 2006 ; Stingl et al., 2006 ; Sleeman et al., 2006 ; Bai & Rohrschneider, 2010).

Des expériences de transplantation en série indiquent que le potentiel régénératif des cellules basales isolées est maintenu à long terme. Cependant, les essais de transplantation en dilution limite montrent que la proportion de MaSC est très limitée au sein de la population de cellules CD24<sup>faible</sup> α6<sup>fort</sup> β1<sup>fort</sup>, qui renferme principalement des cellules myoépithéliales matures (Stingl et al., 2006 ; Kendrick et al., 2008 ; Visvader, 2009). Bien qu'il n'existe pas à ce jour de marqueur permettant d'isoler une population pure de MaSC, l'ensemble des données obtenues indique que les MaSC sont localisées dans le compartiment épithelial basal et que comme les cellules basales, elles n'expriment pas les récepteurs hormonaux (Stingl et al., 2006 ; Kendrick et al., 2008 ; Tanos & Brisken, 2008 ; Visvader, 2009).

### 1.3.2. Capacités clonogéniques des cellules épithéliales mammaires

De façon similaire à de nombreux tissus adultes, l'épithélium mammaire contiendrait, à côté des MaSC, des cellules progénitrices présentant des capacités d'amplification plus restreintes. Ces cellules progénitrices proviendraient de la division asymétrique des MaSC et pourraient donner, de façon transitoire, les cellules myoépithéliales et luminales des canaux et des alvéoles. Pour mettre en évidence les cellules progénitrices mammaires, des tests de formation de colonies en deux et trois dimensions (2D et 3D) ont été développés ([Fig 12B](#)).

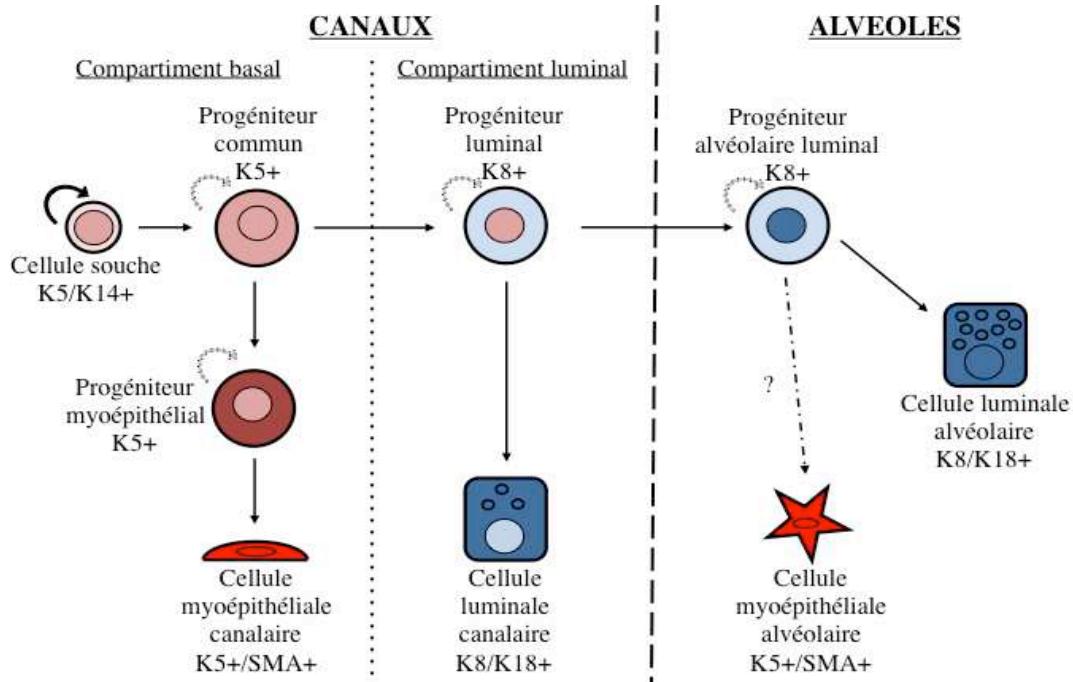
Des conditions de culture en 2D sur support de fibroblastes nourriciers ont été établies, permettant l'expansion clonale d'environ 4% des cellules basales isolées. Bien que l'identité de ces cellules ne soit pas formellement prouvée, elle sont considérées représenter les cellules progénitrices contenues dans le compartiment basal (Stingl et al., 2006 ; Asselin-Labat et al., 2007 ; Visvader, 2009). De la même façon, des essais de formation de colonies ont permis d'identifier une population de progéniteurs présente dans le compartiment luminal. Cette population peut être enrichie à l'aide des marqueurs de surface Sca-1 ou intégrine β3 (CD61). En

effet, deux populations luminales fonctionnellement distinctes ont pu être mise en évidence à l'aide du marqueur Sca-1 : une population négative pour Sca-1 qui est majoritairement négative pour les récepteurs hormonaux et est enrichie en cellules à potentiel clonogénique et une population exprimant Sca-1 qui est enrichie en cellules ER+, exprimant le récepteur ER $\alpha$  et les récepteurs PR et Prl-R et qui montre une faible clonogénérité (Sleeman et al., 2006 ; Sleeman et al., 2007 ; Visvader, 2009 ; Regan et al., 2012). De façon indépendante, des études ont montré que les cellules luminales exprimant l'intégrine  $\beta 3$  sont enrichies en progéniteurs luminaux (Asselin-Labat et al., 2007). Ainsi, la différenciation des cellules progénitrices luminales s'accompagne d'une augmentation de l'expression de Sca1 et d'une baisse importante de celle de l'intégrine  $\beta 3$  (Visvader, 2009).

Des essais de culture en 3D sur support non adhérent ont été développés pour analyser les propriétés fonctionnelles des cellules épithéliales mammaires. Initialement mis au point pour l'étude des cellules mammaires humaines, ces essais ont récemment été adaptés au modèle murin (Dontu et al., 2003 ; Spike et al., 2012). En présence de Matrigel, des structures sphéroïdes d'origine clonale, nommées mammosphères, se développent. Elles peuvent être repiquées plusieurs fois permettant ainsi de quantifier le potentiel clonogénique et d'autorenouvellement des cellules épithéliales mammaires, basales et luminales.

### 1.3.3. Modèle hiérarchique de lignage cellulaire dans l'épithélium mammaire

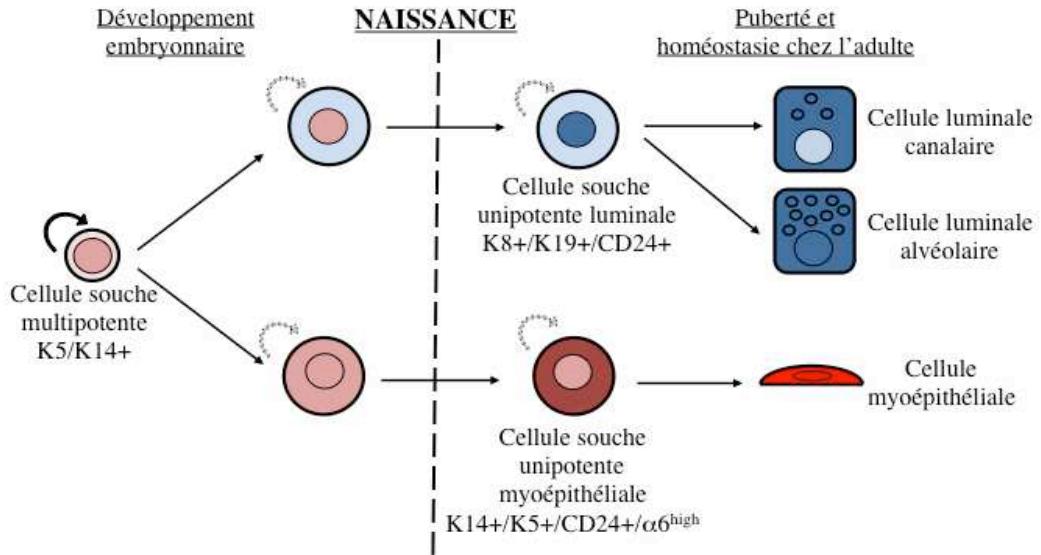
Les expériences de transplantation et de clonogénérité ont conduit à l'ébauche d'un modèle hypothétique de ségrégation des lignages épithéliaux mammaires chez la souris. Ce modèle propose que de rares cellules souches multipotentes de type basal donneraient naissance à des cellules progénitrices possédant des capacités plus restreintes, à l'origine des deux lignages mammaires ([Fig 13](#)) (Deugnier et al., 2002 ; Visvader, 2009 ; Bachelard-Cascales et al., 2010).



**Figure 13.** Schéma hypothétique de ségrégation des lignages épithéliaux mammaires issu des expériences de transplantation et de clonogénérité.

Des cellules souches multipotentes localisées dans le compartiment basal permettraient la régénération d'une glande mammaire entière. La division asymétrique de ces cellules souches donnerait naissance à un progéniteur commun, capable de générer deux types de progéniteurs : des progéniteurs myoépithéliaux conservant une localisation basale et des progéniteurs luminaux dans le compartiment luminal. Le premier type de progéniteurs pourrait se différencier en cellules myoépithéliales canalaires. Le second, en revanche, aurait la capacité de se différencier en cellules luminales canalaires, mais également, lors de chaque gestation, induirait la formation des deux types de cellules composant les alvéoles. Adapté de Visvader, 2009.

A l'aide de stratégies de traçage cellulaire, il a récemment été confirmé que les deux lignages épithéliaux mammaires ont pour origine des cellules embryonnaires précurseurs qui expriment les kératines basales K5 et K14 (Van Keymeulen et al., 2011 ; Moumen et al., 2012). Cependant, ces études montrent que pendant la période postnatale, les cellules du compartiment basal ne contribuent pas de façon significative à la formation du compartiment luminal. Ainsi, l'homéostasie de l'épithélium mammaire adulte ne serait maintenue que par des cellules souches ou progénitrices au potentiel restreint à un seul lignage, même si la participation de rares cellules souches/progénitrices bipotentes ne peut être exclue (Fig 14) (Taddei et al., 2008 ; Van Keymeulen et al., 2011 ; van Amerongen et al., 2012).



**Figure 14.** Schéma hypothétique de ségrégation des lignages épithéliaux mammaires établi grâce aux expériences de traçage cellulaire.

Les cellules souches mammaires embryonnaires multipotentes (K5/K14+) engendreraient, dès la naissance, des cellules souches unipotentes distinctes de type basal et luminal qui assurerait l'expansion de la glande mammaire pendant la puberté et la grossesse. Adapté de Van Keymeulen et al., 2011.

#### 1.3.4. Mécanismes de contrôle de la fonction des cellules souches et progénitrices mammaires

Depuis plusieurs années, des travaux utilisant notamment des modèles murins ont permis d'identifier certains signaux intervenant dans la régulation de la fonction des cellules souches et progénitrices mammaires.

Des études récentes ont montré le rôle crucial joué par les hormones stéroïdiennes, œstrogènes et progestérone, dans le contrôle de la fonction des MaSC. En effet, malgré l'absence d'expression des récepteurs hormonaux, les MaSC présentes dans le compartiment basal répondent à la stimulation hormonale pendant la gestation grâce à différents signaux paracrines provenant des cellules luminales ER+/PR+, parmi lesquels RANKL et Wnt-4 (Kendrick et al., 2008 ; Visvader, 2009 ; Asselin-Labat et al., 2010 ; Joshi et al., 2010).

Notre équipe a montré que l'inactivation du gène codant pour l'intégrine  $\beta 1$  dans les cellules basales entraîne une perte du potentiel régénératif de l'épithélium mammaire. L'absence d'intégrine  $\beta 1$  altère l'orientation de l'axe de division des cellules souches/progénitrices basales, ce qui conduit à l'épuisement de leur potentiel d'autorenouvellement (Taddei et al., 2008). Par

ailleurs, une étude récente a également montré que l'activité de la métalloprotéase CD10, marqueur des cellules progénitrices, dans le compartiment basal, ainsi que l'adhésion à la MEC par les intégrines  $\beta$ 1 sont nécessaires pour prévenir la différenciation des cellules progénitrices mammaires. Ces travaux mettent en évidence l'importance des interactions entre les cellules basales et la MEC ainsi que celle du relargage de molécules de signalisation par l'action des protéases, dans le maintien d'une population de MaSC fonctionnelles (Bachelard-Cascales et al., 2010).

D'autres molécules sont impliquées dans la régulation de la fonction des MaSC. C'est le cas par exemple de la protéine Bmi du groupe Polycomb, impliquée dans la répression du cycle cellulaire et requise pour l'autorenouvellement des cellules souches dans plusieurs tissus (Molofsky et al., 2003 ; Park et al., 2003). Son inactivation dans la glande mammaire entraîne de sévères défauts de croissance épithéliale au cours de la puberté, indiquant que le développement et le maintien de MaSC dépendent en partie du facteur Bmi1 (Pietersen et al., 2008). Des travaux récents ont révélé l'existence, dans la glande mammaire adulte, d'une population de cellules répondant à la signalisation Wnt et enrichie en cellules présentant un potentiel régénératif *in vivo*. En effet, la culture sur plusieurs passages des cellules épithéliales mammaires en présence de facteurs Wnt permet de maintenir un potentiel régénératif dans des expériences de transplantation orthotopique, alors que ce potentiel est perdu si la culture est réalisée en absence de Wnt. Ces données indiquent un rôle important de la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine dans le maintien de l'autorenouvellement des MaSC (Badders et al., 2009 ; Zeng & Nusse, 2010 ; van Amerongen et al., 2012 ; Plaks et al., 2013). De plus, la voie Notch, le facteur de transcription Myc, ou encore le facteur de transcription p53 ont également été impliqués dans la régulation de la fonction des MaSC. Par exemple, le facteur Myc est essentiel au maintien de l'activité des MaSC, alors que le facteur p53 permet de restreindre l'expansion des MaSC (Bouras et al., 2008 ; Visvader, 2009 ; Cicalese et al., 2009 ; Moumen et al., 2012 ; Chiche et al., 2013).

Enfin, il apparaît que de nombreux facteurs de transcription impliqués dans la mise en place de l'alvéologénèse jouent un rôle important dans le contrôle du développement du lignage luminal. Ainsi, le défaut d'alvéologénèse accompagnant la perte de fonction de Stat5a/5b dans la glande mammaire reflète le rôle essentiel joué par ce facteur dans le maintien de progéniteurs luminaux (Yamaji et al., 2009 ; Visvader, 2009 ; Vafaizadeh et al., 2010). Au contraire, les souris

déficientes en Gata-3 et Elf-5 présentent une accumulation de progéniteurs luminaux (Kouros-Mehr et al., 2006 ; Asselin-Labat et al., 2007 ; Oakes et al., 2008 ; Visvader, 2009).

### 1.3.5. Rôle de la transition épithélium-mésenchyme dans l'acquisition des propriétés de cellules souches mammaires

Des travaux ont montré que les cellules différenciées sont capables de retrouver une certaine plasticité afin de retrouver des propriétés de MaSC et donner les différents types cellulaires sous certaines conditions (Stingl et al., 2006 ; Kendrick et al., 2008 ; Lu & Werb, 2008).

La transition épithélium-mésenchyme (ou EMT, pour « Epithelial/Mesenchymal Transition ») joue un rôle central dans de nombreuses étapes du développement normal et pathologique. Les mécanismes de l'EMT contrôlent la plasticité des cellules épithéliales en induisant la perte des propriétés d'adhésion intercellulaire et de polarité cellulaire, au profit de propriétés mésenchymateuses incluant une augmentation de leur motilité. La perte d'expression de la E-cadhérine représente un événement clef de l'EMT. De nombreux facteurs ont été impliqués dans ce mécanisme, comme par exemple les facteurs de transcription Snail, Slug, Twist, Zeb et FoxC2, qui répriment directement l'expression de la E-cadhérine. Les voies de signalisation de l'EMT se confondent avec celles du maintien d'une population de cellules souches (Polyak & Weinberg, 2009 ; Thiery et al., 2009 ; Tomaskovic-Crook et al., 2009 ; Brabletz & Brabletz, 2010 ; Chaffer et al., 2011 ; Nassour et al., 2012 ; Hollier et al., 2013).

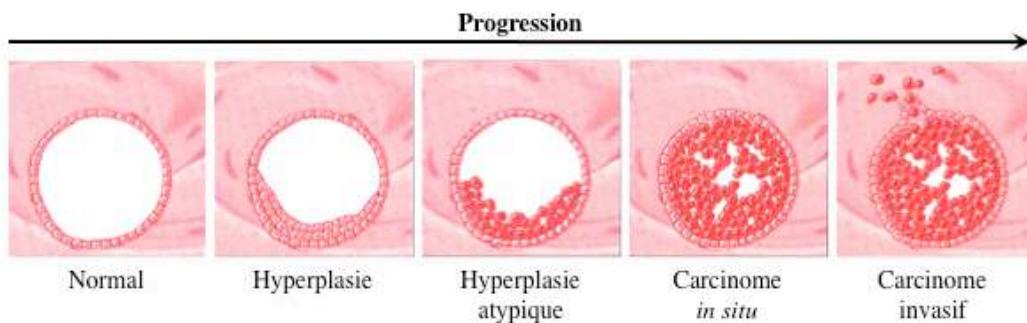
Dans la glande mammaire, le facteur Slug (*Snai2*) est exprimé uniquement par les cellules basales (Proia et al., 2011 ; Guo et al., 2012). L'activation de Slug dans les cellules luminales leur confère des propriétés de régénération mammaire, caractéristique fonctionnelle des cellules souches (Mani et al., 2008 ; Morel et al., 2008 ; Nassour et al., 2012), et réprime la différenciation vers un destin luminal (Proia et al., 2011 ; Sarrio et al., 2012). De plus, une étude a montré que, chez la souris, les facteurs de transcription Slug et Sox9 coopèrent pour permettre la conversion d'une cellule lumineuse différenciée en MaSC. En effet, Sox9 permet le passage des cellules d'un état luminal différencié vers un état progéniteur luminal alors que Slug induit le passage de progéniteur luminal à MaSC (Guo et al., 2012).

## 1.4. Tumorigénèse mammaire

Le développement tumoral est un processus très complexe comprenant plusieurs étapes et ayant des origines diverses. Une cellule normale subit des altérations génétiques et épigénétiques qui la transforment progressivement en cellule cancéreuse présentant une dérégulation des mécanismes contrôlant la prolifération, la survie et/ou la différenciation.

### 1.4.1. Mécanismes de développement

Les cancers du sein se développent selon une progression séquentielle à travers différentes phases. La tumorigénèse commence par l'hyperprolifération des cellules épithéliales qui progressent en carcinome *in situ*, lorsque les cellules envahissent et remplissent le lumen des canaux ou des unités lobulo-alvéolaires (on parle de carcinome canalaire ou lobulaire). Le carcinome devient invasif lorsque la membrane basale est altérée, et enfin métastatique lorsque les cellules passent dans la circulation sanguine ou lymphatique et vont coloniser d'autres organes (Fig 15). L'une des marques de la progression tumorale est la perte de l'architecture et de la polarité tissulaire (Gudjonsson et al., 2005 ; Place et al., 2011).



**Figure 15. Représentation schématique du modèle d'évolution du cancer du sein.**

Le développement tumoral commence par la prolifération anarchique et localisée de cellules épithéliales mammaires suite à des altérations génétiques et épigénétiques. Certaines zones peuvent alors présenter des cellules ayant une morphologie anormale et formant des hyperplasies atypiques. Les carcinomes *in situ* sont caractérisés par une prolifération massive des cellules épithéliales. La rupture de la membrane basale et l'invasion du tissu conjonctif voisin permettent aux cellules cancéreuses d'atteindre le système circulatoire et de former des métastases.

Les cancers du sein ont majoritairement pour origine une mutation sporadique ou *de novo* et sont répertoriés en fonction de critères histologiques et moléculaires, permettant ainsi de développer des thérapies appropriées. Cependant, environ 10% des cancers du sein sont dits héréditaires et se caractérisent par des mutations germinales localisées sur les gènes *Brcal* et

*Brca2*. Ces gènes sont impliqués dans la réparation de l'ADN et le contrôle du cycle cellulaire. Plusieurs études ont montré que le risque de développer un cancer du sein est augmenté par différents facteurs comme une puberté précoce, une grossesse tardive, ou une absence de grossesse (Sivaraman & Medina, 2002 ; Neville et al., 2002 ; Britt et al., 2007 ; Visvader, 2009 ; Asselin-Labat et al., 2010).

D'un point de vue histologique, deux grands groupes de tumeurs du sein peuvent être identifiés : les carcinomes d'origine canalaire (70 à 80% des cancers du sein) et les carcinomes d'origine lobulaires (10 à 15% des cas). Les carcinomes canalaires présentent un pronostic clinique variable, dépendant des caractéristiques morphologiques des cellules, ainsi que de l'expression des récepteurs hormonaux ER et PR, ou du marqueur de prolifération Ki67. Les carcinomes lobulaires sont caractérisés par une forte expression des récepteurs hormonaux et présentent un risque élevé de devenir invasifs, notamment via la perte ou l'inactivation du gène codant pour la E-cadhérine (Berx et al., 1996 ; Cleton-Jansen, 2002). Il existe d'autres types de tumeur du sein qui sont plus rares, comme les carcinomes médullaires, papillaires ou tubulaires, qui sont généralement associés à un bon pronostic clinique, ou les myoépithéliomes, qui sont très agressifs et sont issus des cellules myoépithéliales mammaires (Buza et al., 2010).

Afin de prédire l'évolution des tumeurs et de déterminer l'orientation thérapeutique, les médecins utilisent différents facteurs pronostiques. L'expression des récepteurs hormonaux ER et PR donne une information essentielle sur la réponse prévisible des tumeurs mammaires aux thérapies hormonales existantes. Les patientes qui développent des tumeurs ErbB2+ bénéficient également d'un traitement thérapeutique ciblé (Kuukasjarvi et al., 1997 ; Reis-Filho & Pusztai, 2011). D'autres marqueurs comme la détection immunohistochimique de Ki67 ou p53, sont aussi utilisés pour prévoir l'évolution d'un cancer du sein (Reis-Filho & Pusztai, 2011).

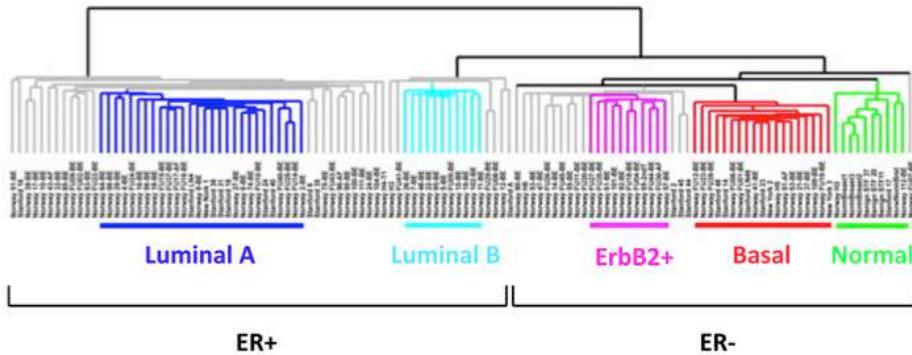
Le compartiment stromal mammaire joue un rôle important dans le développement et la progression des carcinomes mammaires. Il a été observé que la croissance tumorale requiert des interactions stromales locales et systémiques, permettant la régulation de la croissance néoplasique de l'épithélium mammaire (Noel & Foidart, 1998 ; Place et al., 2011 ; Lu et al., 2012). Par exemple, des travaux ont montré que la présence de cellules souches mésenchymateuses augmente significativement la dissémination des cellules mammaires cancéreuses via l'action paracrine de la chimiokine CCL5 (Karnoub et al., 2007). Une autre étude

a montré que la sécrétion par les cellules stromales de périostine active la voie de signalisation Wnt dans les cellules tumorales et favorise leur migration (Malanchi et al., 2012). Ainsi, des médicaments anti-cancéreux ciblant les interactions entre le stroma et les cellules épithéliales sont en cours de développement (Britt et al., 2007 ; Muschler & Streuli, 2010).

#### 1.4.2. Classification moléculaire

Le cancer du sein est une maladie très hétérogène aussi bien d'un point de vue histologique que moléculaire (Perou et al., 2000 ; Sorlie et al., 2001 ; Gudjonsson et al., 2005 ; Visvader, 2009). Au cours des dernières années, l'analyse du profil transcriptionnel des carcinomes mammaires humains a révélé l'existence de différentes signatures moléculaires permettant de les classifier.

Les premiers travaux ont mis en évidence l'existence de deux entités bien distinctes en termes moléculaires constituées par les tumeurs ER+ et les tumeurs ER- ([Fig 16](#)). Cette étude a également permis d'identifier cinq groupes distincts, sur la base de leur profil d'expression génique. Il s'agit tout d'abord des groupes « luminal A » et « luminal B » qui expriment les marqueurs de cellules luminales, comprennent majoritairement des tumeurs ER+ et sont généralement associés à un bon pronostic clinique. Les groupes restants constituent essentiellement des tumeurs ER-. Il s'agit des cancers de type basal (ou « basal-like »), des tumeurs surexprimant le récepteur ErbB2 (appelé HER2 chez l'Homme) et des cancers dit « normal-like ». Ces tumeurs ER- sont très souvent de haut grade, à fort index mitotique, non différenciées, et associées à un mauvais pronostic clinique ([Fig 16](#)) (Perou et al., 2000 ; Sorlie et al., 2001 ; Sorlie et al., 2003 ; Gudjonsson et al., 2005 ; Visvader, 2009).



**Figure 16. Classification moléculaire des cancers du sein.**

Classification hiérarchique constituée à partir de tumeurs mammaires de 115 patientes. Cinq groupes ont pu être différenciés à partir des niveaux d'expression de plus de 530 gènes. Les tumeurs exprimant le récepteur aux œstrogènes (ER+) comprennent les groupes luminal A et luminal B alors que les tumeurs caractérisées par l'absence de ER (ER-) sont sous-divisées en trois groupes : le groupe ErbB2, qui présente une amplification du locus ErbB2, le groupe « basal-like », qui exprime un grand nombre de marqueurs des cellules basales, et le groupe « normal-like ». Adapté de Sorlie et al., 2003.

Ces dernières années, deux nouveaux types de cancers du sein ont été mis en évidence : les groupes « claudin-low » et apocrines (Visvader, 2009 ; Reis-Filho & Pusztai, 2011). Le groupe « claudin-low » est caractérisé par une faible expression des marqueurs de jonctions cellulaires, une augmentation des gènes caractéristiques de l'EMT ( $\alpha$ SMA, Slug, FOXC2 et N-cadhérine), et une faible expression des marqueurs de différenciation lumine (Prat et al., 2010 ; Morel et al., 2012 ; Herschkowitz et al., 2012 ; Hollier et al., 2013). Le groupe des tumeurs apocrines est caractérisé par l'expression du récepteur aux androgènes (Farmer et al., 2005).

Des études récentes combinant des analyses génomiques et transcriptionnelles sur un très grand nombre de tumeurs mammaires ont révélé l'existence de nouveaux sous-groupes à l'intérieur des cinq premiers groupes décrits, présentant des pronostics cliniques différents (Curtis et al., 2012). L'analyse globale des cancers du sein en utilisant des approches à grande échelle (comprenant l'étude du nombre de copies d'ADN génomique ou des méthylations de l'ADN, l'analyse des profils transcriptionnels, le séquençage des microRNAs et l'analyse des protéines en chromatographie en phase reverse) a confirmé la convergence des différentes altérations génétiques et épigénétiques vers quatre phénotypes majeurs de cancers du sein : les tumeurs luminales A et B, les tumeurs ErbB2+ et les tumeurs « basal-like » (The Cancer Genome Atlas Network, 2012). Cette classification moléculaire confirme la grande hétérogénéité observée au niveau histologique dans le cancer du sein, et souligne l'importance du statut du récepteur aux œstrogènes.

#### 1.4.3. Les tumeurs mammaires de type basal

Les tumeurs de type basal (ou « basal-like ») représentent 15 à 20% des cancers du sein. D'un point de vue histologique, ce sont majoritairement des carcinomes canalaires invasifs, mais elles comprennent aussi des tumeurs métaplasiques et médullaires (Fadare & Tavassoli, 2007 ; Weigelt et al., 2009). Les tumeurs de type basal expriment de hauts niveaux de récepteur à l'EGF (EGFR), de kératines basales (K5, K14 et K17), ainsi que d'autres gènes caractéristiques des cellules basales comme les marqueurs p63, la P-cadhérine, l'intégrine  $\beta$ 4 et la métalloendopeptidase CD10 (Fadare & Tavassoli, 2007 ; Bertucci et al., 2012). En revanche, elles n'expriment pas les récepteurs hormonaux ER $\alpha$  et PR, et ne présentent pas d'amplification de ErbB2, et sont, de ce fait, également appelées tumeurs triple-négatives. Cependant, il est important de noter que le groupe de tumeurs triple-négatives n'est constitué qu'à 70% de tumeurs de type basal (Bertucci et al., 2012).

Les altérations moléculaires les plus fréquentes dans les tumeurs de type basal incluent les mutations des gènes codant pour les protéines PTEN, TP53, MET et BRCA1 (Sorlie et al., 2001 ; Deugnier et al., 2002 ; Faraldo et al., 2005 ; Gudjonsson et al., 2005 ; Fadare & Tavassoli, 2007 ; Stingl & Caldas, 2007 ; Visvader, 2009 ; Moumen et al., 2011 ; Proia et al., 2011 ; The Cancer Genome Atlas Network, 2012). La voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine est également trouvée activée (Hayes et al., 2008 ; Khramtsov et al., 2010 ; Moumen et al., 2011) et ces tumeurs présentent une surexpression des gènes activateurs du cycle cellulaire, de l'angiogenèse et de la motilité cellulaire.

L'identification des cellules à l'origine de la transformation néoplasique représente un élément clef pour traiter efficacement les patients. Comme les tumeurs de type basal expriment des marqueurs caractéristiques des cellules basales mammaires, l'hypothèse que ces tumeurs proviendraient de la dérégulation de MaSC, -population cellulaire qui réside à long terme dans le tissu favorisant potentiellement l'accumulation de mutations-, a été émise. L'étude des tumeurs associées à une mutation du gène *Brca1* à l'aide de modèles murins, a révélé que bien que appartenant au groupe des carcinomes mammaires de type basal, ces tumeurs seraient issues de la transformation de cellules progénitrices luminales (Lim et al., 2009 ; Molyneux et al., 2010). Plus récemment, des études ont montré que BRCA1 régule l'activité du facteur de transcription Slug. Ainsi, la perte de BRCA1 induit une augmentation de l'expression de la protéine SLUG, un

blocage de la différenciation lumineuse et un retour des cellules progénitrices vers un état souche (Proia et al., 2011 ; Gastaldi et al., 2013 ; Hollier et al., 2013). L'origine cellulaire des carcinomes mammaires de type basal n'a pas été déterminée dans le cas d'altérations génétiques non associées au gène *Brca1* et l'hypothèse des MaSC comme cellules à l'origine de la transformation néoplasique reste ouverte dans le cas des carcinomes non héréditaires.

Les carcinomes de type basal n'exprimant pas les récepteurs hormonaux et montrant de faibles taux de ErbB2, les thérapies ciblées classiques sont inefficaces dans le traitement de ces tumeurs. De plus, ces tumeurs invasives montrent une forte tendance à développer des métastases. Ainsi, les carcinomes de type basal présentent un mauvais pronostique. Cependant, les analyses transcriptionnelles ont ouvert de nouvelles perspectives dans le développement de thérapies spécifiques (Rodler et al., 2010 ; Bertucci et al., 2012).

#### 1.4.4. Théories menant à l'hétérogénéité tumorale

A l'hétérogénéité inter-tumorale que nous venons de décrire, s'ajoute une hétérogénéité intra-tumorale, chaque tumeur présentant une grande diversité cellulaire et génétique. La compréhension des mécanismes moléculaires à l'origine de cette hétérogénéité représente un apport capital pour le développement de thérapies anti-cancéreuses plus efficaces.

Deux mécanismes essentiels ont été proposés pour expliquer l'hétérogénéité intra-tumorale : le modèle stochastique ou dit d'évolution clonale, et le modèle hiérarchique ou dit des cellules souches cancéreuses (CSC). Bien que ces deux modèles partagent des similitudes, ils ne présentent pas les mêmes implications cliniques (Campbell & Polyak, 2007).

##### *a) Modèle stochastique ou dit d'évolution clonale*

Ce modèle repose sur l'hypothèse que des mutations peuvent survenir dans n'importe quel type cellulaire et être sélectionnées lorsqu'elles confèrent à la cellule un avantage de survie ou de prolifération. Des combinaisons variées de mutations peuvent survenir dans différents types cellulaires, conduisant alors à une sélection des cellules les plus aptes à survivre dans des

environnements spécifiques. Au fur et à mesure que la tumeur progresse, l'instabilité génétique et la prolifération incontrôlée de ces cellules permettent l'apparition de cellules présentant des mutations additionnelles et donc de nouvelles caractéristiques, qui correspondent à chaque étape de l'évolution du cancer. Une diversité cellulaire s'installe ainsi au sein de la tumeur (Nowell, 1976 ; Campbell & Polyak, 2007).

Ce modèle repose sur l'observation que la tumeur et les métastases présentes au sein d'un même individu partagent de nombreuses mutations génétiques mais que chacune présente des populations cellulaires porteuses d'anomalies génétiques et épigénétiques supplémentaires (Fujii et al., 1996 ; Campbell & Polyak, 2007).

#### *b) Modèle hiérarchique ou dit des cellules souches cancéreuses*

Ce modèle prend en compte l'organisation hiérarchique du tissu normal. Ainsi, un même événement oncogénique survenant dans des populations cellulaires distinctes conduirait à la formation de sous-types tumoraux différents. Les cellules souches et progénitrices seraient les cibles initiales de la transformation maligne. L'hétérogénéité cellulaire observée dans une tumeur résulterait des différenciations aberrantes de ces cellules, menant à la formation de la masse désordonnée observée histologiquement. Ces cellules initiatrices de tumeurs sont appelées cellules souches cancéreuses (CSC) et représenteraient une petite population persistante au sein de la tumeur et dirigeant l'initiation, la progression et la récurrence tumorale (Reya et al., 2001 ; Campbell & Polyak, 2007 ; Pece et al., 2010 ; Clevers, 2011 ; Baccelli & Trumpp, 2012 ; Tang, 2012 ; Medema, 2013).

Cette hypothèse provient de plusieurs observations. Tout d'abord, les cellules souches et progénitrices adultes se maintiennent à long terme dans le tissu, en faisant des candidats idéaux à l'accumulation de mutations (Visvader, 2009 ; Visvader, 2011). Ensuite, les cellules souches normales et cancéreuses sont régulées par des mécanismes similaires. Enfin, la transplantation d'un grand nombre de cellules tumorales est nécessaire pour propager une tumeur, suggérant que seule une petite portion de cellules au sein de la tumeur possède la capacité de régénérer une tumeur (Reya et al., 2001 ; Campbell & Polyak, 2007 ; Clevers, 2011 ; Parashurama et al., 2012).

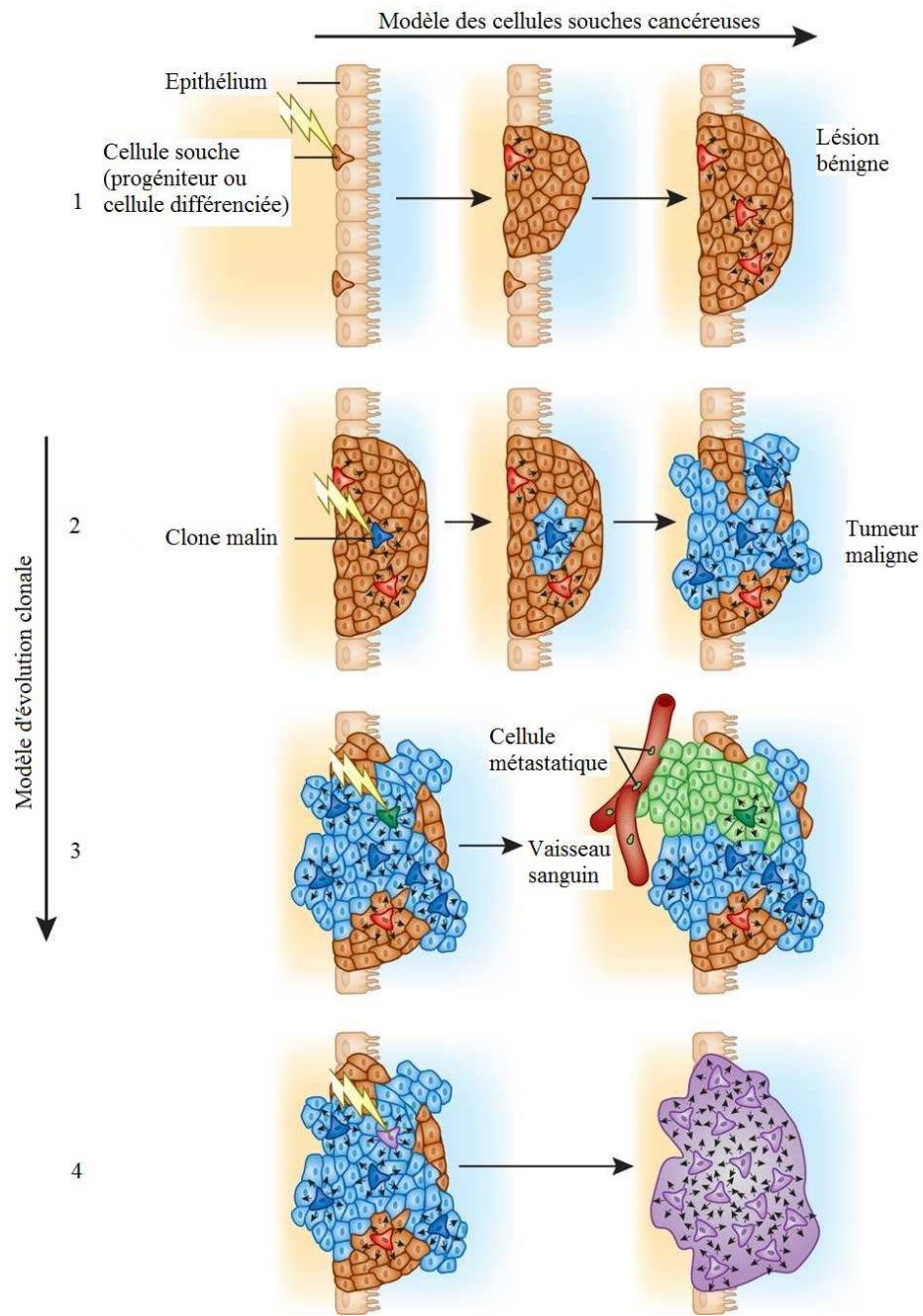
Des travaux ont montré qu'il existe une sous-population de cellules tumorales, caractérisée par l'expression des marqueurs CD44 ou ALDH1, qui représente la population de cellules initiatrices de tumeurs (Al-Hajj et al., 2003 ; Shipitsin et al., 2007 ; Ginestier et al., 2007 ; Campbell & Polyak, 2007 ; Clevers, 2011 ; Baccelli & Trumpp, 2012 ; Tang, 2012 ; Medema, 2013).

### c) Modèle stochastique ou hiérarchique ?

Bien que ces deux modèles partagent de nombreuses similitudes, aucun d'entre eux n'explique seul l'ensemble des aspects de l'hétérogénéité intra-tumorale. Ainsi, il semblerait que l'hétérogénéité intra-tumorale s'expliquerait par une combinaison de ces deux modèles.

Ainsi, l'initiation tumorale pourrait prendre place dans des cellules souches/progénitrices normales ou dans des cellules différenciées ayant acquis des capacités de cellules souches (à la suite de mutations de gènes impliqués dans l'EMT). Les CSC qui en résultent pourraient s'autorenouveler et subsister au sein de la tumeur et se différencier. L'instabilité génétique associée au fort index mitotique des cellules tumorales mènerait à l'apparition de mutations distinctes qui donneraient des sous populations cellulaires différentes, en compétition, au sein de la tumeur et qui participeraient à l'hétérogénéité intra-tumorale ([Fig 17](#)) (Campbell & Polyak, 2007 ; Pece et al., 2010 ; Clevers, 2011 ; Visvader, 2011 ; Chaffer et al., 2011 ; Baccelli & Trumpp, 2012 ; Tang, 2012 ; Medema, 2013).

Des traitements ciblant les CSC ont été proposés en alternative des thérapies anti-cancéreuses courantes. Cependant, l'hétérogénéité intra-tumorale et le concept d'évolution clonale suggèrent que des populations de cellules tumorales multiples devront être ciblées pour que le traitement soit efficace (Campbell & Polyak, 2007 ; Clevers, 2011 ; Visvader, 2011). De plus, la présence de CSC quiescentes au sein des tumeurs a été mise en évidence, soulignant l'importance de développer des stratégies qui ne ciblent pas uniquement les cellules qui se divisent rapidement (Baccelli & Trumpp, 2012).



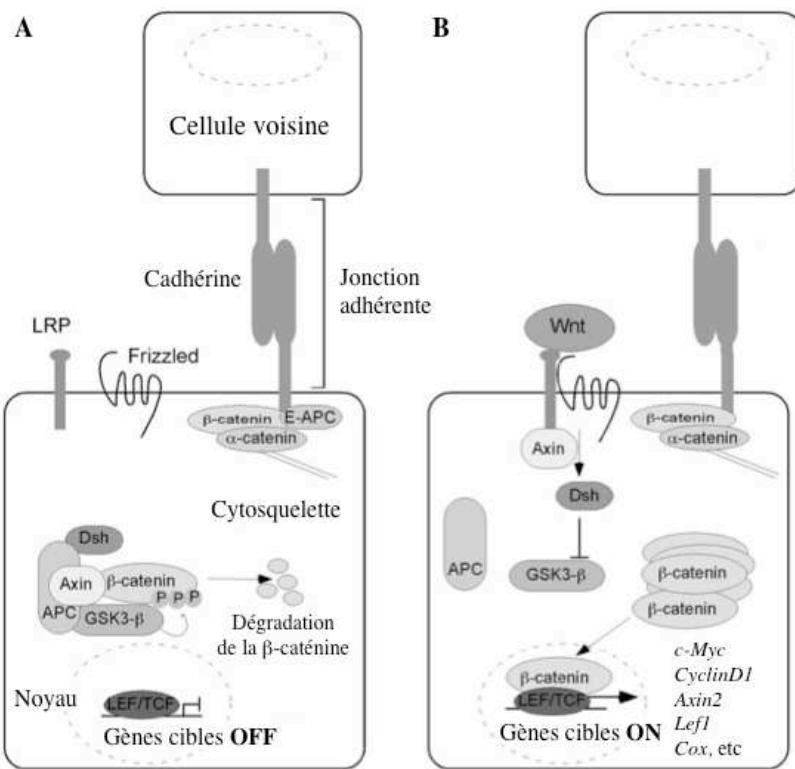
**Figure 17. Modèle hypothétique d'apparition de l'hétérogénéité tumorale.**

L'évolution clonale dirige la progression tumorale. Cependant, à tous les stades du processus d'évolution clonale, les tumeurs contiennent différents sous-clones contenant des CSC. (1) La première mutation oncogénique survient dans une cellule souche (ou progénitrice, ou une cellule différenciée redevenu souche) d'un épithélium sain, menant à la croissance d'une lésion bénigne. (2) Le deuxième événement oncogénique touche l'une des cellules dans la lésion bénigne, menant au développement d'un clone plus invasif et agressif au sein de la tumeur primaire. (3) Une troisième mutation au sein de ce dernier clone induit une transformation supplémentaire, qui provoquera l'entrée de cellules cancéreuses au sein de la circulation sanguine afin de disséminer la tumeur. Des sous-clones génétiquement différents peuvent coexister dans une tumeur. (4) Une dernière mutation induit la transformation de la tumeur vers un phénotype peu différencié. Elle ne contient alors que des cellules se comportant comme des CSC. Adapté de Clevers, 2011.

#### 1.4.5. Rôle de la voie Wnt/β-caténine au cours du développement et de la tumorigenèse mammaire

La voie de signalisation Wnt/β-caténine est impliquée dans de nombreuses étapes du développement. Elle joue un rôle dans la régulation, le maintien et la différenciation des cellules souches/progénitrices dans de nombreux tissus comme la peau, l'intestin, et la glande mammaire. Une dérégulation de la voie de signalisation Wnt/β-caténine est fréquemment observée au cours de la tumorigenèse (Giles et al., 2003 ; Faraldo et al., 2005 ; Blanpain et al., 2007 ; Charafe-Jauffret et al., 2008 ; Kakarala & Wicha, 2008 ; Grigoryan et al., 2008 ; Matushansky et al., 2008 ; Malanchi et al., 2008 ; Visvader, 2009 ; Badders et al., 2009 ; Incassati et al., 2010 ; Plaks et al., 2013).

La présence des protéines Wnt permet de contrôler la stabilité de la β-caténine en interagissant avec les récepteurs Frizzled (Fz) et LRP5/6 ([Fig 18](#)). En absence de ligand Wnt, la β-caténine est retrouvée presque exclusivement dans les jonctions adhérentes cellule-cellule, où elle interagit avec la E-cadhérite et l'α-caténine. L'excès de β-caténine est rapidement dégradé par le complexe de destruction formé principalement par les protéines GSK3-β (Glycogene Synthase Kinase 3β), APC (Adenomatous Polyposis Coli) et axine ([Fig 18A](#)). En effet, la GSK3-β phosphoryle la β-caténine sur les résidus sérines et thréonine présents dans sa région NH<sub>2</sub>-terminale, entraînant sa reconnaissance par une ubiquitine ligase et sa dégradation par le protéasome. La fixation d'un ligand Wnt sur le récepteur Fz entraîne l'activation de la protéine Dishevelled (Dsh), qui inhibe l'action de la GSK3-β et empêche ainsi la dégradation de la β-caténine, qui s'accumule dans le cytoplasme ([Fig 18B](#)). La β-caténine est alors transloquée dans le noyau, se lie aux facteurs de transcription Lef/Tcf et participe à la transactivation de nombreux gènes cibles incluant des régulateurs de croissance, de survie et de différenciation cellulaire, tels que *c-Myc* ou *Ccnd1* (codant pour la Cycline D1) ([Fig 18B](#)) (Giles et al., 2003 ; Blanpain et al., 2007 ; Incassati et al., 2010).



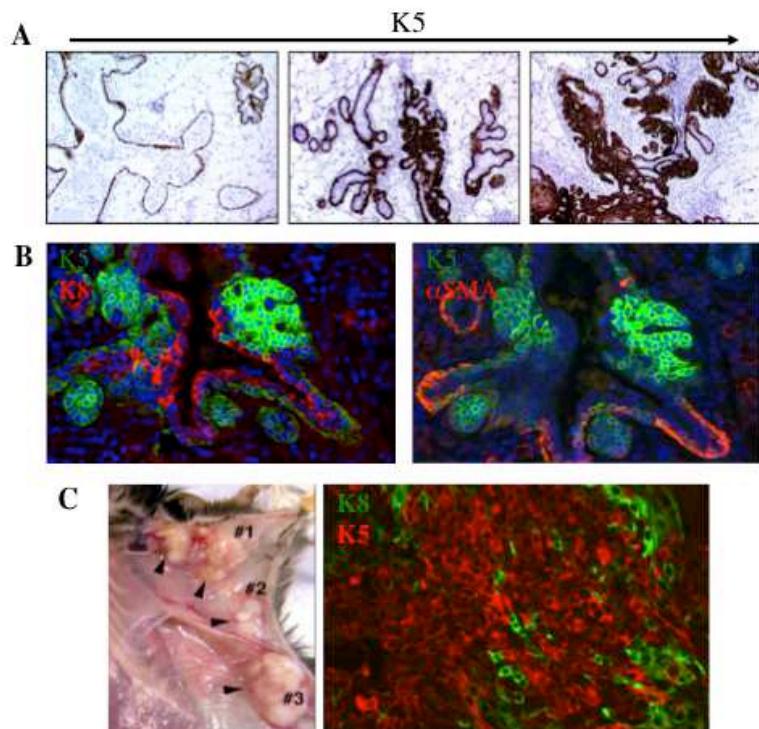
**Figure 18. Régulation de la voie de signalisation Wnt/β-caténine.**

(A) La  $\beta$ -caténine participe à la formation des jonctions adhérentes cellulaires. En absence de ligand de la famille Wnt, l'excès de  $\beta$ -caténine est dégradé par le protéasome, via un complexe protéique faisant intervenir les protéines APC, Axine, Dishevelled (Dsh) et GSK3- $\beta$ . (B) En présence de ligand Wnt, l'action du complexe de dégradation est inhibée et la  $\beta$ -caténine s'accumule dans le cytoplasme. La  $\beta$ -caténine peut alors entrer dans le noyau et, en s'associant aux facteurs de transcription de la famille Lef/Tcf, activer la transcription de gènes cibles. Adapté de Rattis et al., 2004.

Dans certains cancers, notamment celui du colon, la mutation des protéines du complexe de destruction de la  $\beta$ -caténine, tel que APC, est fréquente (Giles et al., 2003). Bien que de telles mutations soient rares dans le cancer du sein, différents travaux ont mis en évidence l'existence de mécanismes alternatifs conduisant à une activation de la signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine (Incassati et al., 2010). Il apparaît que, dans la glande mammaire, la dérégulation de la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine résulte de mécanismes épigénétiques (Klarman et al., 2008 ; Veeck et al., 2008 ; Yin et al., 2013). Environ 50% des carcinomes mammaires présentent une stabilisation de la  $\beta$ -caténine, associée à une surexpression de la cycline D1 et à un mauvais pronostic clinique (Lin et al., 2000 ; Reya et al., 2001 ; Faraldo et al., 2005 ; Visvader, 2009 ; Velasco-Velazquez et al., 2011). L'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine a récemment été associée au développement des carcinomes mammaires de type basal (DiMeo et al., 2009 ; Khramtsov et

al., 2010). L'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine joue un rôle clef dans le maintien de CSC au sein de la tumeur (Malanchi et al., 2008 ; Malanchi et al., 2012).

Plusieurs études utilisant des modèle murins ont démontré l'importance de cette voie dans la tumorigenèse mammaire (Imbert et al., 2001 ; Faraldo et al., 2005 ; Stingl & Caldas, 2007 ; Grigoryan et al., 2008 ; Teissedre et al., 2009). En particulier, notre équipe a généré une souris transgénique exprimant une forme stabilisée de la  $\beta$ -caténine (forme tronquée en N-terminal) dans la couche basale de l'épithélium mammaire (lignée transgénique K5- $\Delta$ N $\beta$ cat). Autour de l'âge 10 mois, les souris K5- $\Delta$ N $\beta$ cat développent des hyperplasies canalaires non-invasives constituées de cellules basales mammaires indifférenciées (expriment le marqueur basal K5, mais pas les marqueurs luminaux (K8) et myoépithéliaux ( $\alpha$ SMA)). A des stades plus tardifs, des carcinomes mammaires invasifs de type basal sont observés (Fig 19). Ce modèle murin représente ainsi un modèle murin des carcinomes mammaires humains de type basal (Teuliere et al., 2005 ; Faraldo et al., 2005 ; Moumen et al., 2011).



**Figure 19.** Les souris K5- $\Delta$ N $\beta$ cat développent des tumeurs mammaires de type basal.

(A) Les cellules épithéliales basales K5+ (en marron) prolifèrent d'abord localement (gauche), puis plus largement pour former d'importantes zones hyperplasiques (droite). (B) Les cellules dans la région hyperplasique sont de type basal (positives pour K5 et négatives pour K8) et indifférenciées (négatives pour  $\alpha$ SMA). (C) Les souris K5- $\Delta$ N $\beta$ cat développent des tumeurs à partir de 10 mois (gauche), qui sont caractérisées par la présence de cellules basales K5+ (droite). Les flèches montrent les tumeurs développées au niveau des glandes mammaires #1, #2 et #3. Adapté de Teuliere et al., 2005.

## **II. LES INTEGRINES**

Les intégrines appartiennent à une large famille de récepteurs d'adhérence cellulaire qui contrôlent les interactions cellule/MEC et dans certains cas, cellule/cellule. La liaison des intégrines à leurs ligands permet l'interaction physique entre la cellule et son environnement et assure la base des tensions générées lors des mouvements cellulaires. Cette interaction sert de plateforme pour l'assemblage de complexes multimoléculaires de signalisation intracellulaire, permettant à la cellule d'intégrer les modifications environnementales et de s'y adapter. De ce fait, les intégrines jouent un rôle clef dans le contrôle de nombreux processus cellulaires tels que l'adhésion, la migration, la prolifération, la différenciation et l'apoptose. Elles participent à la progression de nombreuses pathologies et apparaissent comme des cibles thérapeutiques potentielles (Hynes, 2002 ; Guo & Giancotti, 2004 ; Shattil et al., 2010 ; Desgrosellier & Cheresh, 2010).

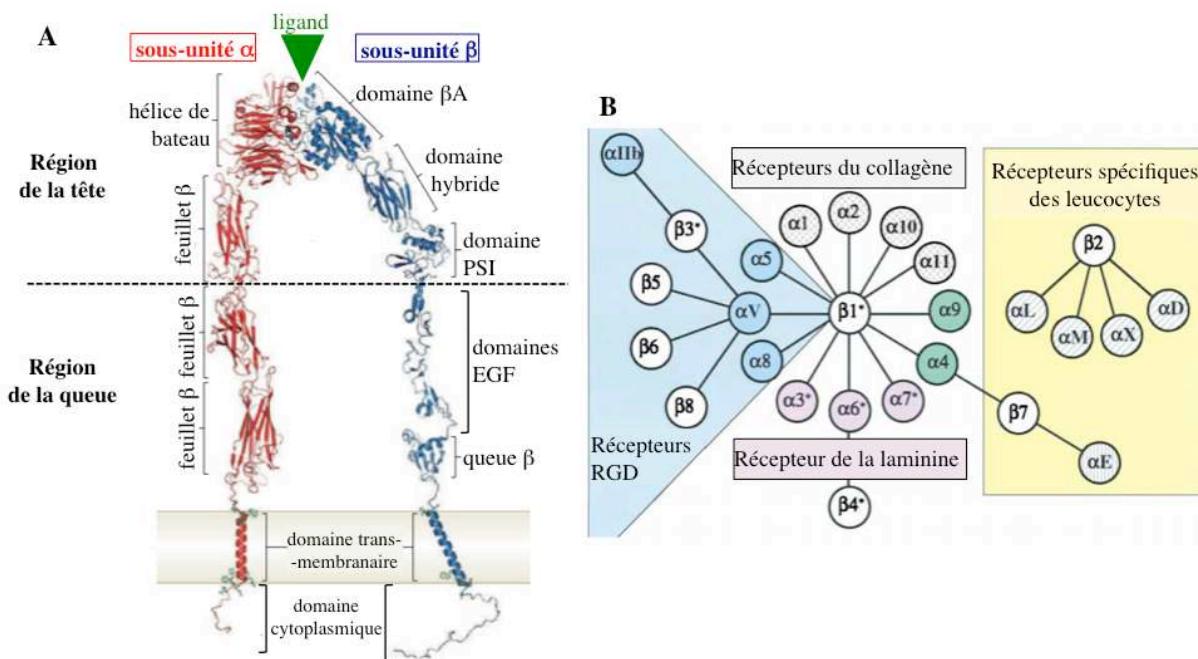
### **2.1. Généralités**

#### 2.1.1. Dimères d'intégrines : classification et structure

Les intégrines sont des molécules hétérodimériques composées de l'association non-covalente entre une sous-unité  $\alpha$  et une sous-unité  $\beta$  (Fig 20A). Chez les mammifères, 18 sous-unités  $\alpha$  et 8 sous-unités  $\beta$ , capables de former 24 dimères d'intégrine, ont été identifiées. L'association  $\alpha\beta$  détermine la spécificité de l'intégrine pour son substrat (Fig 20B). Les intégrines peuvent être classées en quatre grands groupes, en fonction de leur spécificité de ligand : les intégrines liant la laminine, les intégrines liant le collagène, les intégrines reconnaissant les motifs RGD et les intégrines leucocytaires. Le répertoire des intégrines liant la laminine comprend, par exemple, les intégrines  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 1$ ,  $\alpha 7\beta 1$  et  $\alpha 6\beta 4$  (Fig 20B) (van der Flier & Sonnenberg, 2001 ; Hynes, 2002 ; Streuli & Akhtar, 2009 ; Harburger & Calderwood, 2009 ; Shattil et al., 2010 ; Pozzi & Zent, 2011 ; Margadant et al., 2011).

Chaque type cellulaire exprime un répertoire spécifique d'intégrines qui détermine les composants de la MEC avec lesquels il interagit. Par exemple, les cellules épithéliales basales mammaires expriment l'ensemble des intégrines liant la laminine, à l'exception du dimère  $\alpha 7\beta 1$ .

Ainsi les signaux dépendants de l'interaction laminine/intégrines vont dépendre des jeux de coopération et de compétition entre ces différentes intégrines. Enfin, la liaison entre l'intégrine et son ligand est fortement influencée par la conformation du récepteur (affinité) et la formation d'éventuels multimères (avidité) (van der Flier & Sonnenberg, 2001 ; Hynes, 2002 ; Streuli & Akhtar, 2009 ; Harburger & Calderwood, 2009 ; Shattil et al., 2010 ; Pozzi & Zent, 2011 ; Margadant et al., 2011). En plus de lier les protéines de la MEC, les intégrines peuvent interagir avec des récepteurs présents à la surface des cellules voisines, tels que VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1), les molécules de la famille ICAM (Intercellular Cell Adhesion Molecule) et les cadhérines (Hynes, 2002 ; Watt, 2002 ; Takada et al., 2007 ; Bouvard et al., 2013).



**Figure 20. Les intégrines et leurs ligands.**

(A) Structure cristallographique de l'intégrine  $\alpha IIb\beta 3$ . Les intégrines sont composées d'un large domaine extracellulaire, d'un domaine transmembranaire unique et d'une queue cytoplasmique courte. La liaison du substrat se fait à l'interface entre les domaines  $\beta$ A et la structure en hélice de bateau. La sous-unité  $\alpha$  contient le domaine I dans l'hélice de bateau qui confère la spécificité de reconnaissance du ligand. (B) Les intégrines appartiennent à une famille de protéines transmembranaires constituée de 24 hétérodimères différents qui reconnaissent différents ligands. Adapté de Hynes, 2002 ; Askari et al., 2009.

Les intégrines sont constituées d'un large domaine extracellulaire (700 à 1100 aa), d'un court domaine transmembranaire (20 à 30 aa) et d'une petite partie cytoplasmique (10 à 70 aa) qui interagit avec le cytosquelette d'actine via des protéines adaptatrices (Fig 20A). Bien que la structure des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  soit différente, leurs domaines extracellulaires sont

complémentaires et déterminent la spécificité du ligand. Les études par microscopie électronique et par cristallographie ont montré que les intégrines sont composées d'une « tête » globulaire et de deux queues linéaires (Fig 20A). La tête est constituée d'une région contenant la poche de liaison du ligand et mettant en jeu des résidus des deux sous-unités (Hynes, 2002 ; Watt, 2002 ; Takada et al., 2007 ; Bouvard et al., 2013).

Les parties extracellulaires des deux sous-unités interagissent via des liaisons non-covalentes qui assurent la cohésion du dimère.

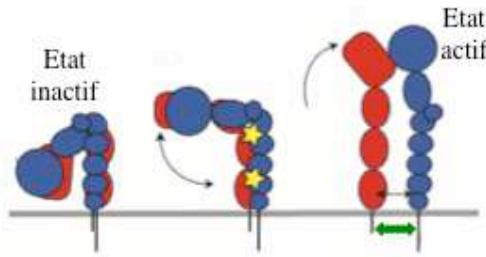
Structure de la sous-unité  $\alpha$  (Fig 20A) : La région N-terminale de cette sous-unité est constituée par la répétition de 7 segments d'environ 60 acides aminés chacun, présentant une forte homologie entre eux. Ces segments se replient pour former une structure en hélice de bateau qui comprend des sites de liaison des cations divalents tels que les ions calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), qui induisent l'inactivation de l'intégrine, et magnésium ( $\text{Mg}^{2+}$ ) et manganèse ( $\text{Mn}^{2+}$ ), qui induisent son activation. Une forte proportion des sous-unités  $\alpha$  présente un domaine additionnel, le domaine I, dans l'hélice de bateau qui joue un rôle important dans la liaison à la MEC et aux récepteurs cellulaires, et qui contient un site MIDAS (Metal Ion-Dependent Adhesion Site) permettant la liaison de cations divalents métalliques. Lorsqu'il est présent, le domaine I représente le site de liaison extracellulaire exclusif du ligand. Le reste de la sous-unité est formé d'une région linéaire constituée de trois feuillets  $\beta$  (Takamatsu et al., 1998 ; Hynes, 2002 ; Watt, 2002 ; Takada et al., 2007 ; Bouvard et al., 2013).

Structure de la sous-unité  $\beta$  (Fig 20A) : Cette sous-unité est plus petite que la sous-unité  $\alpha$ . La région N-terminale est constituée d'un domaine PSI (plexine/sémaphorine/intégrine). Cette région, composée de deux hélices  $\alpha$ , contient 7 résidus cystéines qui assurent des ponts disulfures au sein de la sous-unité. La tête de la sous-unité  $\beta$  est également constituée d'un large domaine, le domaine  $\beta\text{A}$ , qui présente la même conformation que le domaine I de la sous-unité  $\alpha$  et contient un site MIDAS. Ce domaine interagit avec la structure en hélice de bateau de la sous-unité  $\alpha$ . Le reste de la partie extracellulaire est constituée d'un domaine hybride, de la répétition de quatre résidus EGF riches en cystéines et d'un domaine de queue  $\beta$  dont le rôle est encore mal défini (Hynes, 2002 ; Watt, 2002 ; Takada et al., 2007 ; Bouvard et al., 2013).

Les parties transmembranaires des deux sous-unités sont très courtes et en forme d'hélice. La région cytoplasmique des intégrines est dépourvue de toute activité catalytique et est assez restreinte (10-70 acides aminés), à l'exception de l'intégrine  $\beta 4$  qui contient plus de 1000 acides aminés. La queue cytoplasmique de la sous-unité  $\beta$  est capable de lier des protéines cytoplasmiques telles que la taline et les kindlines. En effet, elle contient un motif NpxY, proximal à la membrane, et un motif NxxY distal, qui représentent les séquences de reconnaissance des domaines de liaison phosphotyrosine (domaines PTB) de nombreuses protéines intracellulaires. L'intégrine  $\alpha 6\beta 4$  diffère des autres dans le sens où elle n'interagit pas avec l'actine mais avec les filaments intermédiaires. Elle constitue les hémidesmosomes, structures d'adhésions qui assurent la solidité mécanique du tissu dans les régions où les cellules adhèrent à la lame basale sous-jacente. Au sein d'un épithélium, les intégrines  $\alpha 6\beta 4$  assurent la jonction entre la laminine et les cytokératines (van der Flier & Sonnenberg, 2001 ; Hynes, 2002 ; Calderwood et al., 2003 ; Streuli & Akhtar, 2009 ; Harburger & Calderwood, 2009 ; Shattil et al., 2010 ; Pozzi & Zent, 2011 ; Margadant et al., 2011).

### 2.1.2. Conformations et activation

La structure des intégrines est modulée de manière flexible et dynamique afin de réguler les différentes fonctions cellulaires, via des changements de conformation. Ainsi, les intégrines peuvent adopter trois conformations majeures : inactive (fermée et courbée, de faible affinité avec le substrat), active (ouverte et déployée, de haute affinité), et occupée par un substrat ([Fig 21](#)). Les intégrines en conformation inactive sont caractérisées par l'interaction des domaines cytoplasmiques des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ , empêchant la liaison de toute protéine côté intracellulaire. La séparation des segments transmembranaires et cytoplasmiques est en partie bloquée par un pont salin formé entre les sous-unités  $\beta$  et  $\alpha$ . La rupture du pont salin favorise la conformation active, de haute affinité (Hynes, 2002 ; Askari et al., 2009 ; Harburger & Calderwood, 2009 ; Margadant et al., 2011 ; Wehrle-Haller, 2012 ; Bouvard et al., 2013).



**Figure 21. Représentation schématique de la structure des intégrines.**

Les intégrines passent d'un état conformationnel inactif compact à un état actif déployé. Adapté de Shattil et al., 2010.

La conformation des intégrines peut être modulée par les cations divalents tels que  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  et  $\text{Mn}^{2+}$  qui se fixent sur les sites MIDAS mais également sur des sites additionnels, les sites ADMIDAS (Adjacent to MIDAS) et LIMBS (Ligand-Associated Metal Binding Site). La conformation du dimère peut être affectée par sa liaison au ligand et à des anticorps spécifiques mais elle peut également être modulée par l'interaction avec d'autres protéines intracellulaires ou membranaires. L'activation des intégrines induit leur agrégation, amplifiant ainsi leur signalisation (Hynes, 2002 ; Askari et al., 2009 ; Harburger & Calderwood, 2009 ; Margadant et al., 2011 ; Wehrle-Haller, 2012 ; Bouvard et al., 2013).

### 2.1.3. Points d'ancrage des complexes de signalisation

Les intégrines constituent un point d'ancrage de plateformes de signalisation impliquées dans de nombreux processus cellulaires tels que l'adhésion, la migration, la prolifération et la survie cellulaire. Les intégrines ne possèdent pas d'activité enzymatique intrinsèque mais elles recrutent des partenaires enzymatiques afin de transmettre des signaux. Ce sont des molécules de signalisation bidirectionnelle capables de transmettre deux types de signaux : signal dit « inside-out », modulé par un stimulus intracellulaire afin d'adapter l'affinité de l'intégrine à son environnement, et signal dit « outside-in », régulé par la liaison de l'intégrine à un substrat afin de réguler les processus intracellulaires (Hynes, 2002 ; Askari et al., 2009 ; Harburger & Calderwood, 2009 ; Shattil et al., 2010 ; Wehrle-Haller, 2012 ; Bouvard et al., 2013).

### *a) Partenaires membranaires*

Les intégrines peuvent former des complexes avec d'autres récepteurs membranaires et recruter ainsi des protéines de signalisation au niveau des sites d'interaction cellule/cellule et cellule/MEC. De nombreux récepteurs membranaires interagissent avec les intégrines tels que les protéines associées aux intégrines (ou IAP, pour « Integrin Associated Proteins »), les tétraspanines, les récepteurs aux facteurs de croissance, et les récepteurs membranaires liés par un groupement GPI (glycosylphosphatidylinositol). Les intégrines liant la laminine  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 1$  et  $\alpha 6\beta 4$  s'associent principalement avec les tétraspanines (Yang et al., 2008 ; Bassani & Cingolani, 2012) et les récepteurs ancrés par un groupement GPI.

Les IAP sont des protéines à 5 domaines transmembranaires qui, après interaction avec les intégrines, sont capables de recruter les protéines trimériques de type Gi. En effet, le complexe intégrine-IAP est alors constitué de 7 domaines transmembranaires et possède donc les mêmes propriétés que les récepteurs couplés aux protéines G (Juliano, 2002).

Les tétraspanines sont de petites protéines transmembranaires qui s'associent aux intégrines et forment des microdomaines. Elles peuvent soit interagir directement et être liées par une liaison covalente forte, soit indirectement, la téraspanine recrutant alors des molécules de signalisation intracellulaires à proximité des intégrines qui activeront ces dernières (Bassani & Cingolani, 2012). De nombreuses associations entre ces deux familles de protéines ont ainsi été montrées dans différents contextes cellulaires comme par exemple l'association entre la téraspanine CD151 et les intégrines  $\alpha 3\beta 1$  et  $\alpha 6\beta 4$  qui a été impliquée entre autre dans la tumorigénèse (Hynes, 2002 ; Bassani & Cingolani, 2012).

Certains récepteurs aux facteurs de croissance (EGFR, MET, PDGFR et VEGFR) sont localisés au niveau des points d'adhérence cellulaire. La liaison de l'intégrine à son ligand induit l'activation et l'autophosphorylation des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK), régulant les signaux prolifératifs dépendant de ces récepteurs (Guo & Giancotti, 2004).

Les récepteurs membranaires ancrés par un groupement GPI tels que le récepteur à l'urokinase (uPAR), sont dépourvus de domaines transmembranaires et cytoplasmiques et doivent s'associer à un partenaire tel que les intégrines, pour transmettre des signaux (Guo & Giancotti, 2004).

### *b) Partenaires cytoplasmiques*

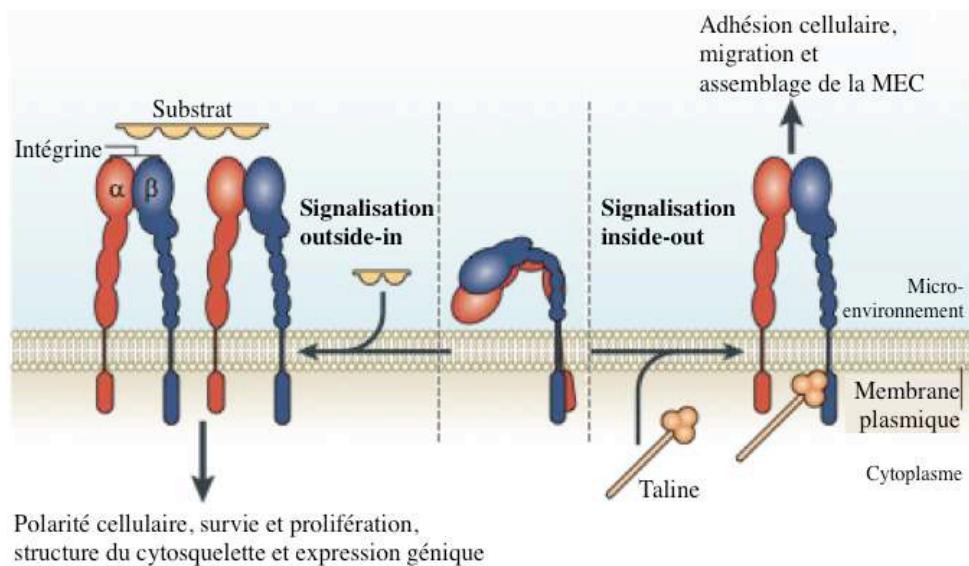
Le domaine cytoplasmique des intégrines joue un rôle central dans la signalisation bidirectionnelle. De nombreux partenaires interagissant avec le domaine cytoplasmique de la sous-unité  $\beta$  des intégrines ont pu être identifiés. Certains ont un rôle essentiellement structural et permettent la liaison des intégrines au cytosquelette d'actine (comme la vinculine, la taline, l' $\alpha$ -actinine, la filamine et la tensine), alors que d'autres sont impliqués dans la transduction des signaux (comme les kinases FAK, Src, Csk, PKC, PI3K et ILK ; les phosphatases PTEN, PTP-PEST et les protéines adaptatrices paxilline, p130Cas, Grb2, Crk et Shc). Les intégrines peuvent également activer les membres de la famille des petites protéines G tels que Rho, Rac et Cdc42 et ainsi modifier le cytosquelette d'actine en réponse à un stimulus externe. En plus de réguler le cytosquelette d'actine, l'engagement des intégrines au sein des adhésions focales mène à l'activation de voies de signalisation qui contrôlent notamment la prolifération et la survie, la migration et l'invasion cellulaire (Petit & Thiery, 2000 ; Hynes, 2002 ; Harburger & Calderwood, 2009 ; Vicente-Manzanares et al., 2009 ; Brizzi et al., 2012 ; Bouvard et al., 2013).

