



HAL
open science

Rôle de la Podoplanine dans le développement et la tumorigenèse mammaires

Laura Bresson

► **To cite this version:**

Laura Bresson. Rôle de la Podoplanine dans le développement et la tumorigenèse mammaires. Biologie cellulaire. Université Paris Saclay (COmUE), 2017. Français. NNT : 2017SACLS403 . tel-01686686

HAL Id: tel-01686686

<https://theses.hal.science/tel-01686686v1>

Submitted on 17 Jan 2018

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.

Rôle de la Podoplanine dans le développement et la tumorigénèse mammaires

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'Institut Curie (UMR144)

École doctorale n°CBMS 582
Spécialité de doctorat : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Thèse présentée et soutenue à Paris, le 21 Novembre 2017, par

Laura Bresson

Composition du Jury :

Eric Rubinstein

Directeur de recherche Inserm, Université Paris-Sud (U935)

Président

Christine Perret

Directeur de recherche Inserm, Institut Cochin (U1016)

Rapporteur

Pierre Savagner

Chargé de recherche Cnrs, IRCM (U1194)

Rapporteur

Fatima Mechta-Grigoriou

Directeur de recherche Inserm, Institut Curie (U830)

Examineur

Veronique Orian-Rousseau

Professeur, KIT (Karlsruhe Institute of Technology Germany ; ITG)

Examineur

Marina Glukhova

Directeur de recherche Inserm, Institut Curie (UMR144)

Directeur de thèse

Marie Ange Deugnier

Chargé de recherche Inserm, Institut Curie (UMR144)

Co-Directeur de thèse

A mon frère, Rémi

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier Marina GLUKHOVA d'avoir encadré ce travail de thèse. Vous m'avez permis d'intégrer votre équipe en me proposant un sujet particulièrement passionnant et motivant et m'avez octroyé tous les moyens nécessaires pour mener à bien ce projet. Merci de votre confiance.

Je remercie également Marie Ange DEUGNIER qui m'a dirigé tout au long de ces quatre années. Vous avez été disponible, à l'écoute de mes interrogations mais aussi de mes doutes. Les nombreuses discussions que nous avons eues ainsi que vos conseils, dictés par votre grande expérience, m'ont été plus que profitables. Vous avez su canaliser mon enthousiasme parfois peut être un peu excessif pour me recentrer sur les points essentiels du projet. Enfin, vos nombreuses relectures et corrections de ma thèse ont été très appréciables.

Je tiens particulièrement à exprimer toute ma gratitude à Christine PERRET et Pierre SAVAGNER d'avoir accepté de relire cette thèse et d'en être rapporteurs. Je remercie aussi Eric RUBINSTEIN qui m'a fait le très grand honneur d'accepter la présidence du jury et également, Véronique ORIAN-ROUSSEAU et Fatima MECHTA-GRIGORIOU d'assister à la présentation de ce travail en tant que membres du jury.

Marisa, je tiens également à te remercier pour ton soutien de tous les instants. Ton aide a été appréciable notamment pour ton expertise sur la partie tumorigénèse du projet et aussi la relecture du manuscrit.

Mathilde, au départ rencontrée dans le cadre professionnel, tu es devenue une véritable amie de qui j'ai pu apprendre énormément et qui as toujours répondu à mes attentes. Merci pour ton soutien dans les moments délicats et les franches parties de rigolade que nous avons pu avoir.

Je remercie également Amandine, le pilier immuable de ce laboratoire. Merci de m'avoir formée de la manière la plus complète qui soit et de m'avoir soutenue techniquement et moralement dans les moments difficiles.

Cela a été un vrai plaisir de partager ces moments avec vous toutes au sein de l'équipe. Je vous suis reconnaissante de m'avoir toujours remotivée et soutenue dans les moments les plus difficiles lors de ces 4 années et toutes mes excuses si j'ai pu vous paraître par moments un peu trop exigeante et passionnée. Je n'oublie pas de remercier Aurélie, aujourd'hui vers d'autres horizons scientifiques, pour son soutien et ses conseils avisés d'ancienne thésarde du labo.

Je voudrais remercier également nos stagiaires, Evens et Cris, avec qui j'ai eu la chance de travailler ; J'ai fait de mon mieux pour vous transmettre ce que vous attendiez de moi mais j'ai aussi beaucoup appris à votre contact.

Une thèse c'est aussi un lieu où l'on passe de nombreuses heures et où il vaut mieux se sentir bien. Je tiens à remercier les équipes Chavrier, Radvanyi et l'UMR3666 du 1^{er} étage du bâtiment Burg pour leurs réponses positives à mes nombreuses requêtes ainsi qu'Annick, Sophie et Zocia de la plateforme de cytométrie, Sonia, notre animalière préférée et Fatima, de la laverie, pour son aide et son sourire réconfortant.

Un merci particulier à Marc TROMBE, de l'Entreprise SANOFI, pour m'avoir « initiée » au domaine de la recherche, discipline que je n'ai jamais cessé d'aimer depuis. C'est après avoir effectué mon stage de fin d'études d'ingénieur dans ton service que j'ai eu envie de travailler dans ce domaine. Tu es pour beaucoup dans ma présence ici aujourd'hui. Merci Marc du fond du cœur.

Un énorme merci à mes parents pour leurs conseils ainsi que leur soutien inconditionnel durant toutes mes études et pour avoir toujours cru en moi. Vous avez approuvé mes choix, m'encourageant toujours à accomplir mes désirs. Je n'en serai pas là aujourd'hui sans vous à mes côtés. Je vous aime et ne saurais jamais comment vous remercier pour tout ce que vous m'avez apporté.

Clément, outre ton soutien culinaire qui m'a permis de me restaurer décemment ... Tout en supportant mes sautes d'humeur, tu as su me réconforter mais aussi me booster pendant ces quatre longues années et je t'en suis infiniment reconnaissante.

Aurore, tu es pour moi comme une sœur et je ne saurais jamais assez te remercier d'être à mes côtés depuis près de 25 ans et d'autant plus dans ce moment délicat qu'est la thèse.

Une épreuve aussi difficile qu'une thèse ne peut être surmontée qu'en étant soutenue et entourée de vrais amis ; Alyzée, Benjamin, Camille L. et M., Cecilia, Charlène, Charlotte, Christelle, Florian, Floriane, Marie, Melody, Nolwenn et Yoann, un gros gâté à tous.

Merci également et toutes mes excuses à tous ceux que j'ai eu grand plaisir de côtoyer pendant ces quatre années et que j'ai omis de citer.

Et une mention spéciale pour toutes mes petites souris que j'ai « utilisées » par obligation. Je n'oublie pas que tout ceci a été rendu possible grâce à elles !

Merci à tous.

Table des matières

Table des matières	5
Table des illustrations et tableaux :	8
Liste des abréviations :	10
INTRODUCTION	13
I) La Glande mammaire.....	14
1) Organisation de la glande mammaire.....	14
a) L'épithélium mammaire : une bicouche spécialisée	15
b) Le stroma mammaire	17
c) Séparation des populations basales et luminales mammaires par cytométrie de flux	19
d) Ciblage des cellules épithéliales mammaires basales et luminales.....	20
2) Les étapes du développement de la glande mammaire	22
a) Développement embryonnaire	22
b) Développement post-natal	24
3) Les cellules souches mammaires	31
a) Mise en évidence des propriétés de régénération de l'épithélium mammaire	33
b) Activité clonogénique des cellules épithéliales mammaires.....	34
c) Les cellules souches multi-potentes basales, les progéniteurs lumaux et les cellules lumaux matures murines.....	35
d) Cellules souches mammaires adultes chez l'humain.	41
4) Les régulateurs des cellules souches de la glande mammaire murine	41
a) Les régulateurs majeurs du compartiment luminal	42
b) Les régulateurs majeurs des cellules souches basales	44
5) La voie de signalisation Wnt et son implication dans le développement mammaire	47
a) Signalosome de la voie Wnt	47
b) Voie de signalisation Wnt canonique	50
c) Les voies de signalisation Wnt non canoniques	54
d) La voie de signalisation Wnt dans le développement de la glande mammaire	56
e) La voie de signalisation Wnt dans le contrôle des cellules souches basales	58
II) La Tumorigénèse mammaire	63
1) Les cancers du sein : Caractéristiques et Classification	63
a) Classification morphologique et histologique des tumeurs du sein.....	64
b) Classification moléculaire des cancers du sein.....	65
2) Les tumeurs mammaires de type basal	67
3) L'hétérogénéité tumorale : hypothèses	68
a) Le concept de la cellule tumorale d'origine	68
b) Hétérogénéité intra-tumorale.....	70
4) Rôle de la voie Wnt/ β cat dans la tumorigénèse mammaire	72
III) La Podoplanine	75
1) Introduction et historique	75
2) Données structurales.....	76
a) Structure du gène.....	76
b) Structure de la protéine	76
3) Expression tissulaire	79
a) Expression au cours du développement embryonnaire.....	79
b) Expression chez l'adulte	79
c) Expression dans le cancer.....	81
4) Régulation de l'expression de Podoplanine.....	81
a) Signaux inducteurs	81
b) Régulation transcriptionnelle.....	82
c) Régulation post-transcriptionnelle	82