Ainsi, du fait de leur grande diversité de partenaires cytoplasmiques, les intégrines régulent des mécanismes physiques (migration et invasion) aussi bien que des voies intracellulaires (survie, prolifération). La complexité de cette signalisation est accentuée par la capacité des intégrines à moduler des signaux dépendants d'autres récepteurs membranaires mais également par la capacité d'autres récepteurs à moduler les signaux régulés par les intégrines.

### *c) Signalisation « inside-out » et « outside-in »*

Les intégrines constituent des molécules de signalisation bidirectionnelles et allostériques. L'affinité des intégrines pour leur ligand est régulée par un stimulus intracellulaire (signal « inside-out ») qui met en jeu des partenaires cytoplasmiques. En se liant à la partie cytoplasmique des intégrines, ces protéines induisent des changements de conformation qui modifient l'affinité du site de liaison du ligand de l'intégrine. Cette signalisation « inside-out » est principalement contrôlée par la taline et les kindlines qui initient la séparation des deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  dans leurs régions cytoplasmiques puis transmembranaires, ce qui conduit au redressement de la tête de liaison du substrat et augmente ainsi l'affinité de liaison de l'intégrine.

à son ligand (Fig 22). La taline, activée par PIP2, se lie au motif NpxY proximal dans la partie cytoplasmique de la sous-unité  $\beta$ , alors que les kindlines se lient au motif NxxY distal. La protéine FAK (Focal Adhesion Kinase) interagit au niveau de ces mêmes motifs (Hynes, 2002 ; Calderwood et al., 2003 ; Montanez et al., 2008 ; Moser et al., 2008 ; Askari et al., 2009 ; Harburger & Calderwood, 2009 ; Shattil et al., 2010 ; Wehrle-Haller, 2012 ; Bouvard et al., 2013). A l'inverse, des protéines telles que DOK1 (Docking protein 1), ICAP-1 (Integrin Cytoplasmic domain-Associated Protein 1) et filamine régulent de manière négative l'activation des intégrines, en entrant en compétition avec la taline ou la kindline (Harburger & Calderwood, 2009 ; Shattil et al., 2010 ; Brunner et al., 2011 ; Bouvard et al., 2013). Le changement de conformation des intégrines induit par cette signalisation « inside-out » permet la liaison du ligand à l'extérieur de la cellule qui régulera alors la transmission de signaux intracellulaires (signalisation « outside-in »).



**Figure 22. Les intégrines : molécules de signalisation bidirectionnelles.**

Les intégrines peuvent être activées après fixation du substrat ce qui induit l'activation de voies de signalisation intracellulaires spécifiques (**gauche**). A l'inverse, des signaux intracellulaires peuvent activer les intégrines (**droite**). L'engagement des intégrines permettra de réguler un grand nombre de fonctions cellulaires. Même si ces deux processus ont été ici séparés, ils sont en réalité liés, dans la cellule. En effet, l'activation des intégrines peut augmenter la liaison du substrat (signalisation inside-out). La liaison au substrat peut alors générer des signaux intracellulaires (signalisation outside-in). Adapté de Shattil et al., 2010.

L'interaction de l'intégrine avec son environnement induit une signalisation « outside-in » et permet ainsi la régulation de nombreux processus intracellulaires. Cette signalisation requiert la coopération entre les récepteurs aux facteurs de croissance et les protéines du cytosquelette. La

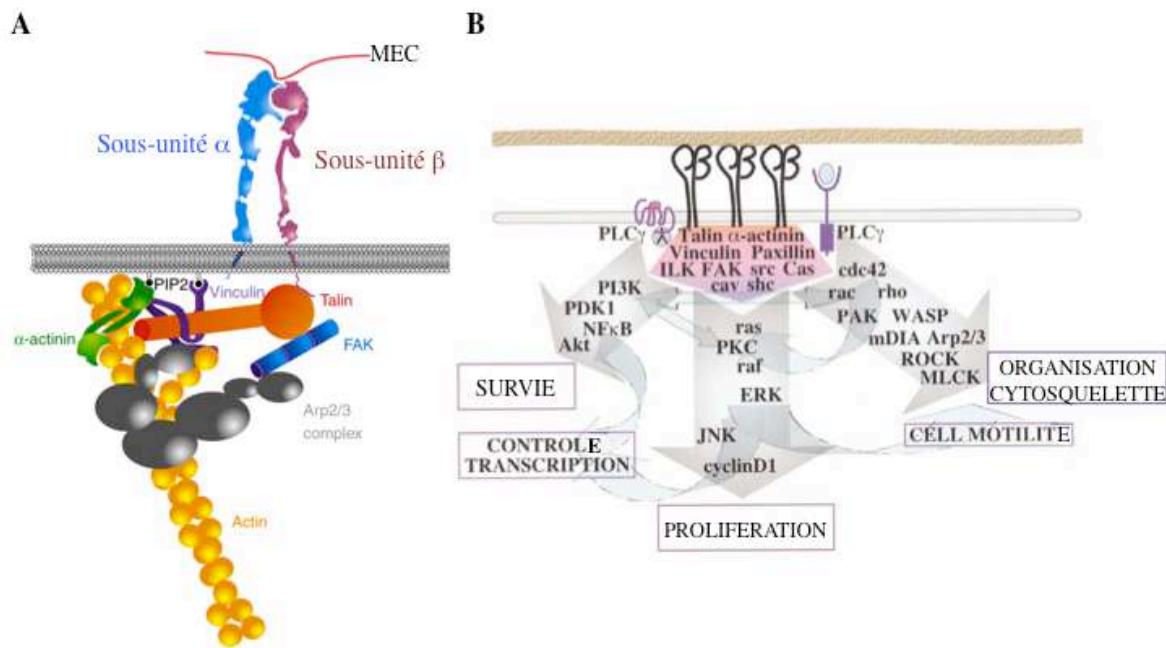
liaison de l'intégrine à son ligand induit la séparation des régions cytoplasmiques et transmembranaires des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ , la stabilisation de l'intégrine en conformation active, le regroupement de plusieurs intégrines et le recrutement de nombreux partenaires cytoplasmiques qui s'organiseront en complexes multiprotéiques afin de favoriser l'assemblage des filaments d'actine ([Fig 22](#)) (Askari et al., 2009 ; Harburger & Calderwood, 2009 ; Streuli & Akhtar, 2009 ; Shattil et al., 2010 ; Margadant et al., 2011 ; Bouvard et al., 2013).

#### *d) Plateformes de signalisation*

Suite à l'interaction des intégrines avec la MEC, les filaments d'actine se réorganisent, déclenchant une boucle de rétrocontrôle positive et provoquant l'agrégation des intégrines au niveau de la membrane cytoplasmique. Cette agrégation induit l'assemblage de complexes multiprotéiques régulés de manière dynamique et formant les complexes focaux. Ces plateformes de signalisation constituent un réseau de 156 protéines connectées par 690 interactions, mettant ainsi en évidence la complexité de la signalisation induite par les intégrines (Zaidel-Bar et al., 2007). Ces protéines sont rassemblées en plusieurs groupes fonctionnels : 25 protéines adaptatrices, 24 protéines du cytosquelette, 9 protéines se liant à l'actine, 10 protéines sérine/thréonine kinases, 3 protéines sérine/thréonine phosphatases, 9 protéines tyrosine kinases, 8 GAP, 8 GEF, 7 récepteurs transmembranaires, 6 protéines d'adhérence, 5 GTPases et 32 autres protéines. Ces complexes protéiques induisent la transmission de signaux extracellulaires à l'intérieur de la cellule mais peuvent également relayer des signaux intracellulaires afin d'activer les intégrines (Berrier & Yamada, 2007).

La signalisation dépendante des intégrines peut être influencée par différents paramètres : les propriétés de la MEC, l'état d'activation des intégrines et leur avidité, l'état de contraction du cytosquelette et la spécificité tissulaire et cellulaire. L'interaction des intégrines avec la MEC induit la liaison de partenaires moléculaires au niveau de la queue cytoplasmique de la sous-unité  $\beta$  des intégrines et l'activation de plusieurs voies de signalisation. Parmi les protéines intracellulaires relayant ces signaux, nous pouvons citer la taline, la vinculine, ILK (Integrin Linked Kinase), et FAK ([Fig 23](#)). La protéine FAK joue un rôle clef dans la signalisation des intégrines. En effet, l'agrégation des intégrines induit l'activation de FAK au sein des adhésions focales par autophosphorylation, générant des sites de liaison pour les protéines de signalisation à

domaine SH2 et menant au recrutement d'autres partenaires cytoplasmiques. Cette association aboutit à l'activation de voies de signalisation telles que Ras/MAPK, JNK, et NF-κB qui contrôlent notamment la prolifération et la survie cellulaires. Ces protéines cytoplasmiques permettent à la signalisation des intégrines d'interagir de manière étroite et coopérative avec la signalisation déclenchée par d'autres récepteurs membranaires, notamment les RTK afin de réguler les divers processus cellulaires (Petit & Thiery, 2000 ; Hynes, 2002 ; Harburger & Calderwood, 2009 ; Vicente-Manzanares et al., 2009 ; Brizzi et al., 2012 ; Bouvard et al., 2013).

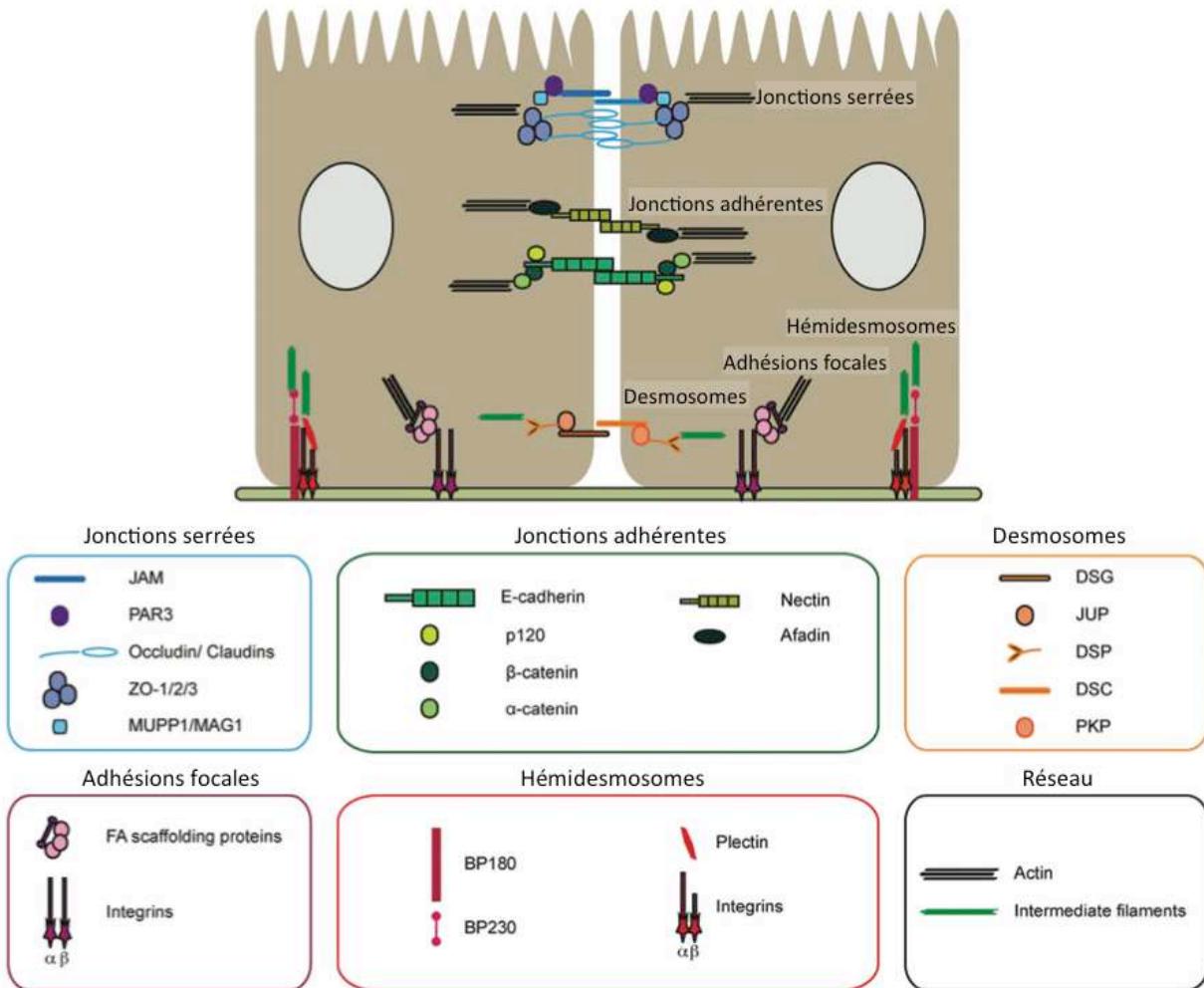


**Figure 23. Structure des adhésions focales.**

(A) La taline se lie aux intégrines et permet alors la liaison directe de l'actine et d'autres molécules telles que la vinculine, l'α-actinine et FAK. (B) Les intégrines peuvent coopérer avec d'autres récepteurs et activer des voies de signalisation permettant le contrôle de fonctions cellulaires essentielles telles que la survie, la prolifération et l'invasion. Adapté de Vicente-Manzanares et al., 2009 et Hynes, 2002.

#### e) Interactions cellule-cellule

En plus des liaisons à la MEC via les adhésions focales et les hémidesmosomes, les cellules interagissent entre elles à l'aide de complexes d'adhésion : les jonctions adhérentes, les jonctions serrées et les desmosomes (Fig 24). Les jonctions adhérentes initient la formation des contacts intercellulaires et permettent la formation et le maintien des jonctions serrées et des desmosomes (Epifano & Perez-Moreno, 2012 ; Canel et al., 2013).



**Figure 24.** Complexes moléculaires impliqués dans les adhésions cellule-cellule et cellule-MEC.  
Adapté de Epifano & Perez-Moreno, 2012.

Les jonctions adhérentes sont constituées par deux types de complexes protéiques : les complexes cadhérine-caténine ancrés à l'actine et aux microtubules, et les complexes nectine-afadine ancrés au cytosquelette d'actine (Fig 24). Les cadhérines sont des protéines transmembranaires qui développent des interactions intercellulaires homophiliques (interaction entre deux mêmes protéines) calcium-dépendantes via leur domaine extracellulaire. Les cellules épithéliales expriment principalement la E-cadhérine, dont le domaine cytoplasmique s'associe aux protéines  $\beta$ -caténine et p120-caténine. L' $\alpha$ -caténine se lie à la  $\beta$ -caténine et aux protéines de liaison de l'actine telles que la vinculine et l' $\alpha$ -actinin, permettant ainsi l'ancrage des jonctions adhérentes au cytosquelette d'actine. De nombreuses protéines additionnelles sont alors recrutées sur ces sites d'adhésions comme par exemple Arp2/3, la cortactine, et les petites Rho-GTPases

Rac1, Cdc42 et RhoA. L'autre composant des jonctions adhérentes est le complexe nectine-afadine. Les nectines constituent une famille de récepteurs ressemblant aux immunoglobulines et permettent l'ancrage au cytosquelette d'actine (Weber et al., 2011 ; Epifano & Perez-Moreno, 2012 ; Canel et al., 2013).

Des études ont permis de montrer l'existence d'interactions entre les intégrines et les cadhérines. Les adhésions dépendantes des cadhérines et des intégrines recrutent des partenaires cytoplasmiques similaires et peuvent contrôler les mêmes processus cellulaires. Les événements de signalisation dépendants des intégrines peuvent réguler ceux dépendants des cadhérines, et inversement (Chen & Gumbiner, 2006 ; Lecuit & Sonnenberg, 2011 ; Epifano & Perez-Moreno, 2012 ; Canel et al., 2013). Par exemple, la perte d'expression de l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  au niveau des cellules épithéliales rénales, chez la souris, à été associée à une réduction des niveaux d' $\alpha$ -actinine aux jonctions adhérentes et à une diminution de l'ancrage au cytosquelette d'actine (Wang et al., 1999). Dans les kératinocytes, l'inhibition des intégrines  $\alpha 3$  ou  $\beta 1$  à l'aide d'anticorps bloquants induit un retard de formation des adhésions dépendantes des cadhérines (Jensen & Wheelock, 1995). Ainsi, les intégrines permettraient le renforcement des adhésions cellule-cellule dépendantes de la E-cadhérine. Au contraire, la diminution ou la perte d'activité des protéines des jonctions adhérentes mène à l'augmentation de l'expression des intégrines et des adhésions cellule-MEC. Ainsi, des souris déficientes en P- et E-cadhérines présentent une désorganisation du réseau d'actine, accompagnée d'une augmentation de l'expression de l'intégrine  $\beta 4$  (Tinkle et al., 2008).

Les protéines Src et FAK sont impliquées dans la coordination des signaux entre les adhésions focales et les jonctions adhérentes, en modulant notamment l'activité des petites Rho-GTPases (Frame, 2002 ; Avizienyte et al., 2002 ; Avizienyte et al., 2004 ; Avizienyte & Frame, 2005 ; Martinez-Rico et al., 2010 ; Weber et al., 2011 ; Canel et al., 2013). L'intégrine  $\beta 1$  active RhoA et Rac1, et mène à la rupture des adhésions intercellulaires dépendantes des cadhérines (Gimond et al., 1999). La E-cadhérine, quant à elle, peut réguler l'expression de Rap1, un homologue de la petite GTPase Ras, et induire l'activation « inside-out » des intégrines (Weber et al., 2011 ; Epifano & Perez-Moreno, 2012).

La rupture des adhésions dépendantes de la E-cadhérine mène à l'initiation du processus d'EMT impliqué, notamment, dans la tumorigénèse (Canel et al., 2013). Ce processus est

dépendant de la libération dans le cytoplasme de la  $\beta$ -caténine qui pourra alors être activée et transloquée dans le noyau. Les intégrines peuvent réguler l'EMT en modulant l'activation de la  $\beta$ -caténine. Il a par exemple été montré que l'absence d'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  empêche la formation des complexes P-Smad/ $\beta$ -caténine et réduit l'EMT (Kim et al., 2009).

#### 2.1.4. Pathologies associées à la perte des intégrines

Chez l'homme, des pathologies associées à la mutation germinale d'une des sous-unités des intégrines, ont été décrites. C'est le cas notamment des mutations portant sur les sous-unités  $\alpha IIb$  ou  $\beta 3$ , qui mènent à la thrombasthenie de Glanzmann, une maladie associée à des dysfonctions plaquettaires et des troubles de la coagulation (Hodivala-Dilke et al., 1999). Des défauts d'adhésions leucocytaires ont été associés à la présence de mutations portant sur la chaîne  $\beta 2$  des intégrines (Hogg & Bates, 2000). Enfin, les mutations portant sur les sous-unités  $\alpha 6$  ou  $\beta 4$  des intégrines mènent à l'épidermolyse bulleuse jonctionnelle, maladie qui se manifeste par un détachement sévère entre l'épiderme et le derme et mène à une létalité périnatale (Vidal et al., 1995 ; Pulkkinen et al., 1997 ; Pulkkinen et al., 1998 ; Ruzzi et al., 1997 ; Takizawa et al., 1997).

Le développement d'approches d'invalidation des gènes codant pour les sous-unités des intégrines chez la souris, a permis de confirmer le lien direct entre les pathologies décrites chez l'homme et la mutation germinale des intégrines. En effet, des défauts similaires aux désordres cliniques décrits chez les patients sont observés dans les modèles génétiques murins correspondants (Georges-Labouesse et al., 1996 ; van der Neut et al., 1996 ; Scharffetter-Kochanek et al., 1998 ; Hodivala-Dilke et al., 1999 ; Tronik-Le Roux et al., 2000). De plus, les approches perte de fonction développées chez la souris ont permis de définir les rôles joués par les différents hétérodimères d'intégrines, au cours du développement et dans de nombreux tissus. Par exemple, la perte d'expression des intégrines de la famille  $\beta 1$  induit une létalité embryonnaire pré-implantatoire, soulignant l'importance de cette famille de récepteur, au cours du développement (Fassler & Meyer, 1995 ; Stephens et al., 1995 ; Brakebusch et al., 1997).

## 2.1.5. Régulation des fonctions cellulaires par les intégrines

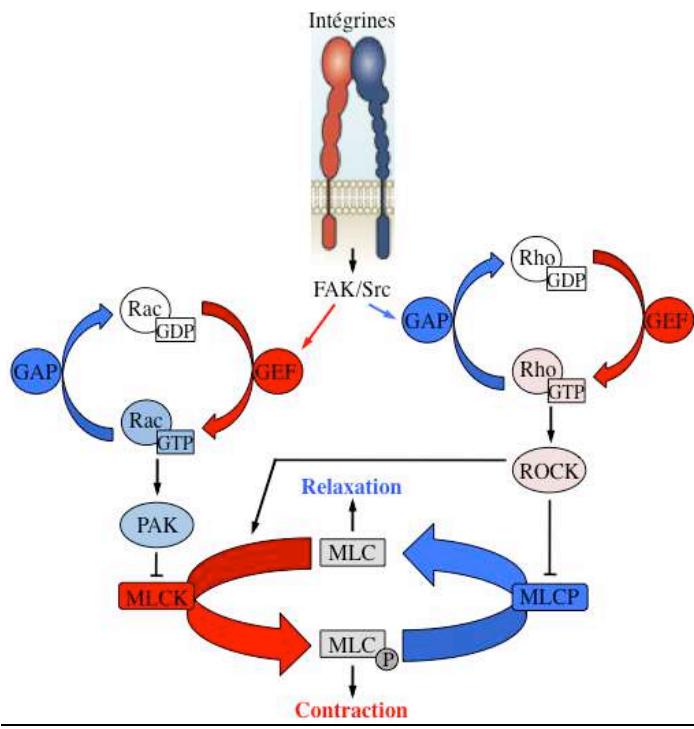
### *a) Migration cellulaire*

La migration est un processus qui fait intervenir plusieurs étapes : l'extension des lamellipodes à l'avant de la cellule ainsi que la formation de nouveaux points d'adhésions, la contraction du corps cellulaire et le détachement de la queue à l'arrière de la cellule.

L'extension des lamellipodes provoque l'engagement et l'agrégation des intégrines à l'avant de la cellule. Ces dernières vont recruter de nombreuses protéines cytoplasmiques et former des adhésions focales, modulant l'activation de plusieurs voies de signalisation capables de réguler l'activation des GTPases de la famille Rho : Rac, Cdc42 et Rho (Srichai & Zent, 2010). RhoA active ROCK (Rho kinase) qui va phosphoryler la phosphatase MLCP (Myosin Light Chain Phosphatase) et la MLCK (Myosin Light Chain Kinase), permettant ainsi la phosphorylation de la MLC (Myosin Light Chain). Cette phosphorylation induit la formation de nouvelles fibres de stress et la contraction des filaments d'actine. Une étude récente a ainsi montré que la perte de ICAP-1, protéine inactivatrice des intégrines, augmente l'activation de l'intégrine  $\beta 1$  et de la voie RhoA, augmentant ainsi la contractilité des cellules endothéliales (Faurobert et al., 2013). Rac et Cdc42 activent PAK (p21 activated kinase) qui phosphoryle directement MLCK et induit la dépolymérisation de l'actine ([Fig 25](#)) (Burridge & Chrzanowska-Wodnicka, 1996 ; Petit & Thiery, 2000 ; Guo & Giancotti, 2004 ; Schober et al., 2007 ; Huvaneers & Danen, 2009 ; Geiger et al., 2009 ; Vicente-Manzanares et al., 2009 ; Schiefermeier et al., 2011 ; Howe, 2011 ; Shen et al., 2012).

La migration cellulaire implique également le détachement des cellules à l'arrière. Ce mécanisme est dépendant du  $\text{Ca}^{2+}$ , les contractions cellulaires augmentant avec son niveau, ce qui conduit à l'augmentation des niveaux d'AMPc. Celle-ci va alors activer PKA (Protein Kinase A) qui va phosphoryler RhoA et diminuer son activité, affectant la morphologie cellulaire et induisant la perte des fibres de stress et des adhésions focales, l'arrondissement des cellules et leur détachement de la MEC. L'augmentation d'AMPc induit la déphosphorylation de nombreuses protéines telles que FAK, Src ou Pax. On observe que l'expression des intégrines est augmentée au front de migration et est diminuée à l'arrière. En effet, les intégrines sont « recyclées » de l'arrière à l'avant de la cellule par voie endocytaire (Burridge & Chrzanowska-

Wodnicka, 1996 ; Petit & Thiery, 2000 ; Guo & Giancotti, 2004 ; Schober et al., 2007 ; Huvaneers & Danen, 2009 ; Geiger et al., 2009 ; Vicente-Manzanares et al., 2009 ; Schiefermeier et al., 2011 ; Howe, 2011 ; Shen et al., 2012). Une étude récente a montré que la protéine CaMKII (calcium and calmodulin-dependent serine/threonine protein kinase type II) phosphoryle et active ICAP-1 qui, en se fixant sur la région cytoplasmique de l'intégrine  $\beta 1$  permet son inhibition et la déstabilisation des adhésions focales (Millon-Fremillon et al., 2013).



**Figure 25.** Modèle montrant la régulation possible de la phosphorylation de la MLC par les intégrines.

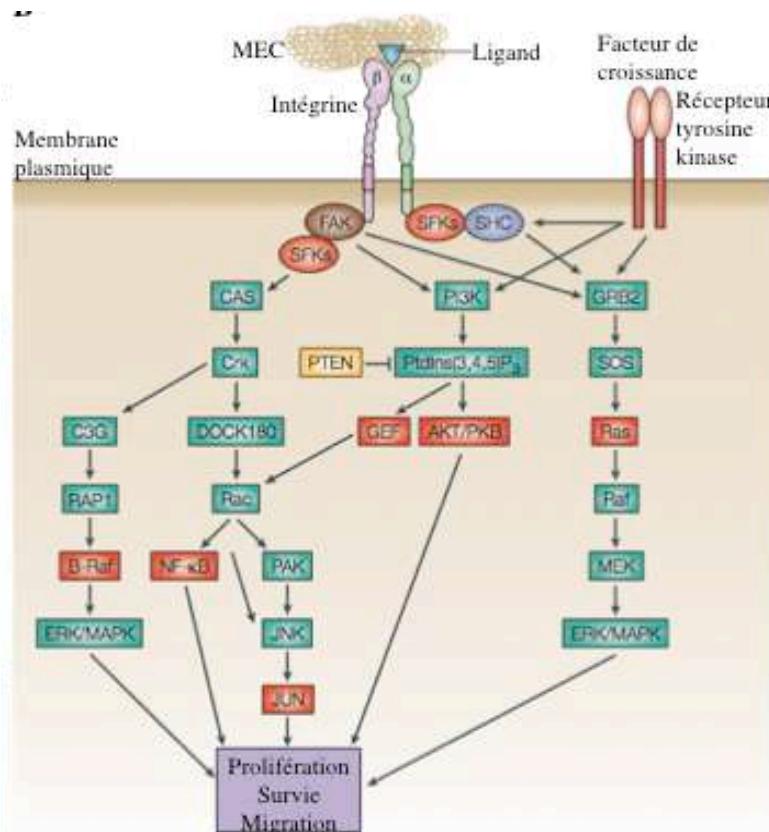
La phosphorylation de la MLC par les kinases MLCK et ROCK induit la liaison de l'actine à la myosine et la contraction. L'engagement des intégrines supprime localement l'activité Rho-ROCK et active la voie Rac-PAK, menant au relâchement des fibres de stress. Adapté de Rottner & Stradal, 2011.

### b) Prolifération cellulaire

Les intégrines contribuent à la prolifération cellulaire en coopérant avec les récepteurs aux facteurs de croissance (Guo & Giancotti, 2004 ; Streuli & Akhtar, 2009 ; Cabodi et al., 2010 ; Desgrosellier & Cheresh, 2010 ; Guadamillas et al., 2011). Cette coopération est favorisée par leur colocalisation au niveau des adhésions focales (Cabodi et al., 2010 ; Desgrosellier & Cheresh, 2010 ; Brizzi et al., 2012). Il a par exemple été montré que les intégrines  $\beta 1$  peuvent s'associer au récepteur à l'EGF (Epidermal Growth Factor), l'intégrine  $\alpha 6\beta 4$  aux récepteurs à

l'EGF, ErbB2 et c-Met et, l'intégrine  $\alpha\beta 3$  au récepteur au PDGF. Les intégrines peuvent influencer l'état de phosphorylation des récepteurs aux facteurs de croissance et leur association aux protéines de signalisation telles que Ras (Guo & Giancotti, 2004 ; Streuli & Akhtar, 2009 ; Cabodi et al., 2010 ; Brizzi et al., 2012).

Les voies de signalisation modulées par les intégrines et les récepteurs aux facteurs de croissance, notamment les voies MAPK/ERK et JNK, régulent la progression des cellules au cours du cycle cellulaire de la phase G1 à S (Fig 26) (Guo & Giancotti, 2004 ; Streuli & Akhtar, 2009 ; Cabodi et al., 2010 ; Brizzi et al., 2012). La protéine FAK, via les petites GTPases RhoA, Rac et Cdc42, active les voies MAPK/ERK et JNK. Ces voies induisent la transcription de facteurs tel que AP-1 (activator protein-1), et mènent à l'activation de la cycline D1 et à l'inhibition des protéines p21 et p27, inhibiteurs des CDK (Cyclin Dependent Kinase), favorisant ainsi la prolifération cellulaire (Juliano, 2002 ; Guo & Giancotti, 2004).



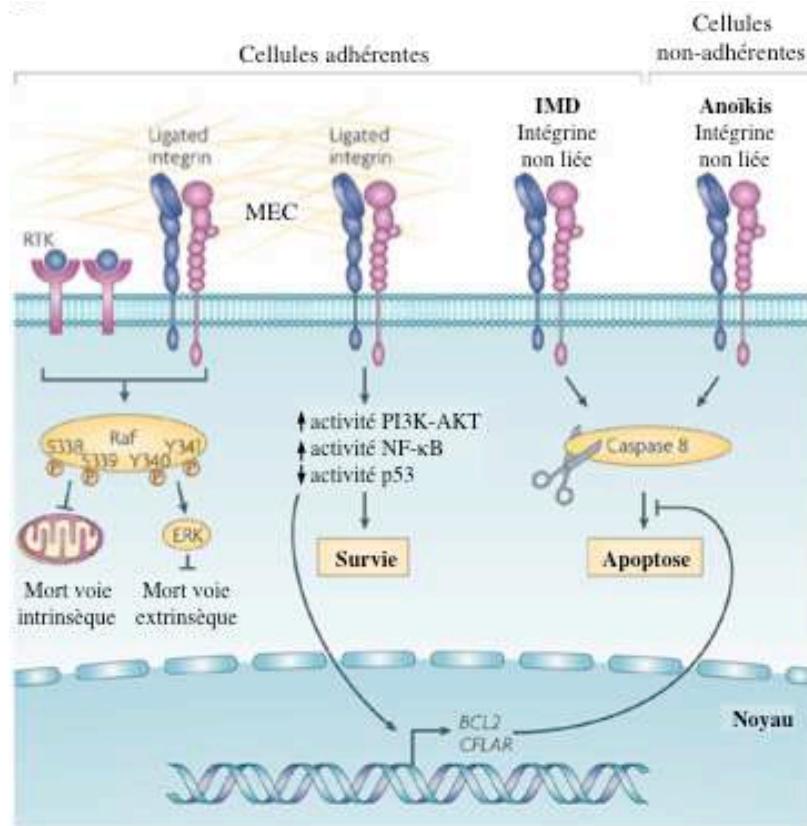
**Figure 26. Voies de signalisation dépendantes des intégrines.**

Les intégrines activent des voies de signalisation permettant la prolifération et la survie des cellules. Les intégrines peuvent s'associer aux récepteurs tyrosines kinases, afin d'amplifier les signalisations dépendantes de ces récepteurs tel que les voies ERK/MAPK, AKT/PKB et JNK. Adapté de Guo & Giancotti, 2004.

### c) Survie cellulaire

Selon les interactions développées avec la MEC, les intégrines pourront favoriser la survie cellulaire ou au contraire initier l'apoptose. L'interaction intégrine/substrat transmet des signaux de survie, alors que l'absence d'engagement des intégrines favorise l'activation de voies de signalisation pro-apoptotiques. La balance entre ces signaux induit la survie ou la mort cellulaire, les intégrines empêchant les cellules de survivre dans un environnement inapproprié.

Les voies de signalisation impliquées en aval des intégrines sont dépendantes de FAK, Src, p130Cas et ILK, et impliquent la protéine anti-apoptotique BCL2, l'activation des voies PI3K/AKT/PKB, NF-κB et JNK, et l'inactivation de p53 ([Fig 27](#)) (Petit & Thiery, 2000 ; Guo & Giancotti, 2004 ; Cabodi et al., 2010 ; Desgrosellier & Cheresh, 2010 ; Guadamilas et al., 2011). La perte d'adhésion à la MEC induit un arrêt du cycle cellulaire et la mort (ou anoikis) est alors induite de plusieurs façons : (i) de manière intrinsèque (mort induite par le relargage de cytochrome c par les mitochondries et l'activation des caspases pro-apoptotiques), (ii) de manière extrinsèque (mort induite par la liaison des récepteurs de mort Fas avec leur ligand et l'activation des caspases incluant la caspase-8) ([Fig 27](#)) (Guo & Giancotti, 2004 ; Desgrosellier & Cheresh, 2010 ; Guadamilas et al., 2011). Un mécanisme distinct de l'anoikis a également été décrit. Il s'agit d'une apoptose modulée uniquement par les intégrines, nommée IMD (Integrin-mediated death), et impliquée lorsque des cellules sont toujours adhérentes mais que les intégrines ne sont pas liées à un substrat. Les intégrines peuvent alors recruter et activer la caspase-8 et induire la mort cellulaire par apoptose ([Fig 27](#)). Ce mécanisme a pu être décrit pour les intégrines β1 et β3 dans les cellules épithéliales. Des études ont montré que la perte d'expression de la caspase-8 est l'un des mécanismes utilisé par les cellules cancéreuses pour éviter la mort par IMD et permettre la dissémination métastatique (Desgrosellier & Cheresh, 2010 ; Guadamilas et al., 2011).



**Figure 27. Voies de signalisation dépendantes des intégrines et régulant la survie cellulaire.**

Les intégrines sont impliquées dans les voies de signalisation qui contrôlent la survie et la mort des cellules. Adapté de Desgrosellier & Cheren, 2010.

#### d) Différenciation

La différenciation cellulaire est le processus par lequel les cellules souches embryonnaires totipotentes donnent naissance aux cellules spécialisées de l'organisme. Chez l'adulte, le maintien de l'homéostasie des tissus et leur régénération sont assurés par la différenciation des cellules souches tissulaires adultes. A chaque stade, les propriétés physico-chimiques de la MEC jouent un rôle clef dans le processus de différenciation. Par exemple, la présence d'une MEC souple, similaire à celle trouvée dans le cerveau, induit les cellules souches mésenchymateuses à se différencier vers un destin neural (Brizzi et al., 2012). L'interaction entre les intégrines et la MEC permet le maintien des cellules souches adultes dans un environnement particulier, appelé niche, qui joue un rôle clef dans le choix du destin cellulaire, à savoir auto-renouvellement versus différenciation (Raymond et al., 2009). Ainsi, l'adhésion dépendante des intégrines est essentielle au maintien des cellules souches dans de nombreux organes comme le système hématopoïétique,

le cerveau, l'épiderme ou encore la glande mammaire (Watt, 2002 ; Taddei et al., 2008 ; Raymond et al., 2009 ; Brizzi et al., 2012).

### 2.1.6. Dérégulation des intégrines dans le cancer

Du fait de leur implication dans un grand nombre de processus cellulaires, les intégrines participent à toutes les étapes de la tumorigénèse, de la transformation tumorale à la propagation par métastase. Le niveau d'expression des intégrines, leur activité ou même leur répertoire sont souvent trouvés modifiés au cours de la transformation tumorale, perturbant les fonctions des cellules et favorisant ainsi leur prolifération, leur survie ou leur capacité de migration (Guo & Giancotti, 2004 ; Hehlgans et al., 2007).

#### *a) Les intégrines dans la transformation et la progression tumorale*

Au cours de la transformation tumorale, les cellules cancéreuses modifient le répertoire des intégrines exprimées à leur surface afin de s'adapter au milieu où elles se trouvent et d'activer les voies de signalisation pro-prolifératives et de survie. Ainsi, par exemple, les carcinomes de type squameux présentent une réduction de l'expression des intégrines  $\alpha\beta 5$  (qui induit l'apoptose de manière intrinsèque), et montrent une augmentation des niveaux de l'intégrine  $\alpha\beta 6$ , qui active la voie de survie PI3K/Akt (Guo & Giancotti, 2004 ; Streuli & Akhtar, 2009 ; Cabodi et al., 2010 ; Desgrosellier & Cheresh, 2010 ; Guadamillas et al., 2011).

#### *b) Les intégrines dans la dissémination métastatique*

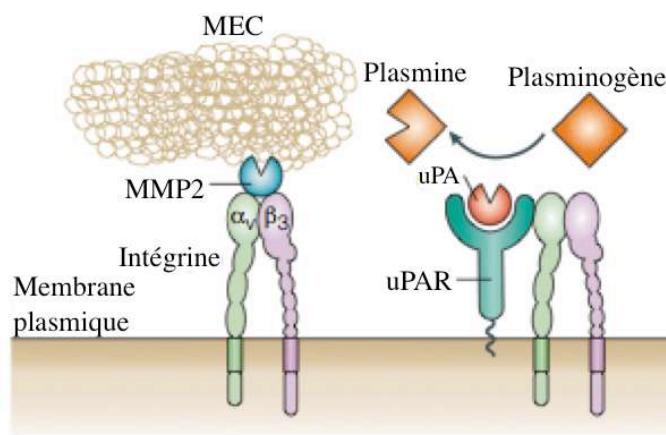
La formation de métastases permet à la tumeur primaire de s'étendre à d'autres organes en utilisant la circulation sanguine ou lymphatique. L'entrée d'une cellule tumorale dans un vaisseau sanguin met en jeu plusieurs processus dont la perte d'adhérence des cellules de la tumeur primaire, la sécrétion de protéases qui dégradent la membrane basale et la migration des cellules à travers la paroi du vaisseau. Les intégrines constituent des protéines clefs dans le contrôle de ces mécanismes (Guo & Giancotti, 2004 ; Streuli & Akhtar, 2009 ; Cabodi et al., 2010 ;

Desgrosellier & Cheresh, 2010 ; Guadamilas et al., 2011).

La rupture des interactions cellule-cellule au niveau de la tumeur primaire requiert la dérégulation de différents signaux. Des études ont montré que les intégrines peuvent inhiber l'expression des cadhérines (Guo & Giancotti, 2004 ; Canel et al., 2013). Elles favorisent ensuite la migration, en activant les GTPases de la famille Rho, comme vu dans la partie 2.1.5.a. Dans ce contexte, l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  a récemment été impliquée comme marqueur moléculaire de cellules subissant l'EMT et de cellules cancéreuses présentant un phénotype agressif (Shirakihara et al., 2013).

Pendant l'invasion tumorale, les MMPs dégradent et remodèlent la MEC afin que les cellules puissent migrer au travers de la MEC tout en y adhérant. Les intégrines interagissent avec les MMPs et les activent soit directement, soit indirectement en s'associant à la protéine uPAR (Fig 28) (Guo & Giancotti, 2004 ; Tang & Wei, 2008). De plus, des études ont montré que la protéine FAK induit l'expression de MMP2 et MMP9 via l'activation de JNK. Au cours de la dégradation de la MEC, de nouveaux sites d'interactions avec les intégrines deviennent accessibles, permettant aux cellules tumorales d'avancer et d'atteindre la paroi vasculaire.

Enfin, l'adhésion des intégrines au niveau de l'organe colonisé est essentielle pour l'établissement des métastases (Guo & Giancotti, 2004 ; Streuli & Akhtar, 2009 ; Cabodi et al., 2010 ; Desgrosellier & Cheresh, 2010 ; Guadamilas et al., 2011).



**Figure 28. Les intégrines et le remodelage de la MEC.**

L'intégrine  $\alpha v\beta 3$  recrute la MMP2 directement à la surface cellulaire afin de dégrader la MEC. Certaines intégrines peuvent s'associer au récepteur uPAR (urokinase plasminogen activator receptor). L'activation du récepteur uPAR par son ligand permet la conversion de plasminogène en plasmine, cette dernière activant alors les MMPs. Adapté de Guo & Giancotti, 2004.

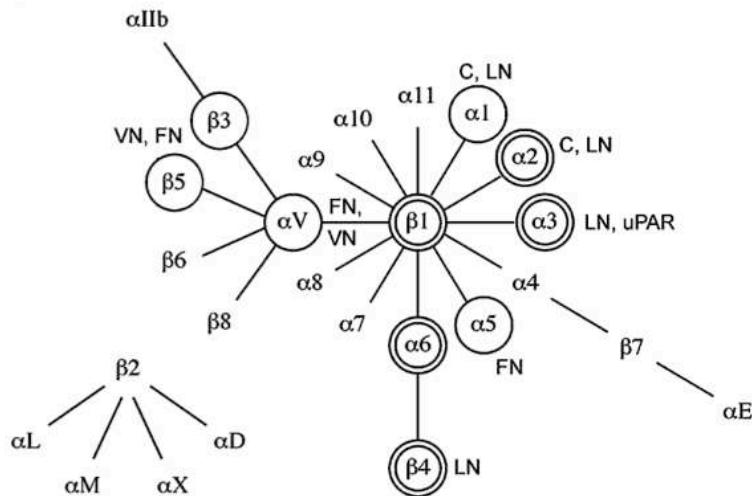
### *c) Les intégrines dans les cellules initiatrices de tumeur*

Des études réalisées à l'aide de modèles murins de tumorigénèse suggèrent que les intégrines jouent un rôle clef dans le maintien d'une population de CSC au sein de la tumeur (Pontier & Muller, 2009 ; Desgrosellier & Cheresh, 2010). La délétion de l'intégrine  $\beta 1$  dans plusieurs modèles murins, a été montrée réduire voir abolir, le développement tumoral dans de nombreux organes (système hématopoïétique, cerveau, peau, glande mammaire) (Pontier & Muller, 2009 ; Brizzi et al., 2012). Les CSC représentant la population cellulaire la plus agressive d'une tumeur, le ciblage des intégrines qui permettent leur maintien et/ou leur amplification, représente ainsi une stratégie prometteuse. Plusieurs molécules sont actuellement en phase d'essais cliniques telles que le cilengitide (qui cible les intégrines  $\alpha v\beta 3$  et  $\alpha v\beta 5$ ) pour traiter le glioblastome, ou le volociximab (qui cible l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ ) pour inhiber l'angiogenèse et la croissance tumorales (Desgrosellier & Cheresh, 2010 ; Brizzi et al., 2012).

## **2.2. Les intégrines dans la glande mammaire**

### 2.2.1. Répertoire des intégrines dans la glande mammaire

Les cellules épithéliales basales et luminales présentent un répertoire spécifique des intégrines exprimées à leur surface. Les intégrines  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha v$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 3$  et  $\beta 4$  sont exprimées par les cellules luminales et myoépithéliales, alors que les sous-unités  $\alpha 1$  et  $\alpha 5$  sont exclusivement exprimées par les cellules myoépithéliales (Fig 29). Les sous-unités  $\alpha 5$  et  $\alpha v$  sont exprimées à des niveaux plus faibles que les autres intégrines. La plupart des intégrines sont présentes au niveau des sites d'interactions cellule/MEC sur les cellules myoépithéliales et sur la surface basale des cellules luminales alvéolaires. Cependant, les intégrines  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 6$ , et  $\beta 1$  sont également exprimées au niveau des surfaces latérales des cellules luminales, aux sites d'interactions cellule/cellule. Dans l'épithélium mammaire, les intégrines liant la laminine sont constituées par les intégrines  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 1$  et  $\alpha 6\beta 4$  (Taddei et al., 2003 ; Faraldo et al., 2005 ; Pontier & Muller, 2009 ; Muschler & Streuli, 2010 ; Moumen et al., 2011 ; Lambert et al., 2012).



**Figure 29. Les dimères d'intégrines exprimés dans l'épithélium mammaire.**

Les sous unités  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha V$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 3$  et  $\beta 4$  (cercle double) sont exprimées par les cellules luminales et myoépithéliales, alors que  $\alpha 1$  et  $\alpha 5$  (cercle simple) sont restreintes aux cellules myoépithéliales.  $\alpha 1\beta 1$  et  $\alpha 2\beta 1$  sont des récepteurs du collagène (C), mais elles peuvent également interagir avec certains variants de la laminine (LN).  $\alpha 6\beta 1$  et  $\alpha 6\beta 4$  sont des récepteurs de la laminine.  $\alpha 3\beta 1$  sert essentiellement de récepteur pour la laminine-332 mais peut également s'associer à uPAR.  $\alpha 5\beta 1$  est un récepteur de la fibronectine (FN). Les cellules en culture expriment également les intégrines  $\alpha V\beta 3$  et  $\alpha V\beta 5$  qui reconnaissent la vitronectine (VN) et la fibronectine. Adapté de Taddei et al., 2003.

### 2.2.2. Les laminines exprimées dans la glande mammaire

Les polymères de laminine représentent un des constituant majeur de la membrane basale et dans la glande mammaire, on retrouve principalement les laminines-111, -322, -511 et -521 (Prince et al., 2002 ; Aumailley et al., 2005). La laminine-332 (anciennement nommée laminine-5) a été particulièrement impliquée dans la croissance et la progression tumorale (Miyazaki, 2006 ; Tsuruta et al., 2008 ; Guess & Quaranta, 2009).

### 2.2.3. Rôle des intégrines dans la glande mammaire

Des approches génétiques réalisées chez la souris ont permis d'évaluer la contribution des intégrines, au cours du développement mammaire. Alors que les intégrines de la famille  $\beta 1$  sont nécessaires à la morphogenèse et au maintien du potentiel régénératif de l'épithélium mammaire, les intégrines  $\beta 4$  ne semblent pas être requises (Klinowska et al., 2001 ; White et al., 2004 ;

Naylor et al., 2005 ; Li et al., 2005 ; Guo et al., 2006 ; Taddei et al., 2008 ; Huck et al., 2010 ; Lahlou & Muller, 2011 ; Akhtar & Streuli, 2013 ; Glukhova & Streuli, 2013).

#### *a) Rôle des intégrines pendant la morphogenèse mammaire*

Les intégrines  $\beta 1$  ont été particulièrement impliquées dans la morphogenèse mammaire. En effet, la perturbation de la fonction des intégrines  $\beta 1$  dans les cellules luminales *in vivo* (par injection d'anticorps anti- $\beta 1$  dans le coussin adipeux ou par expression d'une forme mutante dominante négative de  $\beta 1$ ) induit une réduction du nombre de TEBs, et retarde l'élongation canalaire et le développement lobulo-alvéolaire pendant la gestation (Faraldo et al., 1998 ; Klinowska et al., 2001). Des études utilisant des approches de perte de fonction ont confirmé que, dans les cellules luminales, les interactions dépendantes des intégrines  $\beta 1$  sont essentielles pendant le développement lobulo-alvéolaire (Raymond et al., 2012 ; Lambert et al., 2012). En effet, les souris dépourvues d'intégrines  $\beta 1$  dans le compartiment luminal (sous contrôle des promoteurs BLG-Cre et WAP-Cre, actifs à l'âge adulte et en gestation, respectivement) présentent une désorganisation des alvéoles sécrétrices, un détachement des cellules luminales, une diminution de la phosphorylation de FAK et une réduction de la prolifération des cellules luminales (Li et al., 2005 ; Naylor et al., 2005). La perte de ILK des cellules luminales induit un défaut d'alvéologénèse similaire à celui observé en absence d'intégrine  $\beta 1$  (Akhtar et al., 2009). Le promoteur MMTV-Cre étant activé plus tôt au cours du développement, il permet le ciblage des cellules progénitrices et donc la délétion du gène ciblé dans les cellules luminales et basales. La délétion de FAK à l'aide de ce promoteur induit des défauts de ramification canalaire importants, et une sévère hypoplasie lobulo-alvéolaire (Wagner et al., 2001 ; Nagy et al., 2007).

Au niveau des cellules basales, les intégrines  $\beta 1$  ont été impliquées pendant l'élongation et la ramification canalaire et au cours du développement lobulo-alvéolaire (Raymond et al., 2012 ; Lambert et al., 2012). La délétion des intégrines  $\beta 1$  des cellules basales, à l'aide du promoteur K5-Cre, induit d'importants défauts de morphogenèse. Les souris correspondantes présentent une diminution du nombre et de la distribution des branches latérales, et un retard de développement lobulo-alvéolaire en gestation (Taddei et al., 2008).

Les études décrivant les effets de la perte d'une des intégrines de la famille  $\beta 1$  (souris KO pour une des chaines  $\alpha$  associée à  $\beta 1$ ) n'ont pas révélé d'anomalies sévères de développement, suggérant qu'il y existe des redondances fonctionnelles entre dimères d'intégrines. Les souris déficientes pour l'intégrine  $\alpha 1$  se développent normalement, tandis que les souris déficientes pour l'intégrine  $\alpha 2$  ne présentent qu'une faible réduction de la ramification canalaire, à la puberté (Gardner et al., 1996 ; Chen et al., 2002). L'invalidation des sous-unités  $\alpha 3$  ou  $\alpha 6$  des intégrines menant à une létalité périnatale (Kreidberg et al., 1996 ; Georges-Labouesse et al., 1996 ; DiPersio et al., 1997 ; Georges-Labouesse et al., 1998 ; Anton et al., 1999), une approche de transplantation de rudiments mammaires a été utilisée afin d'étudier l'effet de l'absence de ces intégrines au cours du développement mammaire. Les résultats indiquent que les rudiments mammaires mutants sont capables de régénérer des canaux et des alvéoles, de façon similaire aux rudiments contrôles. Cependant, la fonctionnalité de la glande mammaire n'a pas pu être évaluée par cette approche (Klinowska et al., 2001 ; Hynes, 2002 ; Pozzi & Zent, 2011 ; Moumen et al., 2011).

#### *b) Rôle des intégrines dans la différenciation des cellules épithéliales mammaires*

La différenciation lactogénique des cellules luminales mammaires est essentiellement dirigée par la PrL. Comme expliqué dans la partie 1.2.3, en présence de la PrL, le PrL-R dimérisé et permet l'activation de JAK2 qui va alors phosphoryler le facteur de transcription STAT5, permettant la transcription des gènes du lait.

Les événements de signalisation dépendants des intégrines  $\beta 1$  sont essentiels à la différenciation lactogénique (Muschler & Streuli, 2010 ; Raymond et al., 2012). En effet, la délétion des intégrines  $\beta 1$  du compartiment luminal, ou son inhibition par expression d'une forme dominante-négative, mènent à un défaut de différenciation lactogénique ainsi qu'à une dédifférenciation précoce des cellules luminales, pendant l'involution (Faraldo et al., 1998 ; Faraldo et al., 2002 ; Li et al., 2005 ; Naylor et al., 2005 ; Muschler & Streuli, 2010). Le maintien de l'activation de STAT5 nécessaire pour l'expression des gènes du lait requiert l'adhésion des cellules à la laminine-111 via les intégrines  $\beta 1$  (Xu et al., 2009). Les interactions des cellules épithéliales mammaires avec la laminine-111 conduisent à l'activation de Rac1 par un

mécanisme PI3K-dépendant (Xu et al., 2010). Des études menées *in vitro* suggèrent que Rac1 est un régulateur majeur de la signalisation PrL-R/STAT5 dans les cellules épithéliales mammaires. En effet, l'inhibition de Rac empêche l'activation de STAT5 et la transcription du gène de la  $\beta$ -caséine en réponse à la PrL, alors que l'expression d'une forme constitutivement active de Rac restaure la différenciation lactogénique dans des cellules déficientes en intégrine  $\beta 1$  (Akhtar & Streuli, 2006). Une autre étude a révélé que dans la différenciation lactogénique des cellules luminales, ILK agirait en amont de Rac pour transmettre les signaux provenant des intégrines. En effet, dans les cellules dépourvues de ILK, STAT5 n'est plus activé par la PrL, alors que la réactivation de Rac dans ces cellules restaure leur différenciation. L'importance de ILK dans ce mécanisme a également été confirmée à l'aide de modèles de souris transgéniques (Akhtar et al., 2009). Les souris présentant une perte de fonction de FAK dans les cellules luminales montrent également une réduction de STAT5 et des défauts de différenciation des cellules luminales (Nagy et al., 2007).

La contribution des intégrines dans la différenciation des cellules basales myoépithéliales a été peu étudiée. Il a été suggéré que les intégrines  $\beta 1$  contribuaient au maintien du phénotype des cellules basales mammaires, bien que sa perte, ou son inhibition, n'inhibent pas la différenciation des cellules myoépithéliales (Taddei et al., 2008 ; LaBarge et al., 2009 ; Raymond et al., 2012).

### *c) Rôle des intégrines dans le maintien des cellules souches et progénitrices mammaires*

Les essais de transplantation des différentes populations épithéliales mammaires isolées par cytométrie en flux, ont montré que le potentiel régénératif de l'épithélium mammaire est contenu dans le compartiment basal mammaire. Seules les cellules basales, isolées sur la base du marqueur CD24 et de leur forte expression en intégrines  $\alpha 6$  et  $\beta 1$ , sont capables de régénérer des canaux et des alvéoles, après transplantation. De plus, il a été observé que dans la population de cellules basales, celles qui expriment les niveaux les plus élevés d'intégrine  $\alpha 6$  possèdent un potentiel régénératif supérieur au reste des cellules basales (Stingl et al., 2006). Le compartiment

luminal renferme des cellules progénitrices qui peuvent être enrichies à l'aide des intégrines  $\beta 3$  et  $\alpha 2$  (Asselin-Labat et al., 2007 ; Li et al., 2009).

La fonction des intégrines dans le maintien de l'activité des MaSC/progénitrices a été étudiée à l'aide d'approches consistant à invalider les gènes codant les différentes intégrines, dans le compartiment luminal ou basal, spécifiquement. La délétion de l'intégrine  $\beta 1$  des cellules luminales mammaires affecte le potentiel régénératif de l'épithélium mammaire (Li et al., 2005). Notre équipe a également montré, par une approche perte de fonction dans les cellules basales, que l'intégrine  $\beta 1$  est essentielle pour l'autorenouvellement des MaSC. Cette étude montre que l'axe de division des cellules basales, normalement majoritairement parallèle à l'axe de la membrane basale, devient aléatoire en absence d'intégrine  $\beta 1$ . L'homéostasie de l'épithélium mammaire ainsi que les lignages cellulaires sont alors perturbés. Les mécanismes cellulaires et moléculaires par lesquels les intégrines  $\beta 1$  contribuent au maintien d'une population de MaSC fonctionnelle ne sont cependant pas connus. Les intégrines  $\beta 1$  pourraient réguler les MaSC en jouant sur leur survie, leur capacité à s'autorenouveler, ou encore leur niche (Taddei et al., 2008 ; Raymond et al., 2009 ; Raymond et al., 2012 ; Glukhova & Streuli, 2013a).

#### 2.2.4. Rôle des intégrines dans la tumorigenèse mammaire

Les intégrines  $\beta 1$  et  $\beta 4$  jouent un rôle clef dans la tumorigenèse mammaire (White et al., 2004 ; Guo et al., 2006 ; Huck et al., 2010 ; Lahliou & Muller, 2011 ; Akhtar & Streuli, 2013). En effet, les pertes de fonction des intégrines  $\beta 1$  ou  $\beta 4$  dans différents modèles murins de cancers du sein inhibent l'initiation et la progression tumorales. Par exemple, dans le modèle murin de tumeur ERBB2 (souris transgéniques MMTV-Neu), la perte d'expression de l'intégrine  $\beta 4$  diminue l'initiation tumorale. Dans le modèle murin PyMT (Polymavirus Middle T antigen), la délétion des intégrine  $\beta 4$  ou  $\beta 1$  bloque la tumorigenèse (White et al., 2004 ; Guo et al., 2006 ; Streuli & Akhtar, 2009 ; Pontier & Muller, 2009 ; Huck et al., 2010 ; Desgrosellier & Cheresh, 2010 ; Lahliou & Muller, 2011). De nombreuses études ont suggéré que les CSC sont au centre du développement tumoral. Etant donné le rôle majeur joué par les intégrines  $\beta 1$  dans le maintien de MaSC, ces intégrines pourraient également être impliquées dans la génération et l'amplification de CSC, pendant la progression tumorale (Pontier & Muller, 2009). L'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  a été

impliquée dans la progression tumorale et la migration métastatique dans de nombreuses études (Shirakihara et al., 2013). Ce rôle joué par l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  dépend fortement de son interaction avec les tétraspanines CD151 (Scales et al., 2013 ; Gustafson-Wagner & Stipp, 2013). A l'inverse, l'expression de l'intégrine  $\alpha 2\beta 1$  supprime la formation de métastases provenant de tumeurs mammaires (Pan et al., 2009 ; Ramirez et al., 2011).

De nombreuses études indiquent que les molécules de signalisation dépendantes des intégrines, telles que FAK et ILK, jouent un rôle clef au cours de la tumorigenèse (Luo et al., 2009 ; Guan, 2010 ; Lahlou et al., 2012). Par exemple, la perte de FAK dans le modèle murin PyMT inhibe le développement tumoral et mène à une réduction de la population de CSC (Lahlou et al., 2007 ; Provenzano et al., 2008 ; Pylayeva et al., 2009 ; Luo et al., 2009 ; Pontier & Muller, 2009 ; Desgrosellier & Cheresh, 2010 ; Keely, 2011 ; Lambert et al., 2012). L'activation de FAK par les intégrines a été montrée réguler la transcription de gènes de survie (comme ceux de la famille BCL-2), protégeant les cellules de l'anoikis. De plus, l'activation de FAK induit l'inhibition des miRNA de la famille miR-200, menant à une réduction des niveaux de E-cadhéchine et conduisant à l'EMT, processus requis pour la génération de CSC et l'invasion des cellules tumorales (Thiery et al., 2009 ; Iliopoulos et al., 2009 ; Iliopoulos et al., 2010 ; Brabietz & Brabietz, 2010 ; Howe et al., 2011).

L'un des autres médiateurs de la voie de signalisation des intégrines est ILK. La délétion de ILK dans les tumeurs ErbB2 induit un retard de la croissance tumorale et un blocage de l'invasion, alors que sa surexpression conduit au développement d'hyperplasies et de tumeurs. Dans le modèle murin de tumeur MMTV-Wnt1, la surexpression de ILK accélère l'incidence et la croissance tumorales. Ce développement tumoral est accompagné par une augmentation de l'expression des gènes de prolifération (tels que  $\beta$ -caténine et cycline-D1) et par une expansion des progéniteurs luminaux, suggérant que l'activation des voies dépendantes de ILK et de Wnt1 coopèrent et mènent à l'amplification des progéniteurs luminaux conduisant à l'initiation tumorale (White et al., 2001 ; Akhtar et al., 2009 ; Cabodi et al., 2010 ; Pontier et al., 2010 ; Oloumi et al., 2010 ; Pozzi & Zent, 2011). D'autres protéines impliquées dans la signalisation des intégrines jouent un rôle dans la tumorigenèse mammaire, comme les protéines p130Cas, Src et kindline-1 (Cabodi et al., 2006 ; Cabodi et al., 2010 ; Marcotte et al., 2012 ; Sin et al., 2011). Par exemple, la kindline-1 est trouvée surexprimée dans les métastases pulmonaires provenant de

tumeurs primaires mammaires. Son expression induit une augmentation de la prolifération, de la clonogénicité et de l'invasion des cellules cancéreuses (Sin et al., 2011).

### **III. BUT DE L'ETUDE ET APPROCHES EXPERIMENTALES**

Les interactions entre les cellules mammaires et la MEC, dépendantes des intégrines liant la laminine, jouent un rôle majeur dans le développement et la tumorigénèse mammaires (Schatzmann et al., 2003 ; Lahlou & Muller, 2011 ; Raymond et al., 2012 ; Glukhova & Streuli, 2013). Cependant, ces études n'ont pas permis de déterminer les hétérodimères d'intégrine spécifiquement impliqués. Dans ce contexte, mon projet de thèse à visé à définir le rôle joué par les intégrines contenant les sous-unités  $\alpha 3$  et/ou  $\alpha 6$ , liant les cellules basales mammaires à la laminine (i) au cours du développement mammaire, (ii) dans le contrôle de l'activité des MaSC adultes, et (iii) dans le développement tumoral.

Nous avons utilisé le système Cre/Lox pour invalider les gènes codant pour  $\alpha 3$  et/ou  $\alpha 6$  spécifiquement dans les cellules basales de l'épithélium mammaire. Les souris porteuses des allèles conditionnels pour  $\alpha 3$  ( $\alpha 3^{F/F}$ ) et celles porteuses des allèles conditionnels pour  $\alpha 6$  ( $\alpha 6^{F/F}$ ) ont été générées par les laboratoires des Dr. A. Sonnenberg et E. Georges-Labouesse, respectivement (Kreidberg et al., 1996 ; Georges-Labouesse et al., 1996 ; DiPersio et al., 1997 ; Georges-Labouesse et al., 1998 ; Anton et al., 1999).

Les souris  $\alpha 3^{F/F}$  ont été croisées avec les souris transgéniques permettant le ciblage de la recombinase Cre dans la couche basale de l'épithélium mammaire (lignée K5-Cre, générée par le Dr J.L. Jorcano (Ramirez et al., 2004)). Les souris K5-Cre ;  $\alpha 3^{F/F}$  (K5 $\alpha 3$ KO) sont viables et présentent une forte efficacité de recombinaison des allèles ciblés dans la couche basale mammaire, permettant l'étude des fonctions régulées par cette intégrine au cours des différentes étapes du développement mammaire. Afin de déterminer le rôle joué par l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  dans la tumorigénèse mammaire, les souris K5 $\alpha 3$ KO ont été croisées avec les souris transgéniques K5 $\Delta N\beta$ cat, modèle murin de carcinomes mammaires de type basal, générées précédemment dans notre laboratoire (Teuliere et al., 2005).

Les souris K5-Cre ;  $\alpha 6^{F/F}$  (souris K5 $\alpha 6$ KO) meurent après la naissance. En effet, ces souris présentent une délétion de l'intégrine  $\alpha 6\beta 4$  dans la couche basale de l'épiderme, menant au développement d'une épidermolyse bulleuse jonctionnelle (Georges-Labouesse et al., 1996 ; van der Neut et al., 1996). Ainsi, nous avons isolé les cellules basales à partir des souris  $\alpha 6^{F/F}$  pour induire l'inactivation du gène *itga6* *in vitro*, à l'aide d'un adénovirus exprimant la

recombinase Cre. Le potentiel régénératif de ces cellules mutantes a alors été évalué à l'aide de transplantations en dilutions limites.

Le potentiel régénératif des cellules basales dépourvues des sous unités  $\alpha 3$  et  $\alpha 6$  des intégrines a été étudiée à l'aide d'une stratégie similaire : les cellules basales ont été isolées à partir des souris porteuses des allèles conditionnels pour  $\alpha 3$  et  $\alpha 6$  ( $\alpha 3^{F/F}$ ;  $\alpha 6^{F/F}$ ) puis l'inactivation des gènes *itga3* et *itga6* a été obtenue à l'aide d'un adénovirus exprimant le recombinase Cre.

## **MATERIELS ET METHODES**

Le paragraphe de « matériels et méthodes » décrit ci dessous se rapporte aux résultats présentés en supplément de la 3<sup>e</sup> partie « Les intégrines liant la laminine contrôlent l’activité des cellules souches/progénitrices mammaires ». Les paragraphes « matériels et méthodes » relatifs à l’ensemble des autres résultats sont retrouvés dans les articles.

## I. SOURIS TRANSGENIQUES

Toutes les expériences réalisées sur les souris ont été menées en accord avec la réglementation européenne en vigueur (L358-86/609EEC). Les souris K5Cre, exprimant la recombinase Cre sous le contrôle du promoteur de la kératine 5 (actif dans les cellules basales des épithélia stratifiés, dont la glande mammaire), proviennent du laboratoire du Dr Jorcano (Ramirez et al., 2004). Les souris *itga3<sup>F/F</sup>*, porteuses des allèles conditionnels pour l’intégrine α3, ont été générées par le Dr Sonnenberg (Margadant et al., 2009).

## II. ISOLEMENT DES CELLULES EPITHELIALES BASALES MAMMAIRES

Afin d’isoler par cytométrie en flux les différentes populations présentes dans la glande mammaire, les glandes inguinales mammaires de trois ou quatre souris, âgées de six mois, ont été collectées, finement coupées puis digérées de manière enzymatique à l’aide de collagénase A (3 mg/mL, Roche) et de hyaluronidase (100 U/mL, Sigma) pendant 2h à 37°C sous agitation. La digestion des agrégats cellulaires est poursuivie par incubation dans 0,25% de trypsine-EDTA (Invitrogen) pendant 1 min à 37°C puis par un traitement à l’aide d’un mélange de dispase II (5 mg/mL, Roche) et de DNase I (0,1 mg/mL, Sigma) pendant 5 min à 37°C. Enfin, les cellules sanguines sont lysées par choc osmotique à l’aide d’un tampon à base de chlorure d’ammonium. Une suspension cellulaire homogène est finalement obtenue après passage des agrégats cellulaires sur un filtre de 40 µm.

Les cellules mammaires ainsi dissociées ont ensuite été marquées comme précédemment décrit (Stingl et al., 2006 ; Sleeman et al., 2007 ; Taddei et al., 2008 ; Moumen et al., 2012) et triées par cytométrie en flux à l’aide de l’analyseur FACSvantage (Becton Dickinson, San Jose, CA). Les anticorps suivants ont été utilisés : anti-CD24-PE (clone M1/69, BD Pharmingen), anti-

CD49f-FITC (clone GoH3, BD Pharmingen), anti-CD45-APC (clone 30-F11, Biolegend), et anti-CD31-APC (clone MAC13.3, Biolegend). Des anticorps IgG couplés aux mêmes fluorochromes ont été utilisés comme contrôles. Les cellules basales mammaires triées ( $CD45^{neg}$   $CD31^{neg}$   $CD24^{faible}$   $CD49f^{fort}$ ) ont été à nouveau analysées par cytométrie en flux. Des niveaux de pureté supérieurs à 95% ont été trouvés. Le test d'exclusion au bleu de trypan nous a permis d'estimer que la viabilité des cellules après tri est comprise entre 80 et 87%.

### III. TRANSDUCTION LENTIVIRALE

Les cellules basales isolées par cytométrie en flux ( $10^5$  cellules) ont été incubées avec une suspension lentivirale à une MOI (« Multiplicity Of Infection ») de 5 dans 800  $\mu$ L de milieu DMEM/F12 (Gibco) supplémenté avec du B27 (1%, Gibco), de l'EGF (20 ng/mL, Invitrogen), du bFGF (20 ng/mL, Gibco), de l'héparine (4  $\mu$ g/mL, Sigma-Aldrich), de l'insuline (10  $\mu$ g/mL, Sigma-Aldrich) et du Matrigel (2%, BD Pharmingen) dans une plaque 24 trous à faible adhérence (Corning, NY) pendant 16h.

Afin d'inhiber l'activation de FAK, un lentivirus permettant l'expression d'une forme dominante négative non phosphorylable de FAK a été généré. Le vecteur lentival pEXP-WPI-FAKY397F a été généré en insérant la séquence de FAK<sup>Y397F</sup>, provenant du plasmide pIL2R-FAKY397F (Harvard Medical School PlasmID MmCD00292840, généré par le Dr Yamada (NIH, USA)), dans le vecteur lentival pDEST-WPI, une version Gateway du plasmide pWPI (plasmide Addgene 12254) provenant du laboratoire du Dr Benaroch (Institut Curie, France), à l'aide du protocole de clonage Gateway (Invitrogen). La séquence de l'insert a été vérifiée dans le plasmide pEXP-WPI-FAKY397F.

Afin de restaurer l'expression de FAK, un lentivirus permettant l'expression d'une forme constitutivement active de FAK a été généré. Le vecteur lentival pLV-GFP-CD2-FAK a été généré par insertion de la séquence GFP, provenant du plasmide pDEST-WPI, dans le vecteur lentival pLV-neo-CD2-FAK (plasmide Addgene 37013, provenant du laboratoire du Dr Weinberg (Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, USA)), aux sites de restriction XmaI et SpeI (à la place de la cassette néomycine).

Le vecteur lentiviral pWPXL (plasmide Addgene 12257, provenant du Dr Trono (EPFL, Suisse)) a été utilisé comme contrôle.

Les lentivirus ont été produits à l'aide de cellules HEK 293T cultivées dans des flasques de 75 cm<sup>2</sup> avec du DMEM-GlutaMAX™ (Gibco), supplémenté avec du sérum de veau fœtal (10%, HyClone), des acides aminés non essentiels (0,1 mM, Gibco) et du pyruvate de sodium (1 mM, Gibco). Les cellules ont été transfectées avec 10 µg de vecteur lentiviral, 7,5 µg de psPAX2 et 3 µg de pMDS.G (plasmides Addgene 12260 et 12259 respectivement, provenant du Dr Trono) à l'aide du protocole jetPEI (Polyplus). Les particules virales ont été collectées 48h après transfection, concentrées par ultracentrifugation à 120 000 g pendant 90 min et ressuspension dans du milieu DMEM/F12 (Gibco) supplémenté avec du B27 (1%, Gibco), de l'EGF (20 ng/mL, Invitrogen), du bFGF (20 ng/mL, Gibco), de l'héparine (4 µg/mL, Sigma-Aldrich) et de l'insuline (10 µg/mL, Sigma-Aldrich). Le titre du lentivirus a été déterminé en infectant des cellules HEK-293T avec des dilutions croissantes de surnageant. Le nombre de cellules HEK-293T GFP-positives a été analysé par cytométrie de flux.

#### **IV. ESSAI DE FORMATION DE MAMMOSPHÈRES**

Les cellules basales fraîchement isolées par cytométrie en flux ont été mises en culture dans des plaques de 24 trous à faible adhérence (Corning, NY) à une densité de 5 000 cellules/trou dans du milieu DMEM/F12 (Gibco) supplémenté de B27 (1%, Gibco), EGF (20 ng/mL, Invitrogen), bFGF (20 ng/mL, Gibco), héparine (4 µg/mL, Sigma-Aldrich), insuline (10 µg/mL, Sigma-Aldrich), Matrigel (2%, BD Pharmingen), Pénicilline/Streptomycine (10 mM, Gibco) et glutamine (10 mM, Gibco), selon le protocole précédemment décrit (Dontu et al., 2003 ; Spike et al., 2012).

Pour les tests de mammosphères en présence d'inhibiteur FAK (PF573228, Euromedex), les doses indiquées d'inhibiteur ont été ajoutées dans le milieu dès l'ensemencement puis tous les deux jours.

Au bout de 14 jours de culture, les mammosphères ont été photographiées à la loupe binoculaire (Leica MZ8) et au microscope GFP (Leica M165FC), puis le nombre de colonies et

leur aire ont été mesurés à l'aide du logiciel ImageJ (NIH). Seules les colonies dépassant 1500 cm<sup>2</sup> ont été comptées. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne +/- erreur standard à la moyenne (SEM). L'analyse statistique utilise le test U de Mann-Whitney (logiciel Prism 4, GraphPad). Deux groupes sont considérés significativement différents pour des valeurs de P < 0,05 (\*) ; P < 0,01 (\*\*) ou P < 0,001 (\*\*\*) .

## V. ESSAI DE TRANSPLANTATION DE CELLULES ISOLEES

Afin d'analyser le potentiel de régénération des cellules basales isolées, des essais de transplantation ont été réalisés avec les cellules basales isolées transfectées à l'aide des différents lentivirus (200 cellules/glande). Les cellules basales ont été diluées dans du milieu CO<sub>2</sub> indépendant (Invitrogen) contenant 20% de Matrigel (BD Biosciences) et injectées dans le coussin adipeux de femelles immunodéficientes hôtes âgées de 3 semaines (« nude Balb/c ») dont le rudiment épithelial mammaire endogène a été enlevé par microchirurgie (Deome et al., 1959 ; Taddei et al., 2008). Afin de comparer les capacités régénératrices de deux populations cellulaires dans un même contexte hormonal, les cellules infectées contrôles et mutantes ont été transplantées dans les coussins adipeux contre-latéraux d'une même femelle receveuse.

Les greffons ont été analysés 10 semaines après transplantation : les glandes transplantées ont été prélevées, photographiées dans leur ensemble à l'aide d'une loupe binoculaire GFP (Leica M165FC), puis colorées à l'aide de carmine et photographiées à la loupe binoculaire (Leica MZ8).

## **RESULTATS**

## I. LES EVENEMENTS DE SIGNALISATION REGULES PAR L'INTEGRINE $\alpha 3\beta 1$ SONT ESSENTIELS A LA LACTATION (1<sup>ER</sup> ARTICLE – EMBO JOURNAL)

### 1.1. Contexte et justification de la recherche

La morphogenèse mammaire et la différenciation fonctionnelle de l'épithélium mammaire sont contrôlées par différents facteurs dont la matrice extracellulaire (MEC) dont les récepteurs cellulaires principaux sont les intégrines. Notre équipe a démontré que les interactions entre les cellules épithéliales basales mammaires et la MEC médiées par les intégrines de la famille  $\beta 1$  jouent un rôle majeur dans la morphogenèse mammaire et dans le maintien de MaSC fonctionnelles (Taddei et al., 2008). Pour former un dimère fonctionnel, la sous-unité  $\beta 1$  peut s'associer à différentes chaînes  $\alpha$  et l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$ , récepteur des laminines, est fortement exprimée dans les cellules basales myoépithéliales. L'invalidation totale du gène *itga3*, codant pour  $\alpha 3$ , indique que l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  n'est pas nécessaire au développement et à la différenciation de la glande mammaire (Klinowska et al., 2001). Cependant, cette étude n'a pas permis d'accéder au rôle potentiel de cette intégrine au cours de la lactation. Dans ce but, nous avons utilisé le système Cre/Lox d'invalidation conditionnelle chez la souris. L'expression de la recombinase Cre, sous le contrôle du promoteur constitutif K5 (lignée K5-Cre), permet de recombiner les allèles conditionnels pour  $\alpha 3$  ( $\alpha 3^{F/F}$ ) spécifiquement dans les cellules basales de l'épithélium mammaire. Les souris de génotype K5-Cre ;  $\alpha 3^{F/F}$  (mutantes) sont comparées aux souris  $\alpha 3^{F/F}$  (contrôles).

### 1.2. Résumé des principaux résultats

#### 1.2.1. La perte de l'intégrine $\alpha 3\beta 1$ du compartiment basal mammaire mène à un défaut de lactation

L'analyse des souris mutantes a révélé une fonction nouvelle jouée par l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  au cours de la lactation. En effet, bien que la perte de  $\alpha 3\beta 1$  n'affecte pas la morphogenèse et la différenciation fonctionnelle de la glande mammaire, les femelles mutantes sont incapables de nourrir leur descendance. L'observation macroscopique des glandes mutantes montre que le réseau de canaux est dilaté du fait de l'accumulation de lait, suggérant un défaut de contractilité

des cellules myoépithéliales mutantes, limitant l’expulsion du lait des alvéoles sécrétrices vers le mamelon. Nous avons analysé les niveaux de phosphorylation du régulateur clef de la contractilité, la chaîne légère de myosine (MLC), et trouvé que les glandes mammaires de femelles mutantes lactantes présentent une phosphorylation soutenue aberrante de la MLC.

### 1.2.2. La contraction des cellules myoépithéliales mammaires nécessite l’activation de la voie de signalisation RhoA/ROCK

La phosphorylation de la MLC est connue pour être médiée par la MLC-Kinase (MLCK). L’implication de la Rho Kinase (ROCK) dans la contractilité des cellules myoépithéliales mammaires n’avait pas été démontrée (Reversi et al., 2005). Ainsi, afin de déterminer la contribution potentielle de la ROCK à la contraction des cellules myoépithéliales, des expériences de contractilité ont été réalisées à partir de fragments de glandes mammaires lactantes contrôles. L’inhibition de la ROCK bloque la contraction des cellules myoépithéliales en réponse à l’OT, stimulateur physiologique de la contraction, indiquant que l’activité de cette kinase est essentielle à la contractilité des cellules myoépithéliales mammaires.

### 1.2.3. La perte de l’intégrine $\alpha 3\beta 1$ des cellules myoépithéliales mammaires empêche l’accomplissement des cycles de contraction/relaxation

L’utilisation d’une lignée de cellules myoépithéliales porteuse des allèles conditionnels pour  $\alpha 3$  (lignée MEC- $\alpha 3+$ ) permet, après transduction adénovirale de la recombinase Cre, de générer la lignée MEC- $\alpha 3-$  dépourvue de  $\alpha 3\beta 1$ . La comparaison de la réponse des cellules MEC- $\alpha 3+$  et MEC- $\alpha 3-$  à l’OT indique que les cellules myoépithéliales mutantes se contractent avec une cinétique et une intensité similaire aux cellules contrôles. Cependant, elles sont incapables de retourner à l’état de relaxation initial de façon stable.

#### 1.2.4. L'engagement de l'intégrine $\alpha 3\beta 1$ active la voie de signalisation FAK/Rac/PAK menant à l'inhibition de la MLCK, nécessaire à l'accomplissement des cycles de contraction/relaxation

Nos résultats indiquent que l'activation de FAK est réduite dans les glandes de femelles mutantes en début de lactation. De plus, la balance Rho/Rac est dérégulée en absence de  $\alpha 3\beta 1$ . L'expression des formes dominantes négatives de Rac1 ou de son effecteur PAK dans les MEC- $\alpha 3+$  mime les défauts montrés par les MEC- $\alpha 3-$ . Au contraire, l'expression de formes constitutivement actives de Rac1 ou de PAK ainsi que le prétraitement avec de faibles doses d'inhibiteur de la MLCK, restaure la capacité de relaxation des MEC- $\alpha 3-$ . Ces données impliquent la voie FAK/Rac/PAK, en aval de l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$ , dans le contrôle de la contractilité des cellules myoépithéliales mammaires.

### **1.3. Conclusion de l'article**

Nos résultats indiquent que l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  présente une fonction unique au cours de la lactation. Les mécanismes moléculaires impliqués en aval de  $\alpha 3\beta 1$  font intervenir la voie FAK/Rac/PAK menant à l'inhibition de la MLCK, inhibition nécessaire à la relaxation des cellules myoépithéliales mammaires.

**1er article :** *Control of mammary myoepithelial cell contractile function by  $\alpha 3\beta 1$  integrin signalling -* EMBO J, 2011.

## Control of mammary myoepithelial cell contractile function by $\alpha 3\beta 1$ integrin signalling

Karine Raymond<sup>1,2,\*</sup>, Stéphanie Cagnet<sup>1,2</sup>,  
Maaike Kreft<sup>3</sup>, Hans Janssen<sup>3</sup>, Arnoud  
Sonnenberg<sup>3</sup> and Marina A Glukhova<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Institut Curie, Centre de Recherche, Paris, France; <sup>2</sup>Centre National de la Recherche Scientifique, UMR144, Paris, France and <sup>3</sup>Division of Cell Biology, The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, The Netherlands

In the functionally differentiated mammary gland, basal myoepithelial cells contract to eject the milk produced by luminal epithelial cells from the body. We report that conditional deletion of a laminin receptor,  $\alpha 3\beta 1$  integrin, from myoepithelial cells leads to low rates of milk ejection due to a contractility defect but does not interfere with the integrity or functional differentiation of the mammary epithelium. In lactating mammary gland, in the absence of  $\alpha 3\beta 1$ , focal adhesion kinase phosphorylation is impaired, the Rho/Rac balance is altered and myosin light-chain (MLC) phosphorylation is sustained. Cultured mammary myoepithelial cells depleted of  $\alpha 3\beta 1$  contract in response to oxytocin, but are unable to maintain the state of post-contractile relaxation. The expression of constitutively active Rac or its effector p21-activated kinase (PAK), or treatment with MLC kinase (MLCK) inhibitor, rescues the relaxation capacity of mutant cells, strongly suggesting that  $\alpha 3\beta 1$ -mediated stimulation of the Rac/PAK pathway is required for the inhibition of MLCK activity, permitting completion of the myoepithelial cell contraction/relaxation cycle and successful lactation. This is the first study highlighting the impact of  $\alpha 3\beta 1$  integrin signalling on mammary gland function.

The *EMBO Journal* advance online publication, 12 April 2011;  
doi:10.1038/emboj.2011.113

**Subject Categories:** cell & tissue architecture; development

**Keywords:** contraction; integrin; mammary gland;  
myoepithelium; Rho-GTPases

### Introduction

Integrins are  $\alpha\beta$  heterodimeric adhesion receptors that connect the extracellular matrix (ECM) to the actin cytoskeleton within structures called focal adhesions. These structures stabilize the cytoskeleton and serve as a platform for the assembly of multimolecular complexes mediating activation of intracellular signalling pathways involved in the control of proliferation, survival, differentiation, motility and other

\*Corresponding authors. K Raymond or MA Glukhova, Centre de Recherche, UMR 144, CNRS-Institut Curie, 26 rue d'Ulm, Paris 75005, France. Tel.: +33 1 56 24 63 31; Fax: +33 1 56 24 63 49; E-mail: karine.raymond@curie.fr or marina.glukhova@curie.fr

Received: 12 October 2010; accepted: 15 March 2011

cellular functions (Hynes, 2002; Vincente-Manzanares *et al.*, 2009). Integrin-mediated signalling has an essential role in the activation of small Rho-GTPases, such as Rho and Rac, major regulators of actin cytoskeleton and cell-cell and cell-ECM adhesion (reviewed in Huvanees and Danen (2009)).

The mammary epithelium consists of two layers of epithelial cells: the luminal and basal layers. In functionally differentiated mammary gland, i.e., during lactation, luminal cells produce and secrete milk, whereas basal cells, also referred to as myoepithelial cells, contract to force milk out of the body. Mammary myoepithelial cells are characterized by a dual differentiation program. On the one hand, these cells express numerous markers shared by basal cells from various stratified epithelia. On the other hand, they express high levels of smooth muscle (SM)-specific contractile and cytoskeletal proteins responsible for the contractile activity of the myoepithelium. Inactivation of the gene coding for myoepithelial transcription factor regulating the expression of the SM-contractile proteins perturbs differentiation of the mammary myoepithelial cells resulting in impaired lactation (Li *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2006).

The basal epithelial cell layer interacts directly with the mammary basement membrane, a specialized ECM structure underlying the mammary epithelium, and integrins of the  $\beta 1$  family and  $\alpha 6\beta 4$  are major ECM receptors expressed by mammary epithelial cells (Taddei *et al.*, 2003). Several studies have suggested that  $\beta 1$  integrins participate in the control of growth and differentiation of the mammary epithelium *in vivo* and have an essential role in the maintenance of the mammary stem cell population (Faraldo *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2005; Taddei *et al.*, 2008). The  $\beta 1$  integrin chain binds various  $\alpha$  subunits, and the ECM ligand specificity of the resulting dimer depends on the nature of the  $\alpha$  subunit. Different integrin dimers may activate different intracellular signalling pathways affecting cellular functions in a context-dependent manner (Huvanees and Danen, 2009). The laminin receptor  $\alpha 3\beta 1$  is one of the major integrins expressed in basal mammary epithelial cells. Germinal deletion of the  $\alpha 3$  integrin chain leads to early postnatal lethality due to abnormal kidney and lung development (Kreidberg *et al.*, 1996). Several recent studies using conditional  $\alpha 3$ -knockout mice have addressed the functions of  $\alpha 3\beta 1$  integrin in various tissues. Deletion of the  $\alpha 3$  integrin chain from the epidermis indicated that  $\alpha 3\beta 1$  integrin inhibited directional migration and wound healing in the skin (Margadant *et al.*, 2009).  $\alpha 3\beta 1$  integrin was found to control expression of the pro-angiogenic factor MRP3 in keratinocytes, promoting endothelial cell migration and wound angiogenesis (Mitchell *et al.*, 2009). Conditional deletion from endothelial cells revealed a role for  $\alpha 3\beta 1$  integrin in the regulation of angiogenesis (da Silva *et al.*, 2010).  $\alpha 3\beta 1$  integrin was found to interact with netrin1 and to modulate routes of interneuronal migration in the developing cerebral cortex (Stanco *et al.*, 2009). Analysis of the role

played by  $\alpha 3\beta 1$  integrin in mammary morphogenesis, based on the transplantation of epithelium into the cleared mouse mammary fat pad, led to the conclusion that  $\alpha 3\beta 1$  integrin might be dispensable for mammary development (Klinowska et al, 2001). However, this study neither examined the potential function of  $\alpha 3\beta 1$  integrin during lactation, nor investigated the impact of  $\alpha 3\beta 1$ -mediated signalling events on the functional activity of the mammary epithelium.

To study the role played by  $\alpha 3\beta 1$  integrin in mammary epithelium *in vivo*, we deleted *itga3* from the mammary basal cell layer using Cre-Lox approach. We show here that ablation of *itga3* neither interfered with mammary morphogenesis, nor impeded the functional differentiation of mammary epithelial cells. However, mice harbouring  $\alpha 3\beta 1$ -deficient myoepithelium could not lactate normally due to a myoepithelial cell contractility defect associated with altered Rho/Rac balance. These results suggest that  $\alpha 3\beta 1$  integrin-mediated signalling events have an essential role in the control of the amplitude and duration of the force developed by the myoepithelial cell contractile apparatus in lactating mammary gland and provide the first evidence highlighting the impact of  $\alpha 3\beta 1$  integrin signalling on mammary gland function.

## Results

### $\alpha 3\beta 1$ integrin deletion from myoepithelial cells does not interfere with functional differentiation of the mammary epithelium

To delete the gene coding for  $\alpha 3$  integrin chain, mice harbouring floxed *itga3* alleles (*itga3*<sup>F/F</sup>) were crossed with transgenic mice expressing Cre recombinase under control of the keratin 5-promoter (K5Cre) active in the basal epithelial cells (Ramirez et al, 2004). As expected, Cre-driven recombination was detected in the epidermis and mammary gland (Figure 1A). Ductal branching morphogenesis was not affected in mutant mice, although *itga3* was found to be deleted from the mammary basal epithelial layer of 5-week-old animals (Supplementary Figure S1A-C). Immunoblotting and immunofluorescence analyses confirmed efficient deletion of the  $\alpha 3$  integrin chain from the mammary epithelium of 1 day-lactating mutant mouse mammary glands (Figure 1B and C).

Overall, mutant mammary tissue organization was similar to that of control animals (Figure 1C and D). The expression and distribution of various integrin subunits ( $\alpha 6$ ,  $\beta 1$  and  $\beta 4$ ) and ECM components (processed and unprocessed  $\gamma 2$  laminin chain) were similar in control and mutant glands (Supplementary Figure S2A; data not shown). Ultrastructural analysis of the mutant mammary epithelium revealed no defect in basal myoepithelial cell adhesion to the basement membrane (Supplementary Figure S2B). These data suggest that, in the absence of  $\alpha 3\beta 1$ , other integrin dimers present at the surface of the basal myoepithelial cells ensure adhesion to the ECM.

The functional differentiation of the mammary epithelium appeared normal in mutant glands, as shown by evaluation of the expression levels of milk and SM-contractile protein genes characteristic of luminal and myoepithelial cells, respectively, by quantitative RT-PCR (Figure 1E). Mammary epithelial cell proliferation was not affected in K5Cre;*itga3*<sup>F/F</sup> glands, and hardly any apoptotic cells were detected with anti-cleaved

caspase 3 antibody at the onset of lactation in control and mutant mammary epithelium (Supplementary Figure S2C-E; data not shown). Thus, the deletion of  $\alpha 3\beta 1$  integrin from myoepithelial cells did not affect the integrity and functional differentiation of the mammary epithelium.

### K5Cre;*itga3*<sup>F/F</sup> mice display lactation failure due to low rates of milk ejection

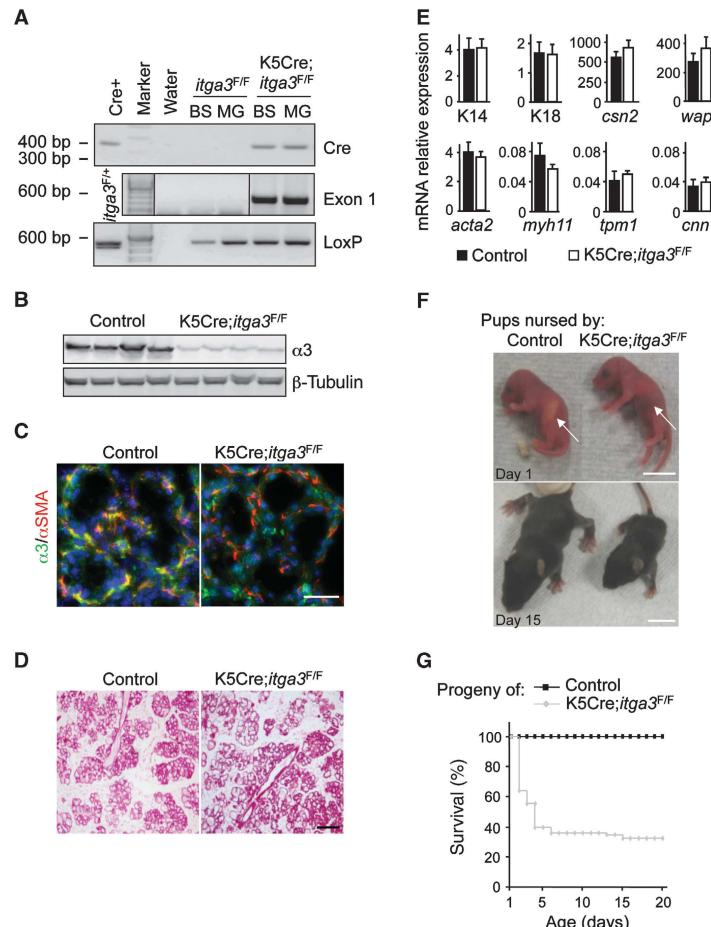
K5Cre;*itga3*<sup>F/F</sup> mutant mice were viable and fertile. However, the females were unable to feed their litters. About half the pups nursed by K5Cre;*itga3*<sup>F/F</sup> females died within 4 days, and the surviving pups displayed severe growth retardation (Figure 1F and G). Milk was visible in the stomachs of the pups fed by control females, whereas the pups nursed by K5Cre;*itga3*<sup>F/F</sup> females appeared to have empty stomachs (Figure 1F). This defect was not intrinsic to the neonates, which developed normally after weaning or when nursed by control females. Control neonates fostered by lactating K5Cre;*itga3*<sup>F/F</sup> females also failed to grow normally (data not shown). The mutant females presented no obvious abnormal maternal nurturing behaviour.

As milk was produced but not available to neonates, we hypothesized that the contractile activity of mutant myoepithelial cells was impaired, leading to a low rate of milk ejection. This hypothesis was supported by the results of morphological analyses of the lactating mouse glands. Most of the mutant glands analysed on days 7 and 18 of lactation contained large dilated ducts engorged with milk. In addition, collapsed alveoli and gland fragments displaying complete secretory tissue regression were found in mutant epithelium examined on day 18 of lactation (Figure 2A; data not shown). These morphological changes in the mutant glands were similar to those resulting from milk stasis, which is known to induce premature involution (Quarrie et al, 1996).

### High myosin light-chain phosphorylation level is maintained in lactating K5Cre;*itga3*<sup>F/F</sup> mouse mammary glands

The contraction of myoepithelial cells, like that of SM cells, is regulated by myosin light-chain (MLC) phosphorylation, which induces myosin ATPase activity, the binding of myosin to actin and contraction (Hartshorne et al, 1989). The subsequent dephosphorylation of the MLC by its specific phosphatase (MLCP) leads to relaxation. Immunofluorescence analysis of MLC distribution showed this protein to be present in large amounts in the myoepithelial cells of control and mutant mammary epithelium (Figure 2B, upper panels), whereas immunolabelling with antibodies against phosphorylated MLC was slightly stronger in mutant myoepithelial cells than in control cells (Figure 2B, middle and lower panels). Immunoblotting analysis performed with protein extracts prepared from control and mutant mammary epithelium on the first day of lactation clearly demonstrated that MLC phosphorylation levels were abnormally high in mutant myoepithelial cells (Figure 2C).

Consistently, on the first day of lactation, the mutant myoepithelial cells presented extensions slightly shorter than those of control cells (data not shown) and, by day 5 of lactation, in most regions of the mutant glands, myoepithelial cells displayed a characteristic hypercontractile phenotype, with a compact cell body and short thick extensions (Figure 2D and E). In control tissue, most myoepithelial



**Figure 1** Conditional deletion of the *itga3* gene from mammary basal epithelial cells does not interfere with mammary development, but leads to lactation failure. (A) PCR analysis of genomic DNA isolated from back skin (BS) and mammary gland (MG) of 5-week-old *itga3*<sup>F/F</sup> and K5Cre;*itga3*<sup>F/F</sup> virgin females. The primers used detect Cre recombinase (Cre), the recombined exon 1 of *itga3* (Exon 1) and LoxP sequences (LoxP). Primer sequences are provided in the Supplementary data. The vertical bars in the middle panel-photograph separate parts of the gel that have been spliced together to remove intervening lines. (B) Immunoblotting analysis of  $\alpha 3$  integrin expression levels in mammary gland from 1 day-lactating control and K5Cre;*itga3*<sup>F/F</sup> females.  $\beta$ -Tubulin was used as the loading control. (C) Double immunofluorescence labelling of sections through inguinal 1 day-lactating mouse mammary gland with antibodies against  $\alpha 3$  integrin and  $\alpha$ SMA. (D) H&E staining of sections through 1 day-lactating inguinal mammary glands. Quantitative RT-PCR: K14, cytokeratin 14; K18, cytokeratin 18; *csn2*,  $\beta$ -casein; *wap*, whey acidic protein; *acta2*,  $\alpha$ -smooth muscle actin; *myh11*, smooth muscle-myosin heavy chain; *tpm1*, tropomyosin  $\alpha$ ; *cnn1*, smooth muscle-calponin. The levels represent mean  $\pm$  s.e.m. for independent RNA preparations obtained from four control and five mutant glands (F) Photographs of pups fed by control females and empty in pups fed by mutant females. (G) Pup survival curve in the litters fed by control ( $n=15$ ) and mutant ( $n=11$ ) females. Bars: 200  $\mu$ m in (C), 75  $\mu$ m in (D) and 1 cm in (F).

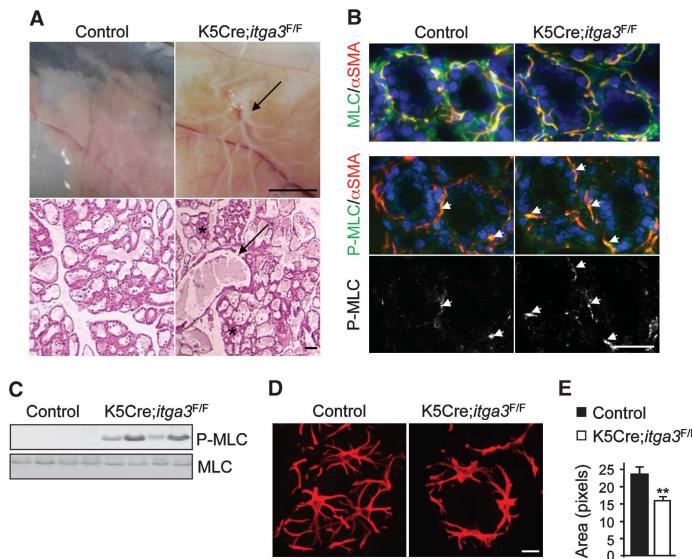
cells appeared more relaxed, with a significantly larger surface area and longer extensions (Figure 2D and E). Taken together, these observations suggest that the MLC kinase/phosphatase activity balance is altered in mutant glands.

#### Mammary myoepithelial cell contraction requires activation of RhoA/ROCK pathway

In non-muscle and SM cells, MLC phosphorylation is controlled essentially by MLCK (Ikebe and Hartshorne, 1985;

Somlyo and Somlyo, 2003; Webb, 2003). The RhoA effector Rho kinase (ROCK) has also been reported to phosphorylate MLC *in vitro*, but the main effect of Rho/ROCK activation is the inhibitory phosphorylation of MLCP (Somlyo and Somlyo, 2003).

During lactation, mammary myoepithelial cell contraction is induced by pulsatile release of the cyclic peptide oxytocin (OT), which binds to a promiscuous G protein-coupled receptor (OTR). The downstream signalling pathways leading



**Figure 2** Deletion of  $\alpha 3\beta 1$  integrin from the basal epithelial cell layer leads to milk stasis, sustained MLC phosphorylation. (A) Photograph of thoracic mammary glands from 18 day-lactating control and K5Cre;itga3<sup>F/F</sup> females (upper panels) and H&E staining through inguinal mammary glands from 7 day-lactating females (lower panels). Arrows and asterisks indicate engorged/dilated ducts and collapsed alveoli, respectively. (B) Double immunofluorescence labelling of sections through 1 day-lactating mouse inguinal mammary glands with antibodies against MLC or  $\alpha$ SMA and  $\alpha$ SMA. (C) Immunoblotting analysis of P-MLC levels in mammary gland extracts from 1 day-lactating control and mutant females. (D) Immunofluorescence labelling of sections through 5 day-lactating mouse inguinal mammary glands with antibody against  $\alpha$ SMA. (E) Diagram showing the surface area of myoepithelial cells at day 5 of lactation. The levels shown represent mean  $\pm$  s.e.m. of surface area of 12 and 16 control and mutant myoepithelial cells, respectively, from 10 independent randomly chosen fields in each case. \*\* $P < 0.01$ . Bars: 2.5 mm and 100  $\mu$ m in (A), upper and lower panels, respectively, 200  $\mu$ m in (B), and 10  $\mu$ m in (D).

to myoepithelial cell contraction remain largely unclear (reviewed in Reversi *et al* (2006)).

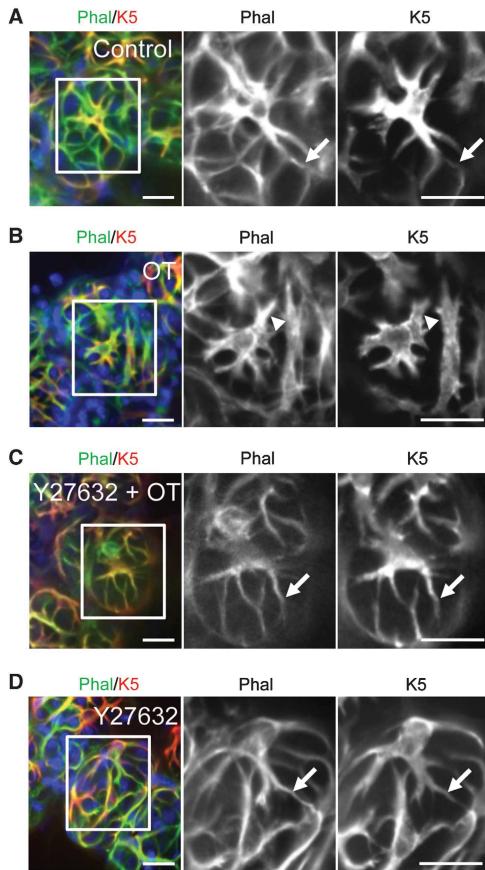
To define whether ROCK has a role in myoepithelial cell contraction, fragments of mammary tissue dissected from 1 day-lactating mammary glands were treated with ROCK inhibitor and then incubated with OT. The changes in myoepithelial cell shape following OT treatment were analysed after labelling with anti-K5 antibody and phalloidin, by immunofluorescence microscopy. As previously reported, OT treatment induced major cell shape changes (Moore *et al*, 1987). Relaxed myoepithelial cells had thin elongated processes, whereas OT-treated contracted cells had a compact spoke-shaped body with short, thick extensions (Figure 3A and B). Pre-treatment with ROCK inhibitor (Y27632) abolished the myoepithelial cell response to OT (Figure 3C). Treatment with the inhibitor only did not lead to any visible cell shape changes (Figure 3D). Similar results were obtained with fragments of mammary tissue dissected from mutant glands (data not shown). These data suggest that OT-stimulated mammary myoepithelial cell contraction requires RhoA pathway activation.

**Mammary myoepithelial cells depleted of  $\alpha 3\beta 1$  integrin are unable to complete the contraction/relaxation cycle**  
To define the molecular mechanisms involved in the regulation of mammary myoepithelial cell contraction by  $\alpha 3\beta 1$  integrin, we used a mouse myoepithelial cell line carrying conditional alleles of *itga3* (MEC- $\alpha 3 +$ ) established in our

laboratory. These cells express myoepithelial markers, including K5,  $\alpha$ -SMA and P-cadherin, and are negative for luminal markers, such as K8 (Supplementary Figure S3A–C). The adenoviral delivery of Cre recombinase, followed by cell sorting with anti- $\alpha 3$  antibody, yielded myoepithelial cells lacking  $\alpha 3\beta 1$  integrin (MEC- $\alpha 3 -$ ) (Figure 4A and B; Supplementary Figure S3D). Flow cytometry analysis and adhesion assays revealed no major change in the surface expression of other integrin subunits or in adhesion properties of  $\alpha 3\beta 1$ -deficient cells (Supplementary Figure S3D and E).

In agreement with the hypercontractile phenotype of mutant mammary myoepithelial cells observed *in vivo*, MEC- $\alpha 3 -$  showed an increased capacity to contract 3D collagen gels as compared with MEC- $\alpha 3 +$  cells (Supplementary Figure S4A). However, both, MEC- $\alpha 3 +$  and MEC- $\alpha 3 -$  contracted collagen gels regardless of the presence of OT (not shown) precluding us from further analysis of the molecular mechanisms underlying the abnormal contractile phenotype of  $\alpha 3\beta 1$ -deficient cells, in this model.

The contractile response of MEC- $\alpha 3 +$  and MEC- $\alpha 3 -$  to OT was analysed using time-lapse video microscopy. We have found that both, MEC- $\alpha 3 +$  and MEC- $\alpha 3 -$  cells responded to OT by a decrease in surface area in a dose-dependent manner (Figure 4C and E, upper panels), and that most MEC- $\alpha 3 -$ , but not MEC- $\alpha 3 +$  cells responded to lower doses of OT (Figure 4C). Analysis of OT receptor transcript levels by quantitative RT-PCR revealed no statistically significant difference between MEC- $\alpha 3 +$  and MEC- $\alpha 3 -$  (Figure 4D),



**Figure 3** OT-induced contraction of mammary myoepithelial cells requires activation Rho/ROCK signalling pathway. Double immunofluorescence labelling of 1 day-lactating mouse mammary gland fragments with phalloidin (Phal) and anti-K5 antibody. (A) Control, untreated tissue. (B) OT-treated tissue. (C) Before addition of OT, mammary tissue was treated with ROCK inhibitor (Y27632). (D) ROCK inhibitor-treated tissue. Arrows point to the thin elongated extensions displayed by relaxed myoepithelial cells, and arrowheads indicate the short and thick extensions of contracted cells. Bar: 15  $\mu$ m.

suggesting that the capacity of  $\alpha 3-$  cells to respond to lower doses of OT was not due to increased expression of OT receptor.

Importantly, the planar cell surface area did not change in response to OT, if MECs were pre-treated with an inhibitor of myosin ATPase, blebbistatin (Supplementary Figure S4B), strongly indicating that the decrease of cell surface area can serve as the readout of cell contraction.

Consistent with the results obtained with lactating mouse mammary tissue fragments, the OT-induced contraction of MEC- $\alpha 3+$  and MEC- $\alpha 3-$  depended largely on ROCK. Indeed, pre-treatment with the ROCK inhibitor abolished OT-induced contraction (Figure 4E and F; Supplementary

Movie 3). Thus, regardless of the presence of  $\alpha 3\beta 1$  integrin, the myoepithelial cell contractile response to OT involved activation of the RhoA pathway.

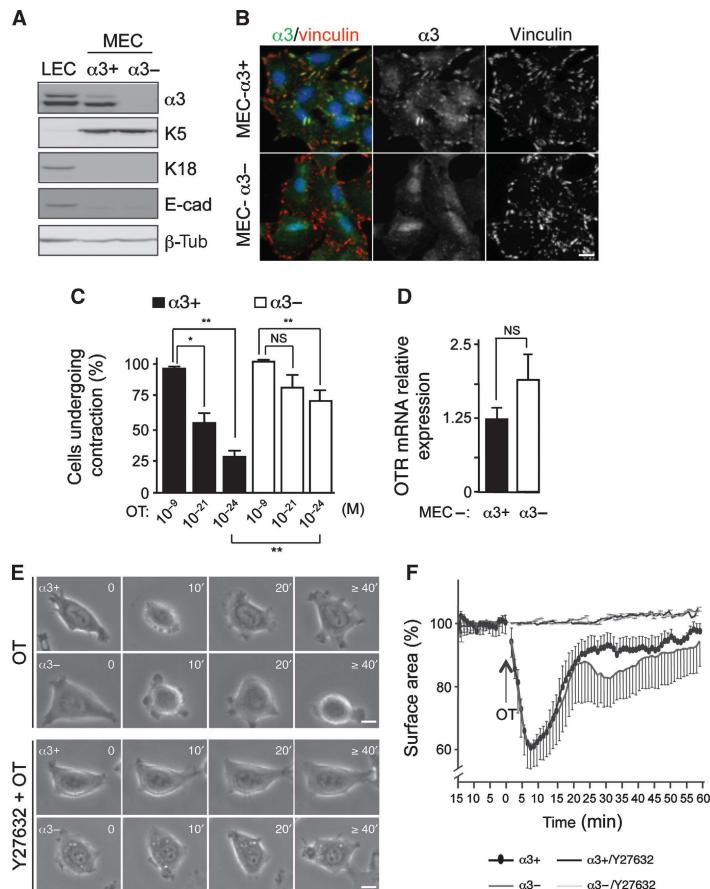
Treatment with  $10^{-9}$  M OT induced a contractile response in most MEC- $\alpha 3+$  and MEC- $\alpha 3-$ . This concentration was therefore chosen for further experiments. No significant difference was observed between MEC- $\alpha 3+$  and MEC- $\alpha 3-$  in terms of the time course and intensity of the primary contractile response, and a minimal surface area of  $54.8 \pm 1.6$  and  $51.9 \pm 1.4$  % of the initial area, for MEC- $\alpha 3+$  and MEC- $\alpha 3-$ , respectively, was reached about 6 min after stimulation (Figure 4E and F; Supplementary Table I). Following contraction, MEC- $\alpha 3+$  and MEC- $\alpha 3-$  gradually recovered their initial surface area, with mean relaxation times of  $20.2 \pm 1.1$  and  $20.4 \pm 0.9$  min, respectively. After relaxation, the surface area of most MEC- $\alpha 3+$  remained constant, whereas about half the MEC- $\alpha 3-$  failed to maintain the state of post-contraction relaxation and underwent additional contractions (Figure 4E and F; Supplementary Table I; Supplementary Movies 1 and 2). These data are in keeping with the observation that high levels of MLC phosphorylation were maintained in lactating K5Cre;itga3<sup>F/F</sup> mouse mammary gland. Thus,  $\alpha 3\beta 1$  integrin-mediated signalling is required for the accomplishment of the contraction cycle, i.e., MLC dephosphorylation and relaxation.

To study whether the regulation of the cell contractile function by  $\alpha 3\beta 1$  integrin involves its engagement at the cell surface, we pre-incubated MEC- $\alpha 3+$  cells with a function-blocking anti- $\beta 1$  integrin antibody before OT treatment. The anti- $\beta 1$  integrin antibody induced additional contractions in MEC- $\alpha 3+$  cells, phenocopying  $\alpha 3$ -deficient cells, and confirming that integrin interaction with its ECM ligands is essential for the control of the contraction/relaxation cycle in the myoepithelial cells (Supplementary Figure S4C; Supplementary Table 1).

#### **$\alpha 3\beta 1$ -mediated stimulation of the FAK/Rac/PAK pathway is required for the inhibition of MLCK and the accomplishment of the myoepithelial cell contraction/relaxation cycle**

Focal adhesion kinase (FAK) controls Rho-family GTPase activation following integrin engagement (reviewed in Vincente-Manzanares *et al* (2009) and Huveneers and Danen (2009)). We therefore analysed FAK phosphorylation levels in the immunoprecipitates obtained from 1 day-lactating mouse mammary gland protein extracts, with anti-FAK antibodies. The levels of total FAK phosphorylation (as estimated with an anti-PY antibody) and FAK autophosphorylation at tyrosine 397 (Y397) were considerably lower in mutant glands than in control tissue (Figure 5A), suggesting an impaired Rho-family GTPase activation.

Previous studies in keratinocytes have shown that  $\alpha 3\beta 1$ -mediated signalling may lead to Rac activation (Choma *et al*, 2004, 2007; Hamelers *et al*, 2005). In the extracts obtained from 1 day-lactating K5Cre;itga3<sup>F/F</sup> mouse mammary glands, the level of active Rac was found to be significantly lower than in control tissue, whereas the level of Rho activation was higher in mutant gland extracts than in control (Figure 5B). In untreated and OT-treated MEC- $\alpha 3-$ , Rac activation levels were found to be significantly decreased as compared with MEC- $\alpha 3+$  (Figure 5C). As expected, OT stimulation did not affect Rac activation but resulted in significant increase of

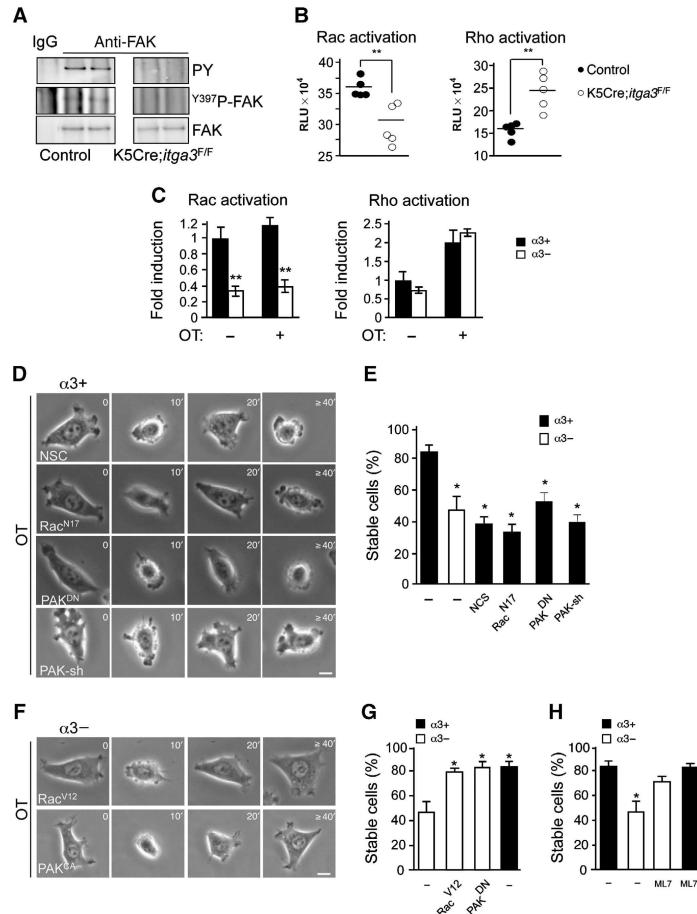


**Figure 4** Mammary myoepithelial cells depleted of  $\alpha 3\beta 1$  integrin are unable to complete contraction/relaxation cycle. (A) Immunoblotting analysis of protein extracts from MEC- $\alpha 3+$ , MEC- $\alpha 3-$  and from a cell line with luminal characteristics (LEC) with anti- $\alpha 3$  integrin ( $\alpha 3$ ), anti-K5, anti-K18, anti-E-cadherin (E-cad) antibodies.  $\beta$ -Tubulin ( $\beta$ -tub) was used as a loading control. (B) Double immunofluorescence labelling of MEC- $\alpha 3+$  or MEC- $\alpha 3-$  with anti- $\alpha 3$  and anti-vinculin antibodies. (C) Diagram showing the percentage of MEC- $\alpha 3+$  or MEC- $\alpha 3-$  undergoing contraction in response to decreasing doses of OT. The levels shown represent mean  $\pm$  s.e.m. obtained in four independent experiments. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; NS, not statistically significant. (D) Relative expression levels of OT receptor (OTR) in MEC- $\alpha 3+$  and MEC- $\alpha 3-$ . Quantitative RT-PCR analysis. The levels represent mean  $\pm$  s.e.m. for three independent samples of MEC- $\alpha 3+$  and MEC- $\alpha 3-$ . NS, not statistically significant. (E) Microphotographs of MEC treated with OT taken at different time points after treatment, as indicated in the top right corner.  $\geq 40'$  marks micrographs taken between 40 and 45 min after OT addition. When indicated, cells were treated with Y27632, before OT. (F) Cell surface area changes following OT treatment as calculated from the experiments illustrated in (E). The levels shown represent mean  $\pm$  s.e.m. obtained in four independent experiments. Bars in (B) and (E), 10  $\mu$ m.

active Rho levels in control MEC- $\alpha 3+$  and MEC- $\alpha 3-$ . However, prior, as well as after OT treatment, active Rho levels in MEC- $\alpha 3-$  were similar to those of MEC- $\alpha 3+$  (Figure 5C). Western blot analyses of extracts prepared from 1 day-lactating mouse mammary glands and cultured MECs did not reveal any  $\alpha 3\beta 1$ -dependent significant differences in Rac and Rho protein levels (Supplementary Figure S5A and B; data not shown). Altogether, these data indicate that the Rho/Rac activity balance is altered in  $\alpha 3\beta 1$  integrin-deficient mammary myoepithelial cells.

Next, we investigated the effect of Rac inhibition on the contractile response of MEC to OT. The treatment of control MEC- $\alpha 3+$  with Rac inhibitor NSC23766 before OT

stimulation induced additional contractions after the primary contractile response (Figure 5D and E; Supplementary Table I; Supplementary Movie 4). Similarly, the expression of dominant-negative Rac ( $Rac^{N17}$ ) in MEC- $\alpha 3+$  led to additional contractions (Figure 5D and E; Supplementary Figure S5C; Supplementary Table I; Supplementary Movie 5). The p21-activated kinase (PAK) is a downstream effector of Rac signalling (Bagrodia and Cerione, 1999). Expression of dominant-negative PAK ( $PAK^{DN}$ ) or its silencing with shRNA ( $PAK-sh$ ) leading to approximately two-fold decrease of initial PAK protein levels, induced additional contractions in control MEC- $\alpha 3+$  cells (Figure 5D and E; Supplementary Figure S5D and E; Supplementary Table I; Supplementary



**Figure 5** Analysis of the intracellular signalling pathways affected by deletion of  $\alpha 3\beta 1$  integrin from mammary myoepithelial cells. (A) Immunoblotting analysis of FAK phosphorylation (PY, pan-tyrosine;  $Y^{397}P$ -FAK, tyrosine 397) levels in the immunoprecipitates obtained with anti-FAK antibodies or with non-relevant IgG using protein extracts from 1 day-lactating control and mutant mouse mammary glands. (B) Quantitative analysis of Rac and Rho activation in protein extracts from 1 day-lactating mammary glands prepared from five control and five mutant mice. The horizontal bars indicate the medians; \*\*P < 0.01. (C) Quantitative analysis of Rac and Rho activation levels in protein extracts from MEC- $\alpha 3+$  and MEC- $\alpha 3-$ . When mentioned, cells were treated with OT. (D) Microphotographs of MEC- $\alpha 3+$  treated with OT taken at different time points after treatment. NCS, MEC- $\alpha 3+$  pre-treated with Rac inhibitor (NCS23766); Rac<sup>N17</sup>, MEC- $\alpha 3+$  stably transfected with a plasmid coding for a dominant-negative Rac mutant; PAK<sup>DN</sup>, MEC- $\alpha 3+$  stably transfected with a plasmid coding for a dominant-negative PAK mutant; PAK-sh, MEC- $\alpha 3+$  stably transfected with a plasmid coding for PAK shRNA. (E) Diagram showing the percentage of MEC- $\alpha 3+$ , MEC- $\alpha 3-$ , MEC- $\alpha 3+$  treated with NCS, MEC- $\alpha 3+$  expressing Rac<sup>N17</sup>, PAK<sup>DN</sup> or PAK shRNA able to maintain their shape after a single OT-induced contraction/relaxation cycle. (F) Upper panels show MEC- $\alpha 3+$  transduced with constitutively active Rac (Rac<sup>V12</sup>). Lower panels represent MEC- $\alpha 3-$  stably transfected with a plasmid coding for a catalytically active PAK mutant (PAK<sup>CA</sup>). (G) Diagram showing the percentage of MEC- $\alpha 3+$ , MEC- $\alpha 3-$  and MEC- $\alpha 3-$  expressing Rac<sup>V12</sup> or PAK<sup>CA</sup> able to maintain their shape after a single OT-induced contraction/relaxation cycle. (H) Diagram showing the percentage of MEC- $\alpha 3+$ , MEC- $\alpha 3-$  and MEC- $\alpha 3+$  and MEC- $\alpha 3-$  pre-treated with MLCK inhibitor (ML7), able to maintain their shape after a single OT-induced contraction/relaxation cycle. The levels shown in (C), (E), (G) and (H) represent the mean  $\pm$  s.e.m. obtained from four independent experiments. \*P < 0.05; \*\*P < 0.01. Bars in (D) and (F), 10  $\mu$ m.

Movie 6). Thus, inhibition of the Rac/PAK pathway phenocopied the lack of  $\alpha 3\beta 1$  integrin in MEC. The pre-treatment of MEC- $\alpha 3-$  with Rac inhibitor had only a minor effect on the response to OT, suggesting that Rac activity might already be inhibited in the absence of  $\alpha 3\beta 1$  (Supplementary Figure S5F). We then obtained MEC- $\alpha 3-$  expressing a constitutively active form of Rac, Rac<sup>V12</sup>, or a catalytically active form of PAK,

PAK<sup>CA</sup> (Supplementary Figure S5G and H). Expression of Rac<sup>V12</sup> or PAK<sup>CA</sup> in MEC- $\alpha 3-$  prevented additional contractions, with about 80% of the cells remaining stable after the primary contractile response (Figure 5F and G; Supplementary Table I; Supplementary Movies 7 and 8). Thus, activation of the Rac/PAK signalling pathway rescued the abnormal phenotype caused by a lack of  $\alpha 3\beta 1$  integrin.

Several studies have demonstrated that PAK can affect myosin contractile function by phosphorylating and inhibiting MLCK (Sanders *et al*, 1999; Goeckeler *et al*, 2000; Murthy *et al*, 2003; Wirth *et al*, 2003). We, therefore, investigated whether reducing MLCK activity restored the relaxation capacity of MEC- $\alpha 3-$  cells. As expected, pre-treatment of MECs with 10  $\mu$ M of the MLCK inhibitor ML7, prevented the OT-induced contraction (data not shown). However, treatment with a low dose of ML7 (1  $\mu$ M) did not interfere with primary contractile response of MEC- $\alpha 3+$  and MEC- $\alpha 3-$  and had only minor effect on MEC- $\alpha 3+$  post-contraction relaxation (data not shown; Figure 5H; Supplementary Table I). Strikingly, treatment of MEC- $\alpha 3-$  with 1  $\mu$ M ML7 led to the restoration of their relaxation capacity, such that ~70% of the cells remained stable after the primary contraction (Figure 5H; Supplementary Table I; Supplementary Movie 9). These results suggest that  $\alpha 3\beta 1$  integrin-deficient cells display an increase in MLCK activity, leading to abnormally high MLC phosphorylation levels and impaired relaxation.

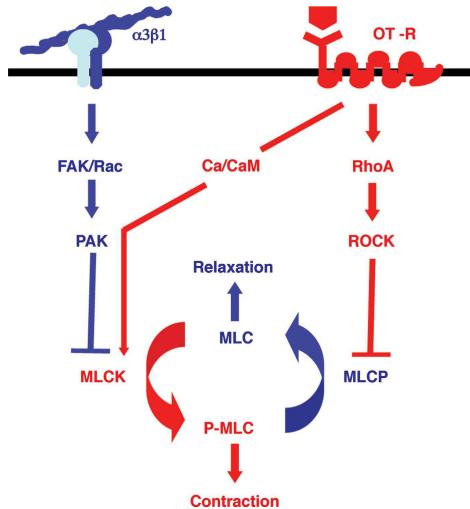
In concert, these data strongly indicate that, in the absence of  $\alpha 3\beta 1$  integrin, Rac activation is impaired, leading to the maintenance of MLC phosphorylation and impeding myoepithelial cell relaxation. This incomplete contraction/relaxation cycle should prevent subsequent full-strength contractions, accounting for the lower milk ejection rates observed in K5Cre;itga3<sup>F/F</sup> mice.

## Discussion

In this study, to analyse the functions of  $\alpha 3\beta 1$  integrin in mammary development and functional differentiation of mammary epithelial cells, we have deleted the *itga3* gene specifically from the mammary basal epithelial cell layer. In agreement with previous data, mammary ductal branching and lobulo-alveolar development were not perturbed in mutant mice (Klinowska *et al*, 2001). We also showed that, similarly to control cells, by the onset of lactation, mutant mammary myoepithelial cells attained a differentiated state and expressed SM-specific contractile proteins. As expected, the differentiation of luminal secretory cells was not affected in mutant epithelium, and expression levels of milk protein genes were similar to those of control animals. Nevertheless, the lack of  $\alpha 3\beta 1$  integrin led to a perturbation of intracellular signalling events essential for myoepithelial cell contractile activity resulting in lactation failure.

In mutant mammary tissue, FAK and Rac activation were impaired, whereas MLC phosphorylation levels were significantly higher than in control tissue. Consistent with these observations, cultured mammary myoepithelial cells depleted of  $\alpha 3\beta 1$  were unable to maintain the state of post-contraction relaxation. The abnormal phenotype of mutant cells was rescued by the expression of activated Rac or PAK or by inhibiting MLCK activity. These results strongly suggest that  $\alpha 3\beta 1$  integrin-mediated activation of the FAK/Rac/PAK signalling pathway is required for the inhibition of MLCK activity and the relaxation of mammary myoepithelial cells.

The scheme presented in Figure 6 summarizes the intracellular signalling events essential for mammary myoepithelial cell contractile activity and illustrates the contribution of  $\alpha 3\beta 1$  integrin to the control of this cellular function. Our results reveal that, in addition to the phospholipase



**Figure 6**  $\alpha 3\beta 1$ -mediated stimulation of the Rac/PAK pathway is required for completion of the myoepithelial cell contraction/relaxation cycle. The contraction and relaxation of myoepithelial cells require MLC phosphorylation and dephosphorylation, respectively. The binding of OT to its receptor leads to MLC phosphorylation and myoepithelial cell contraction via activation of the phospholipase C/ $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin (CaM)/MLCK pathway and the Rho/ROCK signalling pathways. MLCK directly phosphorylates MLC, whereas ROCK inhibits MLCP (Somlyo and Somlyo, 2003). The results of our study suggest that the engagement of  $\alpha 3\beta 1$  integrin leads to the activation of the FAK/Rac/PAK pathway and MLCK inhibition, thereby permitting dephosphorylation of MLC and relaxation. In  $\alpha 3\beta 1$  integrin-deficient cells, Rac activation is impaired resulting in altered MLCK/MLCP activity balance and sustained MLC phosphorylation, preventing the accomplishment of the contraction/relaxation cycle.

C/ $\text{Ca}^{2+}$ /MLCK signalling pathway (reviewed in Reversi *et al* (2006)), the RhoA/ROCK cascade has a major role in the control of OT-induced myoepithelial cell contraction. Most probably, upon OT ligation to its receptor, these two pathways operate in parallel, with MLCK directly phosphorylating MLC and ROCK inhibiting MLCP. The net outcome of MLCK and MLCP activities results in MLC phosphorylation and myoepithelial cell contraction. Further, the  $\alpha 3\beta 1$  integrin-mediated cell-ECM adhesion leads to the activation of the FAK/Rac/PAK signalling pathway, and activated PAK phosphorylates and inhibits MLCK, resulting in the desensitization of myosin to  $\text{Ca}^{2+}$  and in the myoepithelial cell relaxation necessary for the completion of the contraction/relaxation cycle and further contractions in response to pulsatile OT stimulation.

Previous studies have demonstrated that  $\alpha 3\beta 1$ -deficient keratinocytes fail to form stable leading lamellipodia, consistent with the impairment of Rac pathway activation (Choma *et al*, 2004). However, in this case, the abnormal phenotype is not rescued by the expression of constitutively active Rac, confirming that the physiological functions of individual integrin dimers are cell context dependent. Furthermore, in keratinocytes, the Rac guanine-exchange factor, Tiam1, has been shown to promote  $\alpha 3\beta 1$  integrin-mediated cell spreading on laminin (Hamelers *et al*, 2005).

The guanine-exchange factors acting downstream from  $\alpha 3\beta 1$  integrin in the control of Rac activation in myoepithelial cells remain to be determined.

Mammary myoepithelial cells express several different integrin dimers, but none seems to be able to substitute for  $\alpha 3\beta 1$  in activation of the Rac/PAK pathway. Flow cytometry analysis and adhesion assays showed no major change in the surface levels of other integrins or in the adhesion properties of  $\alpha 3\beta 1$ -deficient cells, strongly suggesting that the observed phenotype results from the lack of  $\alpha 3\beta 1$ , rather than from the upregulation of other integrin dimers.

Our findings are consistent with two recent studies reporting high rates of MLC phosphorylation and Rho activation in SM cells depleted of mediators of integrin signalling, such as  $\alpha$ -parvin or integrin-linked kinase (ILK) (Kogata *et al*, 2009; Montanez *et al*, 2009). These studies suggested that the interaction of the ILK/ $\alpha$ -parvin complex with  $\beta$  integrin cytoplasmic tail suppresses SM cell contractility, thereby serving as an important regulator of vascular morphogenesis (Wickström *et al*, 2010). Although deregulation of the Rho/Rac balance leading to cell hypercontractility seems to be a common feature between  $\alpha 3$ -deficient mammary myoepithelium and ILK or  $\alpha$ -parvin-depleted vascular SM,  $\alpha 3\beta 1$  integrin deletion from the myoepithelial cell layer did not have any visible impact on the formation of the bilayered mammary epithelium. It seems plausible that signalling pathways controlled by  $\alpha 3\beta 1$  integrin and ILK/ $\alpha$ -parvin complex do not overlap entirely. For instance, it has been suggested that ILK/ $\alpha$ -parvin complex could differentially regulate signalling downstream of  $\beta 3$  and  $\beta 1$  integrins (Wickström *et al*, 2010).

The reduced Rac activation in  $\alpha 3\beta 1$ -deficient mammary tissue extract prepared from 1 day-lactating gland was associated with an increase in Rho activation. However, our experiments with cultured myoepithelial cells revealed a role for the Rac signalling pathway, downstream from  $\alpha 3\beta 1$  integrin, in the regulation of post-contraction relaxation, and suggested that  $\alpha 3\beta 1$  integrin *per se* had little or no impact on the Rho pathway activation. We found that  $\alpha 3\beta 1$ -deficient cells responded to lower doses of OT than control cells. This phenomenon might result from higher levels of MLCK activity rather than increased levels of the Rho pathway activation in  $\alpha 3\beta 1$ -deficient cells. The Rho and Rac pathways are known to have antagonistic roles in the regulation of various cellular functions, making important fine tuning of the Rho/Rac balance (Sander *et al*, 1999). Elevated levels of active Rho observed in mutant gland extract may result from additional *in vivo* adaptation events associated with unaccomplished contraction/relaxation cycle.

Cell contraction results from the integration of force-generating processes driven by actomyosin, actin polymerization at the cell periphery and the binding of actin filaments to the ECM via integrins at focal adhesion sites. The molecular mechanisms underlying the mechanotransduction processes remain unclear, but it has been suggested that intracellular signalling events associated with focal adhesions regulate force transmission between cells and the ECM (Gunst and Zhang, 2008; Geiger *et al*, 2009; Vincente-Manzanares *et al*, 2009). Our study provides the first *in vivo* evidence that  $\alpha 3\beta 1$  integrin-mediated signalling may contribute to the control of the amplitude and duration of the force developed by the cellular contractile apparatus in response to OT. This critical role in the regulation of

OT-mediated contractility appears to be unique to  $\alpha 3\beta 1$  integrin and involves Rac-mediated signalling events.

## Materials and methods

### Mouse strains

All animal experiments were conducted in accordance with the French veterinary guidelines and Council of Europe guidelines for experimental animal use (L358-86/609EEC). The K5Cre mice were kindly provided by Dr J Jorcano (Ramirez *et al*, 2004). The generation of mice carrying conditional  $\alpha 3$  integrin alleles ( $itga3^{F/F}$ ) has been described elsewhere (Margadant *et al*, 2009). Wild-type,  $itga3^{F/+}$ ,  $itga3^{F/F}$  mice were used as control. Only females with litters of six to eight pups were selected for the analysis of mammary phenotype at lactation.

### BrdU-incorporation test, tissue preparation, whole-mount staining, histology and immunostaining

Mice were injected intraperitoneally with bromodeoxyuridine (BrdU), 0.25 mg/g of body weight, 2.5 h before tissue collection. Dissected mammary glands were either embedded into cryoprotectant (Tissue-Tek® O.C.T) and processed for cryosections (7  $\mu$ m) and immunostained as previously described (Raymond *et al*, 2005) or spread onto a glass slide, fixed in Methacarn and, either stained with Carmine alum in whole-mount, or embedded in paraffin. Sections (5–7  $\mu$ m thick) were used for haematoxylin/eosin or immunofluorescence staining (Teuliére *et al*, 2005). Cells grown on glass coverslips were processed for immunostaining as previously described (Raymond *et al*, 2005). Cell nuclei were stained with DAPI. The list of primary antibodies used for immunostaining is provided in the Supplementary data. All secondary antibodies and phalloidin were Alexaflour conjugated (Molecular Probes). The microphotographs shown in Figure 2D were acquired with Leica SP5 confocal microscope. Leica DM600B microscope was used for other immunofluorescence images.

### Evaluation of the OT effects on alveolar myoepithelial cell shape

Mammary glands were processed as described elsewhere (Moore *et al*, 1987). Briefly, glands were chopped finely with a scalpel in a buffer containing 136 mM NaCl, 1.2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 5 mM KCl, 1.7 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.1 mM glucose, 0.03 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 10 mM Hepes, pH 7.2 and, when indicated 10  $\mu$ M Y27632 (Calbiochem) for 10 min and then treated with 50 nM oxytocin (Tebu-bio) for 2 min at 37°C. Tissue fragments of ~1 mm<sup>3</sup> in size were subsequently fixed for 30 min in 4% paraformaldehyde, then for 5 min in 100% acetone at -20°C, rehydrated in PBS containing 1% BSA and incubated with the anti-keratin 5 antibody, phalloidin and DAPI. After incubation with the secondary antibody and washing, tissue fragments were mounted in Thermo Scientific Shandon Immu-Mount medium for observation under a Leica DM600B microscope.

### Quantitative RT-PCR

RNA was isolated from the third mammary glands of 1 day-lactating females with the RNeasy kit (Qiagen GmbH). Reverse transcription and quantitative PCR were performed as previously described (Taddei *et al*, 2008). The sequences of the primers used are provided in the Supplementary data and in Taddei *et al* (2008). The values were normalized to glyceraldehyde phosphate dehydrogenase expression levels using the comparative CT method.

### Protein extracts, immunoprecipitation and immunoblotting

Proteins extracts were prepared from the fifth mammary glands of 1 day-lactating females. Tissue (125 mg/ml) was homogenized in lysis buffer (50 mM, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 4 mM EDTA, 20 mM NaF, 2 mM sodium orthovanadate) containing a cocktail of protease inhibitors (Sigma-Aldrich). The extracts were cleared by centrifugation at 10 000 g at 4°C for 15 min. For immunoprecipitation assays, 1 mg of protein extracts was pre-absorbed with gammaBind Plus Sepharose beads (GE Healthcare) for 1 h at 4°C on a vertical rotator, incubated for 1 h with 4  $\mu$ g of primary antibody and for 2 h with gammaBind Plus Sepharose beads. The beads were then washed four times with lysis buffer, resuspended in reducing sample buffer for electrophoresis and

boiled for 5 min. The supernatants were run on a NuPAGE<sup>®</sup> Novex<sup>®</sup> 4–12% Bis Tris gel (Invitrogen). After electrophoresis, proteins were transferred onto nitrocellulose. Membranes were successively incubated with 5% BSA in TBST (10 mM Tris, pH 8, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20) for 1 h at room temperature to block non-specific binding sites and with primary antibodies in TBST, overnight at 4°C. Secondary antibodies coupled to horseradish peroxidase were purchased from Amersham. Detection was performed by chemiluminescence (Super Signal<sup>®</sup> west Pico chemiluminescent substrate, Pierce) using a Fuji Imager LAS3000. The list of the antibodies used for immunoprecipitation and immunoblotting is provided in the Supplementary data. Protein extracts from four control and mutant glands were analysed. Protein extracts from MEC were prepared as previously described (Raymond et al., 2005) and immunoblotting was performed as described above.

#### Establishment of MEC line, viral transduction, stable transfection and flow cytometry

The established MEC of *itga3<sup>F/F</sup>* genotype was routinely maintained in low serum medium consisting of DMEM:F12 (Gibco-BRL) buffered with 15 mM Hepes, pH 7.6 (Sigma-Aldrich) containing 10 µg/ml insulin (Sigma-Aldrich), 5 ng/ml epidermal growth factor (Sigma-Aldrich), 0.5 mg/ml bovine serum albumin (Sigma-Aldrich), 5 µg/ml linoleic acid complex (Sigma-Aldrich), 2% calf serum (HyClone), 50 µg/ml gentamycin (Sigma-Aldrich) and 20 U/ml nystatin (Sigma-Aldrich). The line was established as previously described (Medina and Kitterl, 2000). In brief, primary mammary epithelial cells obtained by collagenase/hyaluronidase digestion of inguinal glands from 16 day-pregnant *itga3<sup>F/F</sup>* females were seeded into matrigel in low serum medium defined above. After 4 weeks of growth, the cells were recovered from matrigel using dispase, plated on collagen-coated plastic and maintained in culture. After ~2 months, when most cells became senescent, and only few clones were capable of expanding, the proliferating cell clones were harvested and amplified. The cell clone stably expressing myoepithelial cell markers and negative for mammary luminal markers was chosen for further studies (Supplementary Figure S3). Cre-mediated deletion of *itga3<sup>F/F</sup>* alleles was performed as described previously (Raymond et al., 2005). Retroviral transduction was performed as described elsewhere (Sterk et al., 2000), and infected cells were subsequently maintained under G418 selection (500 µg/ml; #ant-gn-5, Invivogen). The retroviral construct myc-Rac<sup>V12</sup> cloned in pLZRS-MS-IRES-Neo/pBR was kindly provided by Dr JG Collard. Stable transfections were performed with Lipofectamin<sup>TM</sup> 2000 (#11 668, Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The pCAG-Myc-PAK-CAAX-IRES-GFP, pCAG-Myc-PAK-R299-CAAX-IRES-GFP and pCDNA-GFP-Rac<sup>N17</sup> vectors provided by Dr M Nicolic (Jacobs et al., 2007) and Dr A Gautreau, respectively, were co-transfected with pGK puro plasmid. Transfected cells were selected using puromycin (10 µg/ml, #ant-pr-5, Invivogen), and the bulk population of cells was analysed in all cases. The αPAK shRNA and control shRNA plasmids were from Santa Cruz Biotechnology (036SC-270016-SH and sc-108060). Transfections were performed according to the manufacturer's instructions. Flow cytometry and cell sorting were performed, respectively, on BD FACSCalibur and FACSvantage (Becton Dickinson) flow cytometers, as previously described (Margadant et al., 2009).

#### Time-lapse video microscopy

For video microscopy, sparse cell cultures were grown on glass-bottomed microwell dishes (MatTek Corporation) for 16–20 h.

## References

- Bagrodia S, Cerione RA (1999) PAK to the future. *Trends Cell Biol* 9: 350–355  
Choma DP, Pumiglia K, DiPersio CM (2004) Integrin α3β1 directs the stabilization of a polarized lamellipodium in epithelial cells through activation of Rac1. *J Cell Sci* 117: 3947–3959  
Choma DP, Vincenzo M, Pumiglia KM, DiPersio CM (2007) Integrin α3β1-dependent activation of FAK/Src regulates Rac1-mediated keratinocyte polarization on laminin-5. *J Inv Dermatol* 127: 31–40  
da Silva RG, Tavora B, Robinson SD, Reynolds LE, Szekeres C, Lamar J, Batista S, Kostourou V, Germain MA, Reynolds AR, Jones DT, Watson AR, Jones JL, Harris A, Hart IR, Iruela-Arispe ML, DiPersio CM, Kreidberg JA, Hodivala-Dilke KM (2010) Endothelial alpha3-beta1-integrin represses pathological angiogenesis and sustains endothelial-VEGF. *Am J Pathol* 177: 1534–1548  
Faraldo MM, Deugnier MA, Lukashev M, Thiery JP, Glukhova MA (1998) Perturbation of beta1-integrin function alters the development of murine mammary gland. *EMBO J* 17: 2139–2147

Time-lapse video microscopy (one image captured per min) was performed on Time Lapse Imaging System Biostation IM (Nikon Corporation) with an integrated incubation system (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). MLCK inhibitor (ML7) was used at concentrations of 1 µM and 10 µM, ROCK inhibitor (Y27632) at 10 µM; Rac1 inhibitor (NCS23766) at 100 µM; Myosin ATPase inhibitor (blebbistatin) at 25 µM (all from Calbiochem). OT (1 nM, or as indicated; Tebu-bio) was added 45–120 min after inhibitor and the response was followed during 60 min. Planar surface area was measured as readout for contractile responsiveness with Image J software. Initial surface area was defined as a mean value over 15 min. Spontaneous cell surface area fluctuation did not exceed 9.6%. A decrease in surface area was considered as contraction when the cell surface area was <72% of the initial area. Cells with a surface area of at least 86% of the initial surface area were considered as relaxed. Cells that were not spreading (showing refringent borders), abnormally large (usually polynucleated) or dividing, and cells that did not remain stable during the 15 min preceding the addition of OT were excluded from the analysis. The data obtained in four independent experiments are presented.

#### Rho-GTPases activation assay

Quantification of Rac and RhoA activation was performed using G-LISA Rac and RhoA Activation Assay Biochem Kits, following the manufacturer's instructions (Cytoskeleton, Inc.).

#### Statistical analysis

Statistical analysis was performed with Prism 4 software (GraphPad) using Mann-Whitney *U* test for the comparison of two groups except in Figure 2E where unpaired *t*-test was used. A value of \**P*<0.05, \*\**P*<0.01 or \*\*\**P*<0.001 denoted statistical significance.

#### Supplementary data

Supplementary data are available at *The EMBO Journal* Online (<http://www.embojournal.org>).

## Acknowledgements

We are particularly grateful to Dr J Jorcano for providing K5Cre transgenic mice and to Drs T Sasaki, M Nikolic, JG Collard and A Gautreau for reagents. We thank S Jannet and I Grandjean for excellent assistance with animal care, M Denoyelle and A Di Cicco for technical help. We thank the Nikon Imaging Centre at Institut Curie-CNRS for providing time-lapse video microscopy facilities. This work was supported by *La Ligue Nationale Contre le Cancer* (Equipe Labelisée 2009) and a grant from *Agence Nationale de la Recherche* ANR-08-BLAN-0078-01 to MAG. KR received funding from *La Fondation pour la Recherche Médicale* and *Institut National du Cancer*. SC was supported by a grant from *Cancéropôle Ile de France*. MAG is *Directeur de Recherche* at the *Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale* (INSERM).

**Author contributions:** KR designed most experiments; KR and SC performed experiments and analysed results; MK and AS generated mice carrying conditional alleles for *itga3* gene; MK made first observations concerning lactation failure of mutant mice; HJ performed electron microscopy experiments; KR, SC, AS and MAG interpreted and discussed the data; KR and MAG wrote the paper; MAG designed and supervised the study.