5) Partenaires moléculaires de Pdpn	83
a) Clec-2	84
b) ERM	85
c) CD44	86
6) Rôles physiologiques et pathologiques de Pdpn	86
a) Pdpn et développement embryonnaire	86
b) Fonctions de la Pdpn dans le système immunitaire adulte	88
c) Pdpn dans le contrôle de la migration cellulaire	90
d) Implications pathologiques de la Podoplanine	91
Contexte, objectifs de l'étude et approches expérimentales.....	95
RESULTATS	97
I) La perte de Podoplanine perturbe la fonction des cellules souches et la tumorigénèse mammaires par la modulation de la voie de signalisation Wnt/βcaténine	98
1) Dans l'épithélium mammaire post-natal, la Pdpn est exprimée exclusivement dans le compartiment basal, incluant les cellules souches bipotentes	98
2) La perte de Pdpn dans l'épithélium mammaire entraîne un défaut fonctionnel des cellules souches basales et luminales.....	98
3) L'épithélium mammaire déficient en Pdpn présente une perturbation d'expression des composants de la voie de signalisation Wnt/ β cat	100
4) La Pdpn module positivement la voie de signalisation Wnt/ β cat dans les cellules basales mammaires.....	100
5) La perte de Pdpn atténue la formation de tumeurs triple-négatives dans un modèle murin de tumorigénèse mammaire induite par l'activation de la voie Wnt/ β cat	101
6) Conclusion de l'article.....	102
II) Analyse de l'épithélium mammaire des souris déficientes en Pdpn en gestation et lactation.	140
III) Morphologie et cytosquelette des cellules basales myoépithéliales déficientes en Pdpn	144
IV) Rôle de la partie cytoplasmique de Pdpn dans la potentialisation de la signalisation Wnt	149
V) Etude de la perte de Pdpn dans l'épithélium mammaire des souris <i>K5DNbc</i>	151
VI) Expression et valeur pronostique de Pdpn dans les différents sous-types de cancer du sein humains	153
DISCUSSION	157
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	169
MATERIELS ET METHODES.....	170
1) Modèles de souris transgéniques	171
2) Génotypage des souris transgéniques.....	171
3) Dissociation des glandes ou tumeurs mammaires murines	172
4) Culture de la lignée cellulaire BC44	172
5) Tri cellulaire et analyse en cytométrie de flux.....	173
6) Essai de formation de colonies	173
7) Essai de formation de mammosphères et tumorsphères	174
8) Isolement d'organoïdes et culture <i>ex vivo</i> en 2D/3D	175
a) Isolement des organoïdes à partir de tissu mammaire	175
b) Etalement et analyses d'explants <i>ex vivo</i> en culture 2D	175
c) Essai de formation d'organoïdes <i>ex vivo</i> en culture 3D.....	175
9) Implantation de dispositifs hormonaux.....	176
10) Transplantation de cellules isolées et de fragments d'épithélium mammaire	176

11)	Etude morphologique et histologique des tissus mammaires	177
a)	Prélèvement, fixation et coupes histologiques	177
b)	Marquage au Xgal	178
c)	Colorations histologiques	178
12)	Immunohistologie et immunocytologie	179
13)	Constructions plasmidiques et transfections de la lignée BC44	180
14)	Western Blot.....	181
15)	Anticorps	181
16)	RT-PCR en temps réel	182
17)	Analyses <i>in silico</i>	182
18)	Analyse de micromatrices tissulaires sur des échantillons humains	183
19)	Analyse statistique des résultats	184

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	185
--	------------

ANNEXES.....	208
---------------------	------------

Table des illustrations et tableaux :

Figure 1: Comparaison de l'anatomie de glande mammaire humaine et murine.....	15
Figure 2 : Représentation schématique et organisation de l'épithélium mammaire murin.	17
Figure 3 : Séparation des populations épithéliales mammaires murines par cytométrie de flux	20
Figure 4 : Développement embryonnaire de la glande mammaire murine	23
Figure 5 : Développement post-natal de la glande mammaire murine.	24
Figure 6 : Acteurs des régulations hormonales du développement mammaire	25
Figure 7 : Organisation morphologique et histologique du bourgeon terminal (TEB) en puberté	26
Figure 8 : Destin cellulaire et composants de la niche des cellules souches.....	32
Figure 9 : Principe de la technique de transplantation mammaire orthotopique	33
Figure 10 : Séparation par cytométrie de flux et propriétés fonctionnelles des populations mammaires basales et luminales.....	35
Figure 11 : Principe du traçage cellulaire <i>in vivo</i> par la recombinaison Cre	38
Figure 12 : Schéma modélisant la hiérarchie hypothétique des lignages cellulaires mammaires.	40
Figure 13 : Différents modes de transport des ligands Wnt entre les cellules productrices (= « Wnt- producing cell ») et les cellules répondant à la signalisation Wnt (= « Wnt-receiving cell »).....	48
Figure 14 : Schéma des composants du signalosome de Wnt	49
Figure 15 : Schéma modélisant le mécanisme d'activation de la voie de signalisation Wnt/ β cat	51
Figure 16 : Mécanisme d'action du module potentialisateur de la signalisation Wnt : Rspo/Lgrs/ZNRF3- RNF43	54
Figure 17 : Les deux voies de signalisation Wnt non canoniques majeures.....	55
Figure 18 : Modèle des interactions luminal-basal impliquant la voie Wnt/ β cat.	59
Figure 19 : Hétérogénéité des cellules basales associées à la voie de signalisation Wnt/ β cat.	62
Figure 20 : Schéma de la progression tumorale mammaire.....	63
Figure 21 : Classification hiérarchique des échantillons de cancers du sein sur la base de PAM50.	66
Figure 22 : Origines de l'hétérogénéité inter-tumorale dans le cancer du sein.	69
Figure 23 : Les souris $K5\Delta N\beta cat$ développent des tumeurs mammaires de type basal triples négatives	74
Figure 24 : Schéma de la structure de Pdpn et des carbohydrates présents dans sa partie extracellulaire. ...	77
Figure 25 : Schéma des différents domaines des protéines Pdpn humaine et murine.....	78
Figure 26 : Schéma des interactions principales de Pdpn avec ses partenaires moléculaires.	84
Figure 27 : Mécanisme d'activation des protéines de l'ERM et voies de signalisation régulées.....	85
Figure 28 : Schéma des mécanismes impliqués dans la séparation du sac lymphatique de la veine cardinale et rôle de la Pdpn dans ce processus.....	87
Figure 29 : Expression de la Pdpn dans l'épithélium mammaire humain et murin.....	95
Figure 30 : Etude de la réponse à la stimulation hormonale mimant un début de gestation dans des souris déficientes en Pdpn	141
Figure 31 : Analyse des glandes mammaires de souris contrôles, Pdpn ^{F/F} , et mutantes, K5Cre ; Pdpn ^{F/F} , au 15 ^{ème} jour de deuxième gestation successive et capacité d'allaitement de ces souris.	143
Figure 32 : Capacité d'étalement des cellules basales mammaires déficientes en Pdpn.....	145
Figure 33 : Organisation du cytosquelette des cellules myoépithéliales mammaires déficientes en Pdpn..	146
Figure 34 : Impact de la perte de Pdpn dans l'induction de morphogénèse dans des organoïdes.....	148
Figure 35 : Etude de la fonction de la queue cytoplasmique de la Pdpn dans la réponse à la signalisation Wnt	150
Figure 36 : Analyse des propriétés progénitrices des cellules basales issues des souris $K5\Delta N\beta cat$ (Ctrl) et $K5\Delta N\beta cat;K5Cre;Pdpn^{F/F}$ (Mut) avant l'apparition des tumeurs.	151
Figure 37 : Analyse <i>in silico</i> de l'expression et de la valeur pronostique de Pdpn dans les cancers du sein.	153
Figure 38 : Expression de la Pdpn dans des cas de carcinomes mammaires <i>in situ</i>	155
Figure 39 : Modèle de l'implication de la Pdpn dans les interactions luminal-basal contrôlées par la signalisation Wnt/ β cat.....	166
Figure 40 : Analyse par cytométrie de flux de l'expression de Pdpn dans les cellules BC44 transfectées.	180