- Geiger B, Spatz JP, Bershadsky AD (2009) Environmental sensing through focal adhesions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**: 21–33
- Goekeler ZM, Masaracchia RA, Zeng Q, Chew TL, Gallagher P, Wysolmerski RB (2000) Phosphorylation of myosin light chain kinase by p21-activated kinase PAK2. *Biol Chem* **275**: 18366–18374
- Gunst SJ, Zhang W (2008) Actin cytoskeletal dynamics in smooth muscle: a new paradigm for the regulation of smooth muscle contraction. *Am J Physiol Cell Physiol* **293**: C576–C587
- Hamelers IH, Olivo C, Mertens AE, Pegtel DM, van der Kammen RA, Sonnenberg A, Collard JG (2005) The Rac activator Tiam1 is required for ( $\alpha$ 3) $\beta$ 1-mediated laminin-5 deposition, cell spreading, and cell migration. *J Cell Biol* **171**: 871–881
- Hartshorne DJ, Ito M, Ikebe M (1989) Myosin and contractile activity in smooth muscle. *Adv Exp Med Biol* **255**: 269–277
- Huveneers S, Danen EHJ (2009) Adhesion signaling—crosstalk between integrins, Src and Rho. *J Cell Sci* **122**: 1059–1069
- Hynes RO (2002) Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**: 673–687
- Ikebe M, Hartshorne DJ (1985) Phosphorylation of smooth muscle myosin at two distinct sites by myosin light chain kinase. *J Biol Chem* **260**: 10027–10031
- Jacobs T, Causeret F, Nishimura YV, Terao M, Norman A, Hoshino M, Nikolic M (2007) Localized activation of p21-activating kinase controls neuronal polarity and morphology. *J Neurosci* **27**: 8604–8615
- Klinowska TC, Alexander CM, Georges-Labouesse E, Van der Neut R, Kreidberg JA, Jones CJ, Sonnenberg A, Streuli CH (2001) Epithelial development and differentiation in the mammary gland is not dependent on alpha 3 or alpha 6 integrin subunits. *Dev Biol* **233**: 449–467
- Kogata N, Tribe RM, Fässler R, Way M, Adams RH (2009) Integrin-linked kinase controls vascular wall formation by negatively regulating Rho/ROCK-mediated vascular smooth muscle cell contraction. *Genes Dev* **23**: 2278–2283
- Kreidberg JA, Donovan MJ, Goldstein SL, Rennke H, Shepherd K, Jones RC, Jaenisch R (1996) Alpha 3 beta 1 integrin has a crucial role in kidney and lung organogenesis. *Development* **122**: 3537–3547
- Li N, Zhang Y, Naylor MJ, Schatzmann F, Maurer F, Wintermantel T, Schuetz G, Mueller U, Streuli CH, Hynes NE (2005) Beta1 integrins regulate mammary gland proliferation and maintain the integrity of mammary alveoli. *EMBO J* **24**: 1942–1953
- Li S, Chang S, Qi X, Richardson JA, Olson EN (2006) Requirement of a myocardin-related transcription factor for development of mammary myoepithelial cells. *Mol Cell Biol* **26**: 5797–5808
- Margadant C, Raymond K, Kreft M, Sachs N, Janssen H, Sonnenberg A (2009) Integrin  $\alpha$ 3 $\beta$ 1 inhibits directional migration and wound re-epithelialization in the skin. *J Cell Sci* **122**: 278–288
- Medina D, Kittrell F (2000) Establishment of mouse mammary cell lines. In *Methods in Mammary Gland Biology and Breast Cancer Research*, Ip, Asch (eds), Chapter 13, pp 137–145. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers
- Mitchell K, Szekeress C, Milano V, Svenson KB, Nilsen-Hamilton M, Kreidberg JA, DiPersio CM (2009) Alpha3beta1 integrin in epidermis promotes wound angiogenesis and keratinocyte-endothelial-cell crosstalk through the induction of MRP3. *J Cell Sci* **122**: 1778–1787
- Montanez E, Wickström SA, Altstätter J, Chu H, Fässler R (2009)  $\alpha$ -parvin controls vascular mural cell recruitment to vessel wall by regulating RhoA/ROCK signalling. *EMBO J* **28**: 3132–3144
- Moore DM, Vogl AW, Baimbridge K, Emerman JT (1987) Effect of calcium on oxytocin-induced contraction of mammary gland myoepithelium as visualized by NBD-phalloidin. *J Cell Sci* **88**: 563–569
- Murthy KS, Zhou H, Grider JR, Brautigan DL, Eto M, Makhlouf GM (2003) Differential signalling by muscarinic receptors in smooth muscle: m2-mediated inactivation of myosin light chain kinase via Gi3, Cdc42/Rac1 and p21-activated kinase 1 pathway, and m3-mediated MLC20 (20 kDa regulatory light chain of myosin II) phosphorylation via Rho-associated kinase/myosin phosphatase targeting subunit 1 and protein kinase C/CPI-17 pathway. *Biochem J* **374**: 145–155
- Quarrie LH, Addey CV, Wilde CJ (1996) Programmed cell death during mammary tissue involution induced by weaning, litter removal, and milk stasis. *J Cell Physiol* **168**: 559–569
- Ramirez A, Page A, Gandalillas A, Zanet J, Pibre S, Vidal M, Tusell L, Genesca A, Whitaker DA, Melton DW, Jorcano JL (2004) A keratin K5Cre transgenic line appropriate for tissue-specific or generalized Cre-mediated recombination. *Genesis* **39**: 52–57
- Raymond K, Kretf M, Jassen H, Calafat J, Sonnenberg A (2005) Keratinocytes display normal proliferation, survival and differentiation in conditional  $\beta$ 1 integrin knockout mice. *J Cell Sci* **118**: 1045–1060
- Reversi A, Cassoni P, Chini B (2006) Oxytocin receptor signalling in myoepithelial and cancer cells. *J Mam Gland Biol Neopl* **10**: 221–229
- Sander EE, ten Klooster JP, van Delft S, Van der Kammen RA, Collard JG (1999) Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior. *J Cell Biol* **147**: 1009–1022
- Sanders LC, Matsumura F, Bokoch GM, Lanerolle P (1999) Inhibition of myosin light chain kinase by p21-activated kinase. *Science* **283**: 2083–2085
- Somlyo AP, Somlyo AV (2003)  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev* **83**: 1325–1358
- Stanco A, Szekeress C, Patel N, Rao S, Campbell K, Kreidberg JA, Polleux F, Anton ES (2009) Netrin-1-alpha3beta1 integrin interaction regulate the migration of interneurons through the cortical marginal zone. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 7595–7600
- Sterk L, Geijten CA, Oomen LC, Calafat J, Janssen H, Sonnenberg A (2000) The tetraspan molecule CD151, a novel constituent of hemidesmosomes, associates with the integrin  $\alpha$ 6 $\beta$ 4 and may regulate the spatial organization of hemidesmosomes. *J Cell Biol* **149**: 969–982
- Sun Y, Boyd K, Xu W, Ma J, Jackson CW, Fu A, Shillingford JM, Robinson GW, Hennighausen L, Hitzler JK, Ma Z, Morris SW (2006) Acute myeloid leukemia-associated Mkl1 (Mrtf-a) is a key regulator of mammary gland function. *Mol Cell Biol* **26**: 5809–5826
- Taddei I, Deugnier MA, Faraldo MM, Petit V, Bouvard D, Medina D, Fässler R, Thiery JP, Glukhova MA (2008)  $\beta$ 1 integrin deletion from the basal compartment of the mammary epithelium affects stem cells. *Nat Cell Biol* **10**: 716–722
- Taddei I, Faraldo MM, Teulière J, Deugnier MA, Thiery JP, Glukhova MA (2003) Integrins in mammary gland development and differentiation of mammary epithelium. *J Mam Gland Biol Neopl* **8**: 383–394
- Teulière J, Faraldo MM, Deugnier MA, Shtutma M, Ben-Ze'ev A, Thiery JP, Glukhova MA (2005) Targeted activation of beta-catenin signaling in basal mammary epithelial cells affects mammary development and leads to hyperplasia. *Development* **132**: 267–277
- Vincente-Manzanares M, Choi CK, Hortwitz AR (2009) Integrins in cell migration—the actin connection. *J Cell Sci* **122**: 199–206
- Webb RC (2003) Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv Physiol Educ* **27**: 201–206
- Wickström SA, Lange A, Montanez E, Fässler R (2010) The ILK/PINCH/parvin complex: the kinase is dead, long live the pseudokinase!. *EMBO J* **29**: 281–291
- Wirth A, Schroeter M, Kock-Hauser C, Manser E, Chalovich JM, De Lanerolle P, Pfleider G (2003) Inhibition of contraction and myosin light chain phosphorylation in guinea-pig smooth muscle by p21-activated kinase 1. *J Physiol* **549**: 489–500

## **Supplementary Material**

### **Primers used for genomic PCR**

Cre-s ATTTGCCTGCATTACCGGTC

Cre-as ATCAACGTTTGTTCGGA

*itga3*-s (exon1/LoxP) GAACAAACATCTGCCTGGAGT

*itga3*-as (exon1) TAACTATTATCAGAGGGCCTCAG

*itga3*-as (LoxP) GTATGACTTCTGCCATGTAGC

### **Primers used for quantitative RT-PCR**

*acta2*-s GACCCAGATTATGTTGAGAC

*acta2*-as GTCCAGCACAAATACCAGTTG

*myh11*-s CATGGACCCGCTAAATGACA

*myh11*-as CAATGCGGTCCACATCCTTC

*cnn1*-s AGTACTGCCTGAACCCGGAGT

*cnn1*-as GTTGTGCGGGTGGTGATTG

*tpm1*-s AGCTCGACAAAGAGAACGCC

*tpm1*-as ATCTTCCAGCTGCTTGCTCC

GFP-s TCGTGACCACCTGACCTA

GFP-as GCCGTCGTCCCTTGAAGAAGA

**Primary antibodies used for immunolabeling:** rabbit polyclonal against  $\alpha$ 3A integrin (#141742; Sachs *et al*, 2006), keratin 5 (#AF138 ; Covance), laminin 332 (#1097+E from T. Sasaki, Max-Planck Institute, Munich, Germany), MLC-2 (#3672, Cell Signaling), Phospho-(ser19)MLC-2 (#M6068; Sigma-Aldrich), rabbit monoclonal against Ki67 (clone SP6, Neo Markers); rat monoclonal against  $\beta$ 1 integrin (clone MB1.2, Chemicon),  $\beta$ 4 integrin (clone 34611A, PharMingen), E-cadherin (DECMA-1, Abcam); mouse monoclonal against P-

cadherin (clone PCD1, Takara), keratin 8 (clone Ks 8.7, Progen Biotechnik), BrdU (clone 3D4, BD Pharmingen), vinculin (clone VII9, Belkin *et al*, 1988),  $\alpha$ SMA (clone 1A4, Sigma-Aldrich).

**Primary antibody used for immunoprecipitation:** mouse monoclonal anti-FAK (clone 77, Transduction Laboratories).

**Primary antibodies used for immunoblotting:** rabbit polyclonal against keratin 5 (#AF 138 ; Covance), Phospho-(ser19)MLC-2 (#3671, Cell Signaling),  $^{397}\text{P}$ -FAK (#44624G, Invitrogen), FAK (sc-588, Santa Cruz Biotechnology), PY (clone 4G10, Millipore), PAK (sc-882, Santa Cruz Biotechnology); goat polyclonal against  $\alpha$ 3 integrin (#AF2787, R&D Systems); rat monoclonal against E-cadherin (DECMA-1, Abcam), mouse monoclonal against keratin 18 (clone Ks 18.04, Progen), MLC-2 (clone MY-21, Sigma-Aldrich),  $\beta$ -tubulin (clone 4G5, Sigma Aldrich), c-Myc (clone 9E10, Santa Cruz Biotechnology),  $\beta$ -actin (clone AC-74, Sigma Aldrich), Rac (clone 23A8, Upstate).

**Primary antibodies used for flow cytometry:** goat polyclonal against  $\alpha$ 3 integrin (#AF2787, R&D Systems); rat monoclonal against  $\alpha$ 4 integrin (clone R1-2, PharMingen),  $\alpha$ 5 integrin (clone MBA5, Fehlner-Gardiner *et al*, 1996),  $\alpha$ 6 integrin (GoH3, sc-19622),  $\beta$ 1 integrin (clone MB1.2, Chemicon),  $\beta$ 4 integrin (clone 34611A, PharMingen); hamster mAbs against the integrin subunits  $\alpha$ 1 (Ha31/8),  $\alpha$ 2 (HM $\alpha$ 2) and  $\alpha$ v (H9.2B8) from PharMingen.

### **Electron microscopy**

Pieces of tissue approximately 1 mm<sup>3</sup> in size dissected from one-day-lactating mammary glands were fixed in Karnovsky fixative, post-fixed in 1% osmiumtetroxide in 0.1M cacodylate buffer and processed through dehydration for embedding in a CM10 Electron Microscope (FEI, Eindhoven, NL).

### **Adhesion assays**

Subconfluent cells were trypsinized, washed twice with Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM, Invitrogen) containing 2% BSA, seeded in 96-well flat-bottom plates ( $10^5$  cells per well) previously coated with a matrix of laminin-332 deposited by RAC-11P cells as described (Delwel *et al*, 1993), with fibronectin (20 $\mu$ g/mL; Sigma), with collagen type I (20 $\mu$ g/mL; PureCol®, Nutacon) or with Matrigel (354234, BD Biosciences) for 16h at 4°C and blocked for 1h with RPMI medium (Invitrogen) containing 2 % BSA. After incubation for 30 min at 37 °C, the cells were washed three times with PBS, lysed in 0.5% Triton-X-100 and incubated with 50 $\mu$ L of p-nitrophenyl N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminide (Sigma) in 0.1 M Na-citrate buffer (pH 5) for 16h. The reaction was stopped by adding 75 $\mu$ L of 50mM glycine (pH 10.4), 5mM EDTA. Absorbance was measured at 405 nm on a microplate reader. To determine the percentage of adhesion, background values (binding to BSA) were subtracted, and the obtained values were normalized to the total cell number.

### **$\beta$ 1-integrin blocking experiments**

A suspension of  $4 \times 10^4$  cells was pre-incubated with a function-blocking anti- $\beta$ 1 integrin antibody (25 $\mu$ g/mL; clone HM $\beta$ 1-1, Biolegend) for 20 min and plated on the glass-bottomed microwell dishes. After 16-20 h, fresh medium containing 10  $\mu$ g/mL of anti- $\beta$ 1 antibody was added to the cells, and the response to OT was examined by time-lapse video microscopy.

### **Collagen gel contraction assay**

Collagen gel contraction assay was performed essentially as described elsewhere (Ngo *et al*, 2006). Briefly, 400  $\mu$ L of cell suspension ( $6 \times 10^5$  cell) were mixed with 200  $\mu$ L of collagen (2.9 mg/mL, Nutacon) neutralized with NaOH. A measure of 500  $\mu$ L of collagen-cell mixture was placed in a 24-well plate previously coated with BSA (1% in PBS) and incubated for 1h

under standard culture conditions. One mL of standard medium was then added on top of the polymerized collagen. The area of the collagen lattices was measured after 24h of culture.

### **Supplementary Figure Legends**

**Supplementary Figure 1.** Normal ductal morphogenesis in mammary epithelium presenting conditional deletion of *itga3* from basal epithelial cells.

(A) Whole-mount Carmine staining of mammary glands from five- and eight-week-old control and mutant virgin females. Insets show terminal end buds. (B) and (C) Double immunofluorescence labelling of sections through mammary glands from five- (B) or eight-week-old (C) virgin control and mutant females with antibodies against  $\alpha 3$  integrin and  $\alpha$ SMA. Arrows point to the mammary basal epithelial layer. Bar, 3 mm in (A), 100  $\mu$ m in (B) and 55  $\mu$ m in (C).

**Supplementary Figure 2.** Laminin deposition, electron microscopy and epithelial cell proliferation in one-day-lactating mammary gland.

(A) Immunofluorescence labelling with anti- $\beta 1$  integrin, anti- $\beta 4$  integrin and anti-laminin 332 (Ln332) antibodies. (B) Electron microscopy. Black and white arrows indicate the basement membrane and dense bodies, respectively. Squares indicate desmosomes, asterisks mark collagen fibers and arrowheads, hemidesmosomes (C) Double immunofluorescence labelling of control and mutant mouse mammary gland sections with antibodies against K5 and BrdU. (D) and (E) Quantitative analysis of proliferation levels in control and mutant epithelium. The diagrams show percentage of basal, (K5-positive or  $\alpha$ SMA-positive), cells labelled with anti-BrdU (D) or anti-Ki67 antibodies (E), respectively. Mean  $\pm$  SEM levels are presented. Four control and four mutant animals were analysed, in each case,  $10^4$  cells were counted. NS, not significant as determined by unpaired t-test. Bar, 100  $\mu$ m in (A),(C), 500 nm in (B).

**Supplementary Figure 3.** Characterisation of the mouse mammary epithelial cell line carrying conditional alleles for *itga3*.

(A) Microphotograph of MEC- $\alpha$ 3+. Phase-contrast. (B,C) Double immunofluorescence labelling of MEC- $\alpha$ 3+ with anti-K5 and anti-K8 antibodies (B); anti-K5, anti- $\alpha$ SMA, anti-P-cadherin (P-cad), or anti-E-cadherin (E-cad) antibodies (C). Arrows indicate rare ( $\approx 1\%$ ) basal K5-positive cells negative for  $\alpha$ SMA. (D) Flow cytometry analysis of the expression of various  $\alpha$  ( $\alpha$ v,  $\alpha$ 5,  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 3 and  $\alpha$ 6) and  $\beta$  ( $\beta$ 1,  $\beta$ 4) integrin subunit in MEC- $\alpha$ 3+ and MEC- $\alpha$ 3-. The primary antibodies were omitted for the negative control. (E) Assays of the adhesion of MEC- $\alpha$ 3+ and MEC- $\alpha$ 3- on Ln-332-enriched matrix, fibronectin, collagen 1 and matrigel. Data from three independent experiments are shown; the values represent mean  $\pm$  S.E.M. Bar, 100  $\mu$ m in (A), 60  $\mu$ m in (B) and 20  $\mu$ m in (C).

**Supplementary Figure 4.** Collagen gel contraction by MEC, effect of blebbistatin and anti- $\beta$ 1 integrin antibody on the contractile response of MEC to OT.

(A) Collagen gel contraction by MEC- $\alpha$ 3+ and MEC- $\alpha$ 3- The diagram represents the data obtained in five independent experiments. The levels represent mean  $\pm$  S.E.M. (B) Microphotographs of MEC- $\alpha$ 3+ treated with myosin ATPase inhibitor blebbistatin (bleb.) prior to addition of OT. (C) Diagram showing the percentage of MEC- $\alpha$ 3+ and MEC- $\alpha$ 3- able to maintain the state of post-contraction relaxation after a single OT-induced contraction/relaxation cycle. When indicated, anti- $\beta$ 1 integrin antibodies or non-relevant IgG were added to MEC- $\alpha$ 3+ prior to OT treatment. The levels shown represent the mean  $\pm$  S.E.M obtained in four independent experiments. \* P < 0.05; Bar, 10  $\mu$ m.

**Supplementary Figure 5.** Analysis of Rac and various Rac and PAK constructs expression in mammary tissue and MEC.

(A,B) Western blot analysis of Rac expression in the extracts from one-day-lactating control and mutant mammary glands (A) and MEC- $\alpha$ 3+ and MEC- $\alpha$ 3-.  $\beta$ -tubulin was used as loading

control. (C) Analysis of GFP expression levels in MEC- $\alpha$ 3+ stably transfected with GFP-Rac<sup>N17</sup>. Quantitative RT-PCR. (D,E) Immunoblotting analysis performed with protein extracts obtained from MEC- $\alpha$ 3+, MEC- $\alpha$ 3+ expressing PAK<sup>DN</sup> (D), control shRNA (Ctl-sh) or PAK shRNA (PAK-sh) (E) with anti-Myc-tag antibody (D) or PAK antibody (E).  $\beta$ -actin was used as a loading control. (F) Microphotographs of MEC- $\alpha$ 3- treated with Rac inhibitor NSC23766 (NCS) prior to addition of OT. (G,H) Immunoblotting analysis performed with protein extracts obtained from MEC- $\alpha$ 3- expressing Rac<sup>V12</sup> (G) or PAK<sup>CA</sup> (H) with anti-Myc-tag antibody.  $\beta$ -actin was used as a loading control. Bar, 10  $\mu$ m.

**Supplementary Table I. Myoepithelial cell contraction in response to OT.**

Parameters/	$\alpha 3+$	$\alpha 3-$	$\alpha 3+/$	$\alpha 3+/-$	$\alpha 3+/-$	$\alpha 3+/-$	$\alpha 3+/-$	$\alpha 3-/-$	$\alpha 3-/-$
Cells			$\beta 1$ IgG	NCS	$Rac^{N17}$	PAK-sh	$PAK^{DN}$	$Rac^{V12}$	$PAK^{CA}$
Initial area, pixels	2545 $\pm$ 83	2421 $\pm$ 88	2005 $\pm$ 59	2196 $\pm$ 144	2880 $\pm$ 86	2768 $\pm$ 94	2376 $\pm$ 81	2556 $\pm$ 78	2870 $\pm$ 88
Area fluctuation, %	6.9 $\pm$ 0.3	7.1 $\pm$ 0.3	6.9 $\pm$ 0.8	7.7 $\pm$ 0.7	7.1 $\pm$ 0.5	9.6 $\pm$ 0.8	6.4 $\pm$ 0.5	7.5 $\pm$ 0.5	7.4 $\pm$ 0.4
<b>First contraction</b>									
Time, min	6.4 $\pm$ 0.3 (n=60)	6.2 $\pm$ 0.2 (n=93)	8.9 $\pm$ 0.5 (n=75)	9.9 $\pm$ 0.7 (n=23)	9.8 $\pm$ 0.2 (n=48)	13.3 $\pm$ 1.5 (n=46)	10.1 $\pm$ 0.1 (n=89)	9.8 $\pm$ 0.4 (n=88)	6.7 $\pm$ 0.5 (n=69)
Minimal area, %	54.8 $\pm$ 1.6	51.9 $\pm$ 1.4	49.2 $\pm$ 1.4	66.6 $\pm$ 1.7	60.3 $\pm$ 1.3	60.5 $\pm$ 1.4	48.9 $\pm$ 0.1	51.6 $\pm$ 1.1	49.2 $\pm$ 1.3
Recovery time, min	20.2 $\pm$ 1.1	20.4 $\pm$ 0.9	24.1 $\pm$ 1.2	19.2 $\pm$ 2.2	20.3 $\pm$ 1.1	21.7 $\pm$ 1.4	28.1 $\pm$ 1.2	22.6 $\pm$ 1.0	24.2 $\pm$ 1.5
<b>Additional contractions</b>									
<b>First</b>									
Minimal area, %	63.0 $\pm$ 1.9 (n=11)	59.6 $\pm$ 1.5 (n=47)	52.8 $\pm$ 1.9 (n=42)	64.2 $\pm$ 2.0 (n=15)	65.1 $\pm$ 1.4 (n=30)	60.3 $\pm$ 1.7 (n=29)	58.5 $\pm$ 1.9 (n=42)	62.3 $\pm$ 1.2 (n=22)	60.1 $\pm$ 0.9 (n=10)
<b>Second</b>									
Minimal area, %	---	59.6 $\pm$ 4.0 (n=10)	50.8 $\pm$ 4.5 (n=15)	60.6 $\pm$ 4.5 (n=9)	64.0 $\pm$ 2.2 (n=9)	50.5 $\pm$ 4.2 (n=7)	55.5 $\pm$ 4.5 (n=2)	57.1 $\pm$ 0.7 (n=3)	---

The values represent the means  $\pm$  SEM; n represents cell number.

**Supplementary Table I. – continue –**

Parameters/	$\alpha 3+/-$	$\alpha 3-/-$
Cells	ML7	ML7
Initial area, pixels	2454 $\pm$ 111	2298 $\pm$ 69
Area fluctuation, %	8.5 $\pm$ 0.8	9.2 $\pm$ 0.8
<b>First contraction</b>		
Time, min	11.8 $\pm$ 0.6 (n=33)	11.3 $\pm$ 0.2 (n=71)
Minimal area, %	63.5 $\pm$ 1.0	58.9 $\pm$ 0.2
Recovery time, min	17.9 $\pm$ 0.3	20.3 $\pm$ 0.2
<b>Additional contractions</b>		
<b>First</b>		
Minimal area, %	67.6 $\pm$ 1.7 (n=5)	58.4 $\pm$ 1.8 (n=20)
<b>Second</b>		
Minimal area, %	---	59.3 $\pm$ 8.3 (n=2)

### **Supplementary Movie Legends**

In all cases, one image per minute was captured during 60 minutes after OT addition.

**Movies 1, 2.** Response of MEC- $\alpha$ 3+ (S1) and MEC- $\alpha$ 3- (S2) to OT

**Movie 3.** Response of MEC- $\alpha$ 3+ to OT after pre-treatment with ROCK inhibitor (Y27632) (S3).

**Movie 4.** Response of MEC- $\alpha$ 3+ to OT after pre-treatment with Rac inhibitor (NCS23766) (S4).

**Movies 5,6.** Response of MEC- $\alpha$ 3+ expressing Rac<sup>N17</sup> (S5) or PAK shRNA (S6) to OT.

**Movies 7, 8.** Response of MEC- $\alpha$ 3- expressing Rac<sup>V12</sup> (S7) or PAK<sup>CA</sup> (S8) to OT.

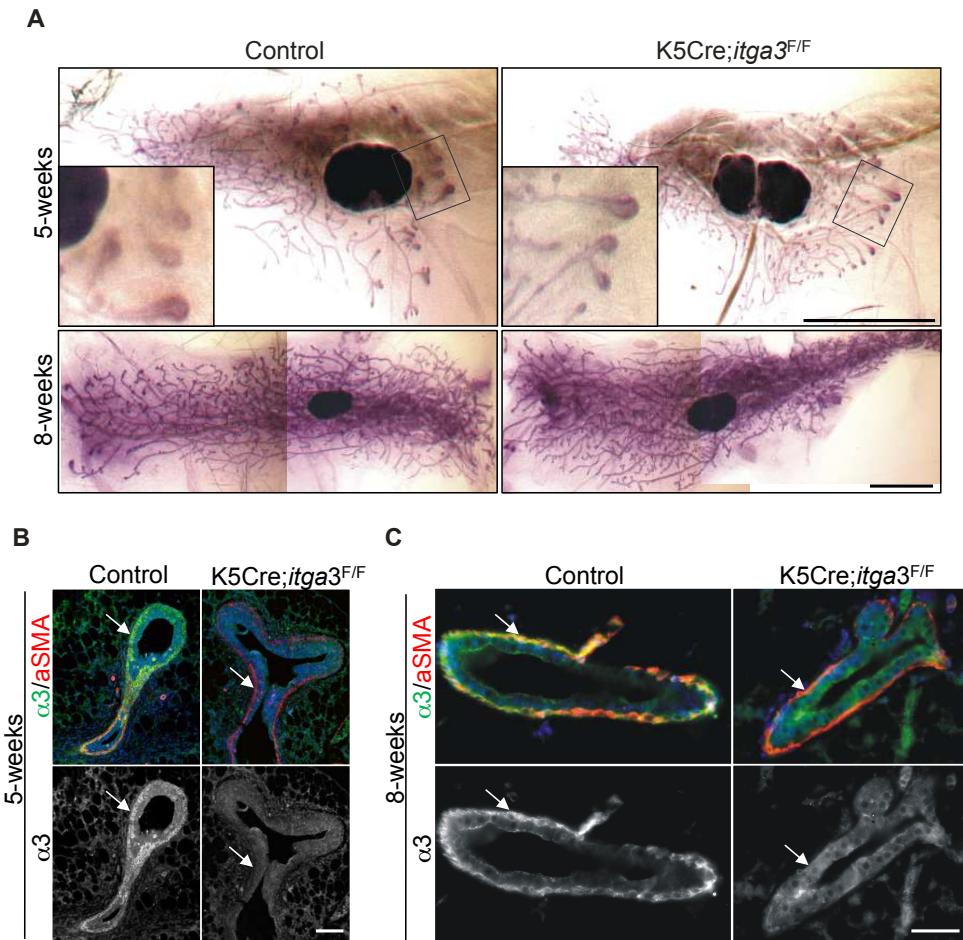
**Movie 9.** Response of MEC- $\alpha$ 3- to OT after pre-treatment with MLCK inhibitor (ML7) (S9).

### **Supplementary Reference**

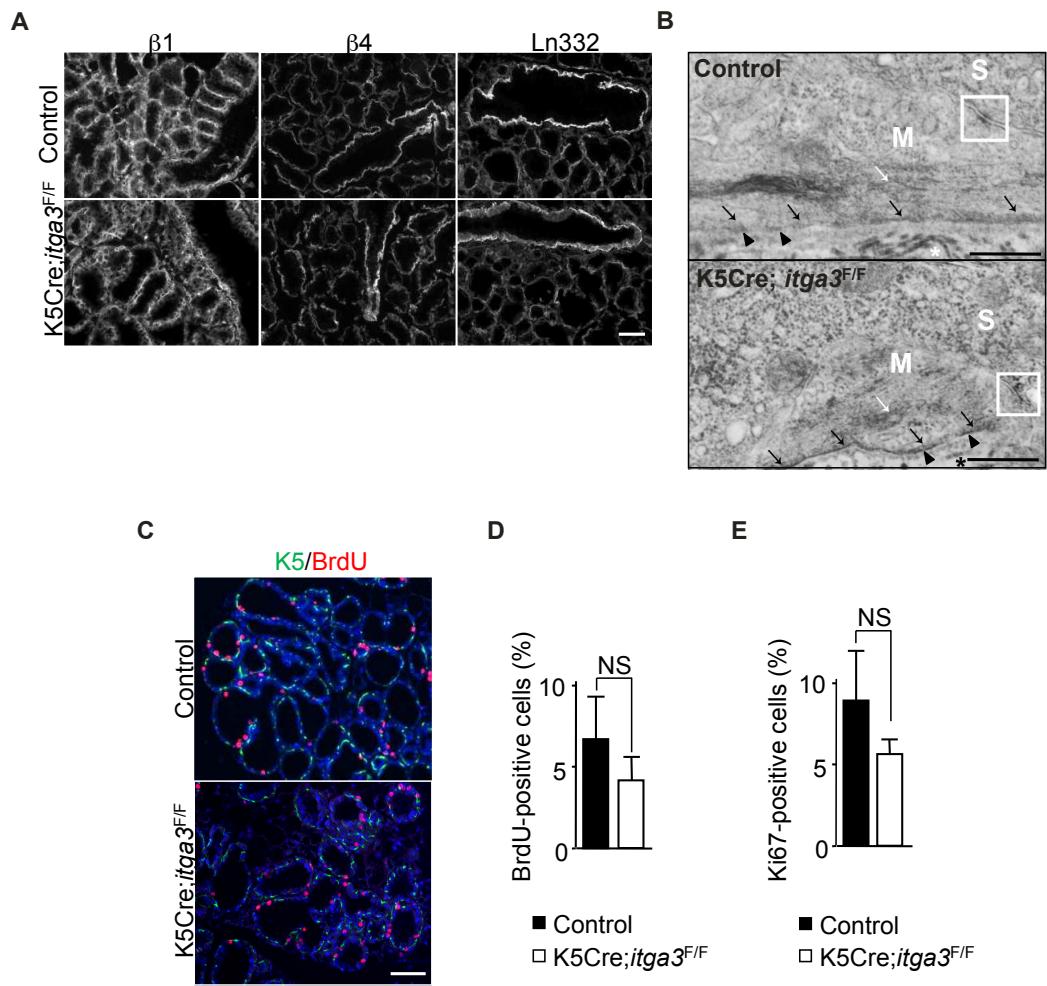
Ngo P, Ramalingam P, Phillips JA, Furuta GT (2006) Collagen gel contraction assay.

*Methods Mol Biol* 341: 103-109

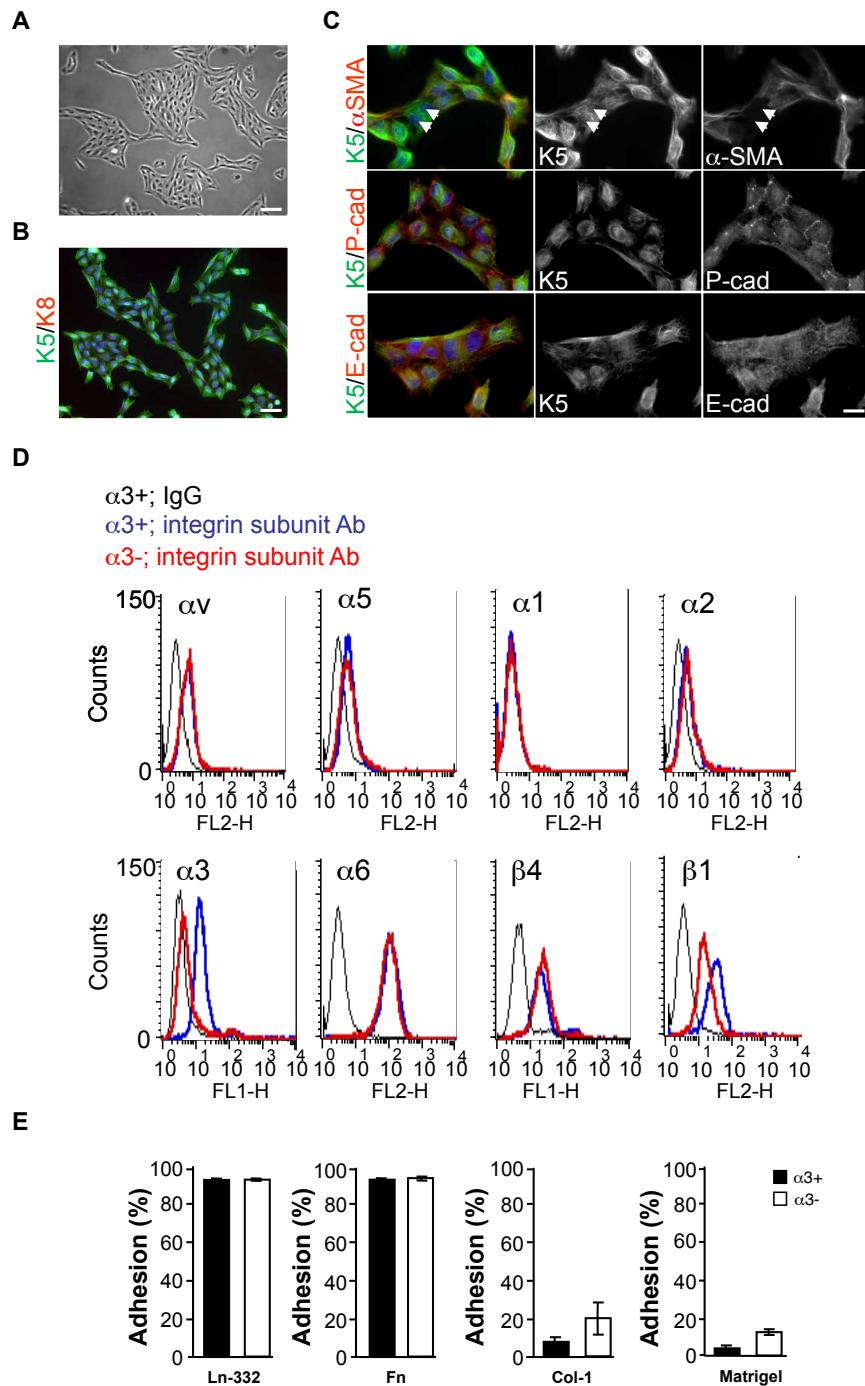
Raymond\_Supplementary Figure 1



Raymond\_Supplementary Figure 2

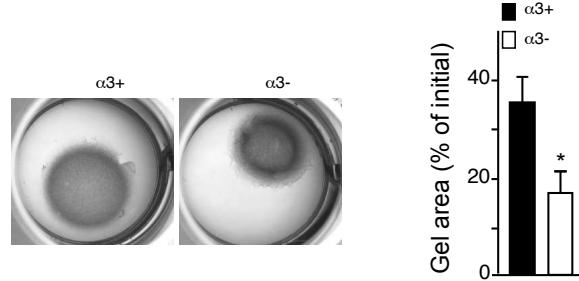


Raymond\_Supplementary Figure 3

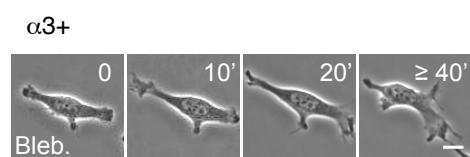


**Raymond\_Supplementary Figure 4**

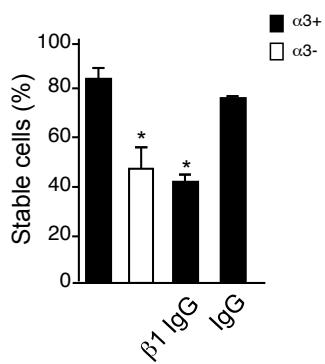
**A**



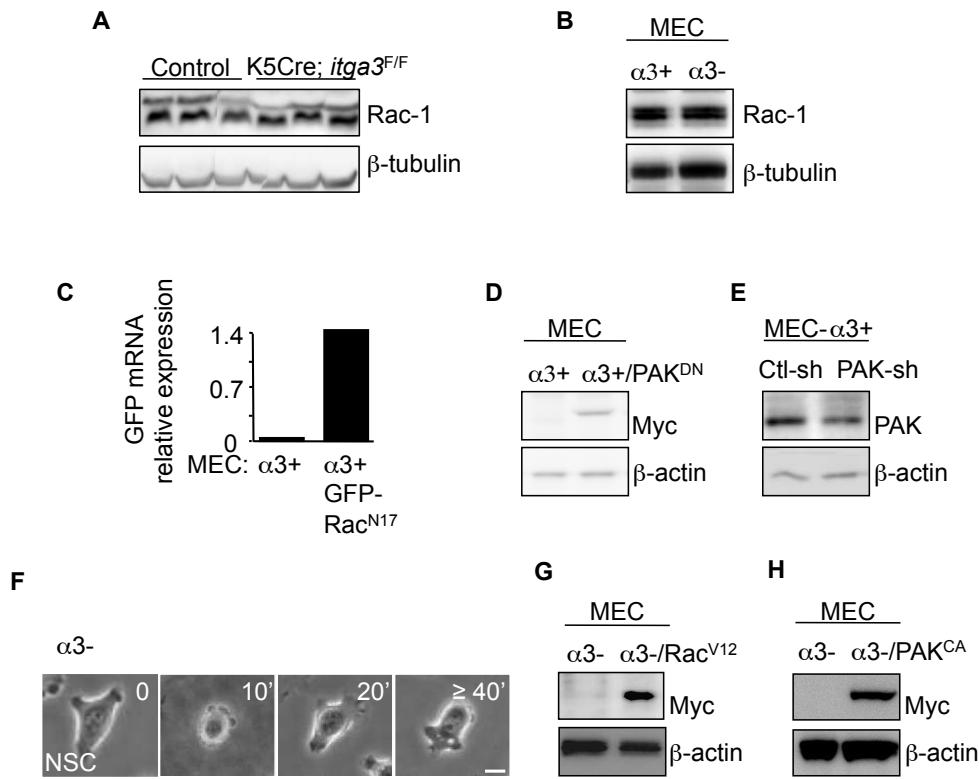
**B**



**C**



Raymond\_Supplementary Figure 5



## **II. LES EVENEMENTS DE SIGNALISATION REGULES PAR L'INTEGRINE $\alpha 3\beta 1$ SONT ESSENTIELS A LA TUMORIGENESE MAMMAIRE (2<sup>E</sup> ARTICLE – ONCOGENE)**

### **2.1. Contexte et justification de la recherche**

La tumorigenèse est souvent accompagnée par une altération de l'expression et/ou de l'activité des intégrines et des molécules de signalisation qui leurs sont associées, suggérant que les interactions cellule/MEC contribuent à la croissance et à la dissémination des cellules tumorales. Par exemple, des niveaux élevés d'intégrine  $\beta 1$  sont associés à un faible taux de survie des patients présentant un cancer du sein invasif, alors que l'expression de l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  est associée à la présence de métastases (Jonjic et al., 1993 ; Yao et al., 2007). Les études réalisées à l'aide de modèles murins de cancers du sein ont permis de mettre en évidence le rôle joué par les intégrines et par leurs effecteurs, tels que FAK, Src, ILK et p130Cas, dans l'initiation et le développement tumoral (Luo & Guan, 2010 ; Raymond et al., 2012 ; Lambert et al., 2012). Par exemple, la délétion des intégrines  $\beta 1$  induit une réduction de l'initiation tumorale dans le modèle de tumorigénèse mammaire MMTV-PyMT et une diminution des métastases dans le modèle murin de tumorigénèse dépendante de HER-2 (Lahou et al., 2011).

Afin de définir la contribution spécifique de l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  au développement tumoral mammaire, nous avons utilisé le modèle murin de carcinogenèse mammaire de type basal développé par le laboratoire. Ce modèle consiste en l'expression d'une forme active de la  $\beta$ -caténine dans la couche basale de l'épithélium mammaire (lignée de souris K5 $\Delta N\beta$ cat). Les souris K5 $\Delta N\beta$ cat développent des hyperplasies basales indifférenciées dans les stades précoces (K5-positives et  $\alpha$ -SMA-négatives) et des carcinomes invasifs de type basal dans les stades plus tardifs. Nous avons ainsi analysé l'effet de la perte d'expression de l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  du compartiment basal mammaire sur le développement tumoral, dans ce modèle de carcinogenèse mammaire. Le développement tumoral des souris K5 $\Delta N\beta$ cat a été comparé à celui des souris K5 $\Delta N\beta$ cat dépourvues d'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  dans la couche basale mammaire (souris K5 $\alpha 3$ KO ;  $\Delta N\beta$ cat).

## **2.2. Résumé des principaux résultats**

### 2.2.1. La perte d'expression de l'intégrine $\alpha 3\beta 1$ du compartiment basal mammaire empêche le développement tumoral dans le modèle murin de carcinogenèse mammaire de type basal

L'analyse des souris K5 $\alpha$ 3KO ;  $\Delta N\beta$ cat a révélé que l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  est essentielle à l'initiation et/ou à la croissance tumorale, dans le modèle murin de carcinogenèse de type basal. En effet, l'absence d'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  abolit la formation de tumeur dans ce modèle. Nos expériences de gènes rapporteurs réalisées à l'aide d'une lignée cellulaire exprimant ou non l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  (lignée MEC et  $\alpha 3KO$ -MEC) indiquent que l'activité transactivatrice de la  $\beta$ -caténine n'est pas significativement modifiée en absence d'intégrine  $\alpha 3\beta 1$ . Ainsi, les mécanismes moléculaires impliqués en aval de l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  ne mènent pas à l'inhibition de l'activité transactivatrice de la  $\beta$ -caténine.

### 2.2.2. Les événements de signalisation contrôlés par l'intégrine $\alpha 3\beta 1$ sont nécessaires au développement tumoral après injection orthotopique de cellules basales mammaires transformées et à la formation de colonies en « soft-agar »

La comparaison du développement tumoral des cellules MEC et  $\alpha 3KO$ -MEC après injection orthotopique indique que l'absence d'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  réduit fortement le potentiel tumorigénique des cellules MEC. De plus, l'absence d'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  affecte le développement de colonies en conditions semi-solides. Nos données indiquent que l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  favorise la survie et la prolifération des cellules tumorales mammaires.

### 2.2.3. La stimulation de la voie Rac1/PAK1 par l'intégrine $\alpha 3\beta 1$ permet le développement tumoral et la formation de colonies en « soft-agar »

Nous avons précédemment montré que la voie de signalisation FAK/Rac1/PAK1 en aval de l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  joue un rôle clef dans le contrôle de l'activité contractile des cellules basales myoépithéliales, au cours de la lactation (Raymond et al., 2011). L'activité de FAK est réduite de

moitié dans les extraits protéiques de glandes mammaires de souris lactantes K5 $\alpha$ 3KO ;  $\Delta N\beta$ cat comparé aux extraits de souris K5 $\Delta N\beta$ cat. De plus, nos données indiquent que l'activation de Rac1 ou de PAK1 restaure le développement tumoral dans des essais d'injection orthotopique ainsi que la croissance de colonies en « soft-agar ». Au contraire, l'inhibition de Rac1 ou de PAK1 dans les cellules MEC phénocopie la perte d'expression de  $\alpha 3\beta 1$ . Nos résultats indiquent que la voie de signalisation Rac1/PAK1 est nécessaire en aval de l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  pour permettre le développement tumoral.

#### 2.2.4. La perte d'expression de l'intégrine $\alpha 3\beta 1$ réduit l'activation des kinases FAK, MAPK et JNK, inhibant la prolifération et la survie des cellules épithéliales basales mammaires tumorales

Contrairement à ce que nous avons observé en milieu semi-solide, les cellules  $\alpha 3KO$ -MEC développent des colonies sphériques en culture en 3D Matrigel. Cependant, le nombre et la taille des colonies formées sont fortement réduits, comparé aux cellules MEC. Cette réduction est associée à une augmentation de la mort cellulaire et à une réduction du taux de prolifération cellulaire. L'inhibition de l'activité de Rac1 ou de PAK1 dans les cellules MEC phénocopie la perte d'expression de l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  alors que l'expression de formes actives de Rac1 ou de PAK1 dans les cellules  $\alpha 3KO$ -MEC restaure leur capacité à former des colonies en culture en 3D Matrigel. Ces expériences indiquent que l'activation de la voie de signalisation Rac1/PAK1, en aval de l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$ , est impliquée dans la formation de colonies en culture 3D Matrigel. De plus, nos expériences révèlent que l'activité des kinases FAK, MAPK et JNK est diminuée de manière significative en absence de  $\alpha 3\beta 1$ . Nos données suggèrent que l'engagement de l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  permet l'activation de signaux pro-prolifératifs et de survie, nécessaires à la tumorigenèse mammaire.

### **2.3. Conclusion de l'article**

Nos résultats révèlent un rôle clef joué par l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  dans le développement tumoral mammaire. L'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  active des voies de signalisation intracellulaires impliquant

les voies FAK/Rac1/PAK1, MAPK et JNK qui favorisent la survie et la prolifération des cellules tumorales.

**2e article :** *Signaling events mediated by  $\alpha 3\beta 1$  integrin are essential for mammary tumorigenesis*

- Oncogene, 2013.

ORIGINAL ARTICLE

# Signaling events mediated by $\alpha 3\beta 1$ integrin are essential for mammary tumorigenesis

S Cagnet<sup>1,2</sup>, MM Faraldo<sup>1,2</sup>, M Kreft<sup>3</sup>, A Sonnenberg<sup>3</sup>, K Raymond<sup>1,2,4</sup> and MA Glukhova<sup>1,2,4</sup>

The constitutive activation of  $\beta$ -catenin signaling in the mammary basal epithelial cell layer in transgenic K5AN $\beta$ cat mice leads to basal-type tumor development. Integrins of the  $\beta 1$  family and integrin-mediated signaling events have an important role in breast tumor growth and progression. We show here that the deletion of  $\alpha 3\beta 1$  integrin, a major laminin receptor, from the basal layer of the mammary epithelium of K5AN $\beta$ cat mice completely prevented the tumorigenesis induced by  $\beta$ -catenin signaling. Moreover, the depletion of  $\alpha 3\beta 1$  integrin from a spontaneously transformed mouse mammary basal epithelial cell line (MEC) prevented the cells from forming colonies in soft agar and greatly reduced tumor development in orthotopic grafts. Inhibition of the integrin signaling intermediates Rac1 or PAK1 (P21-activated Kinase 1) in MEC affected tumor cell growth in soft agar, whereas the expression of activated forms of these effectors in  $\alpha 3$ -depleted cells rescued the capacity of these cells to grow in non-adherent conditions. Similarly, the tumorigenic potential of  $\alpha 3$ -depleted cells was restored by the expression of activated PAK1, as assessed by orthotopic transplantation assay. In three-dimensional Matrigel culture, MEC survival and proliferation were affected by the depletion of  $\alpha 3\beta 1$  integrin, which also significantly decreased the activation of focal adhesion kinase (FAK), mitogen-activated protein kinase (MAPK) and c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase (JNK). Our data suggest that the activation of signaling cascades downstream from  $\alpha 3\beta 1$  and involving the Rac1/PAK1 pathway, MAPK and JNK, promotes prosurvival and proproliferative signals required for the malignant growth of basal mammary epithelial cells, providing further insight into the molecular mechanisms underlying breast cancer initiation and progression.

Oncogene advance online publication, 30 September 2013; doi:10.1038/onc.2013.391

**Keywords:** integrin signaling; basal-like breast cancer; mouse models of breast cancer; Wnt/ $\beta$ -catenin pathway; survival; proliferation

## INTRODUCTION

Breast cancers display high levels of cellular and molecular heterogeneity, which influences their responsiveness to treatment.<sup>1</sup> Breast tumors have been classified into four major molecular subtypes on the basis of their expression profiles, and each of these subtypes may be considered as a separate disease.<sup>2–5</sup> One of these subtypes, basal-like mammary carcinoma, accounts for about 15–20% of breast cancers and is characterized by a poor clinical outcome. Basal-like tumors neither express estrogen and progesterone receptors nor display HER2 overexpression. For this reason, they are often referred to as ‘triple-negative’ tumors. Basal-like tumors contain cells expressing mammary basal cell markers, such as basal keratins 5 (K5), 14 and 17, and HER1. They also frequently display inactivating p53 mutations and activation of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway.<sup>2–4,6,7</sup>

Integrins are  $\alpha\beta$  heterodimeric cell surface adhesion receptors that connect the extracellular matrix to the cytoskeleton, and the binding of extracellular matrix ligands to integrins leads to the activation of adhesion-dependent intracellular signaling pathways.<sup>8,9</sup> Integrin-mediated adhesion can trigger the activation of numerous signaling intermediates, such as focal adhesion kinase (FAK), Src, the Rho-family GTPases, integrin-linked kinase (ILK), phosphatidylinositol-3 kinase, c-Jun NH<sub>2</sub>-

terminal kinase (JNK) and mitogen-activated protein kinase (MAPK).<sup>9,10</sup> Moreover, integrins have been reported to be involved in various types of cross-talk with growth factor receptor-mediated signaling.<sup>11</sup>

Integrin and associated intracellular signaling effector expression levels and/or activity are often modified during tumor development, suggesting that the adhesion machinery has a role in malignant transformation and tumor progression.<sup>10,12–14</sup> Indeed, high levels of  $\beta 1$  integrins correlate with lower survival rates in patients with invasive breast cancer,<sup>15,16</sup> whereas  $\alpha 3\beta 1$  expression in breast carcinoma is associated with metastasis.<sup>17</sup> Moreover, human breast cancers frequently overexpress FAK,<sup>18</sup> and studies in mouse models of breast cancers have provided evidence for a direct role of integrins and associated effectors, such as FAK, Src, ILK and p130Cas, in tumor initiation and development.<sup>10,19,20</sup> For example, the deletion of  $\beta 1$  integrins leads to impaired tumor initiation in the MMTV (mouse mammary tumor virus)-PyMT mouse mammary tumor model and reduces metastasis of HER2-driven mouse mammary tumors.<sup>14</sup> Similarly, the deletion of FAK leads to impaired tumor initiation, maintenance and progression in MMTV-PyMT mice.<sup>14,19,21</sup> A recent study has implicated  $\beta 5$  integrin in the control of tumorigenic potential of human triple-negative breast cancer cell line.<sup>22</sup>

<sup>1</sup>Institut Curie, Centre de Recherche, Paris, France; <sup>2</sup>Section de Recherche, UMR144 Centre National de la Recherche Scientifique-Institut Curie, Paris, France and <sup>3</sup>Division of Cell Biology, The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, The Netherlands. Correspondence, Current address: Dr K Raymond, Saint Antoine Research Center, UPMC Université Paris 06, INSERM U938, Paris, France or Dr MA Glukhova, Section de Recherche, UMR144 CNRS-Institut Curie, 26 rue d'Ulm, 75005 Paris, France.  
E-mail: karine.raymond@inserm.fr or marina.glukhova@curie.fr

<sup>4</sup>These authors contributed equally to this work.  
Received 25 June 2013; accepted 26 July 2013

Integrin  $\alpha 3\beta 1$ , which binds essentially to laminins 332 and 511, is one of the principal integrins expressed by basal mammary epithelial cells.<sup>10,23</sup> We recently showed that integrin  $\alpha 3\beta 1$  has a major role in controlling the basal epithelial cell contractility required for milk expulsion during lactation, despite being dispensable for mammary gland morphogenesis and differentiation.<sup>24</sup> In addition, data obtained with cultured breast cancer cells suggest that integrin  $\alpha 3\beta 1$  may be involved in multiple aspects of tumorigenesis.<sup>25–27</sup>

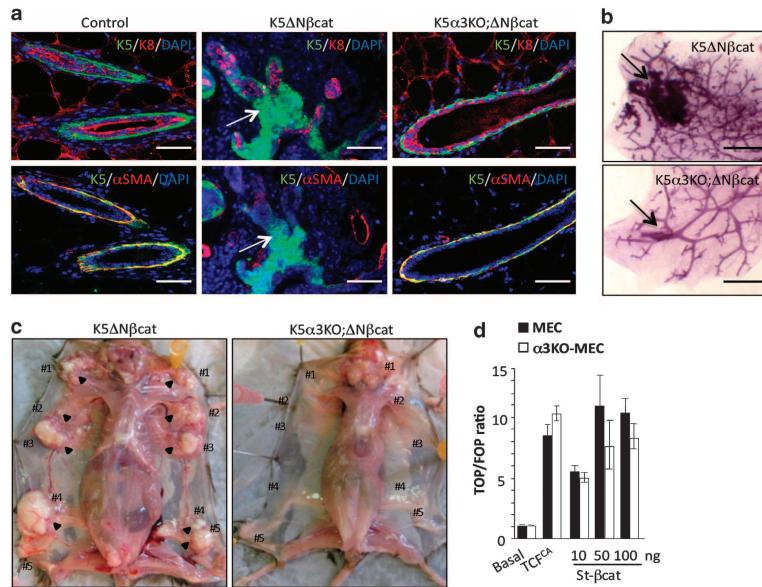
We investigated the role of  $\alpha 3\beta 1$  integrin in tumor development, by assessing the effect of *itga3* deletion from basal epithelial mammary cells on mammary tumorigenesis, in a mouse model of breast cancer developed in our laboratory: K5 $\Delta N\beta$ cat transgenic mice.<sup>28</sup> In K5 $\Delta N\beta$ cat mice, the activation of  $\beta$ -catenin signaling in mammary basal epithelial cells leads to the development of mammary lesions resembling human mammary basal-like carcinomas.<sup>28,29</sup> We show here that the loss of integrin  $\alpha 3\beta 1$  from mammary basal cells in K5 $\Delta N\beta$ cat mice prevents the initiation of tumors and that the deletion of the gene encoding  $\alpha 3$  integrin chain significantly decreases tumor formation by a mouse mammary basal cell line following its injection into the mammary fat pads of immunodeficient mice. We showed, through *in vitro* assays, that the loss of  $\alpha 3\beta 1$  abolished the ability of basal mammary tumor cells to grow in soft agar and decreased the capacity of these cells to grow in three-dimensional (3D) Matrigel cultures. These effects appeared to be associated with a decrease in the activation of FAK, the Rac1/PAK1 (P21-activated Kinase 1), MAPK and JNK pathways, impeding tumor development. Overall, our data indicate that integrin

$\alpha 3\beta 1$ -mediated signaling has a critical role in the initiation and/or growth of mammary tumors.

## RESULTS

Targeted disruption of *itga3* in the mammary basal epithelial cell layer of K5 $\Delta N\beta$ cat mice prevents tumorigenesis

K5 $\Delta N\beta$ cat transgenic mice display constitutive activation of  $\beta$ -catenin signaling in basal mammary epithelial cells. By the age of 10–12 months, they develop mammary lesions, ranging from basal-type mammary hyperplasia to invasive carcinomas (Figure 1a).<sup>28,29</sup> We investigated the potential role of integrin  $\alpha 3\beta 1$  in mammary tumorigenesis, by conditionally deleting *itga3* from the mammary basal cells of K5 $\Delta N\beta$ cat mice. We have already shown that *itga3* deletion in the mammary basal cell layer does not affect mammary development but results in lactation failure because of the impairment of myoepithelial cell contractile activity.<sup>24</sup> The depletion of integrin  $\alpha 3\beta 1$  from the mammary basal cell layer of K5 $\Delta N\beta$ cat mice (referred to hereafter as K5 $\alpha 3KO$ ;  $\Delta N\beta$ cat mouse mutants) completely prevented tumorigenesis (Figures 1a–c and Table 1). At the age of 10–12 months, all K5 $\Delta N\beta$ cat mice presented noninvasive hyperplastic lesions, and 16 of 29 developed invasive mammary carcinomas. By contrast, only two of their 21 K5 $\alpha 3KO$ ;  $\Delta N\beta$ cat littermates presented mild hyperplasia, and none developed invasive tumors (Figures 1b and c and Table 1). Importantly, the small noninvasive lesions found in K5 $\alpha 3KO$ ;  $\Delta N\beta$ cat mice displayed positive staining for  $\alpha 3$  integrin, suggesting that they originated from cells that had escaped Cre-mediated recombination (Supplementary Figure 1).



**Figure 1.** The loss of integrin  $\alpha 3\beta 1$  from basal myoepithelial cells prevents tumor induction in response to the activation of  $\beta$ -catenin signaling. (a) Double immunofluorescence labeling of sections through mouse mammary glands from 10-month-old virgin control, K5 $\Delta N\beta$ cat and K5 $\alpha 3KO$ ;  $\Delta N\beta$ cat females with antibodies against K5 and keratin 8 (K8) (upper panel) or K5 and  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ SMA) (lower panel). Note that sections through control and K5 $\alpha 3KO$ ;  $\Delta N\beta$ cat mammary glands show normal ducts with a layer of basal cells positive for K5 and  $\alpha$ SMA and a layer of luminal cells positive for K8. The K5 $\Delta N\beta$ cat mouse mammary gland section contains a focal hyperplasia consisting of cells positive for K5, but negative for  $\alpha$ SMA and K8. (b) Whole-mount carmine staining of mammary glands from 10-month-old uniparous K5 $\Delta N\beta$ cat and K5 $\alpha 3KO$ ;  $\Delta N\beta$ cat female littermates. Arrows indicate the primary duct. (c) Photographs of mammary glands from 10-month-old uniparous K5 $\Delta N\beta$ cat and K5 $\alpha 3KO$ ;  $\Delta N\beta$ cat female littermates. Arrowheads indicate mammary tumors, and numbers refer to the five pairs of mammary glands. (d) TOP/FOP luciferase reporter assay performed with MEC and  $\alpha 3KO$ -MEC cells. TCF<sup>CA</sup>, constitutively active TCF; St- $\beta$ Cat,  $\Delta N57$ - $\beta$ -catenin. Bars: 100  $\mu$ m in (a) and 1 mm in (b).

Table 1. Effect of <i>itga3</i> deletion on mammary tumorigenesis in K5ΔNβcat mice			
Parity status	Mammary lesion	K5ΔNβcat	K5 $\alpha 3KO;\Delta N\beta cat$
Nulliparous	Hyperplasia	22/22	0/14
	Invasive carcinoma	12/22	0/14
Parous	Hyperplasia	7/7	2 <sup>a</sup> /7
	Invasive carcinoma	4/7	0/7

<sup>a</sup>Cells within the tumors stained positive for  $\alpha 3$  integrin.

We reasoned that integrin  $\alpha 3\beta 1$  deletion might inhibit tumor initiation in K5ΔNβcat mice, by interfering with  $\beta$ -catenin transactivation activity. We tested this hypothesis in a mouse mammary myoepithelial cell line, MEC, carrying conditional alleles of *itga3*.<sup>24</sup> The adenoviral delivery of Cre recombinase, followed by cell sorting with anti- $\alpha 3$  antibody, yielded basal epithelial cells lacking integrin  $\alpha 3\beta 1$  ( $\alpha 3KO$ -MEC; Supplementary Figure 2).

We compared  $\beta$ -catenin transactivation activity of MEC and  $\alpha 3KO$ -MEC cells, after transfection with TOPflash/FOPflash reporter plasmids. We found that the stabilized  $\beta$ -catenin mutant activated transcription from the reporter plasmids in a dose-dependent manner in both MEC and  $\alpha 3KO$ -MEC cells (Figure 1d). Activation levels appeared to be slightly lower in  $\alpha 3KO$ -MEC, but the difference in activation between these cells and MEC was not statistically significant, suggesting that integrin  $\alpha 3\beta 1$  deletion did not prevent  $\beta$ -catenin-Tcf-driven transcription.

These data indicate that integrin  $\alpha 3\beta 1$  controls other steps of mammary tumor initiation and/or growth in K5ΔNβcat mice than activation of  $\beta$ -catenin *per se*.

#### $\alpha 3\beta 1$ -Mediated signaling is required for tumor development from MEC following orthotopic injection or in soft agar

We compared the tumorigenic potential of MEC and  $\alpha 3KO$ -MEC cells, by injecting them into mouse mammary fat pads. The injection of MEC cells led to the development of tumors consisting essentially of spindle-shaped K5-positive and K5-negative cells (Figure 2a). The deletion of integrin  $\alpha 3\beta 1$  from MEC before injection greatly decreased the tumorigenic potential, resulting in a significantly later tumor onset and a lower tumor frequency (Figure 2b). The tumors originating from  $\alpha 3KO$ -MEC cells were smaller than those developed from MEC cells, but the histological characteristics of these two types of tumors were similar (data not shown).

Anchorage-independent proliferation is a hallmark of cancer cells. We therefore investigated the capacity of MEC and  $\alpha 3KO$ -MEC cells to grow in non-adherent conditions, in soft agar. Consistent with the results obtained *in vivo*, MEC cells formed colonies in soft agar, whereas  $\alpha 3KO$ -MEC cells did not (Figures 2c and d). The restoration of integrin  $\alpha 3\beta 1$  expression in  $\alpha 3KO$ -MEC cells rescued their ability to grow in soft agar (Figures 2c and d). These data suggest that integrin  $\alpha 3\beta 1$  expression enables mammary tumor cells to proliferate in an anchorage-independent manner, escaping the apoptosis driven by the lack of adhesion.

The capacity of MEC cells to grow in soft agar may result from the activation of  $\alpha 3\beta 1$  signaling in tumor cells induced by adhesion-independent mechanisms or by cell-cell adhesion. Indeed, it has been suggested that the  $\alpha 3\beta 1$  and  $\alpha 2\beta 1$  integrins expressed on the lateral surfaces of epithelial cells may serve for homophilic or heterophilic intercellular interactions.<sup>30</sup> Alternatively (or additionally)  $\alpha 3\beta 1$  integrin may be activated in tumor cells growing in soft agar because of the ability of these cells to synthesize and secrete Ln332, the ligand of integrin  $\alpha 3\beta 1$ . Consistent with this hypothesis, the immunofluorescence labeling

of MEC cell colonies in soft agar demonstrated the pericellular deposition of Ln332 (Figure 2e). We also found Ln332 levels to be high in mammary hyperplasia lesions and moderate in the invasive carcinomas developed in K5ΔNβcat mice, suggesting a possible role for Ln332 in tumorigenesis (Figure 2f).

#### Integrin $\alpha 3\beta 1$ -mediated stimulation of the Rac1/PAK1 pathway promotes growth in soft agar and tumor development

We have shown that the FAK/Rac1/PAK1 pathway is activated downstream from integrin  $\alpha 3\beta 1$ , to control myoepithelial cell contractility during lactation.<sup>24</sup> Consistent with this finding, the deletion of *itga3* from the mammary basal cell layer in K5ΔNβcat mice halved the level of FAK phosphorylation (Figures 3a and b). Moreover, activated/phosphorylated FAK was detected in K5ΔNβcat mouse mammary tumors, suggesting that FAK-mediated signaling had a role in tumor development (Figures 3a and b). We previously showed that Rac1 activity levels were lower in  $\alpha 3KO$ -MEC than in MEC cells.<sup>24</sup> The expression of a constitutively active form of Rac1 (Rac<sup>V12</sup>) or of a catalytically active form of its effector, PAK1 (PAK<sup>CA</sup>), restored the capacity of  $\alpha 3KO$ -MEC cells to form colonies in soft agar (Figures 3c and d). Conversely, the treatment of MEC cells with the Rac inhibitor NSC23766, the expression of a dominant-negative form of Rac1 (Rac<sup>N17</sup>) or PAK1 (PAK<sup>DN</sup>), or PAK1 silencing by shRNA (PAK-sh) in MEC cells led to an inhibition of colony formation in soft agar, phenocopying a lack of integrin  $\alpha 3\beta 1$  (Figures 3c and d and Supplementary Figure 3a).

Furthermore, the inhibition of PAK1 activity in MEC cells greatly decreased the formation of tumors from cells grafted into the mammary fat pad, whereas the expression of PAK<sup>CA</sup> in  $\alpha 3KO$ -MEC cells restored their tumorigenic potential (Figures 3e and f). Taken together, these results clearly indicate that the Rac1/PAK1 signaling pathway is required downstream from  $\alpha 3\beta 1$  integrin to promote tumor development.

The loss of integrin  $\alpha 3\beta 1$  results in the impaired activation of FAK, MAPK and JNK, inhibiting MEC proliferation and survival in 3D Matrigel cultures

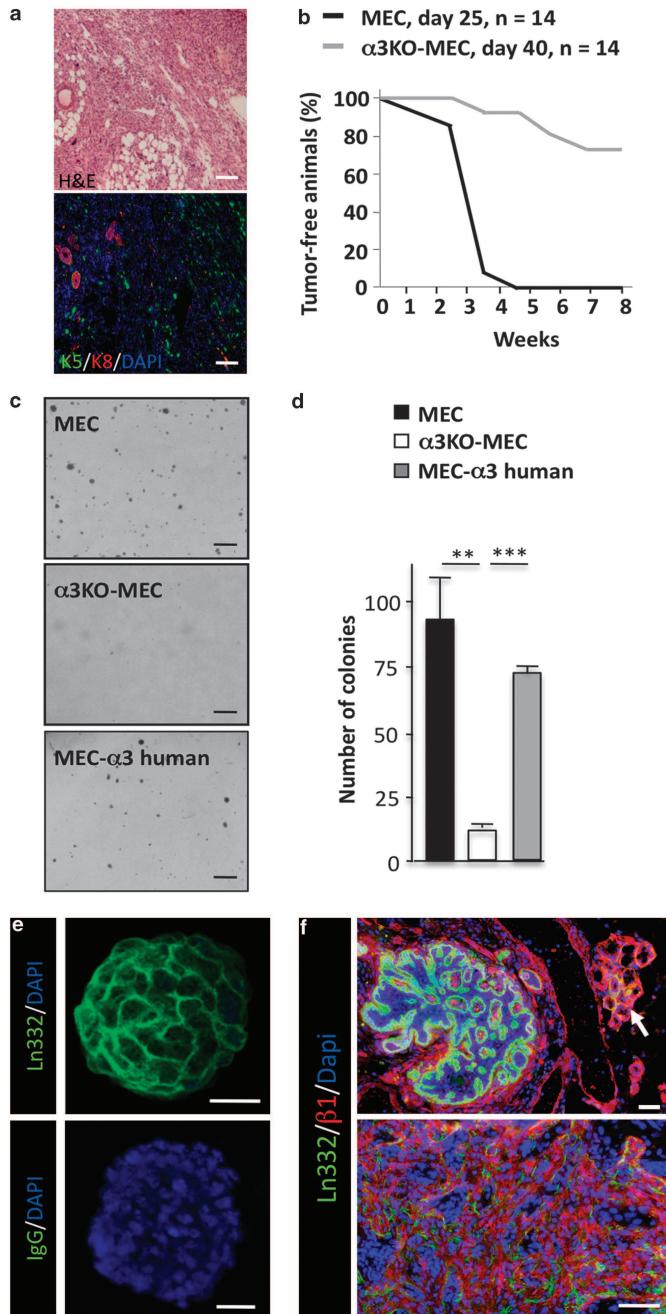
In contrast to their behavior in non-adherent soft agar medium,  $\alpha 3KO$ -MEC cells developed some spherical colonies when grown in 3D Matrigel cultures. However,  $\alpha 3KO$ -MEC cells formed far fewer colonies and these colonies were smaller than those formed by control MEC cells (Figures 4a–c). Colony growth was rescued by the restoration of integrin  $\alpha 3\beta 1$  expression in  $\alpha 3KO$ -MEC cells (data not shown). We found that the lower capacity of  $\alpha 3KO$ -MEC cells to form colonies was associated with higher levels of caspase-3/7 activity at early stages of culture and lower proliferation rates, as demonstrated in a 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation assay (Figures 4d and e). Interestingly, the lack of integrin  $\alpha 3\beta 1$  did not prevent the pericellular accumulation of Ln332, as shown by immunolabeling (Figure 4f).

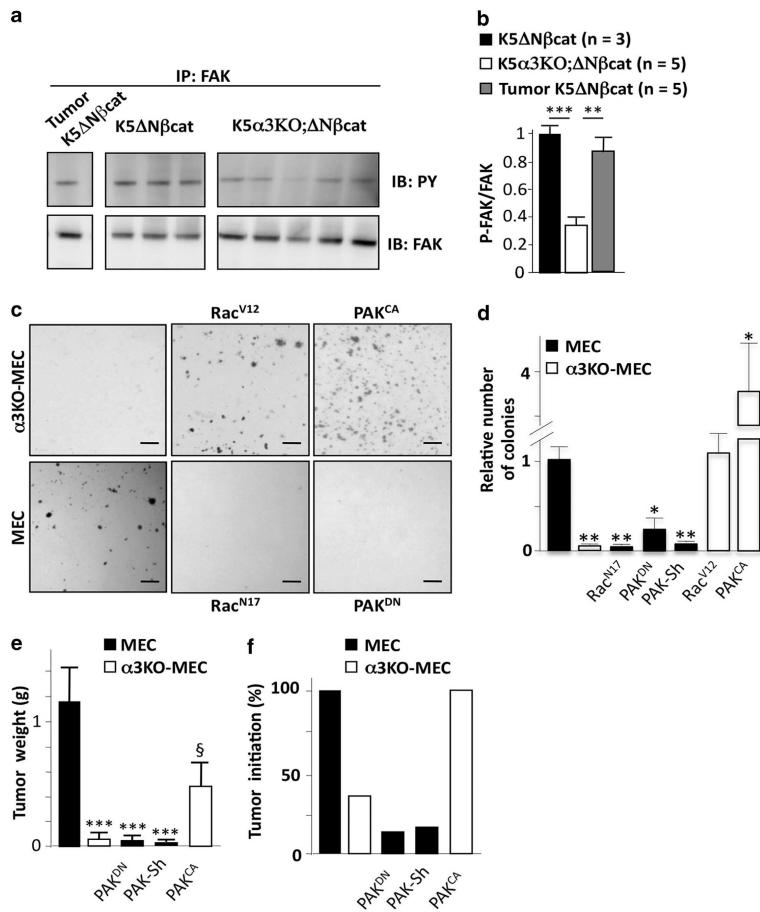
The treatment of MEC cells with the Rac inhibitor NSC23766 or the expression of a dominant-negative form of Rac1 (Rac<sup>N17</sup>) in MEC cells led to an inhibition of colony growth, phenocopying an absence of  $\alpha 3\beta 1$  integrin. Furthermore, the expression of a constitutive active form of Rac1 (Rac<sup>V12</sup>) in  $\alpha 3KO$ -MEC cells restored the capacity of these cells to form colonies (Figures 5a and b and Supplementary Figure 3d). Immunoblots of protein extracts prepared from MEC and  $\alpha 3KO$ -MEC cells grown in 3D Matrigel revealed that FAK phosphorylation levels were lower in the absence of integrin  $\alpha 3\beta 1$  than in its presence (Figures 5c and d). Taken together, these data indicate that the FAK/Rac1/PAK1 signaling pathway has an essential role downstream from integrin  $\alpha 3\beta 1$ , in the promotion of colony formation in 3D cultures.

Rac and PAK have been shown to influence the MAP kinase phosphorylation cascade directly, thereby affecting cell proliferation.<sup>31</sup> Immunoblots of the protein extracts obtained from the

colonies produced by MEC and  $\alpha 3\text{KO}$ -MEC cells in 3D Matrigel cultures revealed that an absence of integrin  $\alpha 3\beta 1$  resulted in much lower levels of MAPK and JNK phosphorylation (Figures 5c

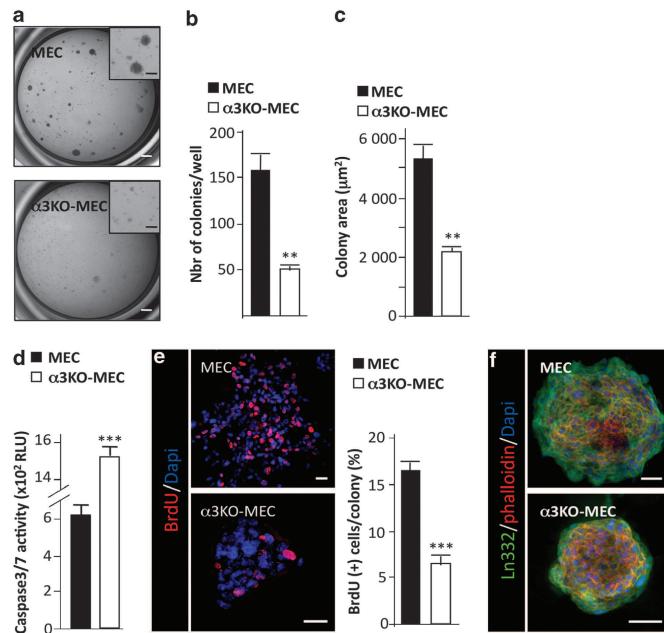
and d). Moreover, the treatment of MEC with a MAPK inhibitor (PD980589) or a JNK inhibitor (SP600125) greatly decreased the capacity of MEC to form colonies in soft agar (Supplementary





**Figure 3.** Integrin  $\alpha$ 3 $\beta$ 1-mediated stimulation of the FAK/Rac1/PAK1 pathway is required for growth in soft agar medium and tumor development. **(a)** Immunoblot (IB) analysis of FAK phosphorylation levels (PY, pan-phosphotyrosine) in the immunoprecipitates (IP) obtained with anti-FAK antibody from protein extracts from 1-day-lactating control and K5 $\Delta$ N $\beta$ cat mouse mammary glands and from a mammary tumor that developed in a female K5 $\Delta$ N $\beta$ cat mouse. **(b)** Diagram showing relative FAK phosphorylation levels in protein extracts from 1-day-lactating control and K5 $\alpha$ 3KO;ΔN $\beta$ cat mouse mammary glands and from mammary tumors that developed in K5 $\Delta$ N $\beta$ cat females. Data are presented as means  $\pm$  s.e.m. **(c)** Phase-contrast images of the colonies developed in soft agar. Rac $V^{12}$ ,  $\alpha$ 3KO-MEC transduced with constitutively active Rac1; PAK $^{CA}$ ,  $\alpha$ 3KO-MEC stably transfected with a plasmid encoding a catalytically active PAK1 mutant; Rac $N^{17}$ , MEC stably transfected with plasmids encoding a dominant-negative Rac1 mutant; and PAK $^{DN}$ , MEC stably transfected by a plasmid encoding for a dominant-negative PAK1 mutant. **(d)** Diagram showing the relative numbers of colonies developed in soft agar by MEC and  $\alpha$ 3KO-MEC cells expressing mutant forms of Rac1 or PAK1, or a short hairpin RNA (sh-RNA) directed against PAK1. The data shown are the means  $\pm$  s.e.m. of three independent experiments. The number of colonies developed by MEC cells was arbitrarily set at 1. **(e)** Diagram showing the means  $\pm$  s.e.m. for the weight of the tumors developed by grafted MEC or  $\alpha$ 3KO-MEC cells expressing mutant forms of PAK1, or a sh-RNA directed against PAK1. \*No statistical data are available as, in this case, tumors were harvested 3-week earlier. **(f)** Diagram showing percentage of tumor containing fat pads 8 weeks after orthotopic injection of the various MEC-derived cell lines, n=8. Bars, 1 mm in (c).

**Figure 2.** Integrin  $\alpha$ 3 $\beta$ 1-mediated signaling is required for tumor development from MEC upon orthotopic injection and in soft agar. **(a)** Hematoxylin and eosin (H&E) staining (upper panel) and double immunofluorescence labeling with antibodies against K5 and K8 (lower panel) of sections through the tumors developed by MEC cells after injection into the fat pads of immunodeficient mice. **(b)** Kaplan-Meier analysis of tumors developed after the injection of  $10^7$  MEC or  $\alpha$ 3KO-MEC cells. Median times to tumor onset are indicated above the diagram.  $\alpha$ 3KO-MEC cells gave rise to tumors in five out of 14 injected fat pads. MEC gave rise to tumors in all injected fat pads. **(c)** Phase-contrast images of the colonies developed by MEC,  $\alpha$ 3KO-MEC and  $\alpha$ 3KO-MEC expressing human  $\alpha$ 3A integrin chain (MEC- $\alpha$ 3 human) grown in soft agar. **(d)** Diagram showing the number of colonies developed in soft agar. The data shown are the means  $\pm$  s.e.m. of at least four independent experiments. **(e)** Immunofluorescence labeling of colonies with an antibody against Ln332 (upper panel) or anti-rabbit immunoglobulin G (IgG) (lower panel) as a negative control. **(f)** Double immunofluorescence labeling, with antibodies against Ln332 and integrin  $\beta$ 1, of mammary lesions from a parous K5 $\Delta$ N $\beta$ cat female. The arrow indicates normal alveoli found in close proximity to the lesion. Bars: 100  $\mu$ m in (a), 1 mm in (c), 25  $\mu$ m in (e) and 100  $\mu$ m in (f).



**Figure 4.**  $\alpha 3\text{KO-MEC}$  have a low colony-forming capacity in 3D Matrigel culture. (a) Phase-contrast images of the 3D structures formed by MEC and  $\alpha 3\text{KO-MEC}$  cells grown in suspension in the presence of 10% Matrigel. (b) Numbers of colonies developed in 3D Matrigel cultures. The data shown are the means  $\pm$  s.e.m. obtained in, at least, four independent experiments. (c) Diagram showing size of colonies developed in 3D Matrigel cultures. (d) Quantitative analysis of Caspase-3/7 activity in MEC and  $\alpha 3\text{KO-MEC}$  cells cultured in 3D Matrigel. (e) Immunofluorescence labeling of the colonies formed by MEC and  $\alpha 3\text{KO-MEC}$  cells in 3D Matrigel cultures with an antibody against BrdU. The diagram shows the percentage of BrdU(+) cells per colony after 1 h of incubation with BrdU. (f) Double immunofluorescence labeling of the colonies formed by MEC and  $\alpha 3\text{KO-MEC}$  cells in 3D Matrigel with antibodies against Ln332 and phalloidin. Bars: 1 mm in (a) and 25  $\mu\text{m}$  in the insets, 25  $\mu\text{m}$  in (e) and 50  $\mu\text{m}$  in (f).

Figures 3b and c) and 3D Matrigel (Supplementary Figures 3e and f). These findings suggest that the activation of integrin  $\alpha 3\beta 1$  signaling leads to stimulation of the proproliferative intracellular signaling pathways required for mammary tumorigenesis.

## DISCUSSION

In this study, we showed that deletion of the *itga3* gene from the mammary epithelial basal layer of K5AN $\beta$ cat mice prevented the mammary tumorigenesis induced by the activation of  $\beta$ -catenin signaling. Consistent with this observation, cultured mammary basal tumor cells lacking  $\alpha 3\beta 1$  were unable to grow in soft agar and were much less able to proliferate in 3D Matrigel cultures or to develop tumors in orthotopic grafts than control cells. Our data suggest that the activation of signaling cascades downstream from  $\alpha 3\beta 1$  involving the Rac1/PAK1 pathway, MAPK and JNK promotes the prosurvival and proproliferative signals required for tumorigenesis.

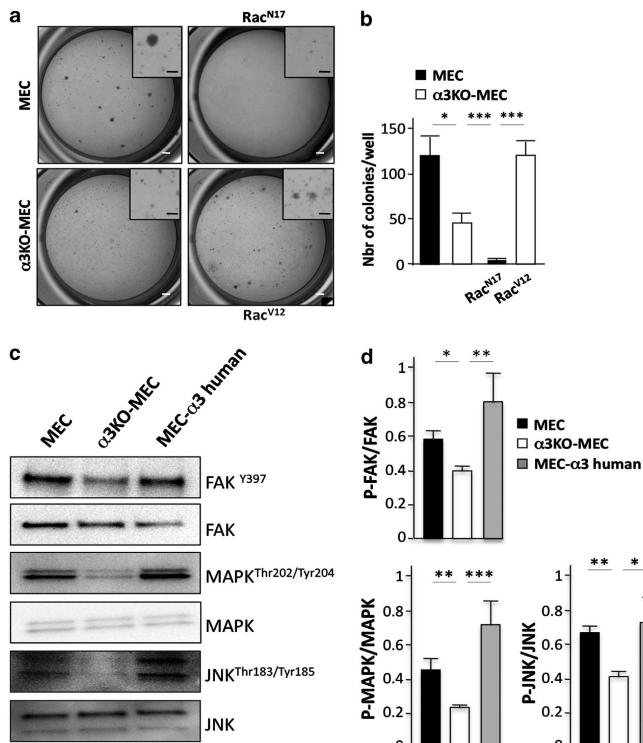
Of note, although other integrin dimers are expressed on the surface of mammary epithelial cells, they were unable to substitute for integrin  $\alpha 3\beta 1$  to support tumorigenesis. Previously we have shown that deletion of integrin  $\alpha 3\beta 1$  from mammary basal cell layer did not perturb adhesion of the mutant mammary epithelium to the basement membrane, suggesting that other integrin dimers ensured adhesion to extracellular matrix.<sup>24</sup> However, it cannot be excluded that, functions of other integrin laminin receptors previously implicated in tumorigenesis, such as

$\alpha 6\beta 1$  or  $\alpha 6\beta 4$ , expressed in mammary epithelial cells, at least, in part, were perturbed by lack of  $\alpha 3\beta 1$  and possible subtle abnormalities of the basement membrane underlying  $\alpha 3\beta 1$ -deficient cells.

Previously, we provided evidence that  $\alpha 3\beta 1$ -dependent PAK1 activation was required for inhibition of the MLCK (myosin light chain kinase) and subsequent myoepithelial cell relaxation, thereby permitting repetitive contractions during lactation.<sup>24</sup> The findings reported here indicate that MAPK and JNK, similar to Rac1 and PAK1, are intermediates of  $\alpha 3\beta 1$  integrin signaling required for tumor development. Thus, integrin  $\alpha 3\beta 1$ -dependent signal transduction appears to control the activity of several kinases and/or phosphatases, with effects on biological processes that differ between cell contexts.

The prosurvival and proproliferative effects of MAPK and the FAK/JNK axis are well established,<sup>19,32,33</sup> but still little is known about the specific functions of individual integrin dimers in the activation of these intracellular pathways. Previous studies in keratinocytes have implicated integrin  $\alpha 3\beta 1$  in FAK/Src and Rac1 activation, leading to polarized lamellipodium extension.<sup>34,35</sup> In the same cell type, integrin  $\alpha 3\beta 1$  has been shown to promote cell survival upon serum withdrawal, through the activation of FAK and MAPK.<sup>36</sup>

A pro-oncogenic activity of  $\alpha 3\beta 1$  integrin in the highly invasive and metastatic basal-like human breast cancer cell line MDA-MB-231, which presents autocrine Wnt signaling activity has been reported previously.<sup>25,37</sup> However, in these cells, the overall



**Figure 5.** Analysis of the downstream intracellular signaling pathways affected by the loss of  $\alpha 3\beta 1$  integrin from mammary basal cells. (a) Phase-contrast images of the colonies developed in 3D Matrigel. Rac<sup>N17</sup>, MEC cells stably transfected with a plasmid encoding a dominant-negative Rac1 mutant; Rac<sup>V12</sup>,  $\alpha 3KO$ -MEC cells transduced with constitutively active Rac1. (b) Diagram showing the number of colonies developed in 3D Matrigel cultures. The data shown are the means  $\pm$  s.e.m. obtained in, at least, four independent experiments. (c) Immunoblotting analysis of FAK, MAPK and JNK phosphorylation levels, using protein extracts from colonies formed by MEC and  $\alpha 3KO$ -MEC cells in 3D Matrigel harvested on day 8 of culture. (d) Relative phosphorylation levels of FAK, MAPK and JNK quantified from the immunoblotting data. The data are presented as means  $\pm$  s.e.m. obtained in four independent experiments. Bars: 1 mm in (a), and 25  $\mu$ m in the insets.

proliferation and survival were not altered by integrin  $\alpha 3\beta 1$  depletion. Instead,  $\alpha 3\beta 1$  integrin was found to be required for the tumor cell invasion and the stimulation of angiogenic endothelial cell function in stroma.<sup>25</sup> These data suggest that  $\alpha 3\beta 1$  integrin can influence various aspects of tumorigenesis by controlling different cancer cell functions. In addition, it has been recently found that  $\alpha 3\beta 1$  integrin can contribute to skin tumor development by promoting epidermal turnover.<sup>38</sup> These results indicate that protumorigenic effects of  $\alpha 3\beta 1$  integrin are not restricted to the mammary epithelium.

Whilst in K5 $\Delta N\beta$ cat mice, mammary tumorigenesis is driven by a constitutive activation of  $\beta$ -catenin signaling, MEC line used in this study is a spontaneously immortalized mammary basal cell line and molecular events underlying its tumorigenic properties remain to be defined. One feature common to these two models of mammary tumorigenesis is the origin of the cells targeted for neoplastic conversion. Indeed, in K5 $\alpha 3KO;\Delta N\beta$ cat mice,  $\beta$ -catenin gene expression and  $\alpha 3$  integrin deletion were targeted to the mammary basal epithelial cell layer,<sup>28</sup> whereas the MEC line is also of mammary basal epithelial origin.<sup>24</sup> Studies from the Nusse laboratory have implicated canonical Wnt signaling in the control of mouse mammary basal stem cell self-renewal.<sup>39</sup> Consistent with

these findings, we observed the amplification of basal stem/progenitor cell populations in early mammary lesions of K5 $\Delta N\beta$ cat mice, suggesting that in this model, mammary basal-like tumors may originate from basal stem/progenitor cells.<sup>28,29</sup> Amplification of the basal stem/progenitor cell compartment has also been reported in the human mammary epithelium, following activation of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway.<sup>40</sup>

We have shown that the loss of  $\beta 1$  integrins from the mammary basal cell layer severely impairs stem cell function.<sup>41</sup> One possible explanation for the inhibition of tumorigenesis in K5 $\Delta N\beta$ cat mice following  $\alpha 3$  integrin deletion is, therefore, an impairment of basal stem cell self-renewal, leading to depletion of the stem cell population. Similarly, the lower tumorigenic potential of the MEC line after deletion of the gene encoding integrin  $\alpha 3$  may reflect a decrease in the pool of tumor-initiating cells. Deficiencies in the activation of FAK, MAPK and JNK can result in senescence and may compromise survival within the basal stem cell compartment *in vivo* in K5 $\Delta N\beta$ cat mice and *in vitro* in the MEC line.

Two recent studies have suggested that basal-like Brca1-associated mammary tumors originate from luminal progenitors.<sup>42,43</sup> Therefore, we are currently analyzing the effects of  $\alpha 3\beta 1$  integrin deletion on mammary basal and luminal stem/progenitor

cell populations. So far, there is no direct evidence implicating integrin  $\alpha 3\beta 1$  in luminal-type breast tumorigenesis. However, in the MMTV-PyMT and ErbB2 mouse models of luminal breast cancer,  $\beta 1$  integrins and several intermediates of integrin signaling, respectively, have been found to have essential roles in various steps of malignant tumor progression.<sup>10,14,19</sup>

Our work and previously obtained data on the tumor-promoting functions of  $\alpha 3\beta 1$  in cultured breast cancer cells suggest that this integrin could be targeted in anticancer therapy.<sup>27</sup> Furthermore, expression of  $\alpha 3\beta 1$  integrin appeared to be upregulated in mammary lesions of K5AN $\beta$ cat mice.<sup>29</sup> Future studies will help to define whether  $\alpha 3\beta 1$  integrin can serve as a basal-like human breast cancer marker and to unravel the contribution of this integrin into induction and/or propagation of various types of human breast cancer.

In brief, we show here that integrin  $\alpha 3\beta 1$ -mediated signaling events are required for the malignant growth of mammary basal epithelial cells, providing further insight into the molecular mechanisms underlying breast cancer initiation and progression.

## MATERIALS AND METHODS

### Mouse strains

All animal experiments were conducted in accordance with French veterinary guidelines and Council of Europe guidelines for the use of experimental animals (L358-86/609EEC). Mice expressing  $\Delta N57\beta$ -catenin in mammary basal epithelial cells (referred to as the K5AN $\beta$ cat strain) have been described elsewhere.<sup>28</sup> The K5-Cre mice were kindly provided by Dr J Jorcano.<sup>44</sup> The mice carrying conditional integrin  $\alpha 3$  alleles ( $itga3^{fl/fl}$ ) have been described elsewhere.<sup>45</sup> The mice were killed when at least one palpable tumor was detected, and all glands were examined in whole-mount preparations for the presence of hyperplasia or tumors.

### Morphological analyses and immunolabeling

Dissected mammary glands were spread onto a glass slide, fixed in Methacarn and either stained with Carmine alum in whole mount or embedded in paraffin. For cryosectioning, mammary tissue was embedded in cryoprotectant (Tissue-Tek OCT, TissuTek, Samura-FineTek, Torrance, CA, USA). For immunofluorescence labeling, frozen or paraffin-embedded 5- to 7- $\mu$ m-thick sections were processed as described previously.<sup>28,46</sup> Cell nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). The following primary antibodies were used: mouse monoclonal anti- $\alpha$ -smooth muscle actin (no. 1A4; Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), anti-HA (no. 12CA5; Roche Applied Science, Basel, Switzerland), anti-keratin 8 (no. AF 138; Covance, Princeton, NJ, USA), anti-BrdU (no. 3D4; BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) and anti-integrin  $\alpha 3$  (no. J143; ab11767; Abcam, Cambridge, MA, USA); rat monoclonal anti-integrin  $\beta 1$  (no. MB1.2, Chemicon-Millipore, Temecula, CA, USA); and rabbit polyclonal antibodies against  $\alpha 3$  integrin (no. 141742, described elsewhere<sup>47</sup>), K5 (no. AF138; Covance) and laminin 332 (no. 1097+E kindly provided by T Sasaki, Max-Planck Institute, Munich, Germany). All secondary antibodies and phalloidin were conjugated to Alexafluor fluorochromes (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). The photomicrographs shown in Figures 2e and 4e,f were acquired with a Nikon A1r confocal microscope (Nikon Instruments, Tokyo, Japan) and correspond to maximal projections of 36 sections of 1  $\mu$ m and 45 sections of 0.5  $\mu$ m, respectively. The other immunofluorescence images were obtained with a Leica DM6000B microscope (Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Germany).

### Preparation of mammary basal epithelial cells and quantitative reverse transcription–polymerase chain reaction

The inguinal mammary glands of three to four 25-week-old virgin females were pooled for the preparation of single-cell suspensions and basal cells were processed for flow cytometry, as described elsewhere.<sup>41</sup> The following conjugated antibodies were used: anti-CD24-PE (no. M1/69; BD Pharmingen), anti-CD49f-FITC (no. GoH3; BD Pharmingen), anti-CD45-APC (#30-F11; Biolegend, San Diego, CA, USA) and anti-CD31-APC (no. MEC13.3; Biolegend). Mammary basal epithelial cells were sorted on a FACSVantage flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) and RNA was

subsequently isolated with the RNeasy kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). Quantitative reverse transcription–polymerase chain reaction was performed as described previously.<sup>48</sup> Values were normalized with respect to glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (*gapdh*) expression levels by the comparative CT method. The primers used for *gapdh* have been described elsewhere.<sup>48</sup> The other primers were purchased from SABiosciences (Frederick, MD, USA) or Qiagen.

### Cell culture assays

The established MEC line of the *itga3<sup>fl/fl</sup>* genotype<sup>24</sup> was routinely maintained in low-serum medium consisting of Dulbecco's modified Eagle's medium:F12 (Gibco-BRL, Gibco, Invitrogen, Saint Aubin, France) buffered with 15 mM HEPES, pH 7.6 (Sigma-Aldrich) and supplemented with 10  $\mu$ g/ml insulin (Sigma-Aldrich), 5 ng/ml epidermal growth factor (Sigma-Aldrich), 0.5 mg/ml bovine serum albumin (Sigma-Aldrich), 5  $\mu$ g/ml oleic acid complex (Sigma-Aldrich), 2% calf serum (HyClone Laboratories, Logan, UT, USA), 50  $\mu$ g/ml gentamicin (Sigma-Aldrich) and 20 U/ml nystatin (Sigma-Aldrich). Initially not tumorigenic, with passages, MEC acquired the capacity to give rise to tumors, when injected subcutaneously into nude mice. Cre-mediated deletion of *itga3<sup>fl/fl</sup>* alleles, retroviral delivery of the human  $\alpha 3$  subunit cloned into the pLZRS-MS-IRESZeo/pBR vector to  $\alpha 3$ KO-MEC, flow cytometry and cell sorting with, respectively, BD FACSCalibur and FACSVantage (Becton Dickinson) flow cytometers, were carried out according to previously described protocols.<sup>45,46</sup> Infected  $\alpha 3$ KO-MEC cells were maintained under zeocin selection (300  $\mu$ g/ml; no. ant-zn-5; Invivogen, San Diego, CA, USA). The MEC/Rac<sup>N17</sup>, MEC/PAK<sup>DN</sup>, MEC/PAK-Sh (Sc-270016; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA),  $\alpha 3$ KO-MEC/Rac<sup>V12</sup> and  $\alpha 3$ KO-MEC/PAK<sup>CA</sup> cells have been described elsewhere.<sup>24</sup>

For the TOP/FOP luciferase reporter assay,  $1.5 \times 10^5$  MEC or  $\alpha 3$ KO-MEC cells were transfected by lipofection (Lipofectamine, Plus Reagent; Invitrogen) kit according to the manufacturer's instructions. A total of 400 ng total DNA, containing 100 ng of reporter plasmid (TOP/FOP) provided by Dr H Clevers (Hubrecht Laboratory, Utrecht, The Netherlands)<sup>49</sup> and 10 ng of pTK-Renilla luciferase control vector (Promega, Madison, WI, USA) were used. When indicated, 100 ng of a plasmid encoding a constitutive active form of TCF or 10–100 ng of a plasmid encoding a stabilized form of  $\beta$ -catenin lacking the NH<sub>2</sub>-terminal 57 amino acids (pCGN-AN57- $\beta$ -catenin)<sup>50</sup> were added. Thirty-six hours after transfection, the cells were lysed and Firefly and *Renilla* luciferase activities were measured. The mean ratio of TOP and FOP reporter activity levels (means  $\pm$  s.d.) was determined in four independent experiments with duplicate measurements in each case. Basal activity in MEC cells was arbitrarily set to a value of 1.

For growth in soft agar medium,  $5 \times 10^4$  cells were plated in medium containing 0.35% low-melting point agarose (Gibco-BRL) in six-well plates coated with 0.6% low-melting point agarose. Colonies with areas of more than 1500  $\mu$ m<sup>2</sup> were counted after 2 weeks of incubation, with ImageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). The results shown are representative of at least three independent experiments performed in duplicate.

For 3D cultures of MEC,  $6 \times 10^3$  cells per well in 24-well Ultra-Low Attachment plates (Costar-Corning, New York, NY, USA) were plated in the presence of 10% Matrigel (BD Pharmingen). ImageJ software was used to count the colonies with areas of more than 1500  $\mu$ m<sup>2</sup>, after 11 days of incubation. Caspase-3/7 activity was assessed in colonies harvested 24 h after plating, with the Caspase-Glo 3/7 Assay System, according to the manufacturer's instructions (Promega). For BrdU incorporation experiments, colonies were incubated with 5  $\mu$ g/ml BrdU for 1 h on day 8 after seeding.

For the orthotopic injection of MEC and  $\alpha 3$ KO-MEC cells into the mammary fat pad of BALB/c nude mice, a suspension of  $10^6$  cells was prepared in 100  $\mu$ l of phosphate-buffered saline. Data are shown as means  $\pm$  s.e.m. for, at least, six injections performed in two independent experiments.

### Protein extracts, immunoprecipitation and immunoblotting

Protein extracts were prepared from the fifth mammary glands of females on the first day of lactation, mammary tumors, subconfluent cell cultures and 3D Matrigel colonies harvested on day 8, as described previously.<sup>24</sup> Immunoprecipitation and immunoblotting were performed as described by Raymond et al.<sup>24</sup> The following primary antibodies were used: mouse monoclonal anti-FAK (clone 77; Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA) for immunoprecipitation; rabbit antibodies against keratin 5 (no. AF 138; Covance), FAK (sc-588; Santa Cruz Biotechnology), PY (clone 4G10;

Millipore, Billerica, MA, USA),  $\gamma^{32}P$ -FAK (no. 44624G; Invitrogen),  $\gamma^{32}P$ -JNK (no. 4668; Cell Signaling, Danvers, MA, USA), JNK (no. 9252; Cell Signaling),  $\gamma^{32}P$ -MAPK (no. 9101; Cell Signaling), MAPK (no. 9102; Cell Signaling) and a goat polyclonal antibody against integrin  $\alpha$ 3 (no. AF2787; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) for immunoblotting.

#### Statistical analysis

Statistical analysis was performed with Prism4 software (GraphPad, <http://www.graphpad.com>), using Mann–Whitney *U*-tests for the pairwise comparison of groups. Values of \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01 and \*\*\* $P$ <0.001 indicate statistical significance.

#### CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We are particularly grateful to Dr JL Jorcano for providing K5Cre transgenic mice. We thank Dr I Grandjean and S Jannet for excellent assistance with animal care, Z Maciorowski, A Viguer and S Grondin for excellent assistance with FACS analyses and M Denoyelle and A Di Cicco for technical help. We also thank the Nikon Imaging Centre at Institut Curie-CNRS for providing confocal microscopy facilities. This work was supported by *La Ligue Nationale Contre le Cancer* (Equipe Labélisée 2009, 2013) and a grant from the *Agence Nationale de la Recherche* ANR-08-BLAN-0078-01 to MAG. SC received funding from *Association pour la Recherche sur le Cancer*; MAG is Directeur de Recherche and MMF and KR are Chargé de Recherche at the *Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale* (INSERM).

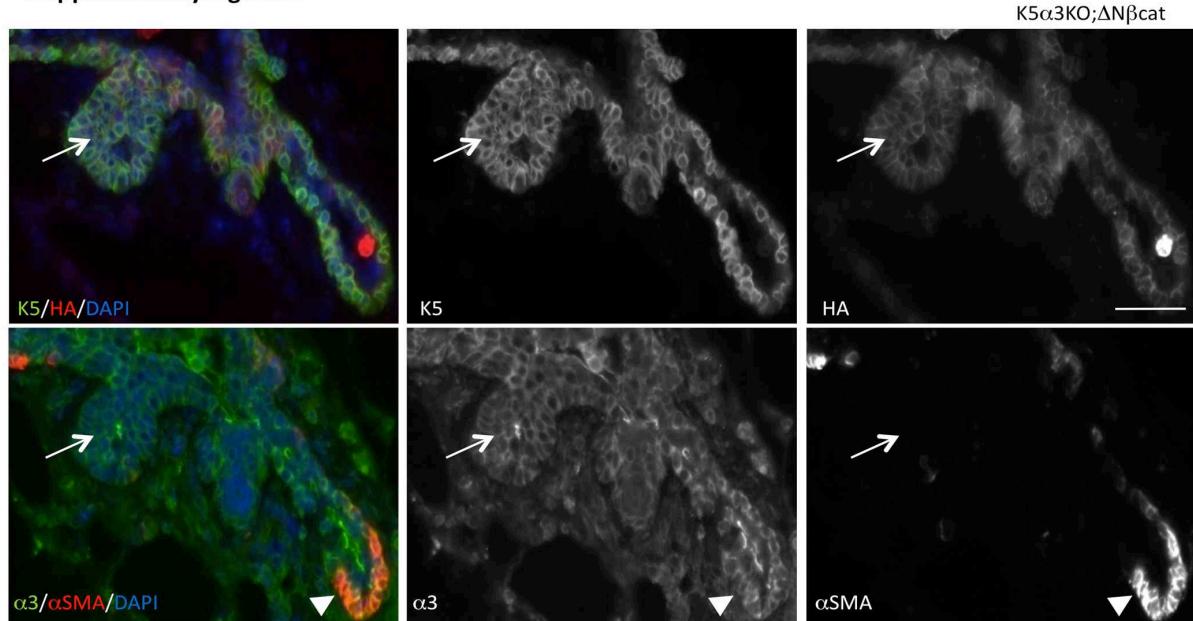
#### REFERENCES

- Prat A, Ellis MJ, Perou CM. Practical implications of gene-expression-based assays for breast oncologists. *Nat Rev Clin Oncol* 2011; **9**: 48–57.
- Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 10869–10874.
- Reis-Filho JS, Pusztai L. Gene expression profiling in breast cancer: classification, prognostication, and prediction. *Lancet* 2011; **378**: 1812–1823.
- Bertucci F, Finetti P, Birnbaum D. Basal breast cancer: a complex and deadly molecular subtype. *Curr Mol Med* 2012; **12**: 96–110.
- Koboldt DC, Fulton RS, McLellan MD, Schmidt H, Kalicki-Veizer J, McMichael JF et al. Cancer Genome Atlas NetworkComprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2012; **490**: 61–70.
- DiMeo TA, Anderson K, Phadke P, Cheng F, Perou CM, Naber S et al. A novel lung metastasis signature links Wnt signaling with cancer cell self-renewal and epithelial-mesenchymal transition in basal-like breast cancer. *Cancer Res* 2009; **69**: 5364–5373.
- Khramtsov AI, Khramtsova GF, Tretiakova M, Huo D, Olopade OI, Goss KH. Wnt/ $\beta$ -catenin pathway activation is enriched in basal-like breast cancers and predicts poor outcome. *Am J Pathol* 2010; **76**: 2911–2920.
- Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 2002; **110**: 673–687.
- Huvemeier S, Danen EHJ. Adhesion signaling-crosstalk between integrins, Src and Rho. *J Cell Sci* 2009; **122**: 1059–1069.
- Raymond K, Faraldo MM, Deugnier MA, Glukhova MA. Integrins in mammary development. *Semin Cell Dev Biol* 2012; **23**: 599–605.
- Streuli CH, Akhtar N. Signal co-operation between integrins and other receptor systems. *Biochem J* 2009; **418**: 491–506.
- Cabodi S, Del Pilar Camacho-Leal M, Di Stefano P, Defilippi P. Integrin signalling adaptors: not only figurants in the cancer story. *Nat Rev Cancer* 2010; **10**: 858–870.
- Rathinam R, Alahari SK. Important role of integrins in the cancer biology. *Cancer Metast Rev* 2010; **29**: 223–237.
- Lahlou H, Muller WJ.  $\beta$ 1-Integrins, signaling and mammary tumor progression in transgenic mouse models: implications for human breast cancer. *Breast Cancer Res* 2011; **13**: 229.
- Jonjic N, Lucin K, Krstulja M, Iternicka Z, Mustac E. Expression of beta-1 integrins on tumor cells of invasive ductal breast carcinoma. *Pathol Res Pract* 1993; **189**: 979–984.
- Yao ES, Zhang H, Chen YY, Lee B, Chew K, Moore D et al. Increased  $\beta$ 1 integrin is associated with decreased survival in invasive breast cancer. *Cancer Res* 2007; **67**: 659–664.
- Morini M, Mottolese M, Ferrari N, Ghirozzi F, Buglioni S, Mortarini R et al. The alpha 3 beta 1 integrin is associated with mammary carcinoma cell metastasis, invasion, and gelatinase B (MMP-9) activity. *Int J Cancer* 2000; **87**: 336–342.
- Cance WG, Harris JE, Iacocca MV, Roche E, Yang X, Chang J et al. Immunohistochemical analyses of focal adhesion kinase expression in benign and malignant human breast and colon tissues: correlation with preinvasive and invasive phenotypes. *Clin Cancer Res* 2000; **6**: 2417–2423.
- Luo M, Guan JL. Focal adhesion kinase: a prominent determinant in breast cancer initiation, progression and metastasis. *Cancer Lett* 2010; **289**: 127–139.
- Lambert AW, Ozturk S, Thiagarangam S. Integrin signaling in mammary epithelial cells and breast cancer. *ISRN Oncol* 2012; **2012**: 493283.
- Plysheva Y, Gillen KM, Gerald W, Beggs HE, Reichardt LF, Giancotti FG. Ras- and PI3K-dependent breast tumorigenesis in mice and humans requires focal adhesion kinase signaling. *J Clin Invest* 2009; **119**: 252–266.
- Bianchi-Smiraglia A, Paesante S, Bakin AV. Integrin  $\beta$ 5 contributes to the tumorigenic potential of breast cancer cells through the Src-FAK and MEK-ERK signaling pathways. *Oncogene* 2013; **32**: 3049–3058.
- Taddei I, Faraldo MM, Teulière J, Deugnier MA, Thiery JP, Glukhova MA. Integrins in mammary gland development and differentiation of mammary epithelium. *J Mam Gland Biol Neoplasia* 2003; **8**: 383–394.
- Raymond K, Cagnet S, Kreft M, Janssen H, Sonneberg A, Glukhova MA. Control of mammary myoepithelial cell contractile function by  $\alpha$ 3 $\beta$ 1 integrin signalling. *EMBO J* 2011; **30**: 1896–1906.
- Mitchell K, Svensson KB, Longmate WM, Gkirtzimanaki K, Sadej R, Wang X et al. Suppression of integrin  $\alpha$ 3 $\beta$ 1 in breast cancer cells reduces cyclooxygenase-2 gene expression and inhibits tumorigenesis, invasion, and cross-talk to endothelial cells. *Cancer Res* 2010; **70**: 6359–6367.
- Novitskaya V, Romanska H, Dawoud M, Jones JL, Berditchevski F. Tetraspanin CD151 regulates growth of mammary epithelial cells in three-dimensional extracellular matrix: implication for mammary ductal carcinoma *in situ*. *Cancer Res* 2010; **70**: 4698–4708.
- Subbaram S, DiPersio CM. Integrin  $\alpha$ 3 $\beta$ 1 as a breast cancer target. *Expert Opin Ther Targets* 2011; **15**: 1197–1210.
- Teulière J, Faraldo MM, Deugnier MA, Shtrutman M, Ben-Ze'ev A, Thiery JP et al. Targeted activation of beta-catenin signaling in basal mammary epithelial cells affects mammary development and leads to hyperplasia. *Development* 2005; **132**: 267–277.
- Moumen M, Chiche A, Decraene C, Petit V, Gendarillas A, Deugnier MA et al. Myc is required for beta-catenin-mediated mammary stem cell amplification and tumorigenesis. *Mol Cancer* (in revision).
- Peltonen J, Larjava H, Jaakkola S, Gralnick H, Akiyama SK, Yamada SS et al. Localization of integrin receptors for fibronectin, collagen, and laminin in human skin. Variable expression in basal and squamous cell carcinomas. *J Clin Invest* 1989; **84**: 1916–1923.
- Elben ST, Slack JR, Weber MJ, Calting AD. Rac-PAK signaling stimulates extracellular signal-regulated kinase (ERK) activation by regulating formation of MEK1–ERK complexes. *Mol Cell Biol* 2002; **22**: 6023–6033.
- Oktay M, Wary KK, Dans M, Birge RB, Giancotti FG. Integrin-mediated activation of focal adhesion is required for signaling to Jun NH2-terminal kinase and progression through the G1 phase of the cell cycle. *J Cell Biol* 1999; **145**: 1461–1469.
- Roskoski Jr R. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol Res* 2012; **66**: 105–143.
- Choma DP, Pumiglia K, DiPersio CM. Integrin  $\alpha$ 3 $\beta$ 1 directs the stabilization of a polarized lamellipodium in epithelial cells through activation of Rac1. *J Cell Sci* 2004; **117**: 3947–3959.
- Choma DP, Vincenzo M, Pumiglia KM, DiPersio CM. Integrin  $\alpha$ 3 $\beta$ 1-dependent activation of FAK/Src regulates Rac1-mediated keratinocyte polarization on laminin-5. *J Inv Dermatol* 2007; **127**: 31–40.
- Manohar A, Shome SG, Lamar J, Stirling L, Iyer V, Pumiglia K et al. Alpha 3 beta 1 integrin promotes keratinocyte cell survival through activation of a MEK/ERK signaling pathway. *J Cell Sci* 2004; **117**: 4043–4054.
- Bafico A, Liu G, Goldin L, Harris V, Aaronson SA. An autocrine mechanism for constitutive Wnt pathway activation in human cancer cells. *Cancer Cell* 2004; **6**: 497–506.
- Sachs N, Secades P, van Hulst L, Kreft M, Song JY, Sonnenberg A. Loss of integrin  $\alpha$ 3 prevents skin tumor formation by promoting epidermal turnover and depletion of slow-cycling cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; **109**: 21468–21473.
- Zeng YA, Nusse R. Wnt proteins are self-renewal factors for mammary stem cells and promote their long-term expansion in culture. *Cell Stem Cell* 2011; **6**: 568–577.
- Korkaya H, Paulson A, Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Brown M, Dutcher J et al. Regulation of mammary stem/progenitor cells by PTEN/Akt/  $\beta$ -catenin signaling. *PLoS Biol* 2009; **7**: e1000121.
- Taddei I, Deugnier MA, Faraldo MM, Petit V, Bouvard D, Medina D et al. Beta1 integrin deletion from the basal compartment of the mammary epithelium affects stem cells. *Nat Cell Biol* 2008; **10**: 716–722.
- Lim E, Vaillant F, Wu D, Forrest NC, Pal B, Hart AH et al. Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers. *Nat Med* 2009; **15**: 907–913.

- 43 Molyneux G, Geyer FC, Magnay FA, McCarthy A, Kendrick H, Natrajan R *et al.* BRCA1 basal-like breast cancers originate from luminal epithelial progenitors and not from basal stem cells. *Cell Stem Cell* 2010; **7**: 403–417.
- 44 Ramirez A, Page A, Gandlerillas A, Zanet J, Pibre S, Vidal M *et al.* A keratin K5Cre transgenic line appropriate for tissue-specific or generalized Cre-mediated recombination. *Genesis* 2004; **39**: 52–57.
- 45 Margadant C, Raymond K, Kreft M, Sachs N, Janssen H, Sonnenberg A. Integrin  $\alpha 3\beta 1$  inhibits directional migration and wound re-epithelialization in the skin. *J Cell Sci* 2009; **122**: 278–288.
- 46 Raymond K, Kreft M, Janssen H, Calafat J, Sonnenberg A. Keratinocytes display normal proliferation, survival and differentiation in conditional beta4-integrin knockout mice. *J Cell Sci* 2005; **118**: 1045–1060.
- 47 Sachs N, Kreft M, van den Bergh Weerman MA, Beynon AJ, Peters TA, Weening JJ *et al.* Kidney failure in mice lacking the tetraspanin CD151. *J Cell Biol* 2006; **175**: 33–39.
- 48 Moumen M, Chiche A, Deugnier MA, Petit V, Gandlerillas A, Glukhova MA *et al.* The proto-oncogene Myc is essential for mammary stem cell function. *Stem Cells* 2012; **30**: 1246–1254.
- 49 Korinek V, Barker N, Morin PJ, van Wichen D, de Weger R, Kinzler KW *et al.* Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC $^{−/−}$  colon carcinoma. *Science* 1997; **275**: 1784–1787.
- 50 Salomon D, Sacco PA, Roy SG, Simcha I, Johnson KR, Wheelock MJ *et al.* Regulation of beta-catenin levels and localization by overexpression of plakoglobin and inhibition of the ubiquitin proteasome system. *J Cell Biol* 1997; **139**: 1325–1335.

Supplementary Information accompanies this paper on the Oncogene website (<http://www.nature.com/onc>)

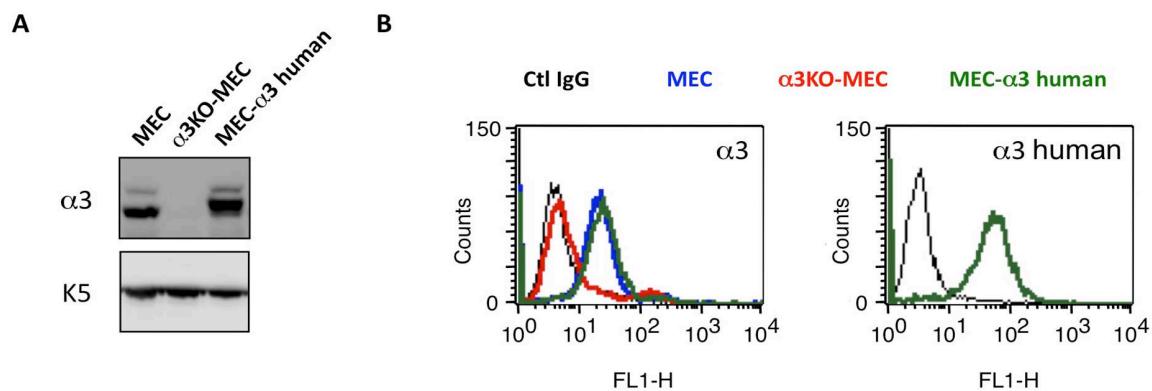
**Supplementary Figure 1**



**Supplementary Figure 1. Integrin  $\alpha$ 3 is expressed in the hyperplasia developed by parous K5 $\alpha$ 3KO;ΔN $\beta$ cat mice**

Double immunofluorescence labeling of sections through mammary gland hyperplasia from K5 $\alpha$ 3KO;ΔN $\beta$ cat mice, with antibodies against K5 and HA-tag (upper panel) or  $\alpha$ 3 integrin subunit ( $\alpha$ 3) and  $\alpha$ SMA (lower panel). Arrows point to K5-positive,  $\alpha$ SMA-negative hyperplastic lesions that retain  $\alpha$ 3 integrin expression. Arrowheads indicates a region of the duct showing a normal morphology, i.e., presenting a single layer of basal cells positive for K5 and  $\alpha$ SMA. Bar, 100  $\mu$ m.

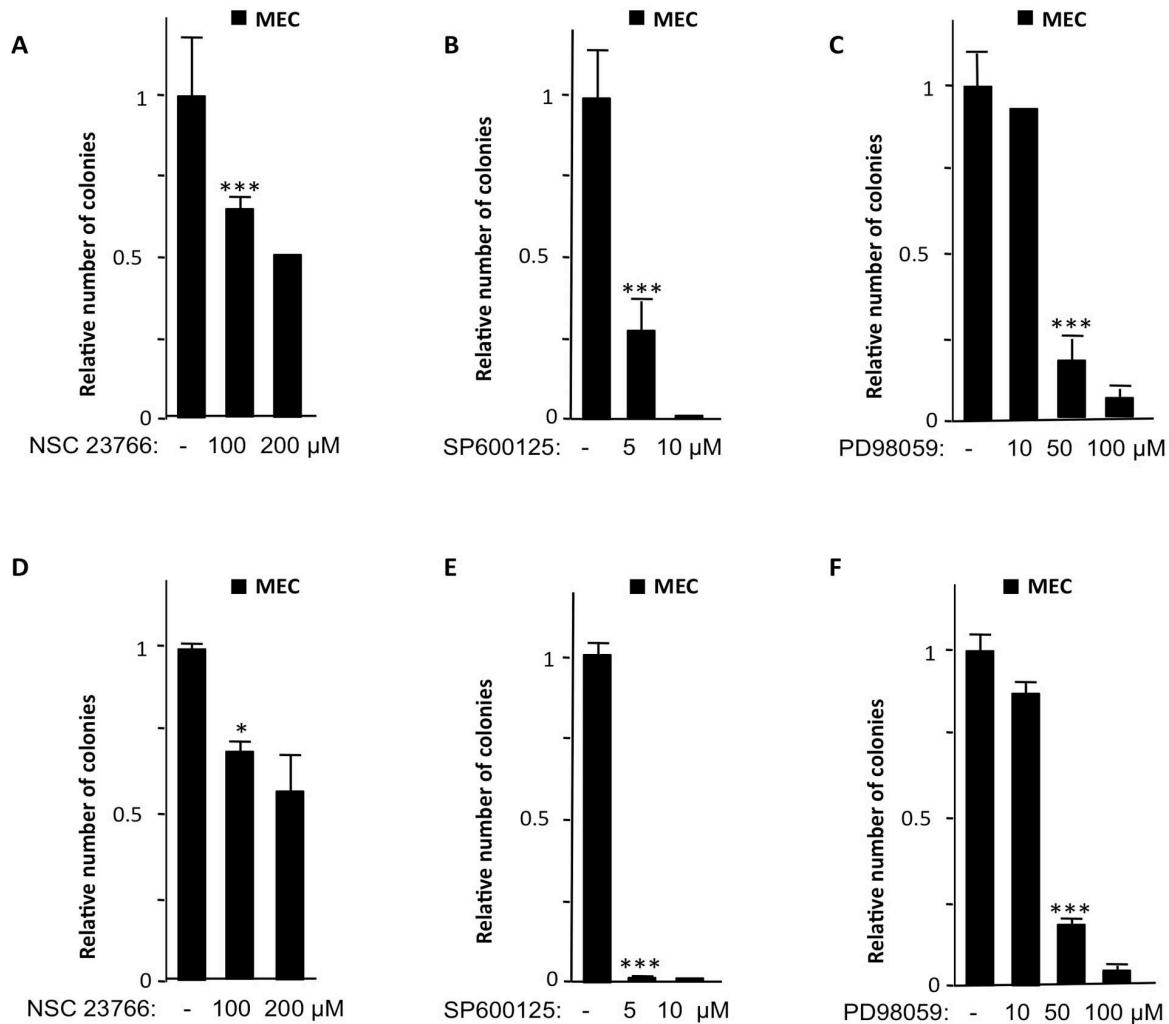
**Supplementary Figure 2**



**Supplementary Figure 2. Characterization of mouse mammary epithelial cell lines carrying conditional alleles for *itga3***

(A) Immunoblot analysis of integrin  $\alpha 3\beta 1$  levels in subconfluent cultures of MEC,  $\alpha 3$ KO-MEC and  $\alpha 3$ KO-MEC expressing human  $\alpha 3$ A integrin chain (MEC- $\alpha 3$  human), with an antibody against the integrin  $\alpha 3$  subunit ( $\alpha 3$ ). K5 was used as a loading control. (B) Flow cytometry analysis of integrin  $\alpha 3$  levels in MEC,  $\alpha 3$ KO-MEC and MEC- $\alpha 3$  human cells, with antibodies recognizing mouse and human (left panel) or only the human integrin  $\alpha 3$  chain (right panel).

**Supplementary Figure 3**



**Supplementary Figure 3. The inhibition of Rac1, MEK or JNK activities decreases the capacity of MEC cells to form colonies in soft agar and in 3D Matrigel cultures**

(A-C) Relative numbers of colonies developed in soft agar after the treatment of MEC cells with the indicated amounts of (A) Rac1 inhibitor (NSC23766), (B) MEK inhibitor (PD98059) and (C) JNK inhibitor (SP600125). (D-F) Relative numbers of colonies developed in 3D-Matrigel cultures after treatment with the indicated amounts of (D) Rac1 inhibitor (NSC23766), (E) MEK inhibitor (PD98059) and (F) JNK inhibitor (SP600125). In each experiment, the number of colonies developed from untreated cells was arbitrarily set at a value of 1.

### **III. LES INTEGRINES LIANT LA LAMININE CONTROLENT L'ACTIVITE DES CELLULES SOUCHES/PROGENITRICES MAMMAIRES (3<sup>E</sup> ARTICLE – EN PREPARATION)**

#### **3.1. Contexte et justification de la recherche**

Notre équipe a montré que les intégrines de la famille  $\beta 1$  sont essentielles au maintien de l'activité des MaSC (Taddei et al., 2008). Pour former un dimère fonctionnel, la sous-unité  $\beta 1$  des intégrines peut interagir avec différentes sous-unités  $\alpha$ , la nature de la sous-unité a déterminant la spécificité de ligand de l'intégrine. Pour évaluer la contribution des intégrines liant les laminines (dimères  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 1$  et  $\alpha 6\beta 4$ ) dans le maintien de cellules souches fonctionnelles, nous avons étudié l'effet de l'invalidation des gènes codant pour  $\alpha 3$  et/ou  $\alpha 6$  sur le potentiel régénératif mammaire.

Afin d'étudier spécifiquement la contribution de l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  dans la régulation de l'activité des cellules souches/progénitrices mammaires, nous avons comparé le potentiel régénératif des cellules basales isolées de souris  $\alpha 3^{F/F}$  (souris contrôles) et de souris dépourvues d'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  dans le compartiment basal (souris K5-Cre ;  $\alpha 3^{F/F}$ , ensuite nommée K5 $\alpha 3$ KO), à l'aide d'expériences de transplantations.

Pour étudier la contribution de la sous-unité  $\alpha 6$  des intégrines (dimères  $\alpha 6\beta 1$  et  $\alpha 6\beta 4$ ), l'étude s'est avérée plus difficile. En effet, l'utilisation du promoteur constitutif K5 (utilisé avec succès pour  $\alpha 3\beta 1$ ) induit une létalité périnatale dans le cas de la sous unité  $\alpha 6$ . Ainsi, nous avons envisagé l'utilisation d'un promoteur inductible permettant d'exprimer la recombinase Cre chez la femelle pubère (promoteur K14-Cre<sup>ERT</sup>). Cette approche a cependant abouti à l'obtention d'individus mosaïques pour l'expression des dimères  $\alpha 6\beta 1$  et  $\alpha 6\beta 4$ , du fait de la faible efficacité de recombinaison de l'allèle ciblé. Nous avons alors choisi une approche permettant la délétion du gène *itga6* *in vitro*, par transduction adénovirale de la recombinase Cre dans les cellules basales isolées. Après une courte incubation avec l'adénovirus *in vitro*, le potentiel des cellules basales isolées de souris  $\alpha 6^{F/+}$ ; Rosa26-LacZ (souris contrôles) et de souris  $\alpha 6^{F/F}$ ; Rosa26-LacZ (souris  $\alpha 6$ KO), a été comparée à l'aide d'expériences de transplantations.

De la même façon, la contribution de l'ensemble des intégrines liant les laminines (dimères  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 1$  et  $\alpha 6\beta 4$ ) a été évaluée après délétion *in vitro* des allèles *itga3* et *itga6*.

### **3.2. Résumé des principaux résultats**

#### 3.2.1. La perte de l'intégrine $\alpha 3\beta 1$ du compartiment basal mammaire réduit le potentiel régénératif des cellules souches/progénitrices mammaires contenues dans le compartiment basal

Nous avons vu précédemment que les souris K5 $\alpha$ 3KO présentent une morphogenèse mammaire normale (Raymond et al., 2011). L'analyse par cytométrie en flux des populations épithéliales mammaires isolées de glandes mammaires de souris contrôles et K5 $\alpha$ 3KO indique que le nombre et la proportion des cellules épithéliales basales et luminales ne sont pas significativement affectés par la perte d'intégrine  $\alpha 3\beta 1$ . Cependant, des expériences de transplantations en dilutions limites de cellules basales isolées montrent que les cellules basales K5 $\alpha$ 3KO ont un potentiel régénératif réduit par rapport aux cellules contrôles (la fréquence des cellules souches fonctionnelles est de 1/572 pour les cellules K5 $\alpha$ 3KO et de 1/77 pour les contrôle). De plus, nos expériences de formation de colonies en 2D et de mammosphères en 3D indiquent que les capacités clonogéniques des cellules basales K5 $\alpha$ 3KO sont réduites. Ces données suggèrent que l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  joue un rôle dans le maintien du pool et de l'activité des cellules souches/progénitrices mammaires contenues dans le compartiment basal.

#### 3.2.2. La délétion du gène *itga6* des cellules épithéliales basales mammaires isolées diminue le potentiel régénératif de l'épithélium mammaire

Les expériences de transplantation en dilution limite de cellules basales isolées dépourvues des intégrines  $\alpha 6\beta 1$  et  $\alpha 6\beta 4$  montrent que le potentiel régénératif des cellules basales  $\alpha 6$ KO est réduit. De plus, les capacités des cellules basales  $\alpha 6$ KO à former des colonies et à s'organiser en mammosphères sont affectées suggérant que les intégrines  $\alpha 6\beta 1$  et  $\alpha 6\beta 4$  participent au contrôle de l'activité des cellules souches/progénitrices mammaires contenues dans le compartiment basal.

### 3.2.3. La délétion des gènes *itga3* et *itga6* des cellules épithéliales basales mammaires isolées réduit de façon drastique le potentiel régénératif de l'épithélium mammaire

La perte d'expression des intégrines liant la laminine des cellules basales mammaires (dimères  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 1$  et  $\alpha 6\beta 4$ ) mène à la perte quasi totale des capacités des cellules basales à régénérer un épithélium mammaire, à former des colonies et à développer des mammosphères suggérant que l'engagement des intégrines liant la laminine est essentiel au maintien de l'activité des cellules souches/progénitrices mammaires.

### **3.3. Conclusion de l'article**

Notre étude indique que bien qu'aucune des intégrines liant les laminines ne semble essentielle, seule, au maintien du potentiel régénératif de l'épithélium mammaire, la perte d'expression de l'ensemble de ces intégrines diminue de façon drastique la capacité des cellules épithéliales basales à régénérer l'épithélium mammaire, après transplantation.

**3<sup>e</sup> article :** *Laminin-binding integrins control mammary stem/progenitor cell activity* - en préparation.

## **Laminin-binding integrins control mammary stem/progenitor cell function**

Stéphanie Cagnet<sup>1,2</sup>, Aurélie Chiche<sup>1,2</sup>, Adèle De Arcangelis<sup>3</sup>, Elisabeth George-Labouesse<sup>3</sup>, Arnoud Sonnenberg<sup>4</sup>, Marina A. Glukhova<sup>1,2,6</sup>, Karine Raymond<sup>1,2,5</sup>

<sup>1</sup>Institut Curie, Centre de Recherche, 26 rue d'Ulm, 75005 Paris, France.

<sup>2</sup>Centre National de la Recherche Scientifique, UMR144, 26 rue d'Ulm, 75005 Paris, France.

<sup>3</sup>Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS/INSERM/ULP, BP 163, 67404 Illkirch, Communauté urbaine de Strasbourg, France.

<sup>4</sup>Division of Cell Biology, The Netherlands Cancer Institute, Plesmanlaan 121, 1066 CX Amsterdam, The Netherlands.

<sup>5</sup>Current address of Karine Raymond: Saint Antoine Research Center, UPMC Université Paris 06, INSERM U938, Paris, France.

<sup>6</sup>**Corresponding author:** Marina Glukhova, UMR144 CNRS-Institut Curie, 26 rue d'Ulm, 75005 Paris, France; Phone: +33(0)156246331; Fax: +33(0)156246349; e-mail: [marina.glukhova@curie.fr](mailto:marina.glukhova@curie.fr)

**Running title:** Integrins in stem cells

**Key words:** mammary gland; Cre-Lox gene deletion; integrin; laminin; stem cells

## ABSTRACT

Mammary epithelium comprises a layer of luminal cells and a basal myoepithelial cell layer. Both mammary epithelial compartments, basal and luminal, contain stem and progenitor cells, but only basal cells are capable of gland regeneration upon transplantation. Mammary epithelium is surrounded by a basement membrane, specific extracellular matrix whose essential components are laminins that bind to transmembrane glycoproteins integrins, major cell surface receptors for extracellular matrix. Ligand binding by integrins leads to activation of the intracellular signaling events implicated in the control of essential cellular functions such as proliferation, survival and differentiation. To analyze the role played by laminin-binding integrins in the control of mammary stem cell function, we employed Cre-Lox-based conditional gene deletion. We show that deletion of  $\alpha 3$  or  $\alpha 6$  integrin subunit from mammary basal epithelial cells diminishes their clonogenic activity *in vitro* and their capacity to regenerate mammary epithelium *in vivo*. We found that functions of  $\alpha 3\beta 1$  and  $\alpha 6$ -containing integrins are partially redundant, and that deletion of both integrin  $\alpha$  chains abolishes stem and progenitor cell activity in mammary basal cells. These data suggest that integrin-mediated intracellular signaling pathways contribute to the control of mammary stem cell function and identify laminins as potential components of mammary stem cell niche.

## INTRODUCTION

The mammary epithelium is organized as a bilayer, with a luminal layer and a layer of underlying basal myoepithelial cells. The extraordinary proliferative potential of the mammary epithelium, allowing gland replenishment during lobulo-alveolar development in subsequent pregnancies and repopulation of the cleared mammary fat pad upon transplantation of tissue fragments or dispersed cells, strongly suggests that stem and progenitor cells are present in this tissue (Visvader and Smith, 2011). Transplantation experiments with sorted epithelial cells from adult mouse mammary gland revealed that only basal cells could regenerate bilayered mammary ducts and alveoli (Stingl et al., 2006; Shackleton et al., 2006; Sleeman et al., 2007). These results led to the assumption that the mammary basal cell layer harbored multipotent stem cells responsible for adult gland homeostasis. However, recent lineage-tracing studies have revealed that, although early mammary progenitors display basal cell characteristics (they express basal cytokeratins, K5 and K14), in adult gland, luminal and basal mammary epithelial compartments are maintained by unipotent stem cells (Van Keymeulen et al., 2011; van Amerongen et al., 2012).

Integrins are heterodimeric trans-membrane receptors for extracellular matrix containing an  $\alpha$  and a  $\beta$  subunit. To date, eight  $\beta$  and 18  $\alpha$  subunits, which can assemble into 24 different integrins, with distinct ligand specificities, have been described (for review, see Hynes, 2002; Barczyk et al., 2011). Association of integrin cytoplasmic tail with intracellular adaptor proteins controls the ligand-binding activity of

integrins. Conversely, binding of the ligand leads to the activation of intracellular signaling events and the extracellular force-sensing increases integrin clustering leading to the amplification of biochemical cascades (Barczyk et al., 2011; DuFort et al., 2011). Integrins have been implicated in the control of stem cell maintenance and progenitor cell differentiation in different embryonic and adult tissues (reviewed in Raymond et al., 2009; Chen et al., 2013; Glukhova and Streuli, 2013). The  $\beta 1$ ,  $\beta 3$ ,  $\alpha 2$  and  $\alpha 6$ -integrin subunits are used to isolate stem and progenitor cells from luminal and basal layers of mouse mammary epithelium (Stingl et al., 2006; Shackleton et al., 2006; Asselin-Labat et al., 2007; Shehata et al., 2012). Deletion of  $\beta 1$ -integrins from luminal cells inhibits epithelial outgrowth development from transplanted mammary tissue fragments (Li et al., 2005). Specific deletion of  $\beta 1$ -integrins from basal layer affects self-renewal of mammary stem cells suggesting that  $\beta 1$ -integrins play an essential role in the maintenance of the mammary stem cell population (Taddei et al., 2008). However, the roles played by specific integrin dimers in mammary stem cells are not yet known. To study the contribution of laminin-binding integrins ( $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 1$  and  $\alpha 6\beta 4$ ) in the control of mammary stem cell activity, we employed a loss-of-function approach and deleted *itga3* and/or *itga6* genes from the mammary basal cells, using Cre-Lox system. Here, we show that laminin-binding integrins are essential for mammary stem cell activity, although  $\alpha 3\beta 1$  and  $\alpha 6$ -containing integrin dimers have partially redundant functions.

## RESULTS

### **$\alpha 3\beta 1$ integrin is deleted from the entire basal and part of luminal cell populations in K5Cre; *itga3*<sup>F/F</sup> mice**

To analyse the role played by  $\alpha 3\beta 1$  integrin in the control of the mammary stem/progenitor cell function, we made use of previously described mouse mutants presenting *itga3* gene deletion from the mammary basal cell layer: K5Cre; *itga3*<sup>F/F</sup> mice (Raymond et al., 2011). Mammary glands of these mice develop normally and produce milk after parturition, however, K5Cre; *itga3*<sup>F/F</sup> mice fail to lactate due to impaired contractile activity of basal myoepithelial cells leading to poor milk ejection from the gland (Raymond et al., 2011). Basal (CD31<sup>-</sup>/CD45<sup>-</sup>/CD24<sup>+</sup>/CD49<sup>HIGH</sup>) and luminal (CD31<sup>-</sup>/CD45<sup>-</sup>/CD24<sup>+</sup>/CD49<sup>LOW</sup>) cell populations were isolated from mammary glands of control, *itga3*<sup>F/F</sup>, and mutant, K5Cre; *itga3*<sup>F/F</sup>, adult virgin mice using flow cytometry cell sorting (Fig. 1A, Supplementary Fig. 1). As could be expected considering normal mammary development in K5Cre; *itga3*<sup>F/F</sup> mice, total amount of epithelial cells and the proportion between basal and luminal cell populations were similar in control and mutant mammary glands (Fig. 1A-C). Quantitative RT-PCR (Q-PCR) analysis revealed that the levels of *itga3* transcripts were about 10-fold lower in basal cells from mutant mice, indicating that *itga3* was efficiently deleted from the basal compartment of the mammary epithelium (Fig. 1D). In luminal cells of mutant mouse mammary glands, *itga3* levels were found three-fold reduced only, indicating that deletion from the luminal compartment was only partial (Fig. 1D).

To further analyse the distribution of  $\alpha 3\beta 1$ -deficient cells in mutant mammary epithelium, we crossed K5Cre and K5Cre; *itga3*<sup>F/F</sup> mice with Rosa26LacZ-reporter (R26R<sup>F/F</sup>) mouse strain. In K5Cre; *itga3*<sup>F/F</sup>; R26R<sup>F/+</sup> mutant epithelium, LacZ expression allows to monitor  $\alpha 3$  deletion. In line with previously published data, in control K5Cre; R26R<sup>F/+</sup> mice, all mammary basal cells and approximately 90% of luminal cells were X-gal-positive indicating that K5Cre-mediated recombination of conditional alleles happened in early mammary stem/progenitor cells (Moumen et al., 2012; Fig. 1E). As expected, all mammary basal cells of K5Cre; *itga3*<sup>F/F</sup>; R26R<sup>F/+</sup> mice were X-gal-positive, whereas luminal layer consisted of X-gal-positive and negative cells indicating that, in agreement with Q-PCR data,  $\alpha 3\beta 1$

integrin was deleted from all basal cells, whilst its deletion from luminal layer was only partial (Fig. 1E). This observation suggests that some early stem/progenitor cells escaped Cre-mediated recombination and gave rise to  $\alpha 3\beta 1$ -positive part of luminal cell population in mutant mouse mammary glands.

### **Mammary stem and progenitor cell activities are diminished in K5Cre; *itga3*<sup>F/F</sup> mouse mammary epithelial cells**

To analyse the effects of  $\alpha 3$  integrin deletion on luminal progenitor cell activity, we compared the capacities of luminal cells isolated from control (K5Cre; R26R<sup>F/+</sup>) and mutant (K5Cre; *itga3*<sup>F/F</sup>; R26R<sup>F/+</sup>) mouse glands to form colonies in 2D-culture. We found that more than half of the colonies formed by luminal cells isolated from mutant mouse glands were X-gal-positive, i.e., depleted of  $\alpha 3\beta 1$  integrin, and that the percentage of colony-forming cells (luminal progenitors) was decreased in mutant epithelium (Fig. 2A). These data suggest that the deletion of  $\alpha 3\beta 1$  integrin diminishes the capacity of luminal cells to form colonies.

Since the deletion of  $\alpha 3$  integrin from luminal layer was only partial, making the interpretation of the data difficult, we focused on the analysis of stem/progenitor activity in mammary basal cells. With this purpose, we performed 2D-colony formation, 3D-mammosphere and limiting dilution transplantation assays.

We found that the percentage of colony-forming cells in basal population isolated from K5Cre; *itga3*<sup>F/F</sup> mouse mammary epithelium was decreased approximately twofold (Fig. 2B). Double immunolabeling with anti-K5 and anti- $\alpha 3$  integrin antibodies confirmed that the colonies developed from K5Cre; *itga3*<sup>F/F</sup> basal cells consisted of  $\alpha 3\beta 1$ -depleted cells (Fig. 2C). Mammosphere assays (Spike et al., 2012) revealed that  $\alpha 3$ -depleted basal cells formed twice fewer spheres than control basal cells (Fig. 2D). Mammospheres derived from both control and mutant basal cells comprised basal (K5+) cells localised at the periphery of the spheres and luminal (K8+) cells localised more centrally. In  $\alpha 3$ -depleted mammospheres, basal cells formed a loose external layer, in contrast to the compact organization of control cells (Fig. 2E). To evaluate the regenerative potential of K5Cre; *itga3*<sup>F/F</sup> mouse mammary epithelium, basal cells isolated by flow cytometry from control and mutant glands were transplanted at limiting dilutions. The K5Cre; *itga3*<sup>F/F</sup> basal cells

were able to produce epithelial outgrowths, however, the take rate and the fat pad filling by the outgrowths were markedly lower compared to control grafts (Fig. 2F,G). The repopulating unit frequency in control and  $\alpha$ 3-depleted sorted basal cells were 1/77 (1/153-1/39) and 1/572 (1/1107-1/153), respectively (CI 95%,  $p = 1.77e-5$ ). Thus, in mutant mouse mammary gland, the number of functional stem cells was 7.4-fold lower than in control tissue.

Altogether, these data suggest that ablation of  $\alpha$ 3 $\beta$ 1 integrin leads to a decrease of luminal and basal clonogenic cell number and diminishes the basal stem cell activity.

#### ***Deletion of itga6 gene leads to a decrease of stem/progenitor cell activity of mammary basal epithelial cells***

To study the role played by  $\alpha$ 6-containing integrins ( $\alpha$ 6 $\beta$ 1 and  $\alpha$ 6 $\beta$ 4) in the control of mammary stem/progenitor function, we initially thought to use a strategy similar to that employed for  $\alpha$ 3 $\beta$ 1 integrin, i.e., conditional gene deletion *in vivo*. However, K5Cre;itga6<sup>F/F</sup> mice die shortly after birth due to epidermal blisters, making the analysis of adult glands impossible. Therefore, we deleted itga6 gene *in vitro* by transduction of sorted basal cells with adenovirus expressing the Cre-recombinase. To monitor itga6 deletion, we made use of the Rosa26LacZ-reporter (R26R) allele. Mammary basal cells were isolated from control (R26R<sup>F/+</sup>) mice and from animals carrying, in addition to R26R, conditional itga6 alleles (itga6<sup>F/F</sup>; R26R<sup>F/+</sup>), transduced with Ad-Cre and tested for stem and progenitor cell activities in 2D colony-formation, mammosphere and limiting dilution transplantation assays.

We found that the capacity of  $\alpha$ 6-depleted basal cells to form colonies and mammospheres was reduced (Fig. 3A,B). Q-PCR analysis of itga6 transcript levels in cells obtained from the mammosphere formed by Ad-Cre transduced control and mutant basal cells revealed that itga6 was efficiently deleted from itga6<sup>F/F</sup>; R26R<sup>F/+</sup> cells. Additionally, we found that itga3 expression was up-regulated in  $\alpha$ 6-depleted cells (Fig 3C). Transplantation of control and mutant basal cells at limiting dilutions revealed that the stem/progenitor activity was decreased in the absence of  $\alpha$ 6 subunit-containing integrin (Fig. 3D,E). Flow cytometry analysis of cell populations isolated from the outgrowths developed from  $\alpha$ 6-depleted basal cells confirmed the absence of this integrin chain in the transplants (Fig. 3F). Thus, the loss of  $\alpha$ 6-

containing integrins led to diminished stem/progenitor cell activity of mammary basal cells.

#### ***Simultaneous deletion of itga3 and itga6 genes abolishes stem/progenitor cell activity of mammary basal epithelial cells***

Our data suggest that depletion of  $\alpha$ 3 or  $\alpha$ 6 integrin chains affected mammary basal stem/progenitor cell activity only partially, suggesting that there might be a functional redundancy between  $\alpha$ 3 $\beta$ 1 and  $\alpha$ 6-containing integrins. Therefore, we isolated mammary basal cells from mice carrying conditional alleles for both  $\alpha$ 3 and  $\alpha$ 6 integrin chains (itga3<sup>F/F</sup>;itga6<sup>F/F</sup>;R26R<sup>F/+</sup>), deleted  $\alpha$ 3 and  $\alpha$ 6 *in vitro* and tested stem cell activity. The lack of laminin-binding integrins drastically diminished the capacity of basal cells to form colonies and mammospheres (Fig. 4A,B). Q-PCR analysis of dissociated mammospheres formed by itga3<sup>F/F</sup>;itga6<sup>F/F</sup>;R26R<sup>F/+</sup> Ad-Cre transduced basal cells, confirmed that both, itga3 and itga6, were deleted from basal cells (Fig. 4C). Strikingly,  $\alpha$ 3/ $\alpha$ 6-depleted basal cells possessed extremely low regenerative capacity as assessed by transplantation assay (Fig. 4D,E). Together these results indicate that laminin-binding integrins play a major role in the control of mammary stem/progenitor activity.

## **DISCUSSION**

A remarkable capacity of the mammary epithelium to regenerate mammary alveoli in repetitive pregnancies and repopulate mammary fat pad upon transplantation strongly suggests the existence of stem cells in this tissue, however, currently, our knowledge of the mechanisms that control mammary stem cell functions and composition of their niche are very limited. Cell populations enriched in clonogenic progenitors and regenerating stem cells can be isolated from the mammary epithelium due to their high surface expression levels of integrins indicating that extracellular matrix, and, in particular, major basement membrane constituents, laminins, may be important components of mammary stem cell microenvironment, the stem cell niche. In agreement with this notion, in this study, we show that laminin-binding integrins,  $\alpha$ 3 $\beta$ 1 and  $\alpha$ 6-containing heterodimers are essential for mammary stem/progenitor cell activity.

The regenerative potential of the mammary epithelium is associated with its basal

myoepithelial compartment. Therefore, to analyse stem and progenitor cells residing in the basal myoepithelial cell layer, we used the K5 promoter, which is active in basal cells of stratified epithelia (Ramirez et al., 2004). In contrast to K5Cre;itga6 mice that die shortly after birth, K5cre;itga3 mice are viable and fertile permitting the analysis of the phenotype resulting from  $\alpha 3$  deletion in early mammary progenitors. Interestingly, even though the mammary glands of K5cre;itga3 mice developed normally,  $\alpha 3$ -deficient basal cells isolated from these glands presented diminished clonogenic and regenerative capacities. Similarly, mammary basal cells depleted of  $\alpha 6$  integrin subunit *in vitro*, due to adenoviral Cre delivery, displayed reduced capacities to form colonies and mammospheres or to repopulate the cleared mammary fat pads. Only simultaneous deletion of both,  $\alpha 3$  and  $\alpha 6$  integrin subunits, resulted in a complete loss of functional stem and progenitor cells. These data clearly indicate functional redundancy of  $\alpha 3\beta 1$  and  $\alpha 6$ -containing integrins and underline the importance of laminins in the regulation of mammary stem cell activity.