Tableau 1 : Principaux marqueurs de surface utilisés pour la séparation des populations épithéliales mammaires.....	19
Tableau 2 : Principaux promoteurs utilisés dans les modèles murins permettant l'étude du développement et de la tumorigénèse mammaires.....	21
Tableau 3 : Tableau résumant les principaux régulateurs des lignages mammaires.	42
Tableau 4 : Résumé des principaux organes et types cellulaires adultes exprimant la Pdpn	80
Tableau 5 : Résumé des principaux types de cancer exprimant la Pdpn.....	81
Tableau 6 : Présentation des amorces utilisées pour le géotypage des souris par PCR.....	172
Tableau 7 : Liste des anticorps primaires utilisés dans cette étude classés par type d'application	182

Liste des abréviations :

ADN	Acide desoxyribonucléique
ALDH	Aldehyde deshydrogenase
APC	Adenomatous polyposis coli
AREG	Amphiregulin
ARN	Acide ribonucléique
β cat	β -caténine
β -Trcp	beta-transducin repeat containing protein
Bcl11a	B-cell Lymphoma leukemia 11A
BCL9	Legless
Blg	Beta-LactoGlobuline
BMP4	Bone Morphogenesis Protein-4
C-ERMAD	C-terminal actin binding domain
CAF	Cancer associated fibroblast
CaMKII	Calmodulin-dependant protein kinase II
Cas	Crk-associated substrate
Cas9	CRISPR Associated System-9
CBP	CREB binding domain
CCL5	Chemokine ligand 5
CCS	Carcinomes à cellules squameuses
CD	Cluster of Differentiation
Cdk	Cyclin-dependant kinase
CIS	Carcinomes <i>in situ</i>
Ck1	Casein kinase 1
Clec-2	C-type lectin-like receptor 2
CRD	Cystein rich domain
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CSC	Cancer stem cell
DCs	Dentritic cells
DKK	Dikkopf
Dvl	Dishevelled
E10	Embryogénèse jour 10
EGF	Epidermal Growth Factor
Elf5	74 Like ETS transcription Factor-5
EMT	Epithelial to mesenchymal transition ou transition épithelio-mésenchymateuse
EpCAM	Epithelial Cell Adhesion Molecule
ER	Estrogen Receptor
ErbB	EGF family tyrosine kinase receptor
ERM	Ezrin, Radixin, Moesin
ES	Cellules souches embryonnaires
FGF	Fibroblastic Growth Factor
FoxA1	Forkhead box protein A1
FoxM1	Foxhead box M1
FRCs	Fibroblastic reticular cells
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
Fzd	Frizzled
GFP	Green Fluorescent Protein
GH	Growth Hormone
GPCR	G protein-coupled receptor
GSK3 β	Glycogen synthase kinase 3 β
HA	Hémagglutinine
HDACs	Histone-déacétylases

HEVs	High endothelial venules
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HR	Hormone Receptor
HSP	Heat shock protein
ICAM	InterCellular Adhesion Molecule
IFN γ	Interferon- γ
IGF	Insulin Growth Factor
IKK β	Inhibitor of nuclear factor Kappa-B Kinase subunit Beta
Itg	Intégrine
Jak	Janus Kinase
Jnk	C-jun N-terminal kinase
K	Kératine
Kb	Kilobase
KDa	Kilo Dalton
KO	Knock-Out
LEC	Lymphatic endothelial cell ou cellules endothéliales lymphatiques
Lef1	Lymphoid Enhancer binding Factor-1
Lgr	Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor
LiCl	Chlorure de lithium
Lif	Leukemia Inhibitory Factor
Lin	Lineage
Lrp	Low density lipoprotein
MDCK	Madin Darby canine kidney cells
miRNA	micro-ARN
MMP	Matrix MetalloProteinase
MMTV	Mouse mammary tumor virus
MVBs	Multivesicular bodies
Myh11	Myosin heavy chain 11
NES	Nuclear Export Sequence
NF- κ B	Nuclear Factor- KappaB
Nfat	Nuclear factor of activated T-cells
NLS	Nuclear Localization Sequence
Nrg1	Neuregulin-1
PCP	Planar cell polarity
PDX	patient-derived xenograft ou Greffes dérivées de patients
PK	Protein kinase
PLAG	Platelet aggregation stimulating domain
PP	Protein phosphatase
ppGalNAc-Ts	N-acetylgalactosaminyltransferases
PR	Progesterone Receptor
Prl	Prolactin
ProcR	Protein-C Receptor
PS1	Presenilline 1
Pygo2	Pygopus
RankL	Rank ligand
RNF43	Ring finger protein 43
Rock	Rho-associated kinase
Rspo	R-spondins
Sca-1	Stem Cell Antigen-1
sFRPs	Secreted Fzd-related proteins
SHIP	SH2 domain-containing 5'-inositol phosphatase
α -SMA	α -Smooth Muscle Actin
SOSTDC1	Sclerotin domain containing-1

Stat	Signal Transducer and Activator of Transcription
STOP	Stabilization of protein
Tbx-3	T-BoX protein-3
Tcf	T-cell factor
TDLUs	Terminal Duct Lobular Unit, unités lobulo-canaulaire terminales
TEB	Terminal End Bud
TEM	Transition épithelio-mésenchymateuse
TGF	Transforming Growth Factor
Tle1	Transducin-like enhancer of split
TMA	Tissue-microarrays
TN	Triples-négatifs
TNBC	Triple negative breast cancer
TNF	Tumor Necrosis Factor
TPA	12-O-tetradecanoyphorbol-13-acetate
Trp53	Transformation Related Protein-53
Tsp	Tetraspanin
Tsp1	Trombospondin type 1 domain
UTR	Untranslated regions
WAP	Whey Acidic Protein
Wif	Wnt inhibitory factor
Wls	Wntless
Wnt	Wingless-type MMTV integration site family
ZFP	Zinc Finger Protein
ZNRF3	Zinc and ring finger protein 3

INTRODUCTION

I) La Glande mammaire

La glande mammaire, spécifique aux mammifères, a pour fonction la production de lait qui nourrit la descendance et ainsi perpétue l'espèce. La présence d'anticorps dans le lait maternel permet d'apporter une protection immunitaire aux nouveau-nés. La glande mammaire est une glande exocrine dérivant de l'ectoderme, composée d'un épithélium pseudo-stratifié entouré d'un stroma fibro-adipeux. Son développement et ses étapes de remodelage tissulaire s'effectuent majoritairement après la naissance (pour revues, [Watson et Kreuzaler, 2011](#); [Macias et Hinck, 2012](#); [Inman *et al.*, 2015](#); [Briskin et Ataca, 2015](#)). Par conséquent, c'est un modèle particulièrement intéressant pour l'étude des mécanismes moléculaires qui contrôlent le développement et la différenciation tissulaire. Ces mécanismes sont souvent dérégulés dans les processus tumorigéniques qui conduisent à la formation de cancers du sein. Malgré d'importants progrès dans le dépistage et les traitements, certains cancers du sein restent de pronostic sévère. Mieux caractériser les cellules épithéliales mammaires et identifier leurs régulateurs constituent donc des objectifs de recherche majeurs.