An earlier report provided evidence that mammary epithelium could develop in the absence of  $\alpha 3\beta 1$  or  $\alpha 6$ -containing integrins (Klinowska et al., 2001). Our finding that the functions of these integrins are redundant, so that the absence of  $\alpha 6$ -chain can be at least partially compensated by  $\alpha 3\beta 1$ , and vice versa, are in agreement with the results of this study. However, in contrast to our work, the experimental approach employed by Klinowska et al., i.e., transplantation of mammary rudiments from embryos with the germline deletion of individual integrin chains, did not permit any quantitative evaluation of stem cell activity, such as the frequency of clonogenic and repopulating cells in tested populations. Additionally, analysis of mammary basal cells depleted of both  $\alpha 3$  and  $\alpha 6$  chains provided in our study, revealed that laminin-binding integrins are crucial for functional stem cells.

Our recent report has demonstrated that  $\alpha 3\beta 1$  integrin is essential for development of mammary tumors with basal-like characteristics in K5 $\Delta N\beta$ cat mice (Teuli  re et al., 2005; Moumen et al., 2013; Cagnet et al., 2013). We have found that stem cells are amplified in early mammary lesions of K5 $\Delta N\beta$ cat mice suggesting that in this model, mammary basal-like tumors may originate from basal stem/progenitor cells (Teuli  re et al., 2005; Moumen et al., 2013). Altogether, our findings, once again, point to a

similarity between the mechanisms that control normal stem cell function and tumorigenesis confirming that thorough analysis of the molecular mechanisms implicated in normal mammary development provides information useful for understanding of the disease.

Further work is required to address the question of how laminin-binding integrins control mammary stem cells. One of the most studied intermediates of integrin signaling is focal adhesion kinase (FAK). FAK activation has been found to be impaired in the mammary epithelium of K5cre;itga3 mice (Raymond et al., 2011). FAK is an essential regulator of cell survival and tumorigenesis (Guan, 2010). Surprisingly, a recent study implicated FAK in the control of mammary progenitors and indicated that FAK kinase activity is not important for mammary stem cell function (Luo et al., 2013). Integrins are well known modulators of RhoGTPase activities that in turn, control epithelial cell polarization, lumen formation during morphogenesis, centrosome positioning, spindle orientation during mitosis having an impact on the choice between symmetric versus asymmetric cell divisions (St Johnston and Sanson, 2011; Rodriguez-Fraticelli and Martin-Belmonte, 2013; Akhtar and Streuli, 2013). A recent study has demonstrated that ECM-induced cell confinement controls the acquisition of epithelial cell polarity, and that fine tuning of Rac1-RhoA balance and myosin-mediated contractility are essential for this process (Rodrigues-Fraticelli et al., 2012). Of note, the loss of  $\alpha 3$  from mammary basal cells led to impaired Rac1 activation, sustained phosphorylation of myosin light chains and a hypercontractile state (Raymond et al., 2011). Future studies will show whether these alterations of intracellular signalling are relevant to impaired stem cell properties of integrin-deficient mammary epithelial cells documented in our study.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We are particularly grateful to Dr. I. Grandjean and the personnel of the animal facilities at Institut Curie for taking care of the mice, to A. Di Cicco for technical assistance and to Z. Maciorowski, A. Viguier and S. Grondin for excellent assistance with FACS analyses. We also thank Drs. J.L. Jorcano and P. Soriano for providing mouse strains. The work was supported by *La Ligue Nationale Contre le Cancer* (Equipe Label  e 2009 and 2013) and a grant from *Agence Nationale de la Recherche* ANR-08-BLAN-0078-01 to MAG. SC received funding from *Association pour la Recherche sur*

le Cancer, AC, from Institut Curie and Servier Laboratories; MAG is Directeur de Recherche, KR is Chargé de Recherche at the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM).

## MATERIALS AND METHODS

### Mouse strains

All animal experiments were conducted in accordance with the French Veterinary guidelines and Council of Europe guidelines for experimental animal use (L358-86/609EEC). Transgenic mice expressing the Cre recombinase under the control of the K5 promoter (K5Cre) and the Rosa26LacZ reporter strain, carrying a loxP-stop-loxP-lacZ cassette, were kindly provided by Dr. J. Jorcane (Ramirez et al., 2004) and by Dr. P. Soriano (Soriano, 1999), respectively. The generation of mice carrying conditional  $\alpha 3$  integrin alleles (*itga3<sup>F/F</sup>*) or  $\alpha 6$  integrin alleles (*itga6<sup>F/F</sup>*) have been described elsewhere (Margadant et al., 2009; Niculescu et al., 2011). Unless indicated otherwise, mice of *itga3<sup>F/F</sup>* genotype served as control.

### Isolation of mammary basal epithelial cells and viral transduction

The inguinal mammary glands of three to four 6-month-old virgin females were pooled to prepare single-cell suspensions and cells were processed for flow cytometry as previously described (Stingl et al., 2006; Sleeman et al., 2007; Taddei et al., 2008). The following conjugated antibodies were used: anti-CD24-PE (clone M1/69; BD Pharmingen), anti-CD49f-FITC (clone GoH3; BD Pharmingen), anti-CD45-APC (clone 30-F11; Biolegend), anti-CD31-APC (clone MEC13.3; Biolegend). Labelled cells were analyzed and sorted on a FACSVantage flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA). Sorted basal cells were routinely reanalyzed and found to be at least 95 % pure. Cell viability was estimated by trypan blue exclusion and found to be between 80% and 87%. The full gating strategy used to sort mammary basal cells has been described elsewhere (Moumen et al., 2012).

For conditional deletion, freshly isolated basal cells were incubated with an adenovirus expressing the Cre recombinase (Ad-Cre) under the control of the CMV promotor (#1045, Vector BioLabs) at an MOI of 100 in 200 $\mu$ L of serum-free DMEM/F12 for 1 hour at 37°C.

### Transplantation assays

Indicated number of isolated basal cells in 10 $\mu$ L of 20% growth-factor-reduced matrigel (BD Biosciences) was implanted into the inguinal fat pads of 3-week-old nude BALB/c females cleared of endogenous epithelium as described elsewhere (Taddei et al., 2008). Mutant and control basal epithelial cells were grafted into two contralateral fat pads of the same recipient mouse, and the outgrowths were analyzed 10 weeks after transplantation. Repopulating unit frequency was calculated using the Extreme Limiting Dilution Analysis software (Hu et al., 2009).

### Whole-mount mammary gland analysis

For whole-mount X-gal staining, mammary glands were fixed in 2.5% paraformaldehyde in PBS, pH 7.5, for 1 hour at 4°C, and stained overnight at 30°C (Biology of the Mammary Gland, <http://mammary.nih.gov>).

For whole-mount Carmine Alum staining, dissected mammary glands were spread onto glass slides, fixed in a 1/3/6 mixture of acetic acid/chloroform/methanol and stained as described elsewhere (Teuliére et al., 2005).

X-Gal- or Carmin Alum- stained mammary glands were imaged on Leica MZ8 stereoscope while GFP-expressing mammary glands were visualized using a Leica M165FC fluorescent stereoscope.

### Cell Culture Assays

For the colony formation assay, freshly isolated basal cells were cultured for a week in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/F12 medium containing 1% fetal calf serum (FCS), B27 (GIBCO) at a density of 1,000 or 2,000 cells per 6-well (Shackleton et al., 2006). Sorted luminal cells were cultured at a density of 500 cells/well of a 6-well plate as previously described (Sleeman et al., 2007).

For the sphere formation assay, isolated basal cells were seeded on a ultra-low attachment 24-well plate (Corning) at a density of 5000 or 10000 cells/well for 2 weeks in DMEM/F12 medium supplemented with B27 (GIBCO), 20ng/mL EGF, (Invitrogen), 20 ng/mL bFGF (GIBCO), 4  $\mu$ g/mL heparin (Sigma-Aldrich), 10  $\mu$ g/mL insulin (Sigma-Aldrich) and 2% Matrigel (BD Pharmingen) as described elsewhere (Spike et al., 2012).

For cell culture assays, at least three independent experiments of three wells/genotype were analysed. The number and

the size of colonies and spheres were evaluated using ImageJ software. Structures with a diameter of less than  $1500\mu\text{m}^2$  were not counted.

#### **Immunofluorescence labeling**

Cells grown on glass coverslips or spheres collected using the Cytospin 4 cytocentrifuge preparation system (Thermo Electron Corporation), were processed for immunofluorescence labeling as previously described (Raymond et al., 2005). Cell nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole DAPI.

The primary antibodies used for immunofluorescence labeling are the following: mouse monoclonal anti- $\alpha$ 3 integrin (clones 29A3 and 158A3); rabbit polyclonal anti-K5, anti-K8 (Covance). All secondary antibodies and phalloidin were Alexafluor conjugated (Molecular Probes). The microphotographs shown were

acquired with Leica DM6000B microscope.

#### **Quantitative RT-PCR**

RNA was isolated from isolated basal cells with the RNeasy kit (Qiagen GmbH). Reverse transcription and quantitative PCR were performed as previously described (Chiche et al., 2013). The sequences of the primers used are provided in the Supplementary information. The values were normalized to glyceraldehyde phosphate dehydrogenase levels using CT methods.

#### **Statistical analysis**

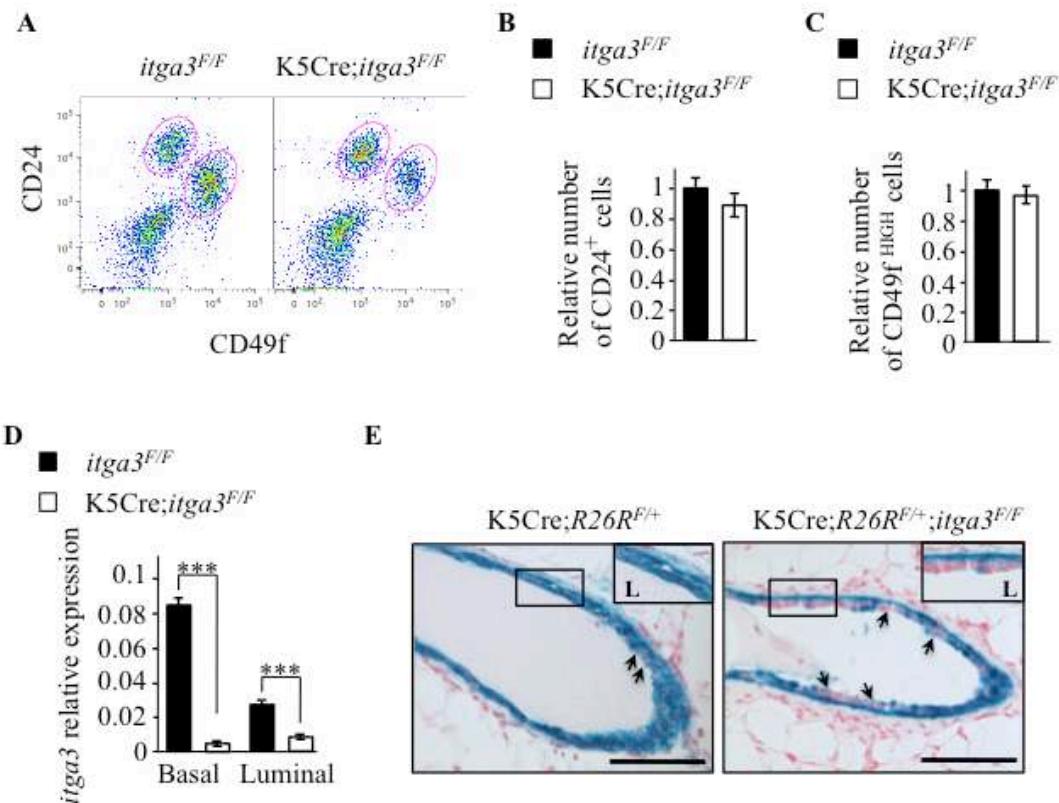
Statistical analysis was performed with Prism 4 software (GraphPad) using Mann-Whitney U test for the comparison of two groups. A value of \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  denoted statistical significance.

## **REFERENCES**

- Akhtar, N., and Streuli C. H. (2013). An integrin-ILK-microtubule network orients cell polarity and lumen formation in glandular epithelium. *Nat Cell Biol.* 15, 17-27.
- Asselin-Labat, M.L., Sutherland, K.D., Barker, H., Thomas, R., Shackleton, M., Forrest, N.C., Hartley, L., Robb, L., Grosveld, F.G., van der Wees, J., et al. (2007). Gata-3 is an essential regulator of mammary-gland morphogenesis and luminal-cell differentiation. *Nat Cell Biol.* 9(2),201-209.
- Barczyk, M., Carracedo, S., and Gullberg, D. (2011). Integrins. *Cell Tissue Res.* 455,339:269-80.
- Cagnet, S., Faraldo, M.M., Kreft, M., Sonnenberg, A., Raymond, K., and Glukhova, M.A. (2013). Signaling events mediated by a3b1 integrin are essential for mammary tumorigenesis. *Oncogene. In press.*
- Chen, S., Lewallen, M., and Xie, T. (2013). Adhesion in the stem cell niche: biological roles and regulation. *Development.* 140(2),255-265.
- Chiche, A., Moumen, M., Petit, V., Jonkers, J., Medina, D., Deugnier, M.A., Faraldo, M.M., and Glukhova, M.A. (2013). Somatic loss of P53 leads to stem/progenitor cell amplification in both mammary epithelial compartments, basal and luminal. *Stem Cells.*
- DuFort, C.C., Paszek, M.J., and Weaver, V.M. (2011). Balancing forces: architectural control of mechanotransduction. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 457,12:30819.
- Guan, J.L. (2010). Integrin signaling through FAK in the regulation of mammary stem cells and breast cancer. *IUBMB Life.* 62, 268-276.
- Hu, Y., and Smith, G.K. (2009). ELDA: extreme limiting dilution analysis for comparing depleted and enriched populations in stem cell and other assays. *J. Immunol. Methods.* 347, 70-78.
- Hynes, R.O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell.* 454,110:673-87.
- Klinowska, T. C., Alexander, C. M., Georges-Labouesse, E., Van der Neut, R., Kreidberg, J. A., Jones, C. J., Sonnenberg, A., and Streuli C. H. (2001). Epithelial development and differentiation in the mammary gland is not dependent on alpha 3 or alpha 6 integrin subunits. *Dev Biol.* 233, 449-467.
- Li, N., Zhang, Y., Naylor, M. J., Schatzmann, F., Maurer, F., Wintermantel, T., Schuetz, G., Mueller, U., Streuli, C. H., and Hynes, N. E. (2005). Beta1 integrins regulate mammary gland proliferation and maintain the integrity of mammary alveoli. *EMBO J.* 24, 1942-1953.
- Luo, M., Zhao, X., Chen, S., Liu, S., Wicha, M.S., and Guan, J.L. (2013) Distinct FAK activities determine progenitor and mammary stem cell characteristics. *Cancer Res.* 73(17),5591-5602.
- Margadant, C., Raymond, K., Kreft, M., Sachs, N., Janssen, H., and Sonnenberg, A. (2009). Integrin alpha3beta1 inhibits directional

- migration and wound re-epithelialization in the skin. *J. Cell Sci.* 122, 278-288.
- Moumen, M., Chiche, A., Deugnier, M.A., Petit, V., Gandarillas, A., Glukhova, M.A. and Faraldo, M.M. (2012). The proto-oncogene Myc is essential for mammary stem cell function. *Stem Cells.* 30(6), 1246-1254.
- Moumen, M., Chiche, A., Decraene, C., Petit, V., Gandarillas, A., Deugnier, M.A., Glukhova, M.A., and Faraldo, M.M. (2013). Myc is required for beta-catenin-mediated mammary stem cell amplification and tumorigenesis. *Molecular Cancer.* *in revision*.
- Niculescu, C., Ganguli-Indra, G., Pfister, V., Dupé, V., Messaddeg, N., De Arcangelis, A., and Georges-Labouesse E. (2011). Conditional ablation of integrin alpha-6 in mouse epidermis leads to skin fragility and inflammation. *Eur. J. Cell Biol.* 90, 270-277.
- Ramirez, A., Page, A., Gandarillas, A., Zanet, J., Pibre, S., Vidal, M., Tusell, L., Genesca, A., Whitaker, D.A., Melton, D.W., et al. (2004). A keratin K5Cre transgenic line appropriate for tissue-specific or generalized Cre-mediated recombination. *Genesis.* 39, 52-57.
- Raymond, K., Cagnet, S., Kreft, M., Janssen, H., Sonnenberg, A., and Glukhova, M.A. (2011). Control of mammary myoepithelial cell contractile function by alpha3 beta1 integrin signalling. *EMBO J.* 30, 1896-1906.
- Raymond, K., Deugnier, M.A., Faraldo, M.M., and Glukhova, M.A. (2009) Adhesion within the stem cell niches. *Curr Opin Cell Biol.* 21(5),623-629.
- Raymond, K., Kreft, M., Janssen, H., Calafat, J., and Sonnenberg, A. (2005). Keratinocytes display normal proliferation, survival and differentiation in conditional beta4-integrin knockout mice. *J. Cell Sci.* 118, 1045-1060.
- Rodriguez-Fraticelli, A.E., and Martin-Belmonte, F. (2013). Mechanical control of epithelial lumen formation. *Small GTPases.* 4(2),136-140.
- Rodriguez-Fraticelli, A.E., Auzan, M., Alonso, M.A., Bornens, M., and Martin-Belmonte, F. (2012) Cell confinement controls centrosome positioning and lumen initiation during epithelial morphogenesis. *J Cell Biol.* 198(6),1011-1023.
- Shackleton, M., Vaillant, F., Simpson, K.J., Stingl, J., Smyth, G.K., Asselin-Labat, M.L., Wu, L., Lindeman, G.J., and Visvader, J.E. (2006). Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature.* 439, 84-88.
- Shehata, M., Teschendorff, A., Sharp, G., Novcic, N., Russell, I.A., Avril, S., Prater, M., Eirew, P., Caldas, C., Watson, C.J., et al. (2012). Phenotypic and functional characterisation of the luminal cell hierarchy of the mammary gland. *Breast Cancer Res.* 14,R134.
- Sleeman, K.E., Kendrick, H., Robertson, D., Isacke, C.M., Ashwoth, A., and Smalley, M.J. (2007). Dissociation of estrogen receptor expression and in vivo stem cell activity in the mammary gland. *J. Cell Biol.* 176(1), 19-26.
- Soriano, P. (1999). Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat. Genet.* 21, 70-71.
- Spike, B.T., Engle, D.D., Lin, J.C., Cheung, S.K., La, J., and Wahl, G.M. (2012). A mammary stem cell population identified and characterized in late embryogenesis reveals similarities to human breast cancer. *Cell Stem Cell.* 10, 183-197.
- Stingl, J., Eirew, P., Ricketson, I., Shackleton, M., Vaillant, F., Choi, D., Li, H.I., and Eaves, C.J. (2006). Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells. *Nature.* 439(7079), 993-997.
- St Johnston, D., and Sanson, B. (2011). Epithelial polarity and morphogenesis. *Curr Opin Cell Biol.* 23(5),540-546.
- Taddei, I., Deugnier, M.A., Faraldo, M.M., Petit, V., Bouvard, D., Medina, D., Fässler, R., Thiery, J.P., and Glukhova, M.A. (2008). Beta1 integrin deletion from the basal compartment of the mammary epithelium affects stem cells. *Nat. Cell Biol.* 10, 716-722.
- Teulière, J., Faraldo, M.M., Deugnier, M.A., Shtutman, M., Ben-Ze'ev, A., Thiery, J.P., and Glukhova, M.A. (2005). Targeted activation of beta-catenin signalling in basal mammary epithelial cells affects mammary development and leads to hyperplasia. *Development.* 132, 267-277.
- Van Amerongen, R., Bowman, A.N., and Nusse, R. (2012). Developmental stage and time dictate the fate of Wnt/beta-catenin-responsive stem cells in the mammary gland. *Cell Stem Cell.* 11,387-400.
- Van Keymeulen, A., Rocha, A.S., Ousset, M., Beck, B., Bouvcourt, G., Rock, J., Sharma, N., Dekoninck, S., and Blanpain, C. (2011). Distinct stem cells contribute to mammary gland development and maintenance. *Nature.* 479,189-193.
- Visvader, J.E., Smith, G.H. (2011). Murine mammary epithelial stem cells: discovery, function, and current status. *Cold Spring Harbor perspectives in biology.* 3.

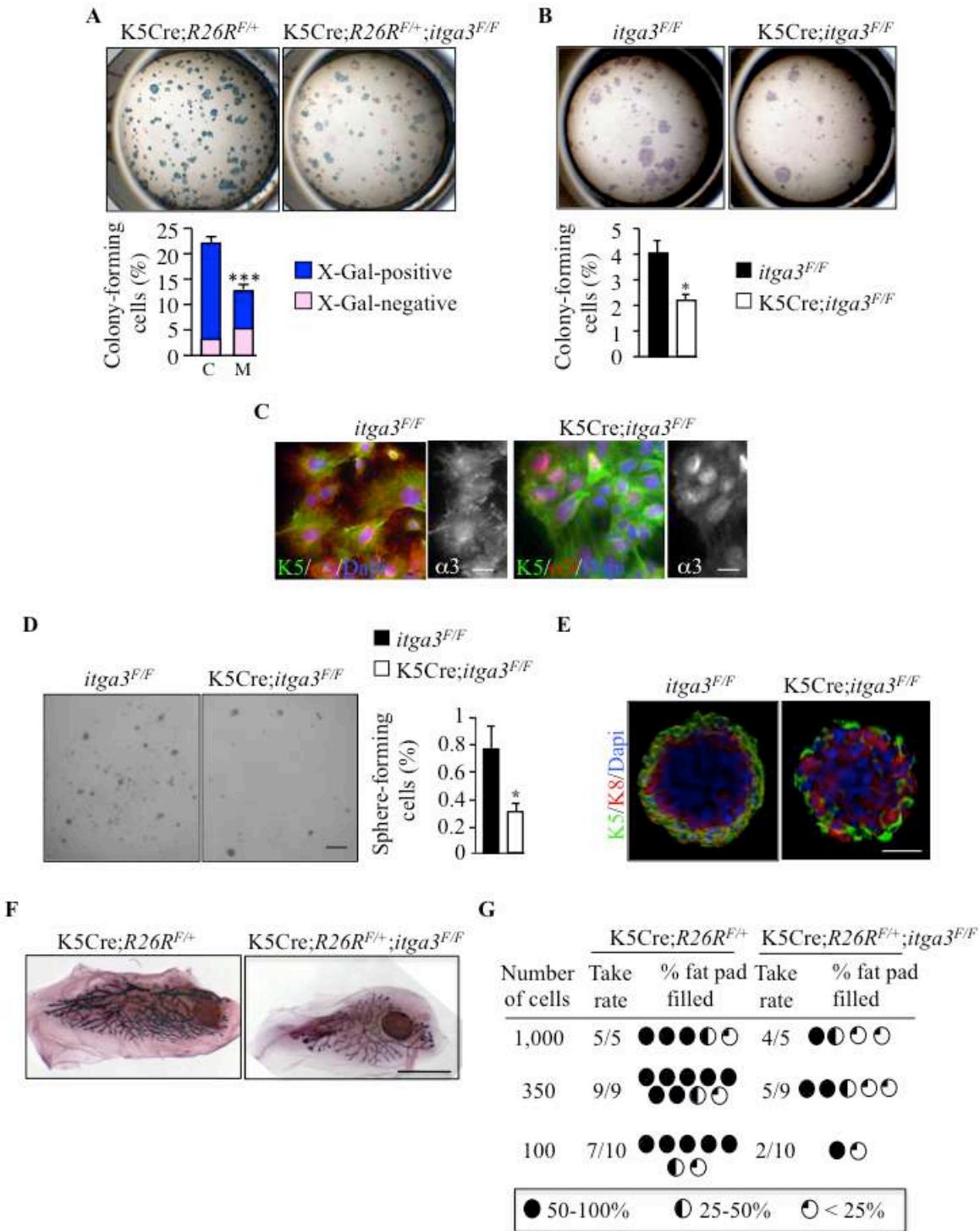
**Figure 1**



**Figure 1. Mammary epithelial cell populations in *K5Cre;itga3<sup>F/F</sup>* mice.**

(A) A representative flow cytometry dot plot illustrating isolation of basal and luminal epithelial cells from 6-month-old virgin control and *K5Cre;itga3<sup>F/F</sup>* mouse mammary glands. Red ovals limit basal ( $\text{CD31}^{\text{low}}/\text{CD45}^{\text{low}}/\text{CD24}^{\text{high}}/\text{CD49f}^{\text{HIGH}}$ ) and luminal ( $\text{CD31}^{\text{high}}/\text{CD45}^{\text{high}}/\text{CD24}^{\text{low}}/\text{CD49f}^{\text{LOW}}$ ) populations. (B) Histogram showing the relative number of  $\text{CD24}^{\text{+}}$  cells in the  $\text{CD31}^{\text{low}}/\text{CD45}^{\text{low}}$  cell population. The number of  $\text{CD24}^{\text{+}}$  cells isolated from control *itga3<sup>F/F</sup>* mouse mammary gland was arbitrarily set at 1. The values obtained in 19 independent cell-sorting experiments are shown as means  $\pm$  SEM. (C) Histogram showing the relative number of basal cells in sorted mammary epithelial cell populations. The number of basal cells isolated from control *itga3<sup>F/F</sup>* mouse mammary gland was arbitrarily set at 1. The values obtained in 19 independent cell-sorting experiments are shown as means  $\pm$  SEM. (D) Q-PCR analysis of *itga3* expression in mammary basal and luminal epithelial cells isolated from 6-month-old virgin mouse mammary glands. (E) Sections through 6-month-old virgin mouse mammary glands X-Gal-stained in whole-mount. Arrows point to X-Gal-negative luminal cells in control and mutant mouse mammary epithelium. L: lumen. Bar: 100  $\mu\text{m}$ .

**Figure 2**

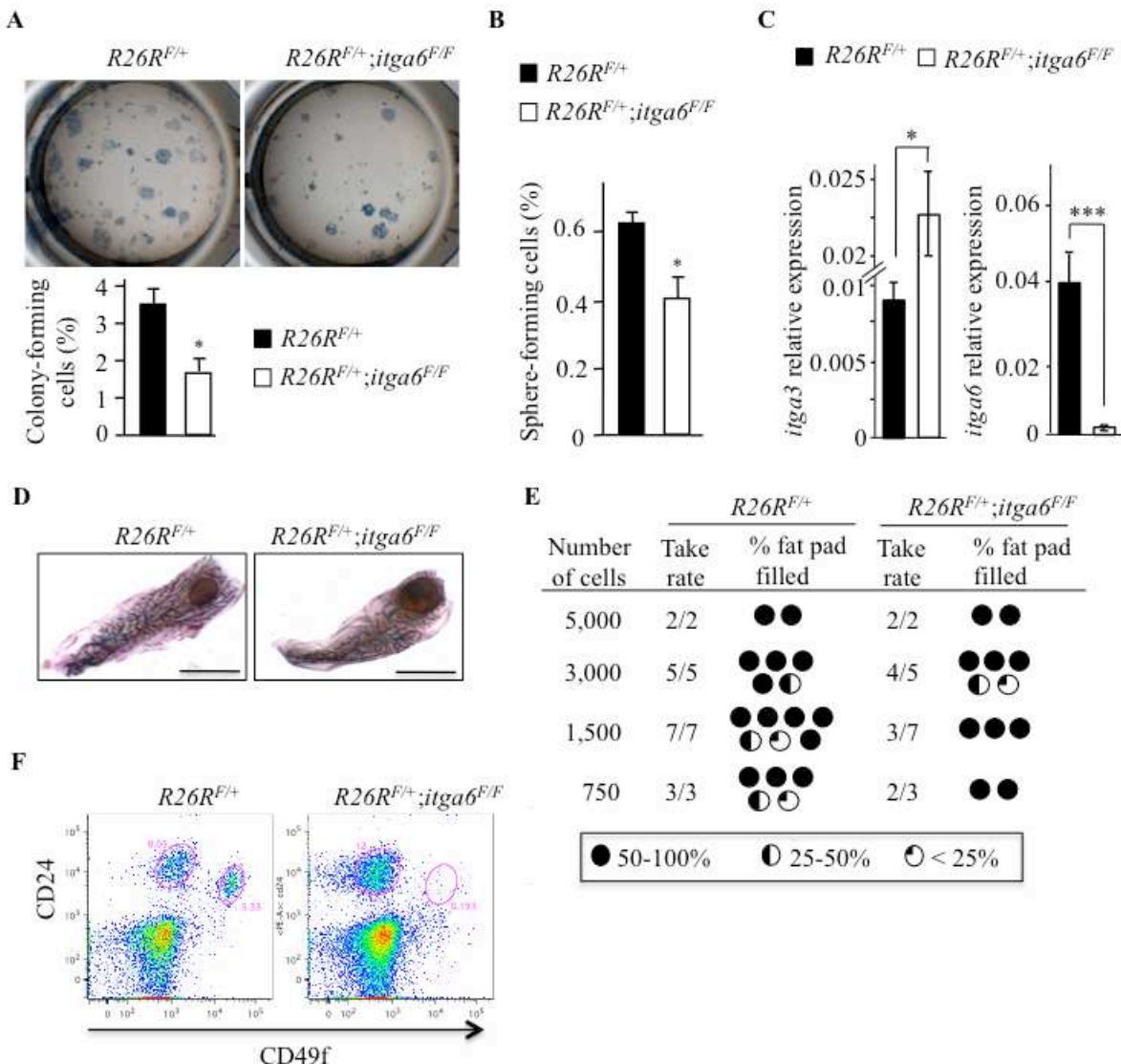


**Figure 2. Stem/progenitor cell activity is diminished in mammary luminal and basal cells from K5Cre;itga3<sup>F/F</sup> mice.**

(A) Colonies formed by 500 mammary luminal cells isolated from 6-month-old virgin control (K5Cre;R26R<sup>F/+</sup>) and mutant (K5Cre;itga3<sup>F/F</sup>;R26R<sup>F/+</sup>) mouse mammary glands. The values shown in the histogram represent the means  $\pm$  SEM obtained in 5 independent experiments. (B) Colonies formed by 1000 mammary basal cells isolated from 6-month-old virgin control (itga3<sup>F/F</sup>) and mutant (K5Cre;itga3<sup>F/F</sup>)

mouse mammary glands. The values shown in the histogram represent the means  $\pm$  SEM of 5 independent experiments. **(C)** Double immunofluorescence labelling of colonies formed by 1000 mammary basal cells isolated from 6-month-old virgin control and mutant mouse mammary glands with anti-k5 and anti- $\alpha$ 3-integrin antibodies. Red nuclear staining is nonspecific. Bar, 10 $\mu$ m. **(D)** Spheres formed by 5000 mammary basal cells isolated from 6-month-old virgin control and mutant mouse mammary glands. The values shown in the histogram represent the means  $\pm$  SEM of 5 independent experiments. Bar, 1 $\mu$ m. **(E)** Double immunofluorescence labelling of mammospheres derived from mammary basal cells isolated from 6-month-old virgin mouse mammary glands with anti-K5 and anti-K8 antibodies. Bar, 25  $\mu$ m. **(F)** Mammary epithelial outgrowths developed after transplantation of 350 basal cells isolated from 6-month-old virgin control ( $K5Cre;R26R^{F/+}$ ) and mutant ( $K5Cre;itga3^{F/F};R26R^{F/+}$ ) mouse mammary glands. Bar, 3 mm. **(G)** Take rate and fat pad filling in limiting dilution transplants of basal cells isolated from 6-month-old virgin mouse mammary glands.

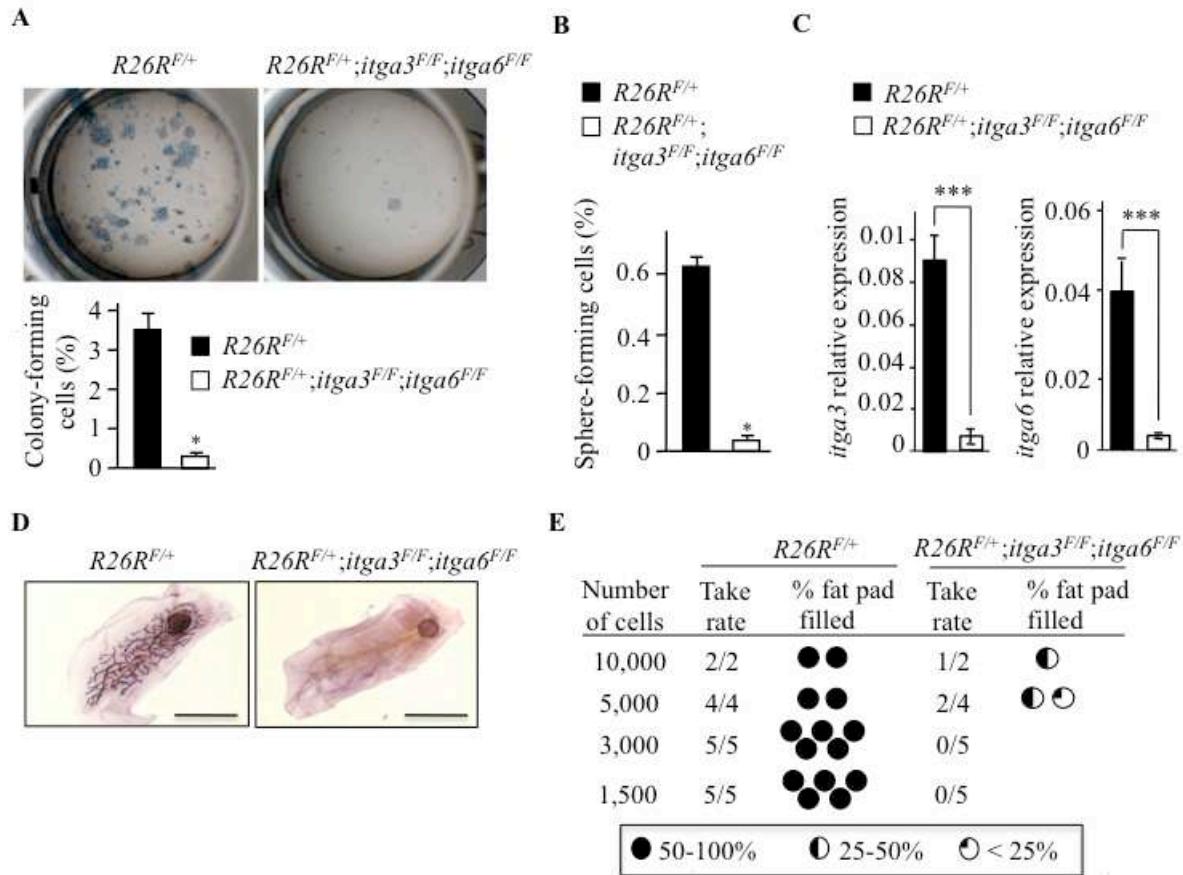
**Figure 3**



**Figure 3. Stem/progenitor cell activity is diminished upon deletion of *itga6* from mammary basal cells.**

(A) Colonies formed by 2000 control ( $R26R^{F/+}$ ) or  $\alpha 6$ -depleted ( $R26R^{F/+};itga6^{F/F}$ ) mammary basal cells isolated from 6-month-old virgin mouse mammary glands. The values shown in the histogram represent the means  $\pm$  SEM of 3 independent experiments. (B) Spheres formed by 10 000 control ( $R26R^{F/+}$ ) or  $\alpha 6$ -depleted ( $R26R^{F/+};itga6^{F/F}$ ) mammary basal cells isolated from 6-month-old virgin mouse mammary glands and transduced with Ad-Cre. The values shown in the histogram represent the means  $\pm$  SEM of 5 independent experiments. (C) Q-PCR analysis of *itga3* and *itga6* expression in cells isolated from the mammospheres developed from control ( $R26R^{F/+}$ ) and  $\alpha 6$ -depleted ( $R26R^{F/+};itga6^{F/F}$ ) basal cells. The values shown represent means  $\pm$  SEM of 3 independent experiments. (D) Mammary epithelial outgrowths developed after transplantation of 1500 control or  $\alpha 6$ -depleted basal cells. Bar, 3 mm. (E) Take rate and fat pad filling in limiting dilution transplantsations of control and  $\alpha 6$ -depleted basal cells. (F) Flow cytometry analysis of epithelial cell populations isolated from the outgrowths developed from grafted control and  $\alpha 6$ -depleted basal cells. Red ovals limit  $CD24^+ / CD49f^{LOW}$  and  $CD24^+ / CD49f^{HIGH}$  populations.

**Figure 4**



**Figure 4. Simultaneous deletion of *itga3* and *itga6* from mammary basal cells abolishes stem cell activity.**

(A) Colonies formed by 2000 mammary basal cells isolated from 6-month-old virgin mouse mammary glands. The values shown in the histogram represent the mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments. (B) Spheres formed by 10000 mammary basal cells isolated from 6-month-old virgin mouse mammary glands. The values shown in the histogram represent the mean  $\pm$  SEM of 5 independent experiments. (C) Q-PCR analysis of *itga3* and *itga6* expression in cells isolated from the mammospheres developed from control ( $R26R^{F/+}$ ) and  $\alpha 3$  and  $\alpha 6$ -depleted ( $R26R^{F/+}; itga3^{F/F}; itga6^{F/F}$ ) basal cells. The values shown represent means  $\pm$  SEM of 3 independent experiments. (D) Mammary fat pads transplanted with 1500 control ( $R26R^{F/+}$ ) or  $\alpha 3$  and  $\alpha 6$ -depleted ( $R26R^{F/+}; itga3^{F/F}; itga6^{F/F}$ ) basal cells. (E) Take rate and fat pad filling in limiting dilution transplants of control or  $\alpha 3$  and  $\alpha 6$ -depleted basal cells. Bar in (D): 3 mm.

## SUPPORTING INFORMATION

### Supplemental Material and Methods

#### List of primers for q-PCR

*gapdh-s*: 5'- CCAATGTGTCCGTCGTGGATC - 3'

*gapdh-as*: 5'- GTTGAAGTCGCAGGAGACAAC - 3'

*cre-s*: 5'- TTCCCGCAGAACCTGAAGAT - 3'

*cre-as*: 5'- GCCGCATAACCAGTGAAACA - 3'

*krt14-s*: 5'- CGGCAAGAGTGAGA TTTCTG -3'

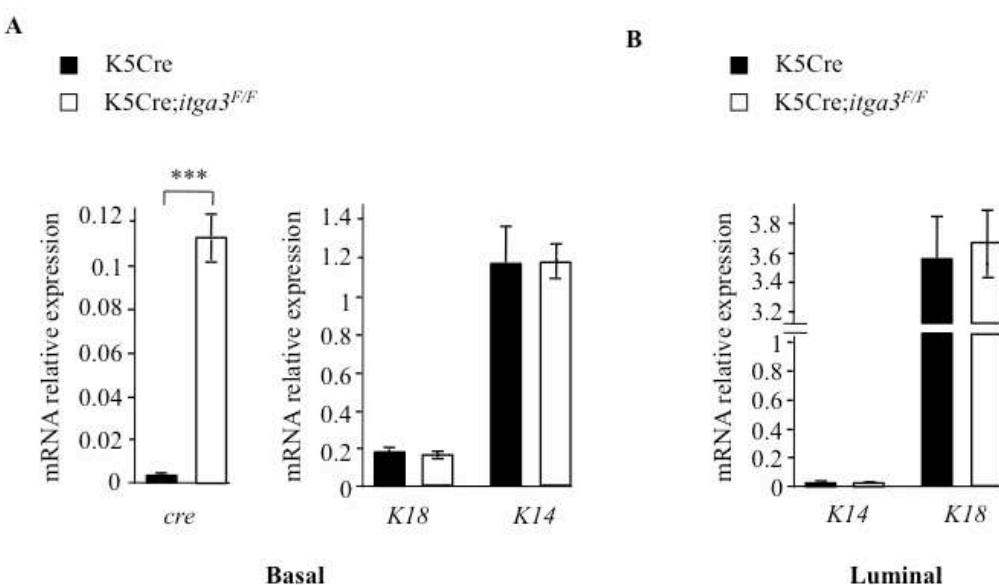
*krt14-as*: 5'- TCCAGCAGGATTGTACTG - 3

*krt18-s*: 5'- CCTTGCCGCCGATGACTTTA - 3'

*krt18-as*: 5'- CAGCCTTGTGATGTTGGTGT - 3'

Other primers were purchased from SABiosciences/Qiagen.

Supplementary Figure 1



**Figure S1. Isolation of basal and luminal cell populations from 6-month-old virgin control and K5Cre;itga3<sup>F/F</sup> mouse mammary glands by flow cytometry.**

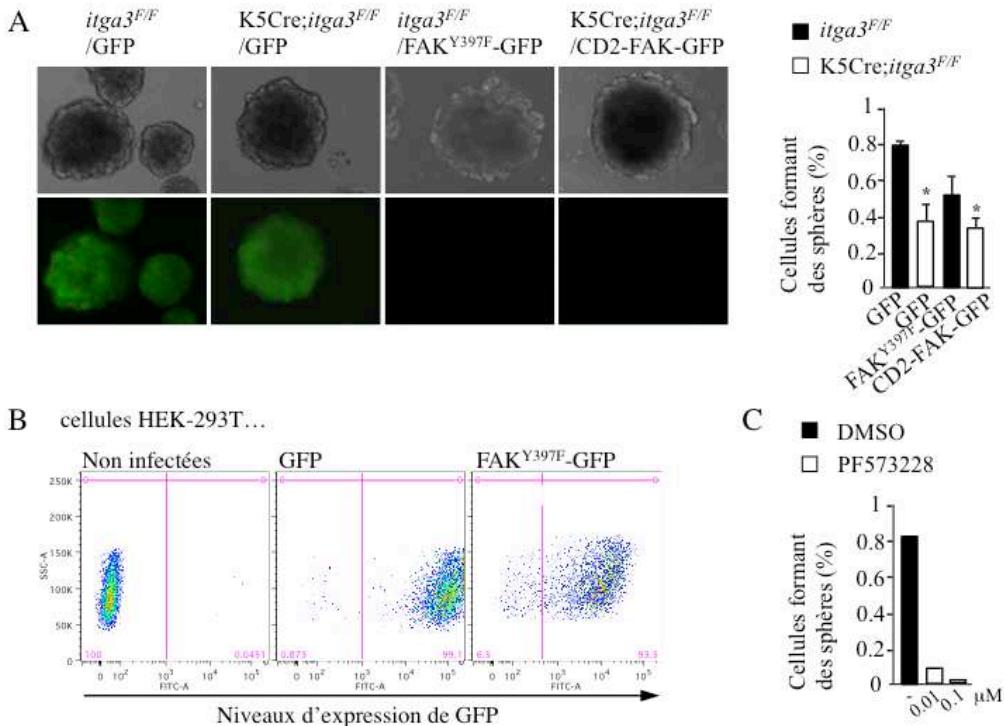
Q-PCR analysis of cre-recombinase (*cre*), K14 and K18 expression in isolated basal (A) and luminal (B) cell populations. The values shown in the histograms represent means  $\pm$  SEM of 11 independent cell sorting experiments.

### 3.2.4. L'activité des cellules souches/progénitrices mammaires est contrôlée par l'activité de FAK

Nous avons montré précédemment que, comparée aux extraits de glandes contrôles, l'activité de FAK est réduite dans les extraits isolés à partir de glandes mammaires K5Cre;*itga3<sup>F/F</sup>* (Raymond et al., 2011). Pour déterminer si l'activité de FAK joue un rôle dans le maintien du potentiel régénératif de l'épithélium mammaire en aval de l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$ , nous avons analysé les capacités régénératrices (i) des cellules basales contrôles (*itga3<sup>F/F</sup>*) transduites à l'aide d'un lentivirus exprimant le mutant non phosphorylable de FAK, FAK<sup>Y397F</sup>-GFP, et (ii) des cellules basales mutantes (K5Cre;*itga3<sup>F/F</sup>*) transduites à l'aide d'un lentivirus exprimant une forme constitutivement active de FAK, CD2-FAK-GFP. Comme contrôle, les cellules basales contrôles et mutantes ont été transduites avec le lentivirus de la GFP seule.

Les cellules basales contrôles traitées avec le lentivirus FAK<sup>Y397F</sup>-GFP ne développent qu'un peu moins de mammosphères que les cellules basales contrôles transduites avec la GFP seule ([Fig 30A](#)). Cependant, de façon surprenante, alors que plus de 80% des mammosphères formées à partir des cellules basales *itga3<sup>F/F</sup>*/GFP et K5Cre;*itga3<sup>F/F</sup>*/GFP sont GFP-positives, aucune des mammosphères développées par les cellules *itga3<sup>F/F</sup>*/FAK<sup>Y397F</sup>-GFP n'exprime la GFP ([Fig 30A](#)). Afin de vérifier le titre et la qualité des suspensions lentivirales utilisées, les cellules HEK-293T ont été infectées avec le même lot de particules virales. L'analyse par cytométrie de flux des niveaux de GFP 48h après infection montre que les cellules HEK-293T infectées expriment des niveaux relativement élevé de GFP ([Fig 30B](#)). Ensembles, ces résultats suggèrent que les mammosphères qui se développent à partir des cellules *itga3<sup>F/F</sup>*/FAK<sup>Y397F</sup>-GFP sont celles qui échappent à la transduction lentivirale et donc à l'inhibition de l'activité FAK. En corrélation avec ces données, l'inhibition pharmacologique de l'activité de FAK avec des doses croissantes d'inhibiteur PF573228 abolit la capacité des cellules basales isolées contrôles à former des mammosphères ([Fig 30C](#)).

Le traitement des cellules K5Cre;*itga3<sup>F/F</sup>* avec le lentivirus CD2-FAK-GFP ne restaure pas le potentiel clonogénique. Cependant, aucune mammosphère n'est GFP-positive ([Fig 30A](#)), suggérant que seules les mammosphères qui échappent à la transduction lentivirale se développent et que le vecteur lentiviral CD2-FAK induit des niveaux d'expression de FAK trop élevés pour permettre la survie des cellules basales infectées.

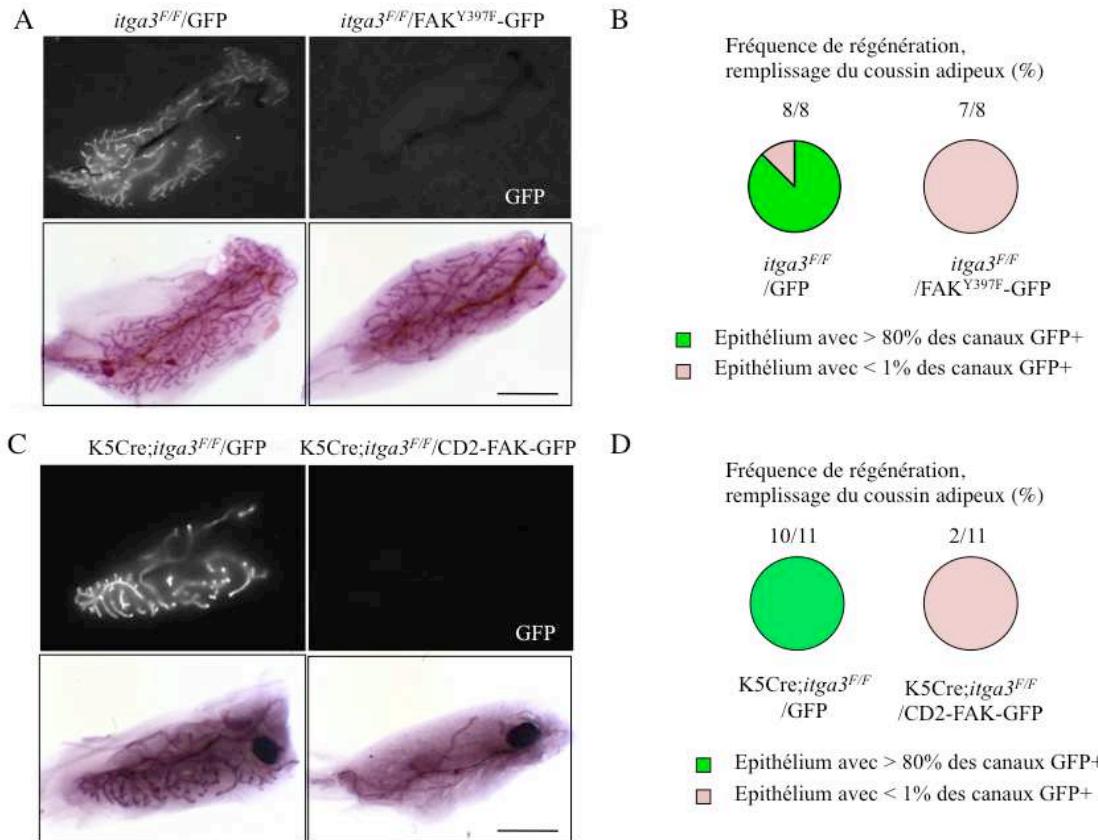


**Figure 30. Le développement de mammosphères à partir de cellules basales isolées requiert l'activation de FAK.**

(A) Mammosphères formées par 5 000 cellules basales transduites avec un lentivirus exprimant la GFP, le mutant FAK<sup>Y397F</sup>-GFP ou le mutant CD2-FAK-GFP. Les valeurs montrées dans l'histogramme représentent la moyenne +/- SEM de 3 expériences indépendantes. (B) Efficacité de transduction lentivirale des cellules HEK-293T à l'aide des lentivirus exprimant la GFP et FAK<sup>Y397F</sup>-GFP à une MOI de 5. (C) Histogramme montrant le pourcentage de mammosphères formées par 5 000 cellules basales mammaires traitées avec différentes doses d'inhibiteur FAK. Les valeurs d'une expérience représentative sont montrées.

Afin de déterminer si l'activité des cellules souches basales est affectée par les modifications de l'activité de FAK, des cellules basales *itga3<sup>F/F</sup>*/GFP et *itga3<sup>F/F</sup>*/FAK<sup>Y397F</sup>-GFP ont été transplantées dans le coussin adipeux de souris immunodéficientes. En parallèle, des cellules basales K5Cre;*itga3<sup>F/F</sup>*/GFP et K5Cre;*itga3<sup>F/F</sup>*/CD2-FAK-GFP ont été transplantées. Le potentiel régénératif de ces cellules a ensuite été analysé 10 semaines après transplantation.

Comparées aux cellules basales contrôles *itga3<sup>F/F</sup>*/GFP, le potentiel régénératif des cellules basales *itga3<sup>F/F</sup>*/FAK<sup>Y397F</sup>-GFP n'est que faiblement diminué. Cependant, l'épithélium mammaire régénéré à partir des cellules basales *itga3<sup>F/F</sup>*/FAK<sup>Y397F</sup>-GFP n'exprime pas la GFP, suggérant qu'elles proviennent de cellules basales ayant échappées à la transduction lentivirale et donc à l'inhibition de l'activité de FAK (Fig 31A,B). De plus, aucune régénération épithéliale n'est observée après transplantation de cellules basales mutantes exprimant CD2-FAK-GFP (Fig 31A).



**Figure 31.** Le potentiel régénératif des cellules souches/progénitrices mammaires requiert l’activation de FAK.

(A) Régénération épithéliale développée après transplantation de 200 cellules basales isolées transduites avec un lentivirus exprimant la GFP, et le mutant FAK<sup>Y397F</sup>-GFP. (B) Fréquence de régénération et proportion de régénération en fonction du pourcentage du coussin adipeux rempli par les greffons après transplantation de 200 cellules basales isolées transduites avec un lentivirus exprimant la GFP, et le mutant FAK<sup>Y397F</sup>-GFP. (C) Régénération épithéliale développée après transplantation de 200 cellules basales isolées transduites avec un lentivirus exprimant la GFP et le mutant CD2-FAK-GFP. (D) Fréquence de régénération et proportion de régénération en fonction du pourcentage du coussin adipeux rempli par les greffons après transplantation de 200 cellules basales isolées transduites avec un lentivirus exprimant la GFP et le mutant CD2-FAK-GFP. Echelle en (A) et (C) : 3000 µm.

Ensembles, nos résultats suggèrent que l’activité de l’effecteur des intégrines, FAK, joue un rôle majeur dans le maintien de l’activité des cellules souches/progénitrices mammaires. Ainsi, les intégrines liant les laminines pourraient réguler l’activité des cellules souches/progénitrices mammaires en jouant de manière fine sur l’activité de FAK. En effet, nos données suggèrent qu’un certain niveau d’activation de FAK est requis pour maintenir l’activité des cellules souches/progénitrices mammaires.

## **DISCUSSION ET PERSPECTIVES**

Le développement de traitements du cancer du sein reste encore limité par le manque de connaissance des mécanismes moléculaires et cellulaires responsables du développement et de la tumorigénèse mammaires. Les intégrines ont été impliquées dans la régulation d'un grand nombre de processus cellulaires. Elles participent au développement de nombreuses pathologies et notamment à la tumorigénèse mammaire (White et al., 2004 ; Guo et al., 2006 ; Huck et al., 2010 ; Lahliou & Muller, 2011 ; Akhtar & Streuli, 2013). Les intégrines liant la laminine en particulier ont été impliquées dans les différentes étapes du développement tumoral et de la progression métastatique.

Dans ce contexte, mon travail de thèse a porté sur l'étude du rôle joué par les interactions entre les intégrines liant la laminine (dimère contenant les sous-unités  $\alpha 3$  et/ou  $\alpha 6$ ) et les cellules épithéliales basales dans le développement et la tumorigénèse mammaires.

Notre stratégie expérimentale a consisté à analyser le phénotype mammaire des souris dépourvues d'intégrine  $\alpha 3$  et/ou  $\alpha 6$  dans le compartiment basal de l'épithélium mammaire.

## I. LES EVENEMENTS DE SIGNALISATION REGULES PAR L'INTEGRINE $\alpha 3\beta 1$ SONT ESSENTIELS A LA LACTATION

Nos résultats indiquent que les femelles présentant une inactivation du gène *itga3* dans la couche basale de l'épithélium mammaire présentent une morphogenèse et une différenciation fonctionnelle de la glande mammaire normale. Cependant, ces souris sont incapables de nourrir leur descendance, indiquant un défaut de lactation. L'observation macroscopique des glandes mutantes révèle la présence de canaux dilatés remplis de lait suggérant que l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  joue un rôle dans la contractilité des cellules myoépithéliales, permettant l'expulsion du lait des alvéoles sécrétrices vers le mamelon.

Afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires aboutissant à ce phénotype, nous avons utilisé une lignée de cellules myoépithéliales porteuse des allèles conditionnels pour  $\alpha 3$  (MEC- $\alpha +$ ) dans laquelle nous avons inactivé l'intégrine  $\alpha 3$  à l'aide d'un adénovirus permettant l'expression de la recombinase Cre (MEC- $\alpha 3 -$ ). Les propriétés contractiles de ces cellules ont été analysées par vidéomicroscopie en temps réel. Nos résultats indiquent que l'engagement de

l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  induit l'activation de la voie de signalisation FAK/Rac1/PAK1 menant à l'inhibition de la MLCK, et favorisant le retour des cellules myoépithéliales vers un état de relaxation nécessaire pour accomplir la contraction suivante, en réponse à la stimulation pulsatile de l'OT.

Les cellules myoépithéliales mammaires expriment plusieurs dimères d'intégrines différents. Ainsi, la perte de l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  dans les cellules myoépithéliales aurait pu être compensée par la surexpression d'une autre intégrine, dont l'activation aurait induit le phénotype observé. Par exemple, une étude récente montre que l'intégrine  $\alpha v$  régule la contractilité des cellules musculaires lisses de vessie humaine via FAK (Luo et al., 2013a). Cependant, nos analyses des niveaux d'expression des différents dimères d'intégrines présents dans les cellules myoépithéliales n'ont révélé aucun changement majeur, en absence de l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$ . Ainsi, le phénotype observé est bien induit par l'absence d'intégrine  $\alpha 3\beta 1$ , qui contrôle l'activation de la voie Rac1/PAK1 permettant la relaxation des cellules myoépithéliales.

Notre étude montre que la perte de l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  ne régule pas la contractilité cellulaire en modifiant l'activation de la voie Rho/ROCK, mais favorise la relaxation des cellules myoépithéliales en modulant la voie Rac/PAK. Au contraire, une étude récente a montré que la déstabilisation de ICAP-1 dans les cellules endothéliales induit l'activation de l'intégrine  $\beta 1$ , qui régule la voie de signalisation Rho/ROCK et augmente la contractilité cellulaire (Faurobert et al., 2013). Ces résultats suggèrent que selon le type cellulaire, les différents hétérodimères d'intégrines constituant la famille  $\beta 1$  peuvent réguler positivement ou négativement la contraction cellulaire en modulant les voies Rho et/ou Rac.

Plusieurs études ont montré que PAK est capable de phosphoryler directement la MLCK, provoquant son inhibition et le relâchement des fibres de stress (Wirth et al., 2003 ; Gonzalez-Forero et al., 2012 ; Kelly et al., 2013). Nos expériences suggèrent que c'est également le cas dans les cellules myoépithéliales. L'inhibition de la MLCK par PAK pourrait impliquer des effecteurs en aval de PAK tels que LIM kinase (LIMK), ou p38 MAPK, qui ont été précédemment impliquée dans la régulation du cytosquelette d'actine et la contractilité cellulaire (Tang & Anfinogenova, 2008 ; Gerthoffer, 2008 ; Galan Moya et al., 2009 ; Kelly et al., 2013).

La contraction cellulaire est provoquée par la mécanotransduction des forces générées par le réseau d’actomyosine, la polymérisation de l’actine à la périphérie cellulaire et la liaison des filaments d’actine à la MEC via les intégrines, au niveau des adhésions focales. Les mécanismes moléculaires impliqués dans ce processus ne sont pas bien déterminés. Le remodèlement du cytosquelette d’actine induit par la contraction cellulaire provoquerait l’engagement des intégrines à la membrane. Les adhésions focales formées, permettraient de réguler la transmission des forces entre les cellules et la MEC (Gunst & Zhang, 2008 ; Geiger et al., 2009 ; Vicente-Manzanares et al., 2009). Des études ont par exemple montré que FAK joue un rôle important dans la transmission des forces via l’activation de la voie Rho/ROCK (Wozniak et al., 2003 ; Tilghman & Parsons, 2008 ; van Miltenburg et al., 2009). Notre étude est la première à mettre en évidence *in vivo* que les événements de signalisation modulés par une intégrine particulière, l’intégrine  $\alpha 3\beta 1$ , contrôlent l’amplitude et la durée des forces développées par l’appareil cellulaire contractile, en réponse à l’OT. Ce rôle est spécifique de l’intégrine  $\alpha 3\beta 1$  et implique des événements de signalisation dépendants de la voie Rac.

## **II. LES EVENEMENTS DE SIGNALISATION REGULES PAR L’INTEGRINE $\alpha 3\beta 1$ SONT ESSENTIELS A LA TUMORIGENÈSE MAMMAIRE**

Nous avons montré que l’absence d’intégrine  $\alpha 3\beta 1$  dans la couche basale de l’épithélium mammaire bloque la tumorigenèse dans le modèle murin de carcinogenèse de type basal développé par le laboratoire (souris K5 $\Delta$ N $\beta$ cat, Teuliere et al., 2005 ; Moumen et al., in revision). Nous avons réalisé des expériences à l’aide d’une lignée de cellules basales mammaires tumorigénique MEC. La délétion de l’intégrine  $\alpha 3\beta 1$  dans cette lignée ( $\alpha 3$ KO-MEC) abolit la capacité des cellules MEC à proliférer en milieu semi-solide, réduit fortement leur capacité à proliférer en 3D Matrigel et à développer des tumeurs après injection orthotopique. Nos résultats suggèrent que l’activation de voies de signalisation en aval de l’intégrine  $\alpha 3\beta 1$ , et impliquant la voie Rac1/PAK1 et les kinases MAPK et JNK, favorise les signaux prolifératifs et de survie requis pour le développement tumoral.

Bien que plusieurs dimères d’intégrine soient exprimés à la surface des cellules épithéliales mammaires, il apparaît qu’aucun ne peut se substituer à l’intégrine  $\alpha 3\beta 1$  pour induire

la tumorigénèse, faisant de l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  une cible de choix dans le cadre d'une thérapie anti-tumorale. Les effets pro-prolifératifs et de survie de la protéine MAPK et de la voie de signalisation FAK/JNK sont bien établis (Oktay et al., 1999 ; Luo & Guan, 2010 ; Roskoski, 2012). Cependant, l'importance des intégrines, et en particulier de l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  dans l'activation de ces voies de signalisation intracellulaires reste peu documentée. Dans les kératinocytes, l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  permet d'activer FAK/Src et Rac1 menant à l'extension de lamellipodes polarisés (Choma et al., 2004 ; Choma et al., 2007) et favorise la survie des cellules en absence de sérum via l'activation de FAK et MAPK (Manohar et al., 2004). Notre étude met en évidence l'implication de l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  dans la régulation des voies FAK/Rac1/PAK1, MAPK et JNK menant à la survie et la prolifération des cellules tumorales.

Une étude précédente a montré que l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  est exprimée dans une lignée de cellules épithéliales mammaires tumorales présentant une activation de la voie de signalisation Wnt, les cellules MDA-MB-231. L'injection sous-cutanée de ces cellules mène au développement de carcinomes mammaires de type basal et à la formation de métastases. L'absence de l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  dans ces cellules n'altère pas la prolifération et la survie cellulaires mais inhibe la migration des cellules tumorales vers un nouveau site (Mitchell et al., 2010). Ainsi, ces résultats et les nôtres suggèrent que l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  peut influencer différentes étapes du développement tumoral. Dans nos expériences, la délétion de l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  survient avant apparition des tumeurs, dans les souris K5 $\Delta N\beta$ cat. Afin de déterminer si l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  contribue à la croissance tumorale, il serait intéressant d'inactiver l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  une fois les tumeurs développées.

La voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine a été impliquée dans l'autorenouvellement des MaSC murines et humaines (Korkaya et al., 2009 ; Zeng & Nusse, 2010 ; Incassati et al., 2010). Dans notre modèle murin K5 $\Delta N\beta$ cat, la présence d'une forme activée de la  $\beta$ -caténine induit le développement de lésions constituées par l'amplification de cellules basales indifférenciées (kératine 5-positives,  $\alpha$ SMA-négatives) (Teuliére et al., 2005), suggérant que les tumeurs de type basal développées par ces souris auraient pour origine les cellules souches/progénitrices présentes dans le compartiment basal mammaire. Notre laboratoire a précédemment montré que les intégrines de la famille  $\beta 1$  sont essentielles à l'activité des cellules souches/progénitrices mammaires (Taddei et al., 2008). Ainsi, l'absence de développement tumoral observé dans les

souris K5ΔN $\beta$ cat après déletion de l'intégrine  $\alpha 3$  pourrait être due à une altération de l'autorenouvellement des cellules souches/progénitrices mammaires, induisant la perte des MaSC ciblées par la transformation néoplasique. En effet, les défauts d'activation des protéines FAK, MAPK et JNK induits par l'absence d'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  pourraient compromettre la survie des cellules souches/progénitrices mammaires présentes dans le compartiment basal mammaire. Des études ont montré que l'inactivation de la protéine FAK inhibe la prolifération des cellules épithéliales mammaires *in vitro* (Wozniak et al., 2003 ; Walker & Assoian, 2005 ; Tilghman & Parsons, 2008), et *in vivo* en réduisant les niveaux de phosphorylation de Erk et les niveaux d'expression de cycline D1 (Nagy et al., 2007 ; Kelly & Chernoff, 2011). De plus, la protéine PAK a été impliquée dans la phosphorylation de plusieurs kinases des voies MEK/ERK, JNK et Akt favorisant la prolifération cellulaire et la survie cellulaire (Kelly et al., 2013).

Des études antérieures ont suggéré que les tumeurs mammaires de type basal, associées à une mutation du gène *Brcal*, auraient pour origine les progéniteurs luminaux (Lim et al., 2009 ; Molyneux et al., 2010). Cependant, les données obtenues avec notre modèle murin K5ΔN $\beta$ cat suggèrent que certains sous-types de tumeurs mammaires de type basal peuvent également avoir pour origine des cellules souches/progénitrices basales (Moumen et al., in revision).

Les voies FAK et Wnt/ $\beta$ -caténine interagissent dans différents types cellulaires. Par exemple, l'association directe de FAK avec la  $\beta$ -caténine permet la stabilisation de cette dernière et favorise sa translocation nucléaire dans les ostéoclastes murins (Fonar & Frank, 2011). L'activation de la voie FAK peut également être induite par la voie Wnt/ $\beta$ -caténine afin de favoriser la régénération de l'intestin et le développement de tumeurs colorectales (Ashton et al., 2010). Aucune modification significative de l'activité transactivatrice de la  $\beta$ -caténine n'apparaît dans nos expériences de gènes rapporteurs, en absence d'intégrine  $\alpha 3\beta 1$ . Cependant, nous utilisons une forme constitutivement active de la  $\beta$ -caténine qui peut donc être transloquée dans le noyau sans l'aide de FAK. Dans notre modèle murin K5ΔN $\beta$ cat, les niveaux d'expression de l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  sont trouvés élevés dans les lésions mammaires (Faraldo M.M., communication personnelle), suggérant que l'activation de l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  est induite en aval de la voie  $\beta$ -caténine. De part le rôle joué dans l'activation de FAK, l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  représente une cible thérapeutique de choix, dans le traitement des tumeurs mammaires présentant une surexpression de FAK.

Il a récemment été rapporté que l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  contribue au développement tumoral dans la peau, en favorisant le renouvellement de l'épiderme (Sachs et al., 2012). De plus, une étude précédente a montré que la voie Rac/PAK est essentielle au développement tumoral dans le modèle murin de carcinome mammaire ErbB2 et induit l'activation de Erk et Akt (Arias-Romero et al., 2010). Ces expériences suggèrent que les effets pro-tumorigéniques de l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$ , via l'activation de la voie Rac/PAK, ne sont pas restreints à l'épithélium mammaire mais feraient de l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  une cible thérapeutique potentielle dans le traitement de plusieurs types de cancers (Subbaram & Dipersio, 2011).

### **III. LES INTEGRINES LIANT LA LAMININE CONTROLENT L'ACTIVITE DES CELLULES SOUCHES/PROGENITRICES MAMMAIRES**

Nos résultats ont mis en évidence l'implication des intégrines liant les laminines ( $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 1$  et  $\alpha 6\beta 4$ ) dans le contrôle de l'activité des cellules souches/progénitrices mammaires. En effet, la délétion des gènes *itga3* ou *itga6* seuls dans le compartiment basal mammaire réduit le potentiel régénératif des cellules souches/progénitrices après transplantation ainsi que leur potentiel clonogénique *in vitro*. Cependant, la perte d'expression de l'ensemble de ces intégrines réduit fortement la capacité des cellules basales mammaires à régénérer l'épithélium, après transplantation. De plus, nos expériences suggèrent que FAK, en aval de ces intégrines, joue un rôle clef dans le maintien de l'activité des cellules souches/progénitrices mammaires. Ainsi, les intégrines liant les laminines réguleraient l'activité des cellules souches/progénitrices mammaires en modulant l'activité de FAK.

Notre étude met en évidence l'importance des intégrines liant la laminine dans le maintien de l'activité des cellules souches/progénitrices mammaires. La délétion des intégrines  $\alpha 3$  et  $\alpha 6$  est suffisante pour compromettre le maintien du potentiel régénératif des cellules basales mammaires et aucune autre intégrine ne semble capable de maintenir cette fonction en leur absence. Notre laboratoire a précédemment montré que l'intégrine  $\beta 1$  régule l'autorenouvellement des MaSC, en contrôlant l'axe de division des cellules basales (Taddei et al., 2008). Cependant, nous n'avons pas pu déterminer si les intégrines  $\alpha 3$  et/ou  $\alpha 6$  contrôlent l'axe de division des cellules basales.

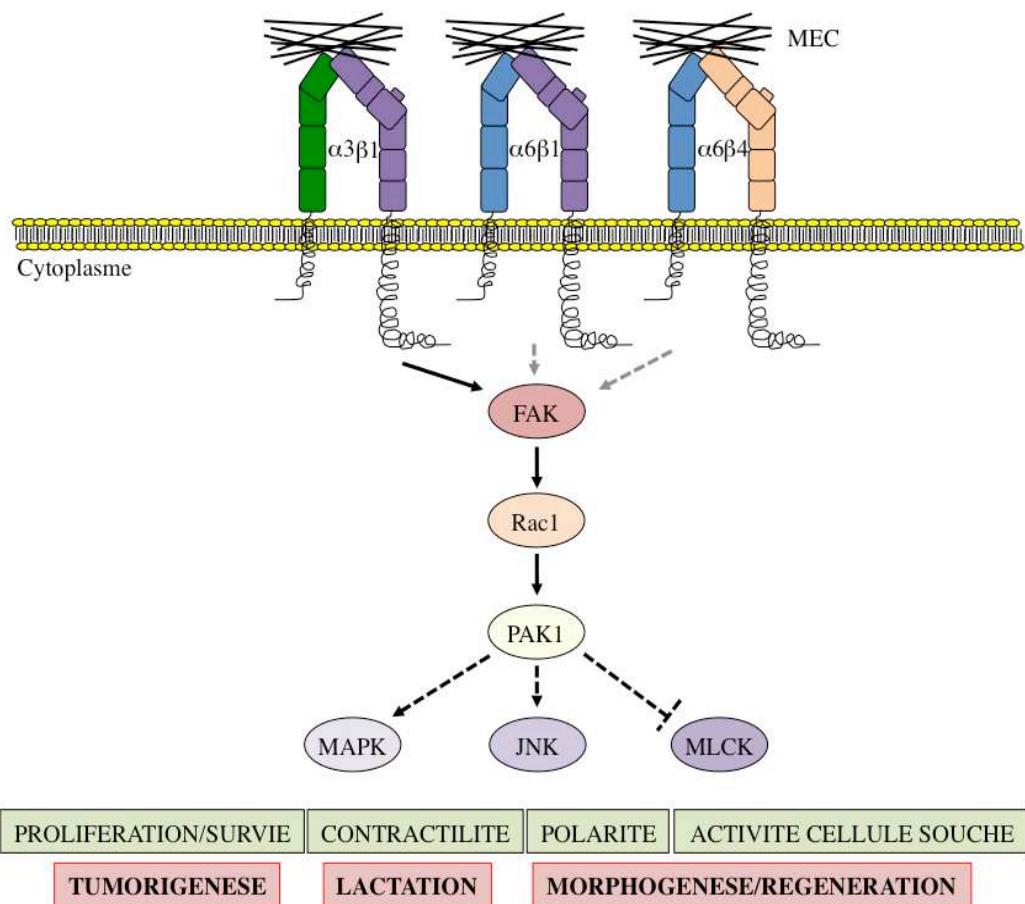
L’expression d’un mutant non phosphorylable de FAK ( $\text{FAK}^{\text{Y397F}}$ ) semble abolir la capacité des cellules basales sauvages à régénérer un épithélium mammaire. Bien que non concordantes avec les résultats de Luo et collaborateurs (Luo et al., 2013b), nos données sont renforcées par l’utilisation d’un inhibiteur pharmacologique de FAK, qui inhibe la formation de mammosphères à partir de cellules basales, *in vitro*.