1) Organisation de la glande mammaire

Le nombre de glandes mammaires varie selon les mammifères; on compte une paire chez l'humain et 5 paires chez la souris ([Fig. 1](#)). La morphologie des glandes mammaires humaines et murines est très similaire, puisqu'elles sont toutes deux composées d'un épithélium ramifié entouré d'un stroma. Néanmoins, épithélium comme stroma présentent quelques différences à l'âge adulte. La glande mammaire des femmes nullipares comporte des grappes d'alvéoles situées aux terminaisons des canaux, que l'on appelle unités lobulo-canales terminales (ou TDLUs pour « terminal ductal lobular unit »). Chez la souris adulte vierge, ce type de structure est beaucoup moins développé, l'épithélium étant essentiellement constitué de canaux ramifiés présentant de petits bourgeons alvéolaires latéraux à certains stades du cycle hormonal ([Fig. 1](#) ; pour revue, [Briskin et Ataca, 2015](#)). Par ailleurs, chez la souris, le stroma est essentiellement adipeux tandis que chez la femme, il comprend une composante fibreuse plus ou moins importante (pour revue, [Howard et Lu, 2014](#)).

Malgré ces quelques différences architecturales, de nombreux travaux ont démontré que l'organisation, le fonctionnement et le développement des glandes mammaires murines et humaines sont très comparables et qu'elles partagent des mécanismes essentiels de régulation

moléculaire (pour revue, Visvader, 2009). La souris reste donc un modèle de référence pour l'étude du développement et de la tumorigénèse mammaires.

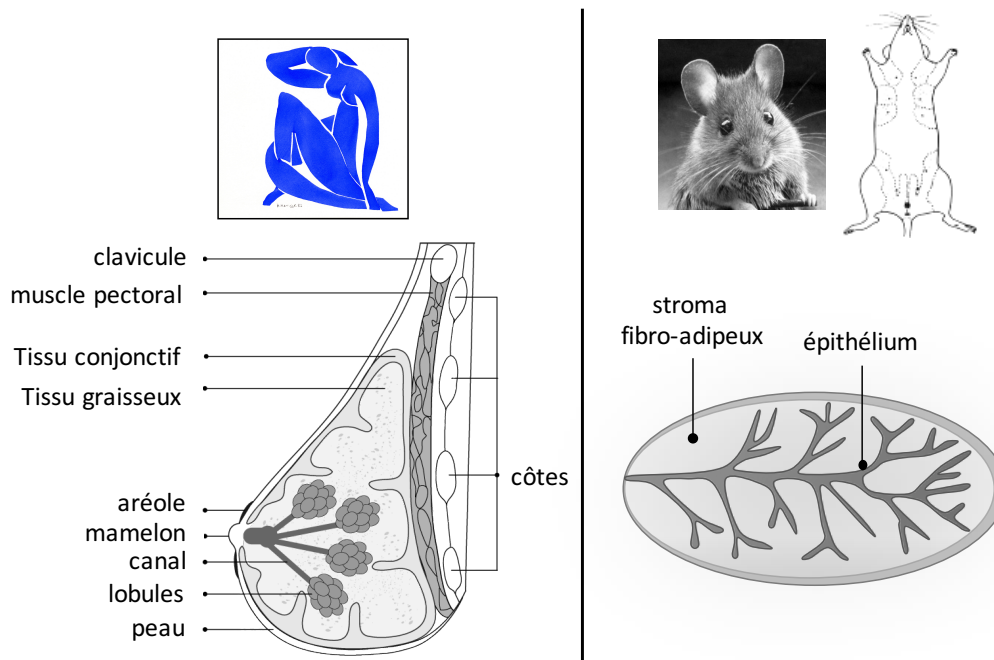


Figure 1: Comparaison de l'anatomie de glande mammaire humaine et murine.

Au stade nullipare, la glande mammaire humaine adulte possède déjà des structures appelées lobules (ou TDLUs) qui seront destinés à la production de lait lors de la lactation. Ces lobules sont connectés avec le mamelon via un réseau de canaux collecteurs. Chez la souris nullipare, la glande mammaire comprend essentiellement une arborescence de canaux entourée du stroma adipeux.

a) L'épithélium mammaire : une bicouche spécialisée

L'épithélium mammaire composant les canaux et alvéoles de la glande mammaire est pseudo-stratifié, il est composé de deux couches distinctes de cellules épithéliales spécialisées :

-une couche de cellules épithéliales « luminales », de forme pavimenteuse destinées à produire et sécréter le lait,

-et une couche de cellules basales dites « myoépithéliales », servant à l'expulsion du lait dans la lumière canalaire.

- **Les cellules luminales, fondamentalement épithéliales et productrices de lait :**

Les cellules luminales expriment les kératines spécifiques, K8, K18, K19 et la cadhérine E (Fig. 2A et B). Certaines d'entre elles, expriment les récepteurs hormonaux aux estrogènes, à la progestérone et à la prolactine (ER, PR et PrIR respectivement). Les cellules ER/PR+, présentes majoritairement dans les canaux, répondent à la stimulation hormonale et produisent différents facteurs paracrines qui influencent la fonction des cellules voisines et le développement

mammaire ([pour revue, Brisken et Ataca, 2015](#)). Lors de la gestation et lactation, les cellules luminales se différencient et sécrètent les protéines du lait comme la caséine β , WAP (de l'anglais « Whey acidic protein ») et la lactoglobuline β .

- **Les cellules basales myoépithéliales, dualité entre épithélium et muscle lisse :**

Les cellules basales myoépithéliales sont à la fois directement en contact avec les cellules luminales et reposent sur la membrane basale. Elles possèdent également un double programme de différenciation : elles expriment les marqueurs des épithélia stratifiés de type basal (les kératines 5/14 et la cadhérine P) ainsi que des marqueurs spécifiques du muscle lisse, caractéristiques d'un programme de différenciation mésenchymateux (l'isoforme α de l'actine du muscle lisse ou α -SMA de l'anglais « smooth muscle actin », la myosine du muscle lisse et la calponine ; [pour revue, Moumen et al., 2011; Fig 2A](#)). Elles sont enrichies en intégrines, principaux récepteurs des composants de la matrice extracellulaire ([pour revue, Glukhova et Streuli, 2013](#)) et expriment les facteurs de transcription Δ Np63 et Snai2/Slug, essentiels au maintien du phénotype basal mammaire ([Barbareschi et al., 2001; Yalcin-Ozuysal et al., 2010; Nassour et al., 2012; Guo et al., 2012](#)).

Dans les canaux, les cellules basales forment une couche quasi-continue de cellules de forme aplatie en contact direct avec la membrane basale. Au contraire, dans les alvéoles elles sont de forme étoilée et s'organisent en un réseau discontinu autour des cellules luminales alvéolaires qui, de ce fait, présentent des zones de contact avec la membrane basale ([Fig. 2B et C](#)). Durant la lactation, les propriétés contractiles des cellules myoépithéliales permettent l'expulsion du lait produit par les cellules luminales dans la lumière des canaux collecteurs.