Des travaux supplémentaires sont nécessaires afin de déterminer comment les intégrines liant la laminine contrôlent les cellules souches/progénitrices mammaires en aval de FAK. Les intégrines sont des régulateurs des petites GTPases de la famille Rho qui, en retour, contrôlent la polarité des cellules épithéliales, la formation du lumen pendant la morphogenèse, le positionnement du centrosome, et l’orientation du fuseau mitotique pendant la mitose, et jouent ainsi un rôle essentiel dans l’orientation de l’axe de division cellulaire (St Johnston & Sanson, 2011 ; Rodriguez-Fraticelli & Martin-Belmonte, 2013 ; Akhtar & Streuli, 2013). Une étude récente montre que le confinement des cellules épithéliales, induit par une faible surface d’adhésion avec la MEC, contrôle l’acquisition de la polarité cellulaire, et que ce processus implique une régulation fine de la balance RhoA-Rac1 et de la contractilité cellulaire (Rodriguez-Fraticelli et al., 2012). Nos précédentes données indiquent que la perte d’intégrine  $\alpha 3\beta 1$  induit une diminution de l’activation de Rac1, une phosphorylation soutenue aberrante de la MLC et un phénotype cellulaire hypercontractile (Raymond et al., 2011). Ainsi, il serait intéressant d’étudier comment l’altération de ces voies de signalisation intracellulaires peut affecter les propriétés des MaSC.

Les régénérations observées après transplantation de cellules basales présentant une délétion de l’intégrine  $\alpha 3$  ou  $\alpha 6$  remplissent le coussin adipeux presque aussi bien que les cellules contrôles. Ces résultats suggèrent que l’inactivation des sous-unités  $\alpha 3$  ou  $\alpha 6$  des intégrines réduit la fréquence des cellules souches, mais a peu d’effet sur leur activité.

#### IV. CONCLUSIONS

Au cours de ma thèse, nous avons pu mettre en évidence une fonction nouvelle, jouée par l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$ , dans le contrôle de l'activité contractile des cellules myoépithéliales mammaires, pendant la lactation. De plus, nos données indiquent que l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  joue un rôle clef dans le développement tumoral mammaire. Enfin, nos résultats ont permis de mettre en évidence l'implication des intégrines liant la laminine (dimères  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 1$  et  $\alpha 6\beta 4$ ) dans le contrôle de l'activité des cellules souches/progénitrices mammaires. Le schéma présenté en Figure 32 résume l'ensemble de nos résultats.



**Figure 32. Fonctions cellulaires régulées par l'engagement des intégrines liant la laminine dans les cellules basales myoépithéliales mammaires.**

L'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  contrôle l'activité contractile des cellules myoépithéliales pendant la lactation. Son action passe très probablement par l'inhibition de la MLCK via PAK1. Au cours de la tumorigénèse, l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  favorise la prolifération et la survie cellulaire, essentielles au développement tumoral. Le mécanisme impliqué ferait intervenir une activation soutenue des MAPK et JNK. Les intégrines liant la laminine ( $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 1$  et  $\alpha 6\beta 4$ ) sont impliquées dans le maintien de l'activité des cellules souches/progénitrices mammaires. L'effектор des intégrines FAK semble jouer un rôle clef dans ce processus. L'implication de Rac1 en aval qui, en modulant la contractilité modifierait l'axe de division cellulaire, reste à déterminer.

Une conclusion intéressante de ce travail est l'absence de redondance fonctionnelle observée entre les intégrines liant la laminine au cours de la lactation ou pendant le développement tumoral. Ces résultats suggèrent que l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  initie des voies de signalisation intracellulaires différentes de celles dépendantes des intégrines  $\alpha 6\beta 1$  et  $\alpha 6\beta 4$ . Par contre, pendant la régénération du tissu mammaire, seule la perte d'expression de l'ensemble des intégrines liant la laminine abolit l'activité des cellules souches. Ces résultats suggèrent que, dans ce contexte, les intégrines  $\alpha 3\beta 1$  et  $\alpha 6\beta 1/\alpha 6\beta 4$  présentent une redondance fonctionnelle.

Un effecteur des intégrines qui semble requis dans l'ensemble des processus que nous avons étudié est la kinase FAK. En effet, les extraits de glande mammaire dépourvus d'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  présentent une activité réduite de FAK que ce soit en contexte génétique sauvage ou  $K5\Delta N\beta cat$ . Cependant, il reste à élucider comment un même effecteur (FAK) situé en aval de l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$ , mène au contrôle sélectif de l'activité de kinases spécifiques selon le contexte biologique (inhibition de la MLCK au cours de la lactation et activation des MAPK et JNK, au cours du processus de tumorigénèse). Les propriétés physico-chimiques de la MEC, connues pour être modifiées au cours du développement tumoral, pourraient être à l'origine de cette spécificité de réponse.

## **ANNEXES**

## The mammary myoepithelial cell

MEJDI MOUMEN, AURÉLIE CHICHE, STÉPHANIE CAGNET, VALÉRIE PETIT, KARINE RAYMOND,  
MARISA M. FARALDO, MARIE-ANGE DEUGNIER and MARINA A. GLUKHOVA\*

CNRS, UMR 144 Institut Curie "Compartimentation et Dynamique Cellulaires", Paris, France

**ABSTRACT** Over the last few years, the discovery of basal-type mammary carcinomas and the association of the regenerative potential of the mammary epithelium with the basal myoepithelial cell population have attracted considerable attention to this second major mammary lineage. However, many questions concerning the role of basal myoepithelial cells in mammary morphogenesis, functional differentiation and disease remain unanswered. Here, we discuss the mechanisms that control the myoepithelial cell differentiation essential for their contractile function, summarize new data concerning the roles played by cell-extracellular matrix (ECM), intercellular and paracrine interactions in the regulation of various aspects of the mammary basal myoepithelial cell functional activity. Finally, we analyze the contribution of the basal myoepithelial cells to the regenerative potential of the mammary epithelium and tumorigenesis.

**KEY WORDS:** *differentiation, extracellular matrix, intercellular signaling, stem cells, tumorigenesis*

### Introduction

Functionally differentiated mammary gland consists of secretory alveoli organized into lobules and connected by branching ducts leading to the surface of the body. The most important portion of the mammary development occurs postnatally. Only a few ducts are formed late in embryonic development, and at birth, the mammary gland remains rudimentary. Intensive growth and branching morphogenesis take place during sexual maturation leading to the establishment of the mammary ductal system. The secretory tissues, the mammary alveoli, develop during pregnancy. The gland attains its fully differentiated state at lactation.

The mammary epithelium is composed of two cell layers, the luminal and basal myoepithelial. During lactation, luminal cells produce and secrete milk, whereas basal myoepithelial cells contract to eject the milk from the body. Mammary morphogenesis and differentiation are controlled by systemic hormones, soluble growth factors, cell-cell and cell-ECM interactions. In the mammary epithelium, hormonal receptors essential for gland development and homeostasis, such as estrogen receptor- $\alpha$  (ER $\alpha$ ), progesterone receptor (PR) and prolactin receptor, are expressed mostly by luminal cells rather than basal myoepithelial cells (Brisken and O'Malley 2010). However, as discussed below, myoepithelial cells in the mammary tissue respond to hormonal stimulation *in vivo*. In addition, these cells express various receptors for soluble and cell surface-associated signaling molecules. They also produce most of the basement membrane components and are involved

in permanent reciprocal interactions with the connective tissue surrounding the mammary epithelium.

The myoepithelium is organized differently in the ducts and alveoli. Ductal myoepithelial cells are arranged in a more or less continuous monolayer, whereas alveolar myoepithelial cells are stellate-shaped and do not form a continuous layer between the secretory epithelium and the surrounding basement membrane (Fig. 1).

Differentiated myoepithelial cells are contractile cells with an ultrastructure reminiscent of smooth muscle. Myoepithelial cells contain large amounts of microfilaments and dense plaques and express smooth muscle-specific cytoskeletal and contractile proteins. Myoepithelial cells form desmosomes and hemidesmosomes, and they are separated from the connective tissue by the basement membrane, a special type of ECM. However, it should be borne in mind that, unlike smooth muscle cells, which originate from mesodermal precursors and neural crest cells, mammary myoepithelial cells and luminal cells are derived from the ectoderm. In addition to displaying phenotypic features of smooth muscle cells, myoepithelial cells have all the characteristics of basal cells from stratified epithelia. In particular, they express basal-type

---

*Abbreviations used in this paper:*  $\alpha$ -SMA,  $\alpha$ -smooth muscle actin; ECM, extracellular matrix; K5, K8, K14, cytokeratins 5, 8 and 14, respectively; MLC, myosin light chain; MKL1, MKL2, megakaryoblastic leukemia 1 and 2, respectively; ROCK, Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase; SRF, serum response factor; TGF- $\beta$ , transforming growth factor  $\beta$ .

\*Address correspondence to: Marina A. Glukhova. UMR144 CNRS/Institut Curie, 26 rue d'Ulm, 75248 Paris cedex 05, France. Tel: +33-1-5624-6331.  
Fax: +33-1-5624-6349. e-mail: marina.glukhova@curie.fr

Final, author-corrected PDF published online: 24 August 2011.

cytokeratins 5, 14 (K5 and K14, respectively) and cytokeratin 17, P-cadherin and high levels of ΔNp63.

Two discoveries reported a few years ago suggested that mammary basal epithelial cells might play a key role in normal mammary development and tumorigenesis. First, the transcriptional profiling of mammary carcinomas revealed a subset of tumors expressing basal cell markers and characterized by a particularly poor clinical outcome (Gusterson 2009; Foulkes *et al.*, 2011 and references therein). Second, several reports describing the isolation and partial characterization of stem/progenitor cells from adult mouse mammary gland and mammary epithelial cell lines indicated that these cells might reside in the basal compartment of the mammary epithelium (Deugnier *et al.*, 2006; Shackleton *et al.*, 2006; Stingl *et al.*, 2006; Sleeman *et al.*, 2007).

In this review, we focus essentially on the aspects of myoepithelial cell functional activity investigated by our team. We provide an overview of studies dealing with the control of myoepithelial cell differentiation, discuss the role of cell-cell and cell-ECM interactions involving basal myoepithelial cells in mammary gland development and, finally, summarize current knowledge concerning the contribution of basal myoepithelial cells to the regenerative potential of the mammary epithelium and tumorigenesis. An important physiological property of myoepithelial cells, their tumor-suppressor potential, has been discussed elsewhere (Barsky and Karlin 2006; Panday *et al.*, 2011). Here, we refer to the studies carried out in mouse, rat and human. Mammary gland development and pathology are clearly not identical in different mammalian species. Of note, the quiescent mammary gland of rodents consists of ramified ducts only, comprising small lateral or tertiary branches that give rise to alveoli in pregnancy, whereas adult human mammary gland, even in the absence of pregnancy, contains variable amounts of lobulo-alveoli (Anbazhagan *et al.*, 1998; Naccarato *et al.*, 2000). Another notable difference between rodent and human mammary tissue concerns the stroma, the connective tissue surrounding the mammary epithelium. In mouse and rat, the stroma is fatty, rich in adipocytes, whereas human breast contains much more fibrous

connective tissue. However, overall, the organization of the mammary parenchyma, at the cellular level, is similar in rodents and humans, and data obtained in rodent models provide essential information relevant to human breast development and disease.

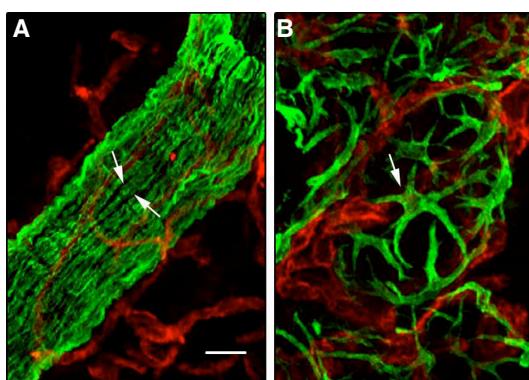
### Differentiation of mammary myoepithelial cells

The basal and luminal cells from the pseudostratified mammary epithelium are functionally and phenotypically distinct. Segregation of the two mammary epithelial compartments begins during embryonic development. In mammary buds from E15-mouse embryo, most, if not all, cells express basal cytokeratin K5, numerous cells stain positive for both, K5 and luminal cytokeratin 8 (K8), whereas expression of a basal cell marker p63 is already restricted to 2-3 basal cell layers (Fig. 2A,B). By E18, expression of K5, is higher in basal cells and lower in the cells concentrated in the future luminal part of the ducts, K8 displays the opposite pattern of expression, and p63 is restricted to the basal cell layer (Fig. 2C,D). Only few mammary basal cells from E18 mouse embryos express first smooth muscle-specific protein, α-smooth muscle actin (α-SMA) (Fig. 2E). In newborn mouse mammary glands, we have detected mammary basal epithelial cells positive for α-SMA and calponin, whereas another contractile protein, caldesmon, was absent from the neonatal mouse mammary epithelium and was detected in myoepithelial cells from three-week-old mice only (Fig. 2F and data not shown). In rat embryo, at E15 and E18, basal epithelial cells from mammary rudiments stained negative for smooth muscle markers. α-SMA and smooth muscle-myosin were first detected in mammary epithelial basal cells from newborn rat females (Deugnier *et al.*, 1995). Thus, in rodents, basal cells from the embryonic mammary buds do not express smooth muscle markers, and myoepithelial cell differentiation begins during the perinatal period.

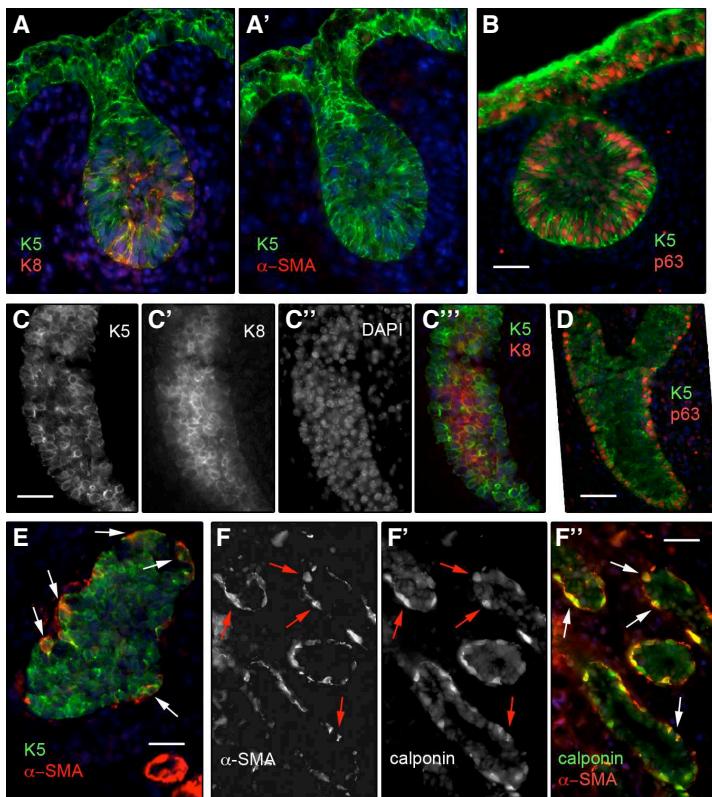
In human fetal breast, the first smooth muscle marker, α-SMA, was detected in basally located ductal cells after 22 to 23 weeks of gestation (Anbazhagan *et al.*, 1998; Friedrichs *et al.*, 2007). At this developmental stage, luminal and basal cell layers could be clearly distinguished due to differences in expression of K8, the transcription factor AP2-α, the transcription factor AP2-γ and HER1, the first two of these markers being restricted to luminal cells and the last two restricted to basal cells (Friedrichs *et al.*, 2007).

The differentiated phenotype, with the induction and upregulation of smooth muscle-specific contractile and cytoskeletal proteins, is acquired gradually by myoepithelial cells, essentially during postnatal mammary gland development. Changes in the adhesion system, including the integrin repertoire and the production of ECM components, accompany the maturation of mammary myoepithelial cells (Deugnier *et al.*, 1995).

In growing pubertal mouse mammary gland, the cap cells of the terminal end buds give rise to new ductal myoepithelial cells (Williams and Daniel 1983). The terminal end buds are bulbous structures found at the growing tips of mammary ducts advancing into the fat pad, with the cap cells forming a monolayer at the front. The cap cells proliferate and, as the duct grows into the stroma, they progressively relocate to the underlying part of the duct, where they differentiate into myoepithelial cells (Williams and Daniel 1983). Cap cells have a particular phenotype: they express α-SMA, P-cadherin and p63, but stain only weakly for basal-type cytokeratins K5 and K14. In addition, a recent study identified a specific marker of cap cells, s-SHIP, a protein of unknown biological



**Fig. 1. Morphology of ductal and alveolar myoepithelial cells.** Double immunofluorescence labelling of sections through 10-week-old virgin (A) and 2-day-lactating (B) mouse mammary glands with the antibodies against cytokeratin 5 (K5, green) and CD31 (red). Arrows indicate elongated ductal (A) and stellate-shaped alveolar (B) myoepithelial cells. CD31 reveals capillaries. Bar, 10 μm.



**Fig. 2. Distribution of epithelial and smooth muscle markers in developing mouse mammary gland.** Double immunofluorescence labelling of sections through developing mammary glands from mouse embryo (A-E) and newborn female mouse (F) with antibodies against K5, K8, p63,  $\alpha$ -SMA and calponin. The nuclei were stained with DAPI. (A,A'), serial sections through a mammary bud from E15.5 embryo, (B) section through another bud from the same embryo. (C-E), sections through a mammary rudiment from an E18 female embryo. C'' shows merged C, C' and C''' images. F' shows merged F and F' images. The arrows in E indicate basal cells positive for K5 and  $\alpha$ -SMA, those in F, F' and F'' indicate basal cells positive for  $\alpha$ -SMA and calponin. Tissues were fixed in paraformaldehyde, embedded in paraffin, sectioned and processed for immunolabelling as described elsewhere (Taddel *et al.*, 2008). Bars, 45  $\mu$ m.

function structurally related to SHIP1, an SH2-containing inositol 5'-phosphatase (Bai and Rohrschneider 2010). The terminal end buds are present only in rapidly growing pubertal mammary glands, but cell populations similar to cap cells may exist at the extremities of all growing buds, at various developmental stages.

The smooth muscle marker expression of myoepithelial cells is not only regulated temporally during development, it is also regulated spatially. In adult quiescent human breast, a specific caldesmon variant implicated in the regulation of smooth muscle contraction is expressed by the myoepithelial cells of large ducts and galactophorous sinuses, but absent from intralobular small ducts and acini (Lazard *et al.*, 1993). Similarly, in the lactating rat mammary gland, ductal and alveolar myoepithelial cells differ in their pat-

terns of contractile and cytoskeletal smooth muscle marker expression (Deugnier *et al.*, 1995). At least in part, this heterogeneity may reflect transient differences in the degree of maturation of the myoepithelial cells located in the various parts of the mammary tree, or differences in the functional properties of ductal and alveolar myoepithelial cells, such as contractile activity. For instance, it seems plausible that the expression of contractile proteins is upregulated in alveolar myoepithelial cells from lactating glands. Jolicoeur (2005) suggested that the heterogeneity of myoepithelial cells "may reflect an innate ability of the mammary basal myoepithelial lineage to adapt to a wide range of environments", enabling these cells to mediate epithelial–stromal interactions adequately.

#### Contractile function and the control of mammary myoepithelial cell differentiation

The intrinsic contractile activity of mammary myoepithelial cells is essential for their physiological function. In lactating mammary gland, myoepithelial cell contraction is induced by the pulsatile release of oxytocin from the pituitary gland. Oxytocin binds to a promiscuous G protein-coupled receptor on the surface of the myoepithelial cell (reviewed in Reversi *et al.*, 2005). As in smooth muscle cells, the contraction of myoepithelial cells is regulated by myosin light chains (MLC). Phosphorylation of the MLC induces myosin ATPase activity, the binding of myosin to actin and contraction (Hartshorne *et al.*, 1989). The subsequent dephosphorylation of MLC by a specific phosphatase leads to relaxation. We recently showed that, in addition to the phospholipase C/Ca<sup>2+</sup>/MLC pathway (Reversi *et al.*, 2005), the RhoA/ROCK signalling cascade is essential for the oxytocin-induced contraction of myoepithelial cells (Raymond *et al.*, 2011). We found that ROCK inhibition completely prevented the

contractile response of myoepithelial cells to oxytocin.

The contractile activity of myoepithelial cells requires the expression of smooth muscle proteins and appropriate cell-ECM interactions. Similar to smooth muscle cells, differentiation of myoepithelial cells is dependent on serum response factor (SRF), a transcription factor that binds a DNA sequence known as the CArG box, associated with smooth muscle structural genes, such as the  $\alpha$ -SMA and smooth muscle myosin heavy chain genes. SRF interacts with members of the myocardin family of transcriptional coactivators that enhance the expression of SRF-dependent genes (see references in Pipes *et al.*, 2006). Myocardin itself is expressed specifically in cardiac and smooth muscle cells, whereas mammary myoepithelial cells express the myocardin-related transcription factors MK1 and

Mkl2 (see references in Pipes *et al.*, 2006).

The mammary glands of MKL1-deficient mice develop normally, but mutant dams fail to feed complete litters, due to impairment of the contractile function of the myoepithelial cells. In the absence of MKL1, mammary myoepithelial cells contain only very low amounts of proteins essential for contraction, such as smooth muscle variants of actin, myosin heavy chains, tropomyosin, transgelin, caldesmon and myosin light chain kinase. Mkl2 is upregulated in mutant tissue, but cannot replace MKL1 (Pipes *et al.*, 2006).

Unlike myocardin, which localizes to the cell nucleus, myocardin-related proteins are associated with cytoplasmic monomeric G-actin. Rho GTPases positively regulate smooth muscle-specific Srf target gene expression, due to their ability to induce F-actin polymerization, leading to the release of cytoplasmic MKL1. Subsequent nuclear accumulation of MKL1 enables the protein to act as SRF co-activator, promoting smooth muscle differentiation (Pipes *et al.*, 2006).

$\alpha$ -SMA is the most abundant actin isoform in mammary myoepithelial cells. A recent study showed that  $\alpha$ -SMA was necessary for the contractile function of myoepithelial cells and for generation of the contractile force required for milk ejection. Mice lacking  $\alpha$ -SMA presented lactation failure, despite the normal development of their mammary glands (Haaksma *et al.*, 2011). Experiments *in vitro* revealed that the contractile response to oxytocin of myoepithelial cells lacking  $\alpha$ -SMA was impaired. Expression of other contractile proteins was not analyzed in this study, but the authors suggested that the lack of  $\alpha$ -SMA might alter actin dynamics, leading to G-actin accumulation, thereby decreasing the transcriptional activity of MKL1 and the expression of other smooth muscle contractile proteins.

Another known regulator of smooth muscle-specific protein expression is TGF- $\beta$ . A transcriptional regulator activated by TGF- $\beta$ , SMAD3, interacts with MKLs, thereby controlling smooth muscle lineage differentiation (reviewed in Pipes *et al.*, 2006). In addition to their role in the regulation of smooth muscle-specific SRF targets, MKL1 and SMAD3 participate in control of the expression of Slug (Morita *et al.*, 2007), a transcription factor essential for the epithelium-to-mesenchyme transition. In mammary epithelium, Slug has been implicated in control of the basal cell phenotype. This protein is found only in the basal myoepithelial cell layer (Mani *et al.*, 2008; Proia *et al.*, 2010).

The Notch pathway has been reported to contribute to the control of the smooth muscle phenotype (Morrow *et al.*, 2008) and implicated in the amplification of mammary myoepithelial progenitors (Dontu *et al.*, 2004). The impact of Notch signaling on control of the balance of smooth muscle (and, probably, myoepithelial) cell proliferation and differentiation is context dependent. On the one hand, Notch signaling directly activates the transcription of smooth muscle-specific genes, whereas, on the other hand, its downstream targets, acting in concert with other signaling pathways, can inhibit the expression of smooth muscle markers inducing dedifferentiation (Morrow *et al.*, 2008). A recent report has suggested a role for the EGFR-ERK1/2 signaling pathway in the control of the propagation of the mammary basal cell population (Pasic *et al.*, 2011). However, the effects of EGFR ligands on the expression of smooth muscle-specific proteins has not been examined in this study.

### Myoepithelial cell-ECM interactions

Cell-ECM interactions play important roles in the control of various aspects of the mammary epithelial cell functional activity.

The mammary epithelium is surrounded by a basement membrane consisting essentially of collagen IV, various laminin variants and nidogen (reviewed in Muschler and Streuli 2010). Due to their direct contact with the basement membrane, myoepithelial cells are particularly rich in integrins. Early immunohistochemical studies have revealed the expression of various integrin dimers, including collagen receptors  $\alpha$ 1 $\beta$ 1,  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 and fibronectin receptor  $\alpha$ 5 $\beta$ 1,  $\alpha$  $\beta$ 3 integrin and high levels of laminin receptors  $\alpha$ 3 $\beta$ 1,  $\alpha$ 6 $\beta$ 1 and  $\alpha$ 6 $\beta$ 4, in rodent and human mammary myoepithelial cells (see references in Taddei *et al.*, 2003 and in Muschler and Streuli 2010).

Mice lacking the  $\alpha$ 1 or  $\alpha$ 2 integrin chain are viable. The germline deletion of the  $\alpha$ 1 integrin gene has no effect on mammary development, whereas ablation of the  $\alpha$ 2 integrin gene results in a slight decrease in mammary ductal branching complexity in virgin mice (reviewed in Hynes 2002). A lack of  $\alpha$ 3 $\beta$ 1 or  $\alpha$ 6 $\beta$ 4 integrins leads to perinatal lethality (reviewed in Hynes 2002). Therefore, tissue transplantation technique has been employed to study the roles played by these integrins in mammary development. Mammary epithelium deficient for  $\alpha$ 3 or  $\alpha$ 6 integrin chain (i.e. depleted of  $\alpha$ 3 $\beta$ 1 or  $\alpha$ 6 $\beta$ 1 and  $\alpha$ 6 $\beta$ 4 integrin dimers), when transplanted into cleared mouse mammary fat pads, produced ducts and alveoli similar to those developed from control tissue, suggesting that these integrins are dispensable for mammary morphogenesis. One possible explanation for these results is the functional redundancy of the  $\alpha$ 3 $\beta$ 1,  $\alpha$ 6 $\beta$ 1 and  $\alpha$ 6 $\beta$ 4 integrins.

To study the roles played by integrins expressed in the mammary myoepithelial cells in mammary gland development, we employed conditional gene deletion involving Cre-Lox approach. We have obtained mouse mutants presenting deletion of  $\beta$ 1 or  $\alpha$ 3 integrin chains in the basal (K5-positive) cell population. The expression of Cre was driven to basal epithelial cells by the K5 promoter (Taddei *et al.*, 2008; Raymond *et al.*, 2011).

The deletion of  $\beta$ 1 integrin from basal myoepithelial cells affected mammary branching morphogenesis in virgin mice and lobulo-alveolar development in pregnancy (Taddei *et al.*, 2008). The mutant epithelium was characterized by a largely disorganized general branching pattern, with few side branches. Lobulo-alveolar development was significantly retarded and secretory alveoli developed only late in pregnancy, after 14.5 p.c. from integrin-positive progenitor cells residing in the luminal layer. However, the deletion of  $\beta$ 1 integrins from the basal myoepithelial cell compartment did not impede ductal growth or differentiation of the two major mammary lineages, the basal myoepithelial and the luminal.

Furthermore, in the mutant epithelium, the lack of  $\beta$ 1 integrin altered the orientation of the basal cell division axis and the progeny of  $\beta$ 1 integrin-depleted basal cells, identified by a genetic marker, was found in the luminal compartment, by contrast to what was observed for control tissue. These observations led to the conclusion that, in the developed ducts, basal mammary epithelial cells divided parallel to the basement membrane, whereas basal cells lacking  $\beta$ 1 integrin escaped this rule. In this case, orientation of the basal cell division plane appeared to be random, so that part of the progeny localized to the luminal compartment and differentiated into luminal cells. These data suggested, that interactions between basal cells and ECM may contribute to cell fate decisions in mammary epithelium.

Serial transplantation experiments revealed that the deletion of  $\beta$ 1 integrin from the basal myoepithelial cell layer abolished the regenerative potential of the mammary epithelium. It is not known

how cell-ECM interactions mediated by  $\beta 1$  integrins contribute to maintenance of the mammary stem cell population, and whether the deletion of  $\beta 1$  integrin affects stem cells, directly, or indirectly, by modifying their survival or self-renewal capacity or disturbing the stem cell niche. Numerous studies have shown that cell-ECM adhesion plays an essential role in various stem cell niches (Raymond *et al.*, 2009).

The conditional deletion of a laminin receptor,  $\alpha 3\beta 1$  integrin, from myoepithelial cells did not interfere with the integrity or functional differentiation of the mammary epithelium, but led to low rates of milk ejection due to impaired myoepithelial cell contractility (Raymond *et al.*, 2011). This study revealed that in mammary myoepithelial cells,  $\alpha 3\beta 1$  integrin-mediated interactions with the ECM play an essential role in the control of FAK-Rac-PAK pathway activation thereby participating in the regulation of the myoepithelial cell post-contraction relaxation. In the mammary glands of lactating mice presenting deletion of  $\alpha 3\beta 1$  integrin from basal myoepithelial cells, we observed sustained MLC phosphorylation, low levels of FAK activation/phosphorylation and altered Rho/Rac balance. Cultured mammary myoepithelial cells depleted of  $\alpha 3\beta 1$  contracted in response to oxytocin, but were unable to maintain the state of post-contractive relaxation. The expression of constitutively active Rac or its effector PAK, or treatment with MLC-kinase inhibitor rescued the relaxation capacity of mutant cells, strongly suggesting that  $\alpha 3\beta 1$ -mediated stimulation of the Rac/PAK pathway is required for the inhibition of MLC-kinase activity, permitting completion of the myoepithelial cell contraction/relaxation cycle and successful lactation. This study provided the first *in vivo* evidence implicating integrin signaling in the control of myoepithelial cell contractile function.

#### **Intercellular and paracrine interactions involving myoepithelial cells**

Like other epithelial cells, mammary basal myoepithelial cells form junctional complexes, including desmosomes and adherens junctions, between them and with luminal cells. Of note, numerous cell-cell-adhesion molecules are expressed differentially in basal and luminal cells of the mammary epithelium. Many cell-cell-adhesion molecules display differential expression between the basal and luminal cells of the mammary epithelium. Runswick and coworkers provided evidence that desmosomes play an important role in the establishment and maintenance of the bilayer organization (Runswick *et al.*, 2001). Desmosomal cadherins, desmocollin 3 and desmoglein 3 are restricted to the myoepithelium. Perturbation of the cell-cell interactions involving these myoepithelium-specific molecules interfere with the cell type-specific positioning of luminal and basal mammary epithelial cells.

Cadherins are adherens junction components essential for the maintenance of epithelial tissue architecture. P-cadherin is expressed in the basal cell layers of stratified and pseudostratified epithelia. In mammary gland, P-cadherin is restricted to the basal cell layer, including ductal and alveolar myoepithelial cells and cap cells from terminal end buds. P-cadherin-deficient mice present unscheduled lobulo-alveolar development (Radice *et al.*, 1997). Alveolus-like structures, similar to those seen early in pregnancy, develop in mutant virgin females, and luminal cells present signs of lactogenic differentiation. Late in life, P-cadherin-deficient mice develop hyperplastic and dysplastic lesions (Radice *et al.*, 1997).

This study suggested that the deletion of P-cadherin, an adhesion molecule expressed by basal cells, affected the luminal cell population. Further studies are required to determine how basal cells contribute to the control of luminal cell proliferation and differentiation.

The molecular mechanisms that control P-cadherin expression remain poorly understood. Using mammary epithelial cell lines and mouse mutants obtained in our laboratory, we have shown that the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway is involved in regulation of P-cadherin expression independently of the Lef/Tcf transcription factors (Faraldo *et al.*, 2007). High levels of P-cadherin were found in mammary glands from transgenic mice presenting a constitutive activation of  $\beta$ -catenin signaling in basal myoepithelial cells (Faraldo *et al.*, 2007).

Novel information about the nature of cell-cell interactions in the mammary epithelium has been provided by Hinck's laboratory. This team was the first to implicate neural guidance molecules in basal-luminal cell adhesion and crosstalk. In the mammary epithelium, Netrin1, a secreted guidance cue molecule is expressed by luminal cells, whereas, its receptor, Neurogenin is present on the surface of cap and differentiated myoepithelial cells. Loss-of-function mutations in genes coding for Netrin1 and Neurogenin resulted in the disorganization of terminal end buds (Srinivasan *et al.*, 2003). Another neural guidance molecules Slit2 is expressed in both mammary epithelial cell layers, whereas its receptor, Robo1 is restricted to the basal cell population, cap and myoepithelial cells. Deletion of Slit2 or Robo1 from the mammary epithelium results in a phenotype similar to that induced by perturbation of Netrin1/Neurogenin couple, a lack of adhesion between luminal and cap cell layers (Strickland *et al.*, 2006). Furthermore, simultaneous loss-of-function mutations of *slit2* and *ntn1* genes resulted in an enhanced phenotype with separated luminal and basal cell layers in the mammary ducts suggestive of synergy between Slit2 and Netrin 1 during ductal morphogenesis. A recent report from the same laboratory implicated Slit/Robo1 signaling in the control of mammary branching morphogenesis (Macias *et al.*, 2011). The authors suggested that basal myoepithelial cells control the formation of new ductal branches via the production of mitogens for the luminal cells. Macias and coworkers revealed that the TGF- $\beta 1$ -induced expression of Robo1 in basal myoepithelial cells and the interaction of Slit2 with Robo1 inhibited  $\beta$ -catenin signaling, limiting basal cell proliferation and preventing the formation of new branches (Macias *et al.*, 2011).

Other examples of differential ligand-receptor distribution between basal and luminal cell layers include the Ephrin and Notch signaling pathways. Several studies have confirmed the functional significance of this expression pattern for mammary development. The ephrin receptor, EphB4, is strongly expressed in myoepithelial cells, whereas its ligand, Ephrin 2, is restricted to luminal cells. The ectopic expression of EphB4 in the luminal compartment disrupts proliferation and survival control in the mammary epithelium (Andres and Ziemiecki 2003). The Notch pathway is preferentially active in the luminal cell compartment of the mammary epithelium, and expression of the Notch targets, Hey1 and Hey2 is characteristic of luminal progenitors (Bouras *et al.*, 2008). By contrast, the Notch ligands Jag1 and 2 and Dlt1 are expressed in mammary basal cells. Thus, direct interactions between basal and adjacent luminal cells may contribute to the control of the expansion of the luminal progenitor population (Bouras *et al.*, 2008).

In turn, luminal cells also affect the homeostasis of the basal cell population. Wnt signaling is essential for proliferation and functional activity of mammary stem cells localized in the basal compartment (reviewed in Incassati *et al.*, 2010). Whilst genes coding for several Wnt ligands (Wnt4, Wnt5a, Wnt7b) were found to be expressed by luminal cells, expression of the receptors and co-receptors associated with Wnt/β-catenin signaling (Frizzled 1, 2, 3, 7, and 8, Lrp5 and 6) was localized to the basal myoepithelial cell compartment suggesting paracrine interactions (Kendrick *et al.*, 2008).

In quiescent mammary gland of virgin mice, myoepithelial cells do not proliferate. By contrast, stimulation with ovarian hormones, either under experimental conditions (hormone injection), or physiologically (during pregnancy or estrus), induces amplification of the basal myoepithelial cell population and expansion of the mammary stem cell population via paracrine mechanisms involving the Wnt and RANK pathways (Brisken and O'Malley 2010; Incassati *et al.*, 2010; Asselin-Labat *et al.*, 2010; Joshi *et al.*, 2010). Wnt4 is induced upon stimulation of the mammary epithelium by progesterone (see references in Brisken and O'Malley 2010). Most hormonal receptors are expressed by luminal cells and basal myoepithelial cells do not express ERα at all, but Wnt/β-catenin pathway-associated genes, including targets and receptors, were found to be upregulated in the mammary basal cell population of animals stimulated by estrogen/progesterone injection (Joshi *et al.*, 2010). Moreover, ovarian hormones induced the expression of RANKL in luminal cells and the expression of its receptor, RANK, in luminal and, particularly, basal cells (Asselin-Labat *et al.*, 2010; Joshi *et al.*, 2010).

Large-scale microarray analysis of gene expression patterns in various mammary epithelial cell populations performed with freshly isolated cells from virgin mouse and human mammary glands revealed numerous genes differentially expressed in basal and luminal cells (Stingl *et al.*, 2006; Kendrick *et al.*, 2008; Lim *et al.*, 2010). These studies provided important information for future work aiming to unravel the molecular mechanisms underlying crosstalk between the two major compartments of the mammary epithelium, the basal and luminal compartments. The microarray data complemented functional studies and indicated signaling pathways potentially involved in basal-luminal paracrine or direct cell-cell interactions and revealed several transcription regulators characterized by a cell type-specific expression pattern.

### Mammary myoepithelium and stem cells

Studies performed with a mammary cell line CommaD1β, possessing a morphogenetic potential, and with dissociated mammary epithelial cells have strongly suggested that the regenerative capacity of the mammary epithelium, as evaluated by transplantation assays, is associated with the basal epithelial compartment (Deugnier *et al.*, 2006; Shackleton *et al.*, 2006; Stingl *et al.*, 2006; Sleeman *et al.*, 2007). Cell populations enriched in stem cells can be isolated from freshly dissociated mammary epithelium, by flow cytometry, due to the strong expression of α6 or β1 integrins (Shackleton *et al.*, 2006; Stingl *et al.*, 2006). Of note, relatively high integrin expression levels are characteristic of the entire basal mammary cell population, consisting essentially of differentiated myoepithelial cells, whereas stem cells would be expected to display phenotypic characteristics different from those of differentiated cells. Consistently, the morphogenetic cell population isolated

from the CommaD1β cell line expresses basal cell markers, such as basal cytokeratins, P-cadherin and ΔNp63, but is negative for the smooth muscle-characteristic proteins (Deugnier *et al.*, 2006).

Putative mammary stem cells have not yet been physically separated from the differentiated myoepithelial cells, the major cell population in the mammary basal compartment. Stingl and coworkers have reported that repopulating activity is associated with a small cell fraction with higher levels of α6 integrin than the rest of the basal myoepithelial cell population. However, a comparative transcriptome analysis revealed that there were no significant differences in gene expression between these two basal cell subsets (Stingl *et al.*, 2006). Smooth muscle-specific contractile and cytoskeletal proteins were present in similar amounts in both cell populations. The myoepithelial cell layer is heterogeneous, but undifferentiated cells negative for smooth muscle markers have not yet been clearly identified *in vivo*, in rodent or human mammary basal epithelial cell layer.

Consistent with the transplantation data, lineage tracing experiments with the mouse reporter strain Rosa 26 led to the conclusion that all mammary epithelium cells originated from stem/progenitor cells expressing the basal cytokeratins K5/K14 (Choi *et al.*, 2009; Moumen and Faraldo, unpublished data). However, there is no experimental evidence to confirm that multipotent stem cells localized in the mammary basal cell layer contribute to the luminal compartment during ductal growth at puberty and lobulo-alveolar development in pregnancy. The results of lineage tracing experiments are consistent with the hypothesis that multipotent stem cells with basal characteristics (K5/K14-positive) give rise to basal myoepithelial and luminal cell lineages during early stages of mammary gland development, and that once the system of branching ducts is formed, the basal cell population makes no further contribution to the luminal cell layer.

Thus, it is still unclear whether an undifferentiated stem cell population exists in pubertal and adult mammary glands. It also remains to be determined whether cells possessing the regenerating potential revealed in transplantation assays, are phenotypically different from the surrounding differentiated myoepithelial cells, or whether at least some of the myoepithelial cells can dedifferentiate and acquire stem cell properties after transplantation.

Although differentiated myoepithelial cells from adult animals may be devoid of stem cell activity, they seem very likely to contribute to the mammary stem cell niche, by producing the necessary growth factors or ECM components. A recent analysis of gene expression patterns in basal and luminal cell populations isolated from human and mouse mammary epithelium confirmed that basal cells expressed numerous ECM proteins in large amounts, including most of the mammary basement membrane constituents, such as laminins, collagens, fibronectin, heparan sulphate proteoglycans and SPARC (Kendrick *et al.*, 2008; Lim *et al.*, 2010).

### Contribution of myoepithelial cells to mammary tumorigenesis

Mammary myoepitheliomas are rare malignant tumors considered to originate from myoepithelial cells. These tumors are characterized by high-level expression of basal epithelial cell markers and, in some cases, the expression of smooth muscle-specific proteins (Buza *et al.*, 2010 and references therein).

Large-scale analyses of gene expression in human breast

carcinomas led to the discovery of a tumor subset characterized by the expression of basal epithelial cell markers, the absence of ER- and PR-positive cells and the lack of HER2 overexpression. These tumors are usually referred to as basal-type or triple negative (reviewed in Gusterson 2009; Foulkes *et al.*, 2011). These tumors were initially thought to originate from mammary progenitor/stem cells. However, several recent studies have provided evidence that, at least, partially contradicted this hypothesis. Hereditary mammary carcinomas associated with the *brca1* gene mutation belong to the basal subtype. It has been demonstrated that luminal progenitors are amplified in the mammary epithelium of *brca1*-mutation carriers suggesting that this cell population might be at the origin of basal-type BRCA1-mammary carcinomas (Lim *et al.*, 2009). Interestingly, the basal cell population was notably decreased in the mammary epithelium of these individuals (Lim *et al.*, 2009). Further, experiments employing a mouse model of breast carcinogenesis demonstrated that deletion of the *brca1* gene from the luminal layer of the mammary epithelium of mice heterozygous for p53 was led to the development of tumors phenotypically similar to human BRCA1-associated carcinomas (Molyneux *et al.*, 2010). The deletion of *brca1* from the basal myoepithelial cell layer led to the development of adenomyoepitheliomas and squamous metaplastic carcinomas. Although the tumors developed after the disruption of *brca1* gene expression in the basal cell layer were of the basal subtype, based on their transcriptional profiles, their histological characteristics differed from human BRCA1 tumors (Molyneux *et al.*, 2010). Finally, a study from the Kuperwasser laboratory revealed that the transcriptional repressor Slug accumulated in BRCA1-associated breast cancer may be responsible for the basal phenotypic characteristics of the tumor cells (Proia *et al.*, 2010).

The Wnt/β-catenin signaling pathway is activated in basal-type mammary carcinomas (Khratsov *et al.*, 2010). We investigated the role of this pathway in mammary gland development and tumorigenesis, by generating transgenic mice expressing in the basal epithelial cell layer, an "activated" (N-terminally truncated and, thus, stabilized) β-catenin under control of the K5-promoter (transgenic lines K5-ΔNβcat). K5-ΔNβcat mice have an abnormal mammary phenotype, including precocious side branching in pregnancy, associated with an increase in proliferation and a decrease in the apoptosis of luminal epithelial cells and accelerated post-lactational involution (Faraldo *et al.*, 2005). By the age of 12 to 16 months, 75% of K5-ΔNβcat nulliparous females develop mammary hyperplasia comprising K5-positive (basal) cells negative for luminal and myoepithelial cell markers. Most multiparous K5-ΔNβcat mice develop invasive mammary carcinomas consisting essentially of undifferentiated basal epithelial cells or presenting signs of differentiation towards epidermal lineages (Faraldo *et al.*, 2005). We suggest that the activation of β-catenin signaling in mammary basal epithelial cell induces the amplification of basal-type progenitors, and, that basal-type progenitor/stem cells may contribute to the development of a subset of basal-type mammary carcinomas, metaplastic lesions characterized by the expression of epidermal lineage markers.

### Conclusions and perspectives

Myoepithelial cells are no longer considered to be a second-class mammary cell population of almost no interest. In addition to its contractile function, which is essential for lactation, the basal

cell layer harbors the regenerative potential of the mammary epithelium. Basal myoepithelial cells modulate the proliferation and differentiation of luminal cells, and affect the surrounding stroma. Various aspects of myoepithelial cell biology therefore merit further investigation.

Recent studies have shed light on the nature of the reciprocal paracrine and adhesion-mediated regulatory signals between the basal and luminal compartments of the mammary epithelium. However, our knowledge of these complex interactions is still limited, and detailed descriptions and analysis of the basal-luminal cell crosstalk are required to define the roles played by the myoepithelial cells in normal development and tumorigenesis. Several of the studies discussed above suggested that triple-negative breast tumors might originate from luminal progenitors (Lim *et al.*, 2009; Molyneux *et al.*, 2010; Proia *et al.*, 2010). However, some of the signals essential for the maintenance of this cell population are thought to be provided by basal cells (Bouras *et al.*, 2008) implying that the question of the contribution of the mammary basal cell compartment to tumorigenesis is still open.

A particularly important subject for further studies is to define the effects of the myoepithelium on the stroma during development and in disease. One aspect of the myoepithelium-stroma crosstalk yet to be unraveled is the contribution of the mammary myoepithelial cells to the establishment of the vascular network in the connective tissue surrounding the epithelium. As discussed elsewhere (Barsky and Karlin 2006), myoepithelial cells are considered to exhibit the anti-angiogenic properties, however, they express VEGFa, and its deletion from the basal cell layer significantly attenuated the angiogenesis accompanying mammary development (Rossiter *et al.*, 2007).

Another intriguing issue is the relationships between myoepithelial and stem/progenitor cells. It is not known yet whether upon transplantation, rare undifferentiated cells possessing stem cell properties give rise to mammary epithelial outgrowths, or, alternatively, all or a subset of myoepithelial cells can dedifferentiate and acquire the repopulating potential. We therefore believe that the phenotypic heterogeneity of the basal myoepithelial cell population in quiescent and hormone-stimulated glands, and control of the smooth muscle differentiation program in the myoepithelium merit further investigation.

### Acknowledgments

*Due to space limitations, in several cases, we have referred to reviews, rather than the original studies. We apologize to colleagues for omission of the original references. The work in MAG laboratory is supported by La Ligue Nationale Contre le Cancer (Equipe Labelisée 2009) and a grant from Agence Nationale de la Recherche ANR-08-BLAN-0078-01. MM received funding from Association pour la Recherche sur le Cancer; AC, from Institut Curie and Servier Laboratories; SC, from Cancéropôle Ile de France; VP, from Agence Nationale de la Recherche; KR, from La Fondation pour la Recherche Médicale and Institut National du Cancer. MAG is Directeur de Recherche, MMF and MAD are Chargé de Recherche at the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM).*

### References

- ANBAZHAGAN R, OSIN PP, BARTKOVAJ, NATHAN B, LANE EB and GUSTERSON BA (1998). The development of epithelial phenotypes in the human fetal and infant breast. *J Pathol* 184: 197-206.
- ANDRES AC and ZIEMIECKI A (2003). Eph and ephrin signaling in mammary gland morphogenesis and cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 8: 475-485.

- ASSELIN-LABAT ML, VAILLANT F, SHERIDAN JM, PAL B, WU D, SIMPSON ER, YASUDA H, SMYTH GK, MARTIN TJ, LINDEMAN GJ and VISVADER JE (2010). Control of mammary stem cell function by steroid hormone signalling. *Nature* 465: 798-802.
- BALI AND ROHR SCHNEIDER LR (2010). s-SHIP promoter expression marks activated stem cells in developing mouse mammary tissue. *Genes Dev* 24: 1882-1892.
- BARSKY SH and KARLIN NJ (2006). Mechanisms of disease: breast tumor pathogenesis and the role of the myoepithelial cell. *Nat Clin Pract Oncol* 3: 138-151.
- BOURAS T, PAL B, VAILLANT F, HARBURG G, ASSELIN-LABAT ML, OAKES SR, LINDEMAN GJ and VISVADER JE (2008). Notch signaling regulates mammary stem cell function and luminal cell-fate commitment. *Cell Stem Cell* 3: 429-441.
- BRISKEN C and O'MALLEY B (2010). Hormone action in the mammary gland. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2: a003178.
- BUZA N, ZEKRY N, CHARPIN C and TAVASSOLI FA (2010). Myoepithelial carcinoma of the breast: a clinicopathological and immunohistochemical study of 15 diagnostically challenging cases. *Virchows Arch* 457: 337-345.
- CHOI YS, CHAKRABARTI R, ESCAMILLA-HERNANDEZ R and SINHA S (2009). Elif5 conditional knockout mice reveal its role as a master regulator in mammary alveolar development: failure of Stat5 activation and functional differentiation in the absence of Elif5. *Dev Biol* 329: 227-241.
- DEUGNIER MA, FARALDO MM, TEULIERE J, THIERY JP, MEDINA D and GLUKHOVA MA (2006). Isolation of mouse mammary epithelial progenitor cells with basal characteristics from the Comma-Dbeta cell line. *Dev Biol* 293: 414-425.
- DEUGNIER MA, MOISEYEV AEP, THIERY JP and GLUKHOVAM (1995). Myoepithelial cell differentiation in the developing mammary gland: progressive acquisition of smooth muscle phenotype. *Dev Dyn* 204: 107-117.
- DONTU G, JACKSON KW, MCNICHOLAS E, KAWAMURA MJ, ABDALLAH WM and WICHA MS (2004). Role of Notch signaling in cell-fate determination of human mammary stem/progenitor cells. *Breast Cancer Res* 6: R605-615.
- FARALDO MM, TEULIERE J, DEUGNIER MA, BIRCHMEIER W, HUELSKEN J, THIERY JP, CANO A and GLUKHOVA MA (2007). beta-Catenin regulates P-cadherin expression in mammary basal epithelial cells. *FEBS Lett* 581: 831-836.
- FARALDO MM, TEULIERE J, DEUGNIER MA, TADDEI-DE LA HOSSERAYE I, THIERY JP and GLUKHOVA MA (2005). Myoepithelial cells in the control of mammary development and tumorigenesis: data from genetically modified mice. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 10: 211-219.
- FOULKES WD, SMITH IE and REIS-FILHO JS (2011). Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med* 363: 1938-1948.
- FRIEDRICHSS N, STEINERS S, BUETTNER R and KNOEPFLE G (2007). Immunohistochemical expression patterns of AP2alpha and AP2gamma in the developing fetal human breast. *Histopathology* 51: 814-823.
- GUSTERSON B (2009). Do 'basal-like' breast cancers really exist? *Nat Rev Cancer* 9: 128-134.
- HAAKSMAC J, SCHWARTZ RJ and TOMASEK JJ (2011). Myoepithelial cell contraction and milk ejection are impaired in mammary glands of mice lacking smooth musclealpha-actin. *Biol Reprod* DOI:10.1095/biolreprod.110.090639.
- HARTSHORNE DJ, ITO M and IKEBE M (1989). Myosin and contractile activity in smooth muscle. *Adv Exp Med Biol* 255: 269-277.
- HYNES RO (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110: 673-687.
- INCASSATI A, CHANDRAMOULI A, EELKEMA R and COWIN P (2010). Key signaling nodes in mammary gland development and cancer: beta-catenin. *Breast Cancer Res* 12: 213.
- JOLICOEUR F (2005). Intrauterine breast development and the mammary myoepithelial lineage. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 10: 199-210.
- JOSHI PA, JACKSON HW, BERISTAIN AG, DI GRAPPA MA, MOTE PA, CLARKE CL, STINGL J, WATERHOUSE PD and KHOKHAR (2010). Progesterone induces adult mammary stem cell expansion. *Nature* 465: 803-807.
- KENDRICK H, REGAN JL, MAGNAY FA, GRIGORIADIS A, MITSOPoulos C, ZVELEBIL M and SMALLEY MJ (2008). Transcriptome analysis of mammary epithelial subpopulations identifies novel determinants of lineage commitment and cell fate. *BMC Genomics* 9: 591.
- KHRAMTSOV AI, KHRAMTSOVA GF, TRETIKOVA M, HUO D, OLOPADE OI and GOSS KH (2010). Wnt/beta-catenin pathway activation is enriched in basal-like breast cancers and predicts poor outcome. *Am J Pathol* 176: 2911-2920.
- LAZARD D, SASTRE X, FRID MG, GLUKHOVA MA, THIERY JP and KOTELANSKY VE (1993). Expression of smooth muscle-specific proteins in myoepithelium and stromal myofibroblasts of normal and malignant human breast tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 999-1003.
- LIM E, VAILLANT F, WU D, FORREST NC, PAL B, HART AH, ASSELIN-LABAT ML, GYORKI DE, WARD T, PARTANENA, FELEPPA F, HUSCHTSCHALI, THORNE HJ, FOX SB, YAN M, FRENCH JD, BROWN MA, SMYTH GK, VISVADER JE and LINDEMAN GJ (2009). Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers. *Nat Med* 15: 907-913.
- LIM E, WU D, PAL B, BOURAS T, ASSELIN-LABAT ML, VAILLANT F, YAGITA H, LINDEMAN GJ, SMYTH GK and VISVADER JE (2010). Transcriptome analyses of mouse and human mammary cell subpopulations reveal multiple conserved genes and pathways. *Breast Cancer Res* 12: R21.
- MACIAS H, MORAN A, SAMARA Y, MORENO M, COMPTON JE, HARBURG G, STRICKLAND P and HINCKL (2011). SLIT/ROBO1 signaling suppresses mammary branching morphogenesis by limiting basal cell number. *Dev Cell* 20: 827-840.
- MANI SA, GUO W, LIAO MJ, EATON EN, AYYANAN A, ZHOU AY, BROOKS M, REINHARD F, ZHANG CC, SHIPSIN M, CAMPBELL LL, POLYAK K, BRISKEN C, YANG J and WEINBERG RA (2008). The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 133: 704-715.
- MOLINEUX G, GEYER FC, MAGNAY FA, MCCARTHY A, KENDRICK H, NATRAJAN R, MACKAY A, GRIGORIADIS A, TUTT A, ASHWORTH A, REIS-FILHO JS and SMALLEY MJ (2010). BRCA1 basal-like breast cancers originate from luminal epithelial progenitors and not from basal stem cells. *Cell Stem Cell* 7: 403-417.
- MORITA T, MAYANAGI T and SOBUKE K (2007). Dual roles of myocardin-related transcription factors in epithelial-mesenchymal transition via slug induction and actin remodeling. *J Cell Biol* 179: 1027-1042.
- MORROW D, GUHA S, SWEENEY C, BIRNEY J, WALSHE T, O'BRIEN C, WALLS D, REDMOND EM and CAHILL PA (2008). Notch and vascular smooth muscle cell phenotype. *Circ Res* 103: 1370-1382.
- MUSCHLER J and STREULI CH (2010). Cell-matrix interactions in mammary gland development and breast cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2: a003202.
- NACCARATO AG, VIACAVA P, VIGNATI S, FANELLI G, BONADIO AG, MONTRUCOLI G and BEVILACQUA G (2000). Bio-morphological events in the development of the human female mammary gland from fetal age to puberty. *Virchows Arch* 436: 431-438.
- PANDEY PR, SAIDOU J and WATABE K (2011). Role of myoepithelial cells in breast tumor progression. *Front Biosci* 15: 226-236.
- PASIC L, EISINGER-MATHASON TSK, VELAYUDHAN BT, MOSKALUK CA, BRENNIN DR, MACARA IG, LANNIGAN DA (2011). Sustained activation of the HER1-ERK1/2-RSK signaling pathway controls myoepithelial cell fate in human mammary tissue. *Genes Dev* 25: 1641-1653.
- PIPES GC, CREEMERS EE and OLSON EN (2006). The myocardin family of transcriptional coactivators: versatile regulators of cell growth, migration, and myogenesis. *Genes Dev* 20: 1545-1556.
- PROIA TA, KELLER PJ, GUPTA PB, KLEBBA I, JONES AD, SEDIC M, GILMORE H, TUNG N, NABER SP, SCHNITT S, LANDER ES and KUPERWASSER C (2010). Genetic predisposition directs breast cancer phenotype by dictating progenitor cell fate. *Cell Stem Cell* 8: 149-163.
- RADICE G, FERREIRA-CORNWELL MC, ROBINSON SD, RAYBURN H, CHODOSH LA, TAKEICHI M, HYNES RO (1997). Precocious mammary gland development in P-cadherin-deficient mice. *J Cell Biol* 139: 1025-1032.
- RAYMOND K, CAGNET S, KREFT M, JANSEN H, SONNENBERG A and GLUKHOVA MA (2011). Control of mammary myoepithelial cell contractile function by alpha3beta1 integrin signalling. *EMBO J* 30: 1896-1906.
- RAYMOND K, DEUGNIER MA, FARALDO MM and GLUKHOVAM (2009). Adhesion within the stem cell niches. *Curr Opin Cell Biol* 21: 623-629.
- REVERSI A, CASSONI P and CHINI B (2005). Oxytocin receptor signaling in myoepithelial and cancer cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 10: 221-229.
- ROSSITER H, BARRESI C, GHANNAJAN M, GRUBER F, MILDNER M, FODINGER D and TSCHACHLER E (2007). Inactivation of VEGF in mammary gland epithelium severely compromises mammary gland development and function. *FASEB J* 21: 3994-4004.
- RUNSWICK SK, O'HARE MJ, JONES L, STREULI CH and GARROD DR (2001). Desmosomal adhesion regulates epithelial morphogenesis and cell positioning.

- Nat Cell Biol* 3: 823-830.
- SHACKLETON M, VAILLANT F, SIMPSON KJ, STINGL J, SMYTH GK, ASSELIN-LABAT ML, WU L, LINDEMAN GJ and VISVADER JE (2006). Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature* 439: 84-88.
- SLEEMAN KE, KENDRICK H, ROBERTSON D, ISACKE CM, ASHWORTH A and SMALLIE MJ (2007). Dissociation of estrogen receptor expression and *in vivo* stem cell activity in the mammary gland. *J Cell Biol* 176: 19-26.
- SRINIVASAN K, STRICKLAND P, VALDESA, SHIN GC and HINCK L (2003). Netrin-1/neogenin interaction stabilizes multipotent progenitor cap cells during mammary gland morphogenesis. *Dev Cell* 4: 371-382.
- STINGL J, EIREW P, RICKETSON I, SHACKLETON M, VAILLANT F, CHOI D, LI HI and EAVES CJ (2006). Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells. *Nature* 439: 993-997.
- STRICKLAND P, SHIN GC, PLUMP A, TESSIER-LAVIGNE M and HINCK L (2006). Slit2 and netrin 1 act synergistically as adhesive cues to generate tubular bi-layers during ductal morphogenesis. *Development* 133: 823-832.
- TADDEI I, DEUGNIER MA, FARALDO MM, PETIT V, BOUVARD D, MEDINA D, FASSLER R, THIERY JP and GLUKHOVA MA (2008). Beta1 integrin deletion from the basal compartment of the mammary epithelium affects stem cells. *Nat Cell Biol* 10: 716-722.
- TADDEI I, FARALDO MM, TEULIERE J, DEUGNIER MA, THIERY JP and GLUKHOVA MA (2003). Integrins in mammary gland development and differentiation of mammary epithelium. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 8: 383-394.
- WILLIAMS JM and DANIEL CW (1983). Mammary ductal elongation: differentiation of myoepithelium and basal lamina during branching morphogenesis. *Dev Biol* 97: 274-290.

#### Further Related Reading, published previously in the *Int. J. Dev. Biol.*

##### Signalling molecules involved in mouse bladder smooth muscle cellular differentiation

Benchun Liu, Dongxiao Feng, Guiting Lin, Mei Cao, Yuet Wai Kan, Gerald R. Cunha and Laurence S. Baskin  
*Int. J. Dev. Biol.* (2010) 54: 175-180

##### Epithelial-Mesenchymal Transitions in development and disease: old views and new perspectives

M. Angela Nieto  
*Int. J. Dev. Biol.* (2009) 53: 1541-1547

##### The stroma reaction myofibroblast: a key player in the control of tumor cell behavior

Alexis Desmoulière, Christelle Guyot and Giulio Gabbiani  
*Int. J. Dev. Biol.* (2004) 48: 509-517

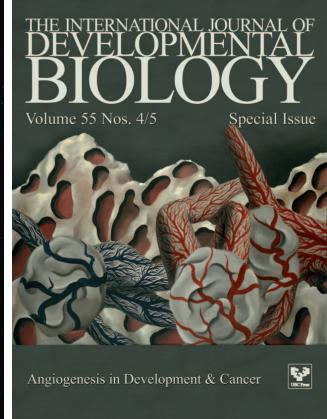
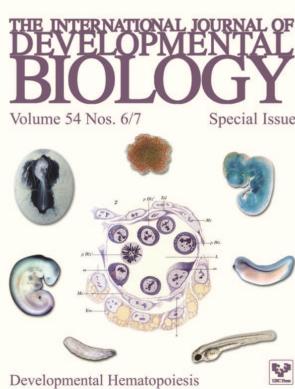
##### Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis

Héctor Peinado, Francisco Portillo and Amparo Cano  
*Int. J. Dev. Biol.* (2004) 48: 365-375

##### Integrin function and regulation in development

G Tarone, E Hirsch, M Brancaccio, M De Acetis, L Barberis, F Balzac, S F Retta, C Botta, F Altruda, L Silengo and F Retta  
*Int. J. Dev. Biol.* (2000) 44: 725-731

5 yr ISI Impact Factor (2010) = 2.961



## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

**The Cancer Atlas Genome Network.** (2012). Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **490**, 61-70.

**Akhtar N., Marlow R., Lambert E., Schatzmann F., Lowe E. T., Cheung J., Katz E., Li W., Wu C., Dedhar S., Naylor M. J. and Streuli C. H.** (2009). Molecular dissection of integrin signalling proteins in the control of mammary epithelial development and differentiation. *Development* **136**, 1019-1027.

**Akhtar N. and Streuli C. H.** (2006). Rac1 links integrin-mediated adhesion to the control of lactational differentiation in mammary epithelia. *J Cell Biol* **173**, 781-793.

**Akhtar N. and Streuli C. H.** (2013). An integrin-ILK-microtubule network orients cell polarity and lumen formation in glandular epithelium. *Nat Cell Biol* **15**, 17-27.

**Al-Hajj M., Wicha M. S., Benito-Hernandez A., Morrison S. J. and Clarke M. F.** (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 3983-3988.

**Anton E. S., Kreidberg J. A. and Rakic P.** (1999). Distinct functions of alpha3 and alpha(v) integrin receptors in neuronal migration and laminar organization of the cerebral cortex. *Neuron* **22**, 277-289.

**Arias-Romero L. E., Villamar-Cruz O., Pacheco A., Kosoff R., Huang M., Muthuswamy S. K. and Chernoff J.** (2010). A Rac-Pak signaling pathway is essential for ErbB2-mediated transformation of human breast epithelial cancer cells. *Oncogene* **29**, 5839-5849.

**Armstrong W. E. and Hatton G. I.** (2006). The puzzle of pulsatile oxytocin secretion during lactation: some new pieces. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **291**, R26-28.

**Ashton G. H., Morton J. P., Myant K., Phesse T. J., Ridgway R. A., Marsh V., Wilkins J. A., Athineos D., Muncan V., Kemp R., Neufeld K., Clevers H., Brunton V., Winton D. J., Wang X., Sears R. C., Clarke A. R., Frame M. C. and Sansom O. J.** (2010). Focal adhesion kinase is required for intestinal regeneration and tumorigenesis downstream of Wnt/c-Myc signaling. *Dev Cell* **19**, 259-269.

**Askari J. A., Buckley P. A., Mould A. P. and Humphries M. J.** (2009). Linking integrin conformation to function. *J Cell Sci* **122**, 165-170.

**Asselin-Labat M. L., Sutherland K. D., Barker H., Thomas R., Shackleton M., Forrest N. C., Hartley L., Robb L., Grosveld F. G., van der Wees J., Lindeman G. J. and Visvader J. E.** (2007). Gata-3 is an essential regulator of mammary-gland morphogenesis and luminal-cell differentiation. *Nat Cell Biol* **9**, 201-209.

**Asselin-Labat M. L., Vaillant F., Sheridan J. M., Pal B., Wu D., Simpson E. R., Yasuda H., Smyth G. K., Martin T. J., Lindeman G. J. and Visvader J. E.** (2010). Control of mammary stem cell function by steroid hormone signalling. *Nature* **465**, 798-802.

**Atwood C. S., Hovey R. C., Glover J. P., Chepko G., Ginsburg E., Robison W. G. and Vonderhaar B. K.** (2000). Progesterone induces side-branching of the ductal epithelium in the mammary glands of peripubertal mice. *J Endocrinol* **167**, 39-52.

**Aumailley M., Bruckner-Tuderman L., Carter W. G., Deutzmann R., Edgar D., Ekblom P., Engel J., Engvall E., Hohenester E., Jones J. C., Kleinman H. K., Marinkovich M. P., Martin G. R., Mayer U., Meneguzzi G., Miner J. H., Miyazaki K., Patarroyo M., Paulsson M., Quaranta V., Sanes J. R., Sasaki T., Sekiguchi K., Sorokin L. M., Talts J. F., Tryggvason K., Uitto J., Virtanen I., von der Mark K., Wewer U. M., Yamada Y. and Yurchenco P. D.** (2005). A simplified laminin nomenclature. *Matrix Biol* **24**, 326-332.

**Avizienyte E., Fincham V. J., Brunton V. G. and Frame M. C.** (2004). Src SH3/2 domain-mediated peripheral accumulation of Src and phospho-myosin is linked to deregulation of E-cadherin and the epithelial-mesenchymal transition. *Mol Biol Cell* **15**, 2794-2803.

**Avizienyte E. and Frame M. C.** (2005). Src and FAK signalling controls adhesion fate and the epithelial-to-mesenchymal transition. *Curr Opin Cell Biol* **17**, 542-547.

**Avizienyte E., Wyke A. W., Jones R. J., McLean G. W., Westhoff M. A., Brunton V. G. and Frame M. C.** (2002). Src-induced de-regulation of E-cadherin in colon cancer cells requires integrin signalling. *Nat Cell Biol* **4**, 632-638.

**Baccelli I. and Trumpp A.** (2012). The evolving concept of cancer and metastasis stem cells. *J Cell Biol* **198**, 281-293.

**Bachelard-Cascales E., Chapellier M., Delay E., Pochon G., Voeltzel T., Puisieux A., Caron de Fromentel C. and Maguer-Satta V.** (2010). The CD10 enzyme is a key player to identify and regulate human mammary stem cells. *Stem Cells* **28**, 1081-1088.

**Badders N. M., Goel S., Clark R. J., Klos K. S., Kim S., Bafico A., Lindvall C., Williams B. O. and Alexander C. M.** (2009). The Wnt receptor, Lrp5, is expressed by mouse mammary stem cells and is required to maintain the basal lineage. *PLoS One* **4**, e6594.

**Bai L. and Rohrschneider L. R.** (2010). s-SHIP promoter expression marks activated stem cells in developing mouse mammary tissue. *Genes Dev* **24**, 1882-1892.

**Bassani S. and Cingolani L. A.** (2012). Tetraspanins: Interactions and interplay with integrins. *Int J Biochem Cell Biol* **44**, 703-708.

**Berrier A. L. and Yamada K. M.** (2007). Cell-matrix adhesion. *J Cell Physiol* **213**, 565-573.

**Bertucci F., Finetti P. and Birnbaum D.** (2012). Basal breast cancer: a complex and deadly molecular subtype. *Curr Mol Med* **12**, 96-110.

**Berx G., Cleton-Jansen A. M., Strumane K., de Leeuw W. J., Nollet F., van Roy F. and Cornelisse C.** (1996). E-cadherin is inactivated in a majority of invasive human lobular breast cancers by truncation mutations throughout its extracellular domain. *Oncogene* **13**, 1919-1925.

**Blanpain C., Horsley V. and Fuchs E.** (2007). Epithelial stem cells: turning over new leaves. *Cell* **128**, 445-458.

**Bocchinfuso W. P., Lindzey J. K., Hewitt S. C., Clark J. A., Myers P. H., Cooper R. and Korach K. S.** (2000). Induction of mammary gland development in estrogen receptor-alpha knockout mice. *Endocrinology* **141**, 2982-2994.

**Bouras T., Pal B., Vaillant F., Harburg G., Asselin-Labat M. L., Oakes S. R., Lindeman G. J. and Visvader J. E.** (2008). Notch signaling regulates mammary stem cell function and luminal cell-fate commitment. *Cell Stem Cell* **3**, 429-441.

**Bouvard D., Pouwels J., De Franceschi N. and Ivaska J.** (2013). Integrin inactivators: balancing cellular functions in vitro and in vivo. *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**, 430-442.

**Brabletz S. and Brabletz T.** (2010). The ZEB/miR-200 feedback loop--a motor of cellular plasticity in development and cancer? *EMBO Rep* **11**, 670-677.

**Brakebusch C., Hirsch E., Potocnik A. and Fassler R.** (1997). Genetic analysis of beta1 integrin function: confirmed, new and revised roles for a crucial family of cell adhesion molecules. *J Cell Sci* **110** (Pt 23), 2895-2904.

**Brisken C.** (2002). Hormonal control of alveolar development and its implications for breast carcinogenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **7**, 39-48.

**Brisken C., Heineman A., Chavarria T., Elenbaas B., Tan J., Dey S. K., McMahon J. A., McMahon A. P. and Weinberg R. A.** (2000). Essential function of Wnt-4 in mammary gland development downstream of progesterone signaling. *Genes Dev* **14**, 650-654.

**Brisken C. and O'Malley B.** (2010). Hormone action in the mammary gland. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a003178.

**Brisken C., Park S., Vass T., Lydon J. P., O'Malley B. W. and Weinberg R. A.** (1998). A paracrine role for the epithelial progesterone receptor in mammary gland development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 5076-5081.

**Britt K., Ashworth A. and Smalley M.** (2007). Pregnancy and the risk of breast cancer. *Endocr Relat Cancer* **14**, 907-933.

**Brizzi M. F., Tarone G. and Defilippi P.** (2012). Extracellular matrix, integrins, and growth factors as tailors of the stem cell niche. *Curr Opin Cell Biol* **24**, 645-651.

**Brunner M., Millon-Fremillon A., Chevalier G., Nakchbandi I. A., Mosher D., Block M. R., Albiges-Rizo C. and Bouvard D.** (2011). Osteoblast mineralization requires beta1 integrin/ICAP-1-dependent fibronectin deposition. *J Cell Biol* **194**, 307-322.

**Burridge K. and Chrzanowska-Wodnicka M.** (1996). Focal adhesions, contractility, and signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol* **12**, 463-518.

**Buza N., Zekry N., Charpin C. and Tavassoli F. A.** (2010). Myoepithelial carcinoma of the breast: a clinicopathological and immunohistochemical study of 15 diagnostically challenging cases. *Virchows Arch* **457**, 337-345.