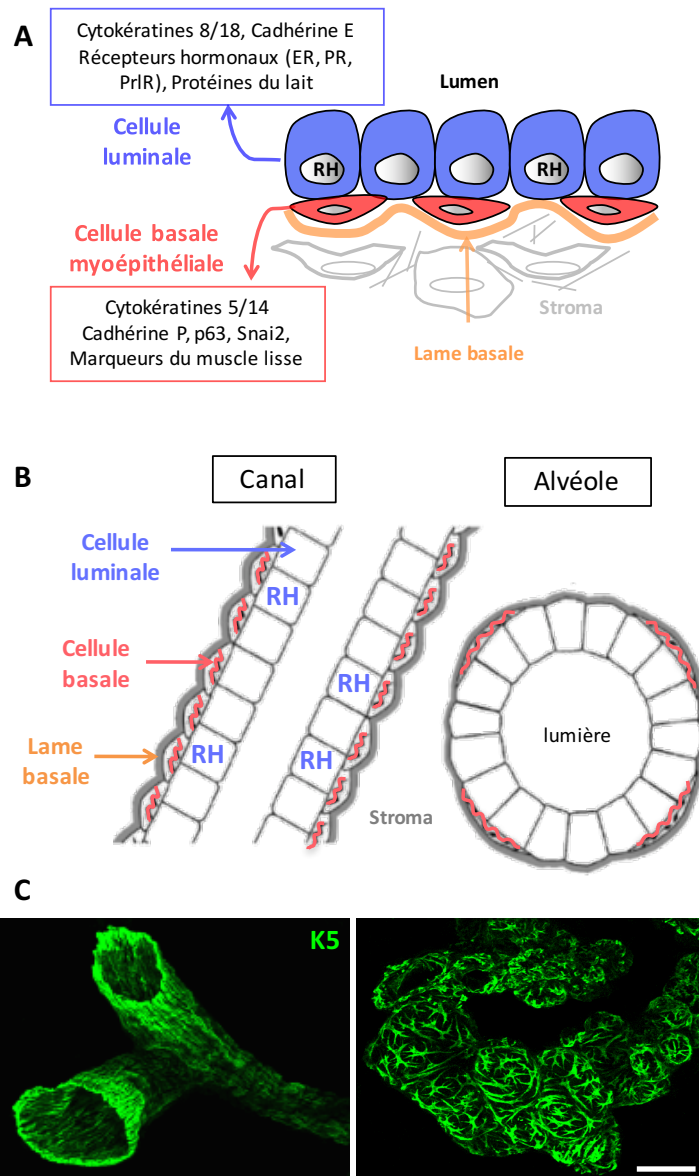


Figure 2 : Représentation schématique et organisation de l'épithélium mammaire murin.

(A) La bicouche épithéliale mammaire est constituée de cellules lumineales et de cellules basales myoépithéliales. La lame basale, formée de protéines et de protéoglycanes, entoure l'épithélium mammaire, le séparant du stroma environnant. (B) Représentation de l'épithélium canalaire et alvéolaire. Les cellules lumineales notées RH (pour récepteurs hormonaux) expriment ER/PR et sont essentiellement présentes dans les canaux. (C) Immunomarquage de canaux (à gauche) et d'alvéoles (à droite) sur coupes épaisses de glande mammaire, illustrant l'organisation des cellules myoépithéliales révélées par un anticorps anti-K5. Barre d'échelle : 150 μ m.

b) Le stroma mammaire

Le stroma mammaire est composé de nombreux types cellulaires incluant des adipocytes, des fibroblastes, des cellules endothéliales vasculaires et lymphatiques, des cellules nerveuses et immunitaires, et une matrice extracellulaire complexe. De nombreux travaux indiquent que le stroma est essentiel au développement normal de l'épithélium (pour revue, Howard et Lu, 2014). Les expériences pionnières de recombinaison tissulaire ont montré que la morphogénèse de

l'épithélium mammaire embryonnaire dépend de la présence et de l'origine tissulaire du mésenchyme. De même, après la naissance, le stroma influence le développement de l'épithélium et ses caractéristiques d'élongation et de ramification. Le rôle de chacun de ses composants cellulaires n'est pas encore totalement élucidé mais on peut mentionner par exemple celui des macrophages et éosinophiles essentiels au développement canalaire ([Gouon-Evans et al., 2000](#)). Les adipocytes font l'objet d'un intérêt récent car le tissu adipeux viscéral produit de nombreux régulateurs moléculaires, incluant des cytokines et hormones comme la leptine ([pour revue, Brisken et O'Malley, 2010](#)). Différents travaux indiquent que les fibroblastes sont nécessaires à la survie des cellules épithéliales et la morphogénèse mammaire. En particulier, il est intéressant de mentionner que pour assurer le développement d'un greffon d'épithélium mammaire humain après sa transplantation dans le coussin adipeux de souris immunodéficientes, il est nécessaire d'y implanter au préalable des fibroblastes primaires humains normaux ([Kuperwasser et al., 2004](#)).

La matrice extracellulaire du stroma mammaire comprend la membrane ou lame basale séparant l'épithélium du stroma et la matrice interstitielle présente entre les différentes cellules stromales du coussin adipeux. La lame basale est une fine couche (100 nm) de glycoprotéines et protéoglycanes qui est construite autour d'un assemblage de polymères de laminines, de fibronectine et d'un réseau de fibres de collagène IV ([pour revue, Muschler et Streuli, 2010](#)). Ses composants sont largement produits par les cellules basales myoépithéliales ([Kendrick et al., 2008](#)). La matrice extracellulaire interstitielle est particulièrement riche en collagène I et III, et comprend aussi de la fibronectine, des tenascines, de l'acide hyaluronique et des protéoglycanes ([pour revue, Muschler et Streuli, 2010](#)). La matrice stromale du tissu mammaire est essentielle non seulement pour l'ancrage des cellules mais aussi pour sa capacité à se lier aux facteurs de croissance ou aux cytokines et les délivrer dans le microenvironnement. Elle confère de plus au stroma des propriétés de rigidité et élasticité connues maintenant pour contrôler les fonctions cellulaires par des mécanismes dit de mécanotransduction ([pour revue, Jansen et al., 2017](#)).

Nous reviendrons plus loin sur l'importance des interactions entre stroma et épithélium dans les étapes du développement mammaire et la fonction des cellules souches.

c) Séparation des populations basales et lumbinales mammaires par cytométrie de flux

Comme nous l'avons décrit précédemment, les populations basales et lumbinales mammaires sont distinguées, *in situ*, par l'expression de protéines intracellulaires spécifiques de leur lignage. Dans les années 2000, la mise au point de processus de dissociation enzymatique de l'épithélium et l'identification de marqueurs de surface ont permis d'isoler les cellules basales et lumbinales par cytométrie de flux, rendant possible leur analyse distincte au plan moléculaire et fonctionnel (Sleeman *et al.*, 2006; Stingl *et al.*, 2006; Shackleton *et al.*, 2006; Sleeman *et al.*, 2007). Les principaux marqueurs utilisés à ce jour pour l'analyse des cellules épithéliales mammaires humaines et murines sont listés dans le Tableau 1. A l'exception de la tyrosine kinase, c-Kit, et de la peptidase, CD10, ce sont toutes des molécules d'adhérence matricielle ou intercellulaire. L'adjonction des marqueurs CD45 et CD31 au cours du processus de séparation permet d'exclure les cellules hématopoïétiques et endothéliales, on peut parfois référencer les cellules restantes par Lin- (pour «lineage - »).

Marqueurs	Espèce	Basal	Luminal ER/PR+	Luminal ER/PR-
CD24	S, Hu	+	++	++
CD49f (Itg α 6)	S, Hu	++	+	+
CD29 (Itg β 1)	S	++	+	+
CD61 (Itg β 3)	S	++	-	++
CD49b (Itg α 2)	S	++	+	++
ICAM-1	S	++	-	+
Sca-1	S	-	++	-
CD117 (c-Kit)	S	-	-	+
EpCAM	S, Hu	+	++	++
CD10	Hu	+	-	-
CD44	Hu	+	-	-

Tableau 1 : Principaux marqueurs de surface utilisés pour la séparation des populations épithéliales mammaires.

(++) Signifie fort niveau d'expression, (+) modéré, (-) pas d'expression, Itg = Intégrine, S = souris, Hu = humain.

Les premières séparations ont révélé que contrairement aux cellules stromales, les cellules épithéliales mammaires exprimaient CD24 et EpCAM et que ces deux molécules d'adhésion apparaissaient plus fortement exprimées par les cellules lumbinales que par les basales myoépithéliales (Sleeman *et al.*, 2006). Par la suite, l'analyse de la distribution des chaînes β 1 (Itg β 1/CD29) ou α 6 (Itg α 6/CD49f) des intégrines a permis une claire séparation des cellules

basales et lumbales au sein du compartiment épithélial CD24+ (Stingl *et al.*, 2006; Shackleton *et al.*, 2006). En raison de leurs interactions privilégiées avec la membrane basale, les cellules basales sont caractérisées par une plus forte expression d'intégrines que les cellules lumbales (Tableau 1 et Fig. 3).

Différentes molécules de surface ont permis de séparer le compartiment luminal, et notamment d'enrichir la fraction ER/PR+ composée essentiellement de cellules lumbales matures (Tableau 1). Celles-ci se sont avérées majoritairement positives pour Sca-1, et négatives pour Itg α 3, Itg α 2, c-kit et ICAM-1 (Asselin-Labat *et al.*, 2007; Sleeman *et al.*, 2007; Regan *et al.*, 2012; Shehata *et al.*, 2012; Di-Cicco *et al.*, 2015). Cependant, une fraction importante de cellules lumbales ER/PR+ est négative pour Sca-1 et les marqueurs Itg β 3 ou c-kit ont des profils d'expression très variables selon les fonds génétiques des souris (pour revue, Visvader et Stingl, 2014; Di-Cicco *et al.*, 2015). A ce jour, la molécule d'adhérence ICAM-1, dont nous avons contribué à caractériser la distribution, est un des marqueurs les plus robustes pour discriminer les cellules lumbales ER/PR+ des cellules ER/PR- (Di-Cicco *et al.*, 2015; Fig. 3). L'article relatif à ce travail sera présenté dans le contexte de la thèse en annexe 1.

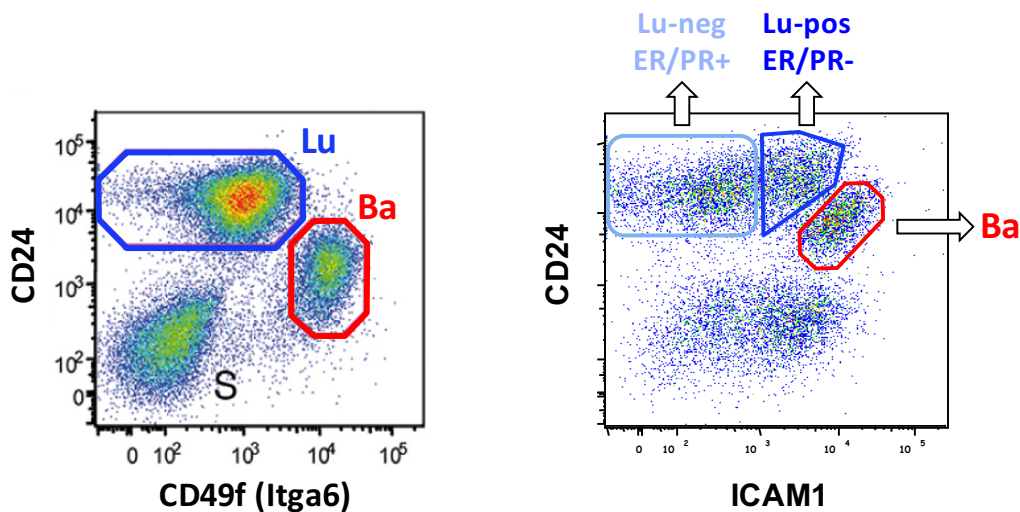


Figure 3 : Séparation des populations épithéliales mammaires murines par cytométrie de flux

d) Ciblage des cellules épithéliales mammaires basales et lumbales

L'étude du développement et de la tumorigénèse mammaire est largement fondée sur l'utilisation de modèles transgéniques murins comportant soit une invalidation totale du gène (appelé KO pour «knock-out» en anglais), soit une perte ou expression ciblée dans l'épithélium mammaire à l'aide de promoteurs spécifiques d'un sous-type cellulaire (pour revues, Faraldo *et al.*, 2005; Allred et Medina, 2008). Les promoteurs les plus utilisés sont référencés dans le tableau ci-dessous

(Tableau 2). On notera que seuls les promoteurs des gènes WAP et Blg, codant pour des protéines du lait, sont strictement spécifiques à l'épithélium mammaire et de plus restreints aux cellules luminales. L'ensemble de ces promoteurs peut également être utilisé pour isoler des sous-populations cellulaires identifiées par un gène rapporteur (par exemple : *Lgr5*-GFP, *ProcR*-GFP) ou pour suivre leur destin dans des expériences de traçage cellulaire. Certaines constructions permettent l'induction du promoteur à un temps donné. Les systèmes inductibles les plus utilisés sont ceux par le tamoxifène et la doxycycline (pour revues, Haegerbarth et Clevers, 2009; Fuchs et Chen, 2013).

Nom du promoteur	Famille	Type cellulaire mammaire ciblé	Autres tissus essentiels ciblés
K5	Kératine	Cellules basales/myoépithéliales	Epithélium stratifié
K14	Kératine	Cellules basales/myoépithéliales	Epithélium stratifié
K8	Kératine	Cellules luminales	Epithélium simple
K18	Kératine	Cellules luminales	Epithélium simple
Lgr5	Effecteur de Wnt	Sous-population de cellules basales/myoépithéliales	Peau, intestin, ovaires
Axin2	Cible de Wnt	Sous-population de cellules basales/myoépithéliales	Nombreux tissus
ProcR	Cible de Wnt	Sous-population de cellules basales/myoépithéliales	Cellules endothéliales
Sma	Cytosquelette d'actine	Cellules basales/myoépithéliales	Péricytes entourant l'endothélium vasculaire
Elf5	Signalisation	Cellules luminales	Poumons, vessie, rein
Notch1	Signalisation	Cellules luminales ER/PR-	Nombreux tissus
MMTV	Rétrovirus	Cellules luminales essentiellement	Ovaires
Blg	Protéines du lait	Cellules luminales lors de la gestation/lactation	-
Wap	Protéines du lait	Cellules luminales lors de la gestation/lactation	-

Tableau 2 : Principaux promoteurs utilisés dans les modèles murins permettant l'étude du développement et de la tumorigénèse mammaires.

L'établissement des modèles transgéniques murins par des méthodes classiques est long. La technique émergente CRISPR/Cas9 devrait permettre de mettre au point des modèles *in vivo* plus rapidement et facilement (pour revue, Kersten *et al.*, 2017). Elle repose sur l'utilisation de « ciseaux moléculaires » permettant de couper une séquence d'ADN à un endroit précis reconnu par des « ARN guides ». Ensuite, les processus cellulaires de réparation de l'ADN se mettent en place, ce qui permet soit d'inactiver un gène, soit d'introduire ou de rétablir une mutation, soit d'insérer une nouvelle séquence génomique. Il est également possible de réaliser des injections de

lentivirus codant pour les « ARN guides » dans des souris transgéniques qui expriment l'enzyme Cas9 sous l'induction d'un promoteur ciblé ou des lentivirus permettant d'exprimer à la fois la Cas9 et les «ARN guides».