**Cabodi S., del Pilar Camacho-Leal M., Di Stefano P. and Defilippi P.** (2010). Integrin signalling adaptors: not only figurants in the cancer story. *Nat Rev Cancer* **10**, 858-870.

**Cabodi S., Tinnirello A., Di Stefano P., Bisaro B., Ambrosino E., Castellano I., Sapino A., Arisio R., Cavallo F., Forni G., Glukhova M., Silengo L., Altruda F., Turco E., Tarone G. and Defilippi P.** (2006). p130Cas as a new regulator of mammary epithelial cell proliferation, survival, and HER2-neu oncogene-dependent breast tumorigenesis. *Cancer Res* **66**, 4672-4680.

**Calderwood D. A., Fujioka Y., de Pereda J. M., Garcia-Alvarez B., Nakamoto T., Margolis B., McGlade C. J., Liddington R. C. and Ginsberg M. H.** (2003). Integrin beta cytoplasmic domain interactions with phosphotyrosine-binding domains: a structural prototype for diversity in integrin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 2272-2277.

**Campbell L. L. and Polyak K.** (2007). Breast tumor heterogeneity: cancer stem cells or clonal evolution? *Cell Cycle* **6**, 2332-2338.

**Canel M., Serrels A., Frame M. C. and Brunton V. G.** (2013). E-cadherin-integrin crosstalk in cancer invasion and metastasis. *J Cell Sci* **126**, 393-401.

**Cao Y., Bonizzi G., Seagroves T. N., Greten F. R., Johnson R., Schmidt E. V. and Karin M.** (2001). IKKalpha provides an essential link between RANK signaling and cyclin D1 expression during mammary gland development. *Cell* **107**, 763-775.

**Chaffer C. L., Brueckmann I., Scheel C., Kaestli A. J., Wiggins P. A., Rodrigues L. O., Brooks M., Reinhardt F., Su Y., Polyak K., Arendt L. M., Kuperwasser C., Bierie B. and Weinberg R. A.** (2011). Normal and neoplastic nonstem cells can spontaneously convert to a stem-like state. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 7950-7955.

**Charafe-Jauffret E., Monville F., Ginestier C., Dontu G., Birnbaum D. and Wicha M. S.** (2008). Cancer stem cells in breast: current opinion and future challenges. *Pathobiology* **75**, 75-84.

**Chen J., Diacovo T. G., Grenache D. G., Santoro S. A. and Zutter M. M.** (2002). The alpha(2) integrin subunit-deficient mouse: a multifaceted phenotype including defects of branching morphogenesis and hemostasis. *Am J Pathol* **161**, 337-344.

**Chen X. and Gumbiner B. M.** (2006). Crosstalk between different adhesion molecules. *Curr Opin Cell Biol* **18**, 572-578.

**Chiche A., Moumen M., Petit V., Jonkers J., Medina D., Deugnier M. A., Faraldo M. M. and Glukhova M. A.** (2013). Somatic Loss of P53 Leads to Stem/Progenitor Cell Amplification in Both Mammary Epithelial Compartments, Basal and Luminal. *Stem Cells*

**Choma D. P., Milano V., Pumiglia K. M. and DiPersio C. M.** (2007). Integrin alpha3beta1-dependent activation of FAK/Src regulates Rac1-mediated keratinocyte polarization on laminin-5. *J Invest Dermatol* **127**, 31-40.

**Choma D. P., Pumiglia K. and DiPersio C. M.** (2004). Integrin alpha3beta1 directs the stabilization of a polarized lamellipodium in epithelial cells through activation of Rac1. *J Cell Sci* **117**, 3947-3959.

**Ciarloni L., Mallepell S. and Brisken C.** (2007). Amphiregulin is an essential mediator of estrogen receptor alpha function in mammary gland development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 5455-5460.

**Cicalese A., Bonizzi G., Pasi C. E., Faretta M., Ronzoni S., Giulini B., Brisken C., Minucci S., Di Fiore P. P. and Pelicci P. G.** (2009). The tumor suppressor p53 regulates polarity of self-renewing divisions in mammary stem cells. *Cell* **138**, 1083-1095.

**Cleton-Jansen A. M.** (2002). E-cadherin and loss of heterozygosity at chromosome 16 in breast carcinogenesis: different genetic pathways in ductal and lobular breast cancer? *Breast Cancer Res* **4**, 5-8.

**Clevers H.** (2011). The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nat Med* **17**, 313-319.

**Conneely O. M., Jericevic B. M. and Lydon J. P.** (2003). Progesterone receptors in mammary gland development and tumorigenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **8**, 205-214.

**Curtis C., Shah S. P., Chin S. F., Turashvili G., Rueda O. M., Dunning M. J., Speed D., Lynch A. G., Samarajiwa S., Yuan Y., Graf S., Ha G., Haffari G., Bashashati A., Russell R., McKinney S., Langerod A., Green A., Provenzano E., Wishart G., Pinder S., Watson P., Markowetz F., Murphy L., Ellis I., Purushotham A., Borresen-Dale A. L., Brenton J. D., Tavare S., Caldas C. and Aparicio S.** (2012). The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature* **486**, 346-352.

**Daniel C. W., De Ome K. B., Young J. T., Blair P. B. and Faulkin L. J., Jr.** (1968). The in vivo life span of normal and preneoplastic mouse mammary glands: a serial transplantation study. *Proc Natl Acad Sci U S A* **61**, 53-60.

**Daniel C. W., Silberstein G. B. and Strickland P.** (1987). Direct action of 17 beta-estradiol on mouse mammary ducts analyzed by sustained release implants and steroid autoradiography. *Cancer Res* **47**, 6052-6057.

**Deome K. B., Faulkin L. J., Jr., Bern H. A. and Blair P. B.** (1959). Development of mammary tumors from hyperplastic alveolar nodules transplanted into gland-free mammary fat pads of female C3H mice. *Cancer Res* **19**, 515-520.

**Desgrosellier J. S. and Cheresh D. A.** (2010). Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* **10**, 9-22.

**Deugnier M. A., Teuliere J., Faraldo M. M., Thiery J. P. and Glukhova M. A.** (2002). The importance of being a myoepithelial cell. *Breast Cancer Res* **4**, 224-230.

**DiMeo T. A., Anderson K., Phadke P., Fan C., Perou C. M., Naber S. and Kuperwasser C.** (2009). A novel lung metastasis signature links Wnt signaling with cancer cell self-renewal and epithelial-mesenchymal transition in basal-like breast cancer. *Cancer Res* **69**, 5364-5373.

**DiPersio C. M., Hodivala-Dilke K. M., Jaenisch R., Kreidberg J. A. and Hynes R. O.** (1997). alpha3beta1 Integrin is required for normal development of the epidermal basement membrane. *J Cell Biol* **137**, 729-742.

**Djonov V., Andres A. C. and Ziemiczki A.** (2001). Vascular remodelling during the normal and malignant life cycle of the mammary gland. *Microsc Res Tech* **52**, 182-189.

**Dontu G., Abdallah W. M., Foley J. M., Jackson K. W., Clarke M. F., Kawamura M. J. and Wicha M. S.** (2003). In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev* **17**, 1253-1270.

**Epifano C. and Perez-Moreno M.** (2012). Crossroads of integrins and cadherins in epithelia and stroma remodeling. *Cell Adh Migr* **6**, 261-273.

**Ewan K. B., Shyamala G., Ravani S. A., Tang Y., Akhurst R., Wakefield L. and Barcellos-Hoff M. H.** (2002). Latent transforming growth factor-beta activation in mammary gland: regulation by ovarian hormones affects ductal and alveolar proliferation. *Am J Pathol* **160**, 2081-2093.

**Fadare O. and Tavassoli F. A.** (2007). The phenotypic spectrum of basal-like breast cancers: a critical appraisal. *Adv Anat Pathol* **14**, 358-373.

**Faraldo M. M., Deugnier M. A., Lukashev M., Thiery J. P. and Glukhova M. A.** (1998). Perturbation of beta1-integrin function alters the development of murine mammary gland. *EMBO J* **17**, 2139-2147.

**Faraldo M. M., Deugnier M. A., Touzeau S., Thiery J. P. and Glukhova M. A.** (2002). Perturbation of beta1-integrin function in involuting mammary gland results in premature dedifferentiation of secretory epithelial cells. *Mol Biol Cell* **13**, 3521-3531.

**Faraldo M. M., Teuliere J., Deugnier M. A., Taddei-De La Hosseraye I., Thiery J. P. and Glukhova M. A.** (2005). Myoepithelial cells in the control of mammary development and tumorigenesis: data from genetically modified mice. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **10**, 211-219.

**Farmer P., Bonnefoi H., Becette V., Tubiana-Hulin M., Fumoleau P., Larsimont D., Macgrogan G., Bergh J., Cameron D., Goldstein D., Duss S., Nicoulaz A. L., Briskin C., Fiche M., Delorenzi M. and Iggo R.** (2005). Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. *Oncogene* **24**, 4660-4671.

**Fassler R. and Meyer M.** (1995). Consequences of lack of beta 1 integrin gene expression in mice. *Genes Dev* **9**, 1896-1908.

**Fata J. E., Kong Y. Y., Li J., Sasaki T., Irie-Sasaki J., Moorehead R. A., Elliott R., Scully S., Voura E. B., Lacey D. L., Boyle W. J., Khokha R. and Penninger J. M.** (2000). The

osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development. *Cell* **103**, 41-50.

**Faurobert E., Rome C., Lisowska J., Manet-Dupe S., Boulday G., Malbouyres M., Balland M., Bouin A. P., Keramidas M., Bouvard D., Coll J. L., Ruggiero F., Tournier-Lasserve E. and Albiges-Rizo C.** (2013). CCM1-ICAP-1 complex controls beta1 integrin-dependent endothelial contractility and fibronectin remodeling. *J Cell Biol* **202**, 545-561.

**Feng Y., Manka D., Wagner K. U. and Khan S. A.** (2007). Estrogen receptor-alpha expression in the mammary epithelium is required for ductal and alveolar morphogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 14718-14723.

**Fonar Y. and Frank D.** (2011). FAK and WNT signaling: the meeting of two pathways in cancer and development. *Anticancer Agents Med Chem* **11**, 600-606.

**Forster C., Makela S., Warri A., Kietz S., Becker D., Hultenby K., Warner M. and Gustafsson J. A.** (2002). Involvement of estrogen receptor beta in terminal differentiation of mammary gland epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 15578-15583.

**Frame M. C.** (2002). Src in cancer: deregulation and consequences for cell behaviour. *Biochim Biophys Acta* **1602**, 114-130.

**Fujii H., Marsh C., Cairns P., Sidransky D. and Gabrielson E.** (1996). Genetic divergence in the clonal evolution of breast cancer. *Cancer Res* **56**, 1493-1497.

**Galan Moya E. M., Le Guelte A. and Gavard J.** (2009). PAKing up to the endothelium. *Cell Signal* **21**, 1727-1737.

**Gardner H., Kreidberg J., Koteliansky V. and Jaenisch R.** (1996). Deletion of integrin alpha 1 by homologous recombination permits normal murine development but gives rise to a specific deficit in cell adhesion. *Dev Biol* **175**, 301-313.

**Gastaldi S., Sassi F., Accornero P., Torti D., Galimi F., Migliardi G., Molyneux G., Perera T., Comoglio P. M., Boccaccio C., Smalley M. J., Bertotti A. and Trusolino L.** (2013). Met signaling regulates growth, repopulating potential and basal cell-fate commitment of mammary luminal progenitors: implications for basal-like breast cancer. *Oncogene* **32**, 1428-1440.

**Geiger B., Spatz J. P. and Bershadsky A. D.** (2009). Environmental sensing through focal adhesions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 21-33.

**Georges-Labouesse E., Mark M., Messaddeq N. and Gansmuller A.** (1998). Essential role of alpha 6 integrins in cortical and retinal lamination. *Curr Biol* **8**, 983-986.

**Georges-Labouesse E., Messaddeq N., Yehia G., Cadalbert L., Dierich A. and Le Meur M.** (1996). Absence of integrin alpha 6 leads to epidermolysis bullosa and neonatal death in mice. *Nat Genet* **13**, 370-373.

**Gerthoffer W. T.** (2008). Migration of airway smooth muscle cells. *Proc Am Thorac Soc* **5**, 97-105.

**Giles R. H., van Es J. H. and Clevers H.** (2003). Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta* **1653**, 1-24.

**Gimond C., van Der Flier A., van Delft S., Brakebusch C., Kuikman I., Collard J. G., Fassler R. and Sonnenberg A.** (1999). Induction of cell scattering by expression of beta1 integrins in beta1-deficient epithelial cells requires activation of members of the rho family of GTPases and downregulation of cadherin and catenin function. *J Cell Biol* **147**, 1325-1340.

**Ginestier C., Hur M. H., Charafe-Jauffret E., Monville F., Dutcher J., Brown M., Jacquemier J., Viens P., Kleer C. G., Liu S., Schott A., Hayes D., Birnbaum D., Wicha M. S. and Dontu G.** (2007). ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell* **1**, 555-567.

**Glukhova M. A. and Streuli C. H.** (2013). How integrins control breast biology. *Curr Opin Cell Biol* **25**, 633-641.

**Gonzalez-Forero D., Montero F., Garcia-Morales V., Dominguez G., Gomez-Perez L., Garcia-Verdugo J. M. and Moreno-Lopez B.** (2012). Endogenous Rho-kinase signaling maintains synaptic strength by stabilizing the size of the readily releasable pool of synaptic vesicles. *J Neurosci* **32**, 68-84.

**Gray R. S., Cheung K. J. and Ewald A. J.** (2010). Cellular mechanisms regulating epithelial morphogenesis and cancer invasion. *Curr Opin Cell Biol* **22**, 640-650.

**Green K. A. and Lund L. R.** (2005). ECM degrading proteases and tissue remodelling in the mammary gland. *Bioessays* **27**, 894-903.

**Grigoryan T., Wend P., Klaus A. and Birchmeier W.** (2008). Deciphering the function of canonical Wnt signals in development and disease: conditional loss- and gain-of-function mutations of beta-catenin in mice. *Genes Dev* **22**, 2308-2341.

**Guadamillas M. C., Cerezo A. and Del Pozo M. A.** (2011). Overcoming anoikis--pathways to anchorage-independent growth in cancer. *J Cell Sci* **124**, 3189-3197.

**Guan J. L.** (2010). Integrin signaling through FAK in the regulation of mammary stem cells and breast cancer. *IUBMB Life* **62**, 268-276.

**Gudjonsson T., Adriance M. C., Sternlicht M. D., Petersen O. W. and Bissell M. J.** (2005). Myoepithelial cells: their origin and function in breast morphogenesis and neoplasia. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **10**, 261-272.

**Guess C. M. and Quaranta V.** (2009). Defining the role of laminin-332 in carcinoma. *Matrix Biol* **28**, 445-455.

**Gunst S. J. and Zhang W.** (2008). Actin cytoskeletal dynamics in smooth muscle: a new paradigm for the regulation of smooth muscle contraction. *Am J Physiol Cell Physiol* **295**, C576-587.

**Guo W. and Giancotti F. G.** (2004). Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 816-826.

**Guo W., Keckesova Z., Donaher J. L., Shibue T., Tischler V., Reinhardt F., Itzkovitz S., Noske A., Zurrer-Hardi U., Bell G., Tam W. L., Mani S. A., van Oudenaarden A. and Weinberg R. A.** (2012). Slug and Sox9 cooperatively determine the mammary stem cell state. *Cell* **148**, 1015-1028.

**Guo W., Pylayeva Y., Pepe A., Yoshioka T., Muller W. J., Inghirami G. and Giancotti F. G.** (2006). Beta 4 integrin amplifies ErbB2 signaling to promote mammary tumorigenesis. *Cell* **126**, 489-502.

**Gustafson-Wagner E. and Stipp C. S.** (2013). The CD9/CD81 tetraspanin complex and tetraspanin CD151 regulate alpha3beta1 integrin-dependent tumor cell behaviors by overlapping but distinct mechanisms. *PLoS One* **8**, e61834.

**Haaksma C. J., Schwartz R. J. and Tomasek J. J.** (2011). Myoepithelial cell contraction and milk ejection are impaired in mammary glands of mice lacking smooth muscle alpha-actin. *Biol Reprod* **85**, 13-21.

**Harburger D. S. and Calderwood D. A.** (2009). Integrin signalling at a glance. *J Cell Sci* **122**, 159-163.

**Hayes M. J., Thomas D., Emmons A., Giordano T. J. and Kleer C. G.** (2008). Genetic changes of Wnt pathway genes are common events in metaplastic carcinomas of the breast. *Clin Cancer Res* **14**, 4038-4044.

**Hehlgans S., Haase M. and Cordes N.** (2007). Signalling via integrins: implications for cell survival and anticancer strategies. *Biochim Biophys Acta* **1775**, 163-180.

**Hennighausen L. and Robinson G. W.** (1998). Think globally, act locally: the making of a mouse mammary gland. *Genes Dev* **12**, 449-455.

**Hens J. R. and Wysolmerski J. J.** (2005). Key stages of mammary gland development: molecular mechanisms involved in the formation of the embryonic mammary gland. *Breast Cancer Res* **7**, 220-224.

**Herschkowitz J. I., Zhao W., Zhang M., Usary J., Murrow G., Edwards D., Knezevic J., Greene S. B., Darr D., Troester M. A., Hilsenbeck S. G., Medina D., Perou C. M. and Rosen J. M.** (2012). Comparative oncogenomics identifies breast tumors enriched in functional tumor-initiating cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 2778-2783.

**Hinck L. and Silberstein G. B.** (2005). Key stages in mammary gland development: the mammary end bud as a motile organ. *Breast Cancer Res* **7**, 245-251.

**Hiremath M. and Wysolmerski J.** (2013). Parathyroid hormone-related protein specifies the mammary mesenchyme and regulates embryonic mammary development. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **18**, 171-177.

**Hodivala-Dilke K. M., McHugh K. P., Tsakiris D. A., Rayburn H., Crowley D., Ullman-Cullere M., Ross F. P., Coller B. S., Teitelbaum S. and Hynes R. O.** (1999). Beta3-integrin-deficient mice are a model for Glanzmann thrombasthenia showing placental defects and reduced survival. *J Clin Invest* **103**, 229-238.

**Hogg N. and Bates P. A.** (2000). Genetic analysis of integrin function in man: LAD-1 and other syndromes. *Matrix Biol* **19**, 211-222.

**Hollier B. G., Tinnirello A. A., Werden S. J., Evans K. W., Taube J. H., Sarkar T. R., Sphyris N., Shariati M., Kumar S. V., Battula V. L., Herschkowitz J. I., Guerra R., Chang J. T., Miura N., Rosen J. M. and Mani S. A.** (2013). FOXC2 expression links epithelial-mesenchymal transition and stem cell properties in breast cancer. *Cancer Res* **73**, 1981-1992.

**Hovey R. C., Trott J. F. and Vonderhaar B. K.** (2002). Establishing a framework for the functional mammary gland: from endocrinology to morphology. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **7**, 17-38.

**Howe A. K.** (2011). Cross-talk between calcium and protein kinase A in the regulation of cell migration. *Curr Opin Cell Biol* **23**, 554-561.

**Howe E. N., Cochrane D. R. and Richer J. K.** (2011). Targets of miR-200c mediate suppression of cell motility and anoikis resistance. *Breast Cancer Res* **13**, R45.

**Huck L., Pontier S. M., Zuo D. M. and Muller W. J.** (2010). beta1-integrin is dispensable for the induction of ErbB2 mammary tumors but plays a critical role in the metastatic phase of tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 15559-15564.

**Huvemeers S. and Danen E. H.** (2009). Adhesion signaling - crosstalk between integrins, Src and Rho. *J Cell Sci* **122**, 1059-1069.

**Hynes R. O.** (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**, 673-687.

**Iliopoulos D., Lindahl-Allen M., Polytarchou C., Hirsch H. A., Tsichlis P. N. and Struhl K.** (2010). Loss of miR-200 inhibition of Suz12 leads to polycomb-mediated repression required for the formation and maintenance of cancer stem cells. *Mol Cell* **39**, 761-772.

**Iliopoulos D., Polytarchou C., Hatziapostolou M., Kottakis F., Maroulakou I. G., Struhl K. and Tsichlis P. N.** (2009). MicroRNAs differentially regulated by Akt isoforms control EMT and stem cell renewal in cancer cells. *Sci Signal* **2**, ra62.

**Imbert A., Eelkema R., Jordan S., Feiner H. and Cowin P.** (2001). Delta N89 beta-catenin induces precocious development, differentiation, and neoplasia in mammary gland. *J Cell Biol* **153**, 555-568.

**Incassati A., Chandramouli A., Eelkema R. and Cowin P.** (2010). Key signaling nodes in mammary gland development and cancer: beta-catenin. *Breast Cancer Res* **12**, 213.

**Jensen P. J. and Wheelock M. J.** (1995). Beta 1 integrins do not have a major role in keratinocyte intercellular adhesion. *Exp Cell Res* **219**, 322-331.

**Jerry D. J., Kuperwasser C., Downing S. R., Pinkas J., He C., Dickinson E., Marconi S. and Naber S. P.** (1998). Delayed involution of the mammary epithelium in BALB/c-p53null mice. *Oncogene* **17**, 2305-2312.

**Jones F. E., Welte T., Fu X. Y. and Stern D. F.** (1999). ErbB4 signaling in the mammary gland is required for lobuloalveolar development and Stat5 activation during lactation. *J Cell Biol* **147**, 77-88.

**Jonjic N., Lucin K., Krstulja M., Iternicka Z. and Mustac E.** (1993). Expression of beta-1 integrins on tumor cells of invasive ductal breast carcinoma. *Pathol Res Pract* **189**, 979-984.

**Joshi P. A., Jackson H. W., Beristain A. G., Di Grappa M. A., Mote P. A., Clarke C. L., Stingl J., Waterhouse P. D. and Khokha R.** (2010). Progesterone induces adult mammary stem cell expansion. *Nature* **465**, 803-807.

**Juliano R. L.** (2002). Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: functions of integrins, cadherins, selectins, and immunoglobulin-superfamily members. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **42**, 283-323.

**Kakarala M. and Wicha M. S.** (2008). Implications of the cancer stem-cell hypothesis for breast cancer prevention and therapy. *J Clin Oncol* **26**, 2813-2820.

**Karnoub A. E., Dash A. B., Vo A. P., Sullivan A., Brooks M. W., Bell G. W., Richardson A. L., Polyak K., Tubo R. and Weinberg R. A.** (2007). Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* **449**, 557-563.

**Keely P. J.** (2011). Mechanisms by which the extracellular matrix and integrin signaling act to regulate the switch between tumor suppression and tumor promotion. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **16**, 205-219.

**Kelly M. L., Astsaturov A. and Chernoff J.** (2013). Role of p21-activated kinases in cardiovascular development and function. *Cell Mol Life Sci*

**Kelly M. L. and Chernoff J.** (2011). Getting smart about p21-activated kinases. *Mol Cell Biol* **31**, 386-387.

**Kendrick H., Regan J. L., Magnay F. A., Grigoriadis A., Mitsopoulos C., Zvelebil M. and Smalley M. J.** (2008). Transcriptome analysis of mammary epithelial subpopulations identifies novel determinants of lineage commitment and cell fate. *BMC Genomics* **9**, 591.

**Khramtsov A. I., Khramtsova G. F., Tretiakova M., Huo D., Olopade O. I. and Goss K. H.** (2010). Wnt/beta-catenin pathway activation is enriched in basal-like breast cancers and predicts poor outcome. *Am J Pathol* **176**, 2911-2920.

**Kim Y., Kugler M. C., Wei Y., Kim K. K., Li X., Brumwell A. N. and Chapman H. A.** (2009). Integrin alpha3beta1-dependent beta-catenin phosphorylation links epithelial Smad signaling to cell contacts. *J Cell Biol* **184**, 309-322.

**Klarman G. J., Decker A. and Farrar W. L.** (2008). Epigenetic gene silencing in the Wnt pathway in breast cancer. *Epigenetics* **3**, 59-63.

**Kleinberg D. L., Feldman M. and Ruan W.** (2000). IGF-I: an essential factor in terminal end bud formation and ductal morphogenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **5**, 7-17.

**Klinowska T. C., Alexander C. M., Georges-Labouesse E., Van der Neut R., Kreidberg J. A., Jones C. J., Sonnenberg A. and Streuli C. H.** (2001). Epithelial development and differentiation in the mammary gland is not dependent on alpha 3 or alpha 6 integrin subunits. *Dev Biol* **233**, 449-467.

**Korkaya H., Paulson A., Charafe-Jauffret E., Ginestier C., Brown M., Dutcher J., Clouthier S. G. and Wicha M. S.** (2009). Regulation of mammary stem/progenitor cells by PTEN/Akt/beta-catenin signaling. *PLoS Biol* **7**, e1000121.

**Kouros-Mehr H., Slorach E. M., Sternlicht M. D. and Werb Z.** (2006). GATA-3 maintains the differentiation of the luminal cell fate in the mammary gland. *Cell* **127**, 1041-1055.

**Kreidberg J. A., Donovan M. J., Goldstein S. L., Rennke H., Shepherd K., Jones R. C. and Jaenisch R.** (1996). Alpha 3 beta 1 integrin has a crucial role in kidney and lung organogenesis. *Development* **122**, 3537-3547.

**Kritikou E. A., Sharkey A., Abell K., Came P. J., Anderson E., Clarkson R. W. and Watson C. J.** (2003). A dual, non-redundant, role for LIF as a regulator of development and STAT3-mediated cell death in mammary gland. *Development* **130**, 3459-3468.

**Kuperwasser C., Chavarria T., Wu M., Magrane G., Gray J. W., Carey L., Richardson A. and Weinberg R. A.** (2004). Reconstruction of functionally normal and malignant human breast tissues in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 4966-4971.

**Kuukasjarvi T., Tanner M., Pennanen S., Karhu R., Kallioniemi O. P. and Isola J.** (1997). Genetic changes in intraductal breast cancer detected by comparative genomic hybridization. *Am J Pathol* **150**, 1465-1471.

**LaBarge M. A., Nelson C. M., Villadsen R., Fridriksdottir A., Ruth J. R., Stampfer M. R., Petersen O. W. and Bissell M. J.** (2009). Human mammary progenitor cell fate decisions are products of interactions with combinatorial microenvironments. *Integr Biol (Camb)* **1**, 70-79.

**Lahlou H. and Muller W. J.** (2011). beta1-integrins signaling and mammary tumor progression in transgenic mouse models: implications for human breast cancer. *Breast Cancer Res* **13**, 229.

**Lahlou H., Sanguin-Gendreau V., Frame M. C. and Muller W. J.** (2012). Focal adhesion kinase contributes to proliferative potential of ErbB2 mammary tumour cells but is dispensable for ErbB2 mammary tumour induction in vivo. *Breast Cancer Res* **14**, R36.

**Lahlou H., Sanguin-Gendreau V., Zuo D., Cardiff R. D., McLean G. W., Frame M. C. and Muller W. J.** (2007). Mammary epithelial-specific disruption of the focal adhesion kinase blocks mammary tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 20302-20307.

**Lambert A. W., Ozturk S. and Thiagalingam S.** (2012). Integrin signaling in mammary epithelial cells and breast cancer. *ISRN Oncol* **2012**, 493283.

**Lecuit T. and Sonnenberg A.** (2011). Cell-to-cell contact and extracellular matrix. Editorial overview. *Curr Opin Cell Biol* **23**, 505-507.

**Li N., Zhang Y., Naylor M. J., Schatzmann F., Maurer F., Wintermantel T., Schuetz G., Mueller U., Streuli C. H. and Hynes N. E.** (2005). Beta1 integrins regulate mammary gland proliferation and maintain the integrity of mammary alveoli. *EMBO J* **24**, 1942-1953.

**Li W., Ferguson B. J., Khaled W. T., Tevendale M., Stingl J., Poli V., Rich T., Salomoni P. and Watson C. J.** (2009). PML depletion disrupts normal mammary gland development and skews the composition of the mammary luminal cell progenitor pool. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 4725-4730.

**Lim E., Vaillant F., Wu D., Forrest N. C., Pal B., Hart A. H., Asselin-Labat M. L., Gyorki D. E., Ward T., Partanen A., Feleppa F., Huschtscha L. I., Thorne H. J., Fox S. B., Yan M., French J. D., Brown M. A., Smyth G. K., Visvader J. E. and Lindeman G. J.** (2009). Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers. *Nat Med* **15**, 907-913.

**Lin S. Y., Xia W., Wang J. C., Kwong K. Y., Spohn B., Wen Y., Pestell R. G. and Hung M. C.** (2000). Beta-catenin, a novel prognostic marker for breast cancer: its roles in cyclin D1 expression and cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 4262-4266.

**Long W., Wagner K. U., Lloyd K. C., Binart N., Shillingford J. M., Hennighausen L. and Jones F. E.** (2003). Impaired differentiation and lactational failure of Erbb4-deficient mammary glands identify ERBB4 as an obligate mediator of STAT5. *Development* **130**, 5257-5268.

**Lu P., Weaver V. M. and Werb Z.** (2012). The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *J Cell Biol* **196**, 395-406.

**Lu P. and Werb Z.** (2008). Patterning mechanisms of branched organs. *Science* **322**, 1506-1509.

**Luetteke N. C., Qiu T. H., Fenton S. E., Troyer K. L., Riedel R. F., Chang A. and Lee D. C.** (1999). Targeted inactivation of the EGF and amphiregulin genes reveals distinct roles for EGF receptor ligands in mouse mammary gland development. *Development* **126**, 2739-2750.

**Luo D. Y., Wazir R., Tian Y., Yue X., Wei T. Q. and Wang K. J.** (2013a). Integrin alphav Mediates Contractility Whereas Integrin alpha4 Regulates Proliferation of Human Bladder Smooth Muscle Cells via FAK Pathway under Physiological Stretch. *J Urol* **190**, 1421-1429.

**Luo M., Fan H., Nagy T., Wei H., Wang C., Liu S., Wicha M. S. and Guan J. L.** (2009). Mammary epithelial-specific ablation of the focal adhesion kinase suppresses mammary tumorigenesis by affecting mammary cancer stem/progenitor cells. *Cancer Res* **69**, 466-474.

**Luo M. and Guan J. L.** (2010). Focal adhesion kinase: a prominent determinant in breast cancer initiation, progression and metastasis. *Cancer Lett* **289**, 127-139.

**Luo M., Zhao X., Chen S., Liu S., Wicha M. S. and Guan J. L.** (2013b). Distinct FAK activities determine progenitor and mammary stem cell characteristics. *Cancer Res* **73**, 12.

**Lydon J. P., DeMayo F. J., Funk C. R., Mani S. K., Hughes A. R., Montgomery C. A., Jr., Shyamala G., Conneely O. M. and O'Malley B. W.** (1995). Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes Dev* **9**, 2266-2278.

**Mailleux A. A., Overholtzer M., Schmelzle T., Bouillet P., Strasser A. and Brugge J. S.** (2007). BIM regulates apoptosis during mammary ductal morphogenesis, and its absence reveals alternative cell death mechanisms. *Dev Cell* **12**, 221-234.

**Mailleux A. A., Spencer-Dene B., Dillon C., Ndiaye D., Savona-Baron C., Itoh N., Kato S., Dickson C., Thiery J. P. and Bellusci S.** (2002). Role of FGF10/FGFR2b signaling during mammary gland development in the mouse embryo. *Development* **129**, 53-60.

**Malanchi I., Peinado H., Kassen D., Hussenot T., Metzger D., Chambon P., Huber M., Hohl D., Cano A., Birchmeier W. and Huelsken J.** (2008). Cutaneous cancer stem cell maintenance is dependent on beta-catenin signalling. *Nature* **452**, 650-653.

**Malanchi I., Santamaria-Martinez A., Susanto E., Peng H., Lehr H. A., Delaloye J. F. and Huelsken J.** (2012). Interactions between cancer stem cells and their niche govern metastatic colonization. *Nature* **481**, 85-89.

**Mallepell S., Krust A., Chambon P. and Brisken C.** (2006). Paracrine signaling through the epithelial estrogen receptor alpha is required for proliferation and morphogenesis in the mammary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 2196-2201.

**Maller O., Martinson H. and Schedin P.** (2010). Extracellular matrix composition reveals complex and dynamic stromal-epithelial interactions in the mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **15**, 301-318.

**Mani S. A., Guo W., Liao M. J., Eaton E. N., Ayyanan A., Zhou A. Y., Brooks M., Reinhard F., Zhang C. C., Shipitsin M., Campbell L. L., Polyak K., Brisken C., Yang J. and Weinberg R. A.** (2008). The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* **133**, 704-715.

**Manohar A., Shome S. G., Lamar J., Stirling L., Iyer V., Pumiglia K. and DiPersio C. M.** (2004). Alpha 3 beta 1 integrin promotes keratinocyte cell survival through activation of a MEK/ERK signaling pathway. *J Cell Sci* **117**, 4043-4054.

**Marcotte R., Smith H. W., Sanguin-Gendreau V., McDonough R. V. and Muller W. J.** (2012). Mammary epithelial-specific disruption of c-Src impairs cell cycle progression and tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 2808-2813.

**Margadant C., Monsuur H. N., Norman J. C. and Sonnenberg A.** (2011). Mechanisms of integrin activation and trafficking. *Curr Opin Cell Biol* **23**, 607-614.

**Margadant C., Raymond K., Kreft M., Sachs N., Janssen H. and Sonnenberg A.** (2009). Integrin alpha3beta1 inhibits directional migration and wound re-epithelialization in the skin. *J Cell Sci* **122**, 278-288.

**Martinez-Rico C., Pincet F., Thiery J. P. and Dufour S.** (2010). Integrins stimulate E-cadherin-mediated intercellular adhesion by regulating Src-kinase activation and actomyosin contractility. *J Cell Sci* **123**, 712-722.

**Matushansky I., Maki R. G. and Cordon-Cardo C.** (2008). A context dependent role for Wnt signaling in tumorigenesis and stem cells. *Cell Cycle* **7**, 720-724.

**Medema J. P.** (2013). Cancer stem cells: the challenges ahead. *Nat Cell Biol* **15**, 338-344.

**Millon-Fremillon A., Brunner M., Abed N., Collomb E., Ribba A. S., Block M. R., Albiges-Rizo C. and Bouvard D.** (2013). Calcium and calmodulin-dependent serine/threonine protein kinase type II (CaMKII)-mediated intramolecular opening of integrin cytoplasmic domain-associated protein-1 (ICAP-1alpha) negatively regulates beta1 integrins. *J Biol Chem* **288**, 20248-20260.

**Mitchell K., Svenson K. B., Longmate W. M., Gkirtzimanaki K., Sadej R., Wang X., Zhao J., Eliopoulos A. G., Berditchevski F. and Dipersio C. M.** (2010). Suppression of integrin alpha3beta1 in breast cancer cells reduces cyclooxygenase-2 gene expression and inhibits tumorigenesis, invasion, and cross-talk to endothelial cells. *Cancer Res* **70**, 6359-6367.

**Miyazaki K.** (2006). Laminin-5 (laminin-332): Unique biological activity and role in tumor growth and invasion. *Cancer Sci* **97**, 91-98.

**Miyoshi K., Shillingford J. M., Smith G. H., Grimm S. L., Wagner K. U., Oka T., Rosen J. M., Robinson G. W. and Hennighausen L.** (2001). Signal transducer and activator of transcription (Stat) 5 controls the proliferation and differentiation of mammary alveolar epithelium. *J Cell Biol* **155**, 531-542.

**Molofsky A. V., Pardal R., Iwashita T., Park I. K., Clarke M. F. and Morrison S. J.** (2003). Bmi-1 dependence distinguishes neural stem cell self-renewal from progenitor proliferation. *Nature* **425**, 962-967.

**Molyneux G., Geyer F. C., Magnay F. A., McCarthy A., Kendrick H., Natrajan R., Mackay A., Grigoriadis A., Tutt A., Ashworth A., Reis-Filho J. S. and Smalley M. J.** (2010). BRCA1 basal-like breast cancers originate from luminal epithelial progenitors and not from basal stem cells. *Cell Stem Cell* **7**, 403-417.

**Montanez E., Ussar S., Schifferer M., Bosl M., Zent R., Moser M. and Fassler R.** (2008). Kindlin-2 controls bidirectional signaling of integrins. *Genes Dev* **22**, 1325-1330.

**Morel A. P., Hinkal G. W., Thomas C., Fauvet F., Courtois-Cox S., Wierinckx A., Devouassoux-Shisheboran M., Treilleux I., Tissier A., Gras B., Pourchet J., Puisieux I., Browne G. J., Spicer D. B., Lachuer J., Ansieau S. and Puisieux A.** (2012). EMT inducers catalyze malignant transformation of mammary epithelial cells and drive tumorigenesis towards claudin-low tumors in transgenic mice. *PLoS Genet* **8**, e1002723.

**Morel A. P., Lievre M., Thomas C., Hinkal G., Ansieau S. and Puisieux A.** (2008). Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One* **3**, e2888.

**Moser M., Nieswandt B., Ussar S., Pozgajova M. and Fassler R.** (2008). Kindlin-3 is essential for integrin activation and platelet aggregation. *Nat Med* **14**, 325-330.

**Moumen M., Chiche A., Cagnet S., Petit V., Raymond K., Faraldo M. M., Deugnier M. A. and Glukhova M. A.** (2011). The mammary myoepithelial cell. *Int J Dev Biol* **55**, 763-771.

**Moumen M., Chiche A., Decraene C., Petit V., Gendarillas A., Deugnier M. A., Glukhova M. A. and Faraldo M. M.** (in revision). Myc is required for beta-catenin-mediated mammary stem cell amplification and tumorigenesis. *Molecular Cancer*

**Moumen M., Chiche A., Deugnier M. A., Petit V., Gendarillas A., Glukhova M. A. and Faraldo M. M.** (2012). The proto-oncogene Myc is essential for mammary stem cell function. *Stem Cells* **30**, 1246-1254.

**Mueller S. O., Clark J. A., Myers P. H. and Korach K. S.** (2002). Mammary gland development in adult mice requires epithelial and stromal estrogen receptor alpha. *Endocrinology* **143**, 2357-2365.

**Mulac-Jericevic B., Lydon J. P., DeMayo F. J. and Conneely O. M.** (2003). Defective mammary gland morphogenesis in mice lacking the progesterone receptor B isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 9744-9749.

**Mulac-Jericevic B., Mullinax R. A., DeMayo F. J., Lydon J. P. and Conneely O. M.** (2000). Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform. *Science* **289**, 1751-1754.

**Muschler J. and Streuli C. H.** (2010). Cell-matrix interactions in mammary gland development and breast cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a003202.

**Nagy T., Wei H., Shen T. L., Peng X., Liang C. C., Gan B. and Guan J. L.** (2007). Mammary epithelial-specific deletion of the focal adhesion kinase gene leads to severe lobulo-alveolar hypoplasia and secretory immaturity of the murine mammary gland. *J Biol Chem* **282**, 31766-31776.

**Nassour M., Idoux-Gillet Y., Selmi A., Come C., Faraldo M. L., Deugnier M. A. and Savagner P.** (2012). Slug controls stem/progenitor cell growth dynamics during mammary gland morphogenesis. *PLoS One* **7**, e53498.

**Naylor M. J., Li N., Cheung J., Lowe E. T., Lambert E., Marlow R., Wang P., Schatzmann F., Wintermantel T., Schuetz G., Clarke A. R., Mueller U., Hynes N. E. and Streuli C. H.** (2005). Ablation of beta1 integrin in mammary epithelium reveals a key role for integrin in glandular morphogenesis and differentiation. *J Cell Biol* **171**, 717-728.

**Nelson C. M. and Bissell M. J.** (2006). Of extracellular matrix, scaffolds, and signaling: tissue architecture regulates development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* **22**, 287-309.

**Neville M. C., McFadden T. B. and Forsyth I.** (2002). Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **7**, 49-66.

**Neville M. C., Medina D., Monks J. and Hovey R. C.** (1998). The mammary fat pad. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **3**, 109-116.

**Nguyen A. V. and Pollard J. W.** (2000). Transforming growth factor beta3 induces cell death during the first stage of mammary gland involution. *Development* **127**, 3107-3118.

**Noel A. and Foidart J. M.** (1998). The role of stroma in breast carcinoma growth in vivo. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **3**, 215-225.

**Nowell P. C.** (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* **194**, 23-28.

**Oakes S. R., Naylor M. J., Asselin-Labat M. L., Blazek K. D., Gardiner-Garden M., Hilton H. N., Kazlauskas M., Pritchard M. A., Chodosh L. A., Pfeffer P. L., Lindeman G. J., Visvader J. E. and Ormandy C. J.** (2008). The Ets transcription factor Elf5 specifies mammary alveolar cell fate. *Genes Dev* **22**, 581-586.

**Oktay M., Wary K. K., Dans M., Birge R. B. and Giancotti F. G.** (1999). Integrin-mediated activation of focal adhesion kinase is required for signaling to Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase and progression through the G1 phase of the cell cycle. *J Cell Biol* **145**, 1461-1469.

**Oloumi A., Maidan M., Lock F. E., Tearle H., McKinney S., Muller W. J., Aparicio S. A. and Dedhar S.** (2010). Cooperative signaling between Wnt1 and integrin-linked kinase induces accelerated breast tumor development. *Breast Cancer Res* **12**, R38.

**Ormandy C. J., Camus A., Barra J., Damotte D., Lucas B., Buteau H., Edery M., Brousse N., Babinet C., Binart N. and Kelly P. A.** (1997). Null mutation of the prolactin receptor gene produces multiple reproductive defects in the mouse. *Genes Dev* **11**, 167-178.

**Pan H., Wanami L. S., Dissanayake T. R. and Bachelder R. E.** (2009). Autocrine semaphorin3A stimulates alpha2 beta1 integrin expression/function in breast tumor cells. *Breast Cancer Res Treat* **118**, 197-205.

**Parashurama N., Lobo N. A., Ito K., Mosley A. R., Habte F. G., Zabala M., Smith B. R., Lam J., Weissman I. L., Clarke M. F. and Gambhir S. S.** (2012). Remodeling of endogenous mammary epithelium by breast cancer stem cells. *Stem Cells* **30**, 2114-2127.

**Park I. K., Qian D., Kiel M., Becker M. W., Pihalja M., Weissman I. L., Morrison S. J. and Clarke M. F.** (2003). Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. *Nature* **423**, 302-305.

**Parsa S., Ramasamy S. K., De Langhe S., Gupte V. V., Haigh J. J., Medina D. and Bellusci S.** (2008). Terminal end bud maintenance in mammary gland is dependent upon FGFR2b signaling. *Dev Biol* **317**, 121-131.

**Pece S., Tosoni D., Confalonieri S., Mazzarol G., Vecchi M., Ronzoni S., Bernard L., Viale G., Pelicci P. G. and Di Fiore P. P.** (2010). Biological and molecular heterogeneity of breast cancers correlates with their cancer stem cell content. *Cell* **140**, 62-73.

**Perou C. M., Sorlie T., Eisen M. B., van de Rijn M., Jeffrey S. S., Rees C. A., Pollack J. R., Ross D. T., Johnsen H., Akslen L. A., Fluge O., Pergamenschikov A., Williams C.,**

**Zhu S. X., Lonning P. E., Borresen-Dale A. L., Brown P. O. and Botstein D.** (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**, 747-752.

**Petit V. and Thiery J. P.** (2000). Focal adhesions: structure and dynamics. *Biol Cell* **92**, 477-494.

**Pietersen A. M., Evers B., Prasad A. A., Tanger E., Cornelissen-Steijger P., Jonkers J. and van Lohuizen M.** (2008). Bmi1 regulates stem cells and proliferation and differentiation of committed cells in mammary epithelium. *Curr Biol* **18**, 1094-1099.

**Place A. E., Jin Huh S. and Polyak K.** (2011). The microenvironment in breast cancer progression: biology and implications for treatment. *Breast Cancer Res* **13**, 227.

**Plaks V., Brenot A., Lawson D. A., Linnemann J. R., Van Kappel E. C., Wong K. C., de Sauvage F., Klein O. D. and Werb Z.** (2013). Lgr5-expressing cells are sufficient and necessary for postnatal mammary gland organogenesis. *Cell Rep* **3**, 70-78.

**Polyak K. and Weinberg R. A.** (2009). Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer* **9**, 265-273.

**Pontier S. M., Huck L., White D. E., Rayment J., Sanguin-Gendreau V., Hennessy B., Zuo D., St-Arnaud R., Mills G. B., Dedhar S., Marshall C. J. and Muller W. J.** (2010). Integrin-linked kinase has a critical role in ErbB2 mammary tumor progression: implications for human breast cancer. *Oncogene* **29**, 3374-3385.

**Pontier S. M. and Muller W. J.** (2009). Integrins in mammary-stem-cell biology and breast-cancer progression--a role in cancer stem cells? *J Cell Sci* **122**, 207-214.

**Pozzi A. and Zent R.** (2011). Extracellular matrix receptors in branched organs. *Curr Opin Cell Biol* **23**, 547-553.

**Prat A., Parker J. S., Karginova O., Fan C., Livasy C., Herschkowitz J. I., He X. and Perou C. M.** (2010). Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res* **12**, R68.

**Prince J. M., Klinowska T. C., Marshman E., Lowe E. T., Mayer U., Miner J., Aberdam D., Vestweber D., Gusterson B. and Streuli C. H.** (2002). Cell-matrix interactions during development and apoptosis of the mouse mammary gland in vivo. *Dev Dyn* **223**, 497-516.

**Proia T. A., Keller P. J., Gupta P. B., Klebba I., Jones A. D., Sedic M., Gilmore H., Tung N., Naber S. P., Schnitt S., Lander E. S. and Kuperwasser C.** (2011). Genetic predisposition directs breast cancer phenotype by dictating progenitor cell fate. *Cell Stem Cell* **8**, 149-163.

**Provenzano P. P., Inman D. R., Eliceiri K. W., Beggs H. E. and Keely P. J.** (2008). Mammary epithelial-specific disruption of focal adhesion kinase retards tumor formation and metastasis in a transgenic mouse model of human breast cancer. *Am J Pathol* **173**, 1551-1565.

**Pulkkinen L., Kimonis V. E., Xu Y., Spanou E. N., McLean W. H. and Uitto J.** (1997). Homozygous alpha6 integrin mutation in junctional epidermolysis bullosa with congenital duodenal atresia. *Hum Mol Genet* **6**, 669-674.

**Pulkkinen L., Rouan F., Bruckner-Tuderman L., Wallerstein R., Garzon M., Brown T., Smith L., Carter W. and Uitto J.** (1998). Novel ITGB4 mutations in lethal and nonlethal variants of epidermolysis bullosa with pyloric atresia: missense versus nonsense. *Am J Hum Genet* **63**, 1376-1387.

**Pylayeva Y., Gillen K. M., Gerald W., Beggs H. E., Reichardt L. F. and Giancotti F. G.** (2009). Ras- and PI3K-dependent breast tumorigenesis in mice and humans requires focal adhesion kinase signaling. *J Clin Invest* **119**, 252-266.

**Ramirez A., Page A., Gandarillas A., Zanet J., Pibre S., Vidal M., Tusell L., Genesca A., Whitaker D. A., Melton D. W. and Jorcano J. L.** (2004). A keratin K5Cre transgenic line appropriate for tissue-specific or generalized Cre-mediated recombination. *Genesis* **39**, 52-57.

**Ramirez N. E., Zhang Z., Madamanchi A., Boyd K. L., O'Rear L. D., Nashabi A., Li Z., Dupont W. D., Zijlstra A. and Zutter M. M.** (2011). The alpha(2)beta(1) integrin is a metastasis suppressor in mouse models and human cancer. *J Clin Invest* **121**, 226-237.

**Rattis F. M., Voermans C. and Reya T.** (2004). Wnt signaling in the stem cell niche. *Curr Opin Hematol* **11**, 88-94.

**Raymond K., Cagnet S., Kreft M., Janssen H., Sonnenberg A. and Glukhova M. A.** (2011). Control of mammary myoepithelial cell contractile function by alpha3beta1 integrin signalling. *EMBO J* **30**, 1896-1906.

**Raymond K., Deugnier M. A., Faraldo M. M. and Glukhova M. A.** (2009). Adhesion within the stem cell niches. *Curr Opin Cell Biol* **21**, 623-629.

**Raymond K., Faraldo M. M., Deugnier M. A. and Glukhova M. A.** (2012). Integrins in mammary development. *Semin Cell Dev Biol* **23**, 599-605.

**Regan J. L., Kendrick H., Magnay F. A., Vafaizadeh V., Groner B. and Smalley M. J.** (2012). c-Kit is required for growth and survival of the cells of origin of Brca1-mutation-associated breast cancer. *Oncogene* **31**, 869-883.

**Reis-Filho J. S. and Pusztai L.** (2011). Gene expression profiling in breast cancer: classification, prognostication, and prediction. *Lancet* **378**, 1812-1823.

**Reversi A., Cassoni P. and Chini B.** (2005). Oxytocin receptor signaling in myoepithelial and cancer cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **10**, 221-229.

**Reya T., Morrison S. J., Clarke M. F. and Weissman I. L.** (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **414**, 105-111.

**Richert M. M., Schwertfeger K. L., Ryder J. W. and Anderson S. M.** (2000). An atlas of mouse mammary gland development. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **5**, 227-241.

**Robinson G. W.** (2007). Cooperation of signalling pathways in embryonic mammary gland development. *Nat Rev Genet* **8**, 963-972.

**Rodler E., Korde L. and Gralow J.** (2010). Current treatment options in triple negative breast cancer. *Breast Dis* **32**, 99-122.

**Rodriguez-Fraticelli A. E., Auzan M., Alonso M. A., Bornens M. and Martin-Belmonte F.** (2012). Cell confinement controls centrosome positioning and lumen initiation during epithelial morphogenesis. *J Cell Biol* **198**, 1011-1023.

**Rodriguez-Fraticelli A. E. and Martin-Belmonte F.** (2013). Mechanical control of epithelial lumen formation. *Small GTPases* **4**, 136-140.

**Roskoski R., Jr.** (2012). ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol Res* **66**, 105-143.

**Rottner K. and Stradal T. E.** (2011). Actin dynamics and turnover in cell motility. *Curr Opin Cell Biol* **23**, 569-578.

**Ruan W., Newman C. B. and Kleinberg D. L.** (1992). Intact and amino-terminally shortened forms of insulin-like growth factor I induce mammary gland differentiation and development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 10872-10876.

**Ruzzi L., Gagnoux-Palacios L., Pinola M., Belli S., Meneguzzi G., D'Alessio M. and Zambruno G.** (1997). A homozygous mutation in the integrin alpha6 gene in junctional epidermolysis bullosa with pyloric atresia. *J Clin Invest* **99**, 2826-2831.

**Sachs N., Secades P., van Hulst L., Kreft M., Song J. Y. and Sonnenberg A.** (2012). Loss of integrin alpha3 prevents skin tumor formation by promoting epidermal turnover and depletion of slow-cycling cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 21468-21473.

**Sarrio D., Franklin C. K., Mackay A., Reis-Filho J. S. and Isacke C. M.** (2012). Epithelial and mesenchymal subpopulations within normal basal breast cell lines exhibit distinct stem cell/progenitor properties. *Stem Cells* **30**, 292-303.

**Scales T. M., Jayo A., Obara B., Holt M. R., Hotchin N. A., Berditchevski F. and Parsons M.** (2013). alpha3beta1 integrins regulate CD151 complex assembly and membrane dynamics in carcinoma cells within 3D environments. *Oncogene* **32**, 3965-3979.

**Scharffetter-Kochanek K., Lu H., Norman K., van Nood N., Munoz F., Grabbe S., McArthur M., Lorenzo I., Kaplan S., Ley K., Smith C. W., Montgomery C. A., Rich S. and Beaudet A. L.** (1998). Spontaneous skin ulceration and defective T cell function in CD18 null mice. *J Exp Med* **188**, 119-131.

**Schatzmann F., Marlow R. and Streuli C. H.** (2003). Integrin signaling and mammary cell function. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **8**, 395-408.

**Schedin P., Mitrenga T., McDaniel S. and Kaeck M.** (2004). Mammary ECM composition and function are altered by reproductive state. *Mol Carcinog* **41**, 207-220.

**Schere-Levy C., Buggiano V., Quaglino A., Gattelli A., Cirio M. C., Piazzon I., Vanzulli S. and Kordon E. C.** (2003). Leukemia inhibitory factor induces apoptosis of the mammary epithelial cells and participates in mouse mammary gland involution. *Exp Cell Res* **282**, 35-47.

**Schiefermeier N., Teis D. and Huber L. A.** (2011). Endosomal signaling and cell migration. *Curr Opin Cell Biol* **23**, 615-620.

**Schober M., Raghavan S., Nikolova M., Polak L., Pasolli H. A., Beggs H. E., Reichardt L. F. and Fuchs E.** (2007). Focal adhesion kinase modulates tension signaling to control actin and focal adhesion dynamics. *J Cell Biol* **176**, 667-680.

**Seagroves T. N., Krnacik S., Raught B., Gay J., Burgess-Beusse B., Darlington G. J. and Rosen J. M.** (1998). C/EBP $\beta$ , but not C/EBP $\alpha$ , is essential for ductal morphogenesis, lobuloalveolar proliferation, and functional differentiation in the mouse mammary gland. *Genes Dev* **12**, 1917-1928.

**Shackleton M., Vaillant F., Simpson K. J., Stingl J., Smyth G. K., Asselin-Labat M. L., Wu L., Lindeman G. J. and Visvader J. E.** (2006). Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature* **439**, 84-88.

**Shattil S. J., Kim C. and Ginsberg M. H.** (2010). The final steps of integrin activation: the end game. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 288-300.

**Shen B., Delaney M. K. and Du X.** (2012). Inside-out, outside-in, and inside-outside-in: G protein signaling in integrin-mediated cell adhesion, spreading, and retraction. *Curr Opin Cell Biol* **24**, 600-606.

**Shipitsin M., Campbell L. L., Argani P., Weremowicz S., Bloushtain-Qimron N., Yao J., Nikolskaya T., Serebryiskaya T., Beroukhim R., Hu M., Halushka M. K., Sukumar S., Parker L. M., Anderson K. S., Harris L. N., Garber J. E., Richardson A. L., Schnitt S. J., Nikolsky Y., Gelman R. S. and Polyak K.** (2007). Molecular definition of breast tumor heterogeneity. *Cancer Cell* **11**, 259-273.

**Shirakihara T., Kawasaki T., Fukagawa A., Semba K., Sakai R., Miyazono K., Miyazawa K. and Saitoh M.** (2013). Identification of integrin alpha3 as a molecular marker of cells undergoing epithelial-mesenchymal transition and of cancer cells with aggressive phenotypes. *Cancer Sci* **104**, 1189-1197.

**Sin S., Bonin F., Petit V., Meseure D., Lallemand F., Bieche I., Bellahcene A., Castronovo V., de Wever O., Gespach C., Lidereau R. and Driouch K.** (2011). Role of the focal adhesion protein kindlin-1 in breast cancer growth and lung metastasis. *J Natl Cancer Inst* **103**, 1323-1337.

**Sivaraman L. and Medina D.** (2002). Hormone-induced protection against breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **7**, 77-92.

**Sleeman K. E., Kendrick H., Ashworth A., Isacke C. M. and Smalley M. J.** (2006). CD24 staining of mouse mammary gland cells defines luminal epithelial, myoepithelial/basal and non-epithelial cells. *Breast Cancer Res* **8**, R7.

**Sleeman K. E., Kendrick H., Robertson D., Isacke C. M., Ashworth A. and Smalley M. J.** (2007). Dissociation of estrogen receptor expression and in vivo stem cell activity in the mammary gland. *J Cell Biol* **176**, 19-26.

**Sorlie T., Perou C. M., Tibshirani R., Aas T., Geisler S., Johnsen H., Hastie T., Eisen M. B., van de Rijn M., Jeffrey S. S., Thorsen T., Quist H., Matei J. C., Brown P. O., Botstein D., Lonning P. E. and Borresen-Dale A. L.** (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 10869-10874.

**Sorlie T., Tibshirani R., Parker J., Hastie T., Marron J. S., Nobel A., Deng S., Johnsen H., Pesich R., Geisler S., Demeter J., Perou C. M., Lonning P. E., Brown P. O., Borresen-Dale A. L. and Botstein D.** (2003). Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 8418-8423.

**Spencer V. A., Xu R. and Bissell M. J.** (2010). Gene expression in the third dimension: the ECM-nucleus connection. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **15**, 65-71.

**Spike B. T., Engle D. D., Lin J. C., Cheung S. K., La J. and Wahl G. M.** (2012). A mammary stem cell population identified and characterized in late embryogenesis reveals similarities to human breast cancer. *Cell Stem Cell* **10**, 183-197.

**Srivastava S., Matsuda M., Hou Z., Bailey J. P., Kitazawa R., Herbst M. P. and Horseman N. D.** (2003). Receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand induction via Jak2 and Stat5a in mammary epithelial cells. *J Biol Chem* **278**, 46171-46178.

**St Johnston D. and Sanson B.** (2011). Epithelial polarity and morphogenesis. *Curr Opin Cell Biol* **23**, 540-546.

**Staniszewska A. D., Pensa S., Caffarel M. M., Anderson L. H., Poli V. and Watson C. J.** (2012). Stat3 is required to maintain the full differentiation potential of mammary stem cells and the proliferative potential of mammary luminal progenitors. *PLoS One* **7**, e52608.

**Stephens L. E., Sutherland A. E., Klimanskaya I. V., Andrieux A., Meneses J., Pedersen R. A. and Damsky C. H.** (1995). Deletion of beta 1 integrins in mice results in inner cell mass failure and peri-implantation lethality. *Genes Dev* **9**, 1883-1895.

**Sternlicht M. D.** (2006). Key stages in mammary gland development: the cues that regulate ductal branching morphogenesis. *Breast Cancer Res* **8**, 201.

**Stingl J. and Caldas C.** (2007). Molecular heterogeneity of breast carcinomas and the cancer stem cell hypothesis. *Nat Rev Cancer* **7**, 791-799.

**Stingl J., Eirew P., Ricketson I., Shackleton M., Vaillant F., Choi D., Li H. I. and Eaves C. J.** (2006). Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells. *Nature* **439**, 993-997.

**Streuli C. H. and Akhtar N.** (2009). Signal co-operation between integrins and other receptor systems. *Biochem J* **418**, 491-506.

**Subbaram S. and Dipersio C. M.** (2011). Integrin alpha3beta1 as a breast cancer target. *Expert Opin Ther Targets* **15**, 1197-1210.

**Sun P., Yuan Y., Li A., Li B. and Dai X.** (2010). Cytokeratin expression during mouse embryonic and early postnatal mammary gland development. *Histochem Cell Biol* **133**, 213-221.

**Taddei I., Deugnier M. A., Faraldo M. M., Petit V., Bouvard D., Medina D., Fassler R., Thiery J. P. and Glukhova M. A.** (2008). Beta1 integrin deletion from the basal compartment of the mammary epithelium affects stem cells. *Nat Cell Biol* **10**, 716-722.

**Taddei I., Faraldo M. M., Teuliere J., Deugnier M. A., Thiery J. P. and Glukhova M. A.** (2003). Integrins in mammary gland development and differentiation of mammary epithelium. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **8**, 383-394.

**Takada Y., Ye X. and Simon S.** (2007). The integrins. *Genome Biol* **8**, 215.

**Takamatsu Y., Simmons P. J. and Levesque J. P.** (1998). Dual control by divalent cations and mitogenic cytokines of alpha 4 beta 1 and alpha 5 beta 1 integrin avidity expressed by human hemopoietic cells. *Cell Adhes Commun* **5**, 349-366.

**Takizawa Y., Shimizu H., Nishikawa T., Hatta N., Pulkkinen L. and Uitto J.** (1997). Novel ITGB4 mutations in a patient with junctional epidermolysis bullosa-pyloric atresia syndrome and altered basement membrane zone immunofluorescence for the alpha6beta4 integrin. *J Invest Dermatol* **108**, 943-946.

**Tang C. H. and Wei Y.** (2008). The urokinase receptor and integrins in cancer progression. *Cell Mol Life Sci* **65**, 1916-1932.

**Tang D. D. and Anfinogenova Y.** (2008). Physiologic properties and regulation of the actin cytoskeleton in vascular smooth muscle. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* **13**, 130-140.

**Tang D. G.** (2012). Understanding cancer stem cell heterogeneity and plasticity. *Cell Res* **22**, 457-472.

**Tanos T. and Brisken C.** (2008). What signals operate in the mammary niche? *Breast Dis* **29**, 69-82.

**Tanos T., Rojo L. J., Echeverria P. and Brisken C.** (2012). ER and PR signaling nodes during mammary gland development. *Breast Cancer Res* **14**, 210.

**Teissedre B., Pinderhughes A., Incassati A., Hatsell S. J., Hiremath M. and Cowin P.** (2009). MMTV-Wnt1 and -DeltaN89beta-catenin induce canonical signaling in distinct progenitors and differentially activate Hedgehog signaling within mammary tumors. *PLoS One* **4**, e4537.

**Teuliere J., Faraldo M. M., Deugnier M. A., Shtutman M., Ben-Ze'ev A., Thiery J. P. and Glukhova M. A.** (2005). Targeted activation of beta-catenin signaling in basal mammary

epithelial cells affects mammary development and leads to hyperplasia. *Development* **132**, 267-277.

**Thiery J. P., Acloque H., Huang R. Y. and Nieto M. A.** (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* **139**, 871-890.

**Tilghman R. W. and Parsons J. T.** (2008). Focal adhesion kinase as a regulator of cell tension in the progression of cancer. *Semin Cancer Biol* **18**, 45-52.

**Tinkle C. L., Pasolli H. A., Stokes N. and Fuchs E.** (2008). New insights into cadherin function in epidermal sheet formation and maintenance of tissue integrity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 15405-15410.

**Tomaskovic-Crook E., Thompson E. W. and Thiery J. P.** (2009). Epithelial to mesenchymal transition and breast cancer. *Breast Cancer Res* **11**, 213.

**Tronik-Le Roux D., Roullot V., Poujol C., Kortulewski T., Nurden P. and Marguerie G.** (2000). Thrombasthenic mice generated by replacement of the integrin alpha(IIb) gene: demonstration that transcriptional activation of this megakaryocytic locus precedes lineage commitment. *Blood* **96**, 1399-1408.

**Tsuruta D., Kobayashi H., Imanishi H., Sugawara K., Ishii M. and Jones J. C.** (2008). Laminin-332-integrin interaction: a target for cancer therapy? *Curr Med Chem* **15**, 1968-1975.

**Vafaizadeh V., Klemmt P., Brendel C., Weber K., Doebele C., Britt K., Grez M., Fehse B., Desrivieres S. and Groner B.** (2010). Mammary epithelial reconstitution with gene-modified stem cells assigns roles to Stat5 in luminal alveolar cell fate decisions, differentiation, involution, and mammary tumor formation. *Stem Cells* **28**, 928-938.

**van Amerongen R., Bowman A. N. and Nusse R.** (2012). Developmental stage and time dictate the fate of Wnt/beta-catenin-responsive stem cells in the mammary gland. *Cell Stem Cell* **11**, 387-400.

**van der Flier A. and Sonnenberg A.** (2001). Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res* **305**, 285-298.

**van der Neut R., Krimpenfort P., Calafat J., Niessen C. M. and Sonnenberg A.** (1996). Epithelial detachment due to absence of hemidesmosomes in integrin beta 4 null mice. *Nat Genet* **13**, 366-369.

**Van Keymeulen A., Rocha A. S., Ousset M., Beck B., Bouvencourt G., Rock J., Sharma N., Dekoninck S. and Blanpain C.** (2011). Distinct stem cells contribute to mammary gland development and maintenance. *Nature* **479**, 189-193.

**van Miltenburg M. H., Lalai R., de Bont H., van Waaij E., Beggs H., Danen E. H. and van de Water B.** (2009). Complete focal adhesion kinase deficiency in the mammary gland causes ductal dilation and aberrant branching morphogenesis through defects in Rho kinase-dependent cell contractility. *FASEB J* **23**, 3482-3493.

**Veeck J., Bektas N., Hartmann A., Kristiansen G., Heindrichs U., Knuchel R. and Dahl E.** (2008). Wnt signalling in human breast cancer: expression of the putative Wnt inhibitor Dickkopf-3 (DKK3) is frequently suppressed by promoter hypermethylation in mammary tumours. *Breast Cancer Res* **10**, R82.

**Velasco-Velazquez M. A., Li Z., Casimiro M., Loro E., Homsi N. and Pestell R. G.** (2011). Examining the role of cyclin D1 in breast cancer. *Future Oncol* **7**, 753-765.

**Veltmaat J. M., Mailleux A. A., Thiery J. P. and Bellusci S.** (2003). Mouse embryonic mammogenesis as a model for the molecular regulation of pattern formation. *Differentiation* **71**, 1-17.

**Veltmaat J. M., Van Veelen W., Thiery J. P. and Bellusci S.** (2004). Identification of the mammary line in mouse by Wnt10b expression. *Dev Dyn* **229**, 349-356.

**Vicente-Manzanares M., Choi C. K. and Horwitz A. R.** (2009). Integrins in cell migration--the actin connection. *J Cell Sci* **122**, 199-206.

**Vidal F., Aberdam D., Miquel C., Christiano A. M., Pulkkinen L., Uitto J., Ortonne J. P. and Meneguzzi G.** (1995). Integrin beta 4 mutations associated with junctional epidermolysis bullosa with pyloric atresia. *Nat Genet* **10**, 229-234.

**Visvader J. E.** (2009). Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis. *Genes Dev* **23**, 2563-2577.

**Visvader J. E.** (2011). Cells of origin in cancer. *Nature* **469**, 314-322.

**Wagner K. U., McAllister K., Ward T., Davis B., Wiseman R. and Hennighausen L.** (2001). Spatial and temporal expression of the Cre gene under the control of the MMTV-LTR in different lines of transgenic mice. *Transgenic Res* **10**, 545-553.

**Walker J. L. and Assoian R. K.** (2005). Integrin-dependent signal transduction regulating cyclin D1 expression and G1 phase cell cycle progression. *Cancer Metastasis Rev* **24**, 383-393.

**Wang Z., Symons J. M., Goldstein S. L., McDonald A., Miner J. H. and Kreidberg J. A.** (1999). (Alpha)3(beta)1 integrin regulates epithelial cytoskeletal organization. *J Cell Sci* **112** (Pt 17), 2925-2935.

**Watson C. J.** (2006). Involution: apoptosis and tissue remodelling that convert the mammary gland from milk factory to a quiescent organ. *Breast Cancer Res* **8**, 203.

**Watt F. M.** (2002). The stem cell compartment in human interfollicular epidermis. *J Dermatol Sci* **28**, 173-180.

**Weber G. F., Bjerke M. A. and DeSimone D. W.** (2011). Integrins and cadherins join forces to form adhesive networks. *J Cell Sci* **124**, 1183-1193.

**Wehrle-Haller B.** (2012). Assembly and disassembly of cell matrix adhesions. *Curr Opin Cell Biol* **24**, 569-581.

**Weigelt B., Kreike B. and Reis-Filho J. S.** (2009). Metaplastic breast carcinomas are basal-like breast cancers: a genomic profiling analysis. *Breast Cancer Res Treat* **117**, 273-280.

**White D. E., Cardiff R. D., Dedhar S. and Muller W. J.** (2001). Mammary epithelial-specific expression of the integrin-linked kinase (ILK) results in the induction of mammary gland hyperplasias and tumors in transgenic mice. *Oncogene* **20**, 7064-7072.

**White D. E., Kurpios N. A., Zuo D., Hassell J. A., Blaess S., Mueller U. and Muller W. J.** (2004). Targeted disruption of beta1-integrin in a transgenic mouse model of human breast cancer reveals an essential role in mammary tumor induction. *Cancer Cell* **6**, 159-170.

**Wilde C. J., Knight C. H. and Flint D. J.** (1999). Control of milk secretion and apoptosis during mammary involution. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **4**, 129-136.

**Wirth A., Schroeter M., Kock-Hauser C., Manser E., Chalovich J. M., De Lanerolle P. and Pfitzer G.** (2003). Inhibition of contraction and myosin light chain phosphorylation in guinea-pig smooth muscle by p21-activated kinase 1. *J Physiol* **549**, 489-500.

**Wiseman B. S., Sternlicht M. D., Lund L. R., Alexander C. M., Mott J., Bissell M. J., Soloway P., Itohara S. and Werb Z.** (2003). Site-specific inductive and inhibitory activities of MMP-2 and MMP-3 orchestrate mammary gland branching morphogenesis. *J Cell Biol* **162**, 1123-1133.

**Wozniak M. A., Desai R., Solski P. A., Der C. J. and Keely P. J.** (2003). ROCK-generated contractility regulates breast epithelial cell differentiation in response to the physical properties of a three-dimensional collagen matrix. *J Cell Biol* **163**, 583-595.

**Xu R., Nelson C. M., Muschler J. L., Veiseh M., Vonderhaar B. K. and Bissell M. J.** (2009). Sustained activation of STAT5 is essential for chromatin remodeling and maintenance of mammary-specific function. *J Cell Biol* **184**, 57-66.

**Xu R., Spencer V. A., Groesser D. L. and Bissell M. J.** (2010). Laminin regulates PI3K basal localization and activation to sustain STAT5 activation. *Cell Cycle* **9**, 4315-4322.

**Yamaji D., Na R., Feuermann Y., Pechhold S., Chen W., Robinson G. W. and Hennighausen L.** (2009). Development of mammary luminal progenitor cells is controlled by the transcription factor STAT5A. *Genes Dev* **23**, 2382-2387.

**Yang X. H., Richardson A. L., Torres-Arzayus M. I., Zhou P., Sharma C., Kazarov A. R., Andzelm M. M., Strominger J. L., Brown M. and Hemler M. E.** (2008). CD151 accelerates breast cancer by regulating alpha 6 integrin function, signaling, and molecular organization. *Cancer Res* **68**, 3204-3213.

**Yao E. S., Zhang H., Chen Y. Y., Lee B., Chew K., Moore D. and Park C.** (2007). Increased beta1 integrin is associated with decreased survival in invasive breast cancer. *Cancer Res* **67**, 659-664.

**Yin X., Xiang T., Li L., Su X., Shu X., Luo X., Huang J., Yuan Y., Peng W., Oberst M., Kelly K., Ren G. and Tao Q.** (2013). DACT1, an antagonist to Wnt/beta-catenin signaling,

suppresses tumor cell growth and is frequently silenced in breast cancer. *Breast Cancer Res* **15**, R23.

**Yurchenco P. D. and Patton B. L.** (2009). Developmental and pathogenic mechanisms of basement membrane assembly. *Curr Pharm Des* **15**, 1277-1294.

**Zaidel-Bar R., Itzkovitz S., Ma'ayan A., Iyengar R. and Geiger B.** (2007). Functional atlas of the integrin adhesome. *Nat Cell Biol* **9**, 858-867.

**Zeng Y. A. and Nusse R.** (2010). Wnt proteins are self-renewal factors for mammary stem cells and promote their long-term expansion in culture. *Cell Stem Cell* **6**, 568-577.