2) Les étapes du développement de la glande mammaire

La morphogénèse de la glande mammaire est très limitée durant la vie embryonnaire et s'effectue principalement après la naissance sous l'influence des stimuli hormonaux ([pour revues, Macias et Hinck, 2012; Brisken et Ataca, 2015](#)). On distingue deux étapes dans le développement post-natal : la croissance et ramification canalaire durant la puberté, et le développement lobulo-alvéolaire pendant la gestation et lactation qui s'accompagne d'une différenciation lactogénique. A la fin de la lactation, le tissu mammaire s'engage dans une involution massive et reprend une morphologie similaire à celle de l'adulte vierge. Chez la souris nullipare sexuellement mature, l'épithélium mammaire, considéré comme essentiellement quiescent, subit de courtes phases de bourgeonnement alvéolaire sous l'influence de stimuli ovariens cycliques.

a) Développement embryonnaire

Le développement embryonnaire de la glande mammaire se traduit par l'établissement d'ébauches mammaires. Ces dernières sont constituées d'une partie épithéliale provenant de l'ectoderme et d'un stroma dont l'origine est le mésoderme. Chez la souris, le développement mammaire embryonnaire débute au jour 10 de l'embryogénèse (E10) par la formation de lignes mammaires bilatérales le long de l'axe cranio-caudal sur la surface ventrale de l'embryon. Elles sont constituées de multiples couches cellulaires ectodermiques. A E11.5, ces lignes mammaires se concentrent en 5 paires de placodes situées aux futurs emplacements des mamelons ([pour revue, Watson et Khaled, 2008; Fig. 4A](#)).

Au niveau de chaque placode, l'épithélium forme un bourgeon qui s'invagine dans le mésenchyme sous-jacent (E14). Ce bourgeon épithélial forme alors un rudiment mammaire entouré de mésenchyme condensé composé d'une fine couche de fibroblaste (E16).

Lorsque ce rudiment mammaire atteint le mésenchyme adipeux, ébauche du futur coussin adipeux, il se ramifie par des divisions du bourgeon terminal ([Fig. 4B](#)). Cette ramification dichotomique aboutit à un système canalaire rudimentaire composé de 10 à 15 branches ([Fig. 4B](#)).

Il est à noter que l'établissement du rudiment mammaire embryonnaire s'effectue sans

stimulation hormonale et qu'il n'existe aucun patron préalablement établi comme c'est le cas pour le poumon (pour revue, Sternlicht, 2006).

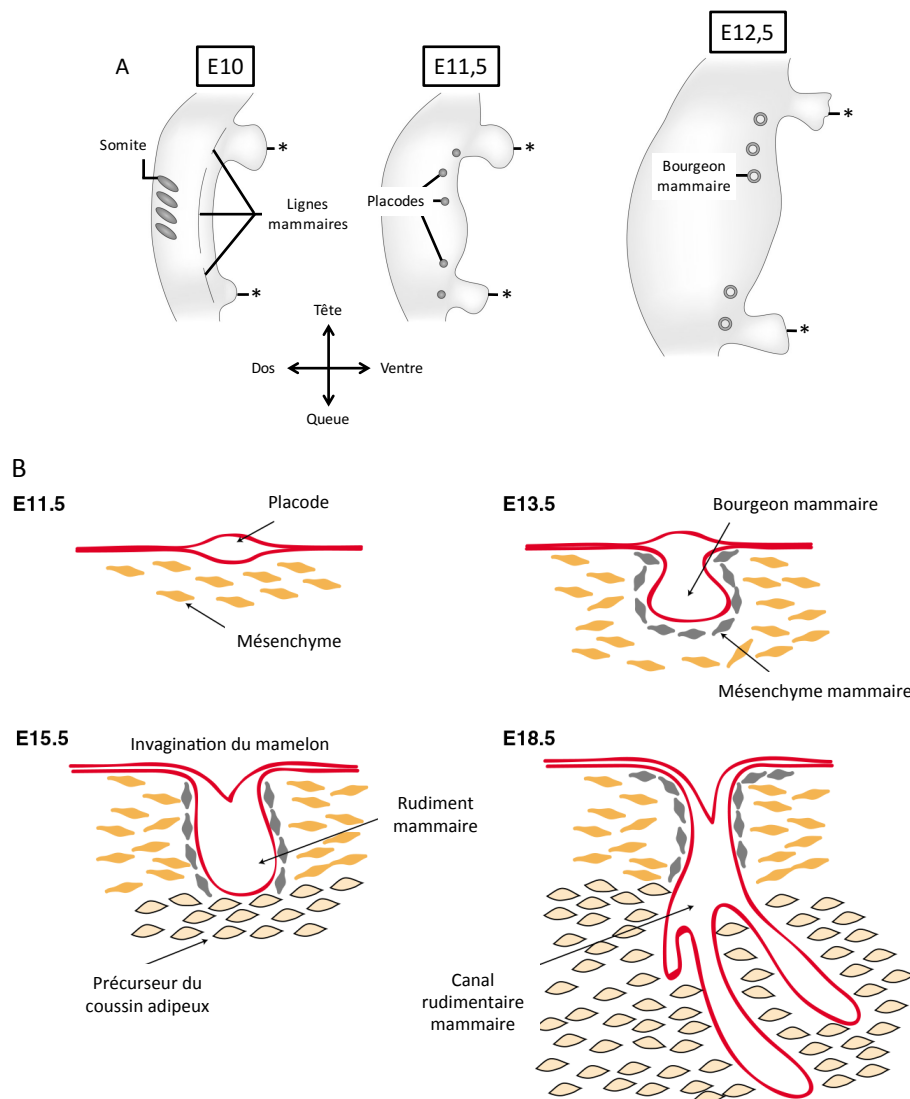


Figure 4 : Développement embryonnaire de la glande mammaire murine

(A) Schéma de la position des lignes mammaires chez l'embryon murin au jour 10 de l'embryogénèse (E10), formant les placodes à partir d'E11.5 puis les bourgeons mammaires après E12.5. Les * indiquent les ébauches des membres supérieurs et inférieurs. (Modifié de Robinson, 2007). (B) Etapes du développement embryonnaire depuis la formation des placodes jusqu'aux rudiments mammaires ramifiés (Modifié de Watson et Khaled, 2008).

Avant la naissance, les rudiments mammaires subissent encore trois processus morphologiques supplémentaires : le développement de la lumière canalaire, la formation du mamelon et la spécification entre mâle et femelle. Le développement de la lumière canalaire, entre E16 et E18, passe par des processus d'apoptose, d'autophagie et de remodelage cellulaire qui restent peu décrits. La génération du mamelon s'effectue par des modifications de la peau recouvrant le mésenchyme mammaire primaire. Chez la souris mâle, le mésenchyme entourant le canal primaire se condense jusqu'à son sectionnement résultant en un bourgeon mammaire réduit.

Nous reviendrons sur les mécanismes moléculaires qui gouvernent la morphogénèse embryonnaire plus loin dans la section dédiée à la voie Wnt qui joue un rôle central dans cette phase (page 56-section I) ; 5) ; d)).

b) Développement post-natal

La Figure 5 illustre les principales étapes du développement post-natal mammaire et leur contrôle hormonal. Nous décrivons les caractéristiques morphologiques de la glande à chaque étape de morphogénèse et verrons quels hormones et médiateurs locaux ont été identifiés.

Développement et ramification canaux

➤ Estrogènes, hormone de croissance

Développement lobulo-alvéolaire

➤ Progestérone, Prolactine

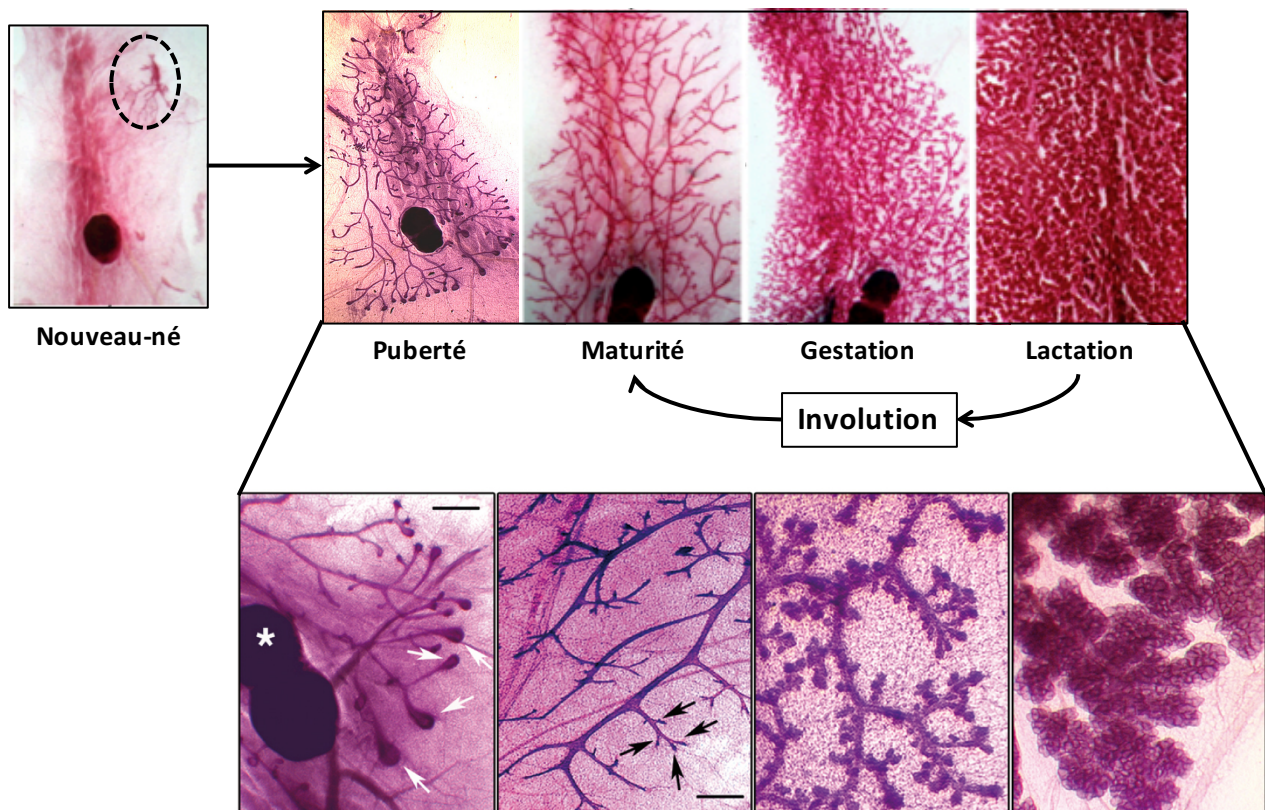


Figure 5 : Développement post-natal de la glande mammaire murine.

Photographies de glandes mammaires *in toto* colorées au rouge carmin représentant les différentes étapes du développement. A la naissance, l'épithélium mammaire est rudimentaire (encadré en pointillés). Durant la puberté, sous contrôle des estrogènes et de l'hormone de croissance, la formation des TEBs (indiqués par des flèches blanches) permet la croissance et la ramification canaux. A maturité, l'arborescence canalaire remplit entièrement le coussin adipeux et présente quelques ramifications latérales (indiquées par des flèches noires). Le développement lobulo-alvéolaire et la différenciation lactogénique ont lieu pendant la gestation et la lactation sous contrôle de la progestérone et de la prolactine. Lors du sevrage des petits, l'épithélium mammaire involue et revient alors à un état similaire à la maturité. Les photographies du bas représentent les stades du développement avec un plus fort grossissement (* ganglion lymphatique). Barre d'échelle : 1mm.

- **Régulation hormonale et interactions paracrines dans la glande mammaire murine**

Les expériences d'ablation des organes endocriniens puis les multiples modèles de souris déficientes en récepteurs hormonaux ont permis d'identifier les stimuli hormonaux indispensables au développement post-natal et à la fonction de la glande mammaire ([pour revue, Briskin et Ataca, 2015](#)). Il s'agit principalement des stimuli ovariens par les hormones stéroïdes, estrogènes et progestérone, et des stimuli hypophysaires, hormone de croissance, prolactine et ocytocine ([Fig. 6](#)).

Comme nous l'avons déjà mentionné, les récepteurs hormonaux, ER et PR sont absents des cellules basales mammaires et seule une fraction des cellules luminales les expriment. Curieusement, peu de cellules luminales ER/PR+ prolifèrent durant les phases actives de développement de l'épithélium sous l'action des hormones ([Clarke et al., 1997](#)). Ces observations ont conduit à émettre l'hypothèse que les cellules ER/PR+ jouent un rôle paracrine essentiel dans le contrôle de la prolifération de l'épithélium mammaire. Cette hypothèse est maintenant largement validée et les médiateurs locaux identifiés en aval de la signalisation hormonale seront décrits ci dessous pour chaque étape du développement de la glande. La place centrale de la voie Wnt sera détaillée plus loin en pages [41](#) et [47](#) dans les sections I)-4) et I)-5).

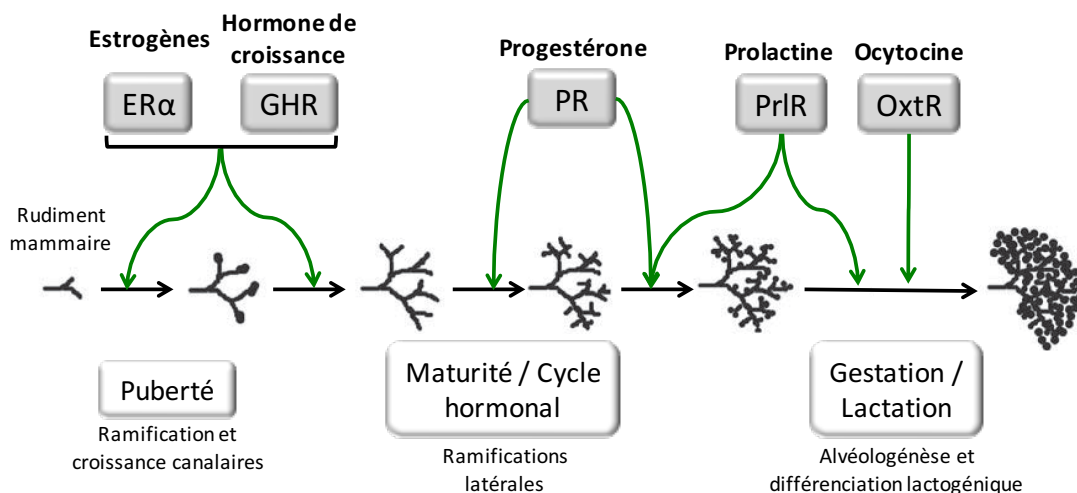


Figure 6 : Acteurs des régulations hormonales du développement mammaire
(Modifié à partir de [Briskin et O'Malley, 2010](#)).

- **Puberté : croissance canalaire de la glande mammaire**

A la naissance, la glande mammaire est un système canalaire très rudimentaire mais déjà capable de produire du lait. L'exposition du fœtus aux hormones maternelles peut parfois causer la

sécrétion d'une substance très similaire au lait chez l'enfant, on appelle cela le lait de sorcière. Le rudiment mammaire est composé de quelques ramifications secondaires reliées à un canal primaire directement connecté au mamelon (Fig. 5). A partir de la puberté, l'épithélium mammaire se développe très rapidement. Il est caractérisé par l'apparition de larges structures bulbaires, appelées bourgeons terminaux (TEBs de l'anglais « Terminal End Buds »), situées aux extrémités distales des canaux (Fig. 5). Les TEBs sont composés d'une couche cellulaire externe constituée de cellules de type basal dites de la coiffe (« cap cells » en anglais), qui vont générer les cellules myoépithéliales, entourant une multicouche de cellules internes, ou cellules du corps du bourgeon (« body cells » en anglais), dont sont issues les cellules luminales (Williams et Daniel, 1983; Fig. 7A). Les cellules du corps des TEBs expriment les kératines luminales K8/K18 alors que les cellules de la coiffe sont positives pour le facteur de transcription p63 et l'actine du muscle lisse (α -SMA). Les cellules de la coiffe expriment peu les kératines spécifiques des cellules basales (K5/K14) par rapport aux cellules myoépithéliales bordant les canaux matures, suggérant qu'elles présentent une forme de plasticité phénotypique (Daniel *et al.*, 1987; Mikaelian *et al.*, 2006 ; Fig. 7B). La lumière canalaire est formée par apoptose des cellules du corps du bourgeon lors de la croissance des TEBs (Mailleux *et al.*, 2007).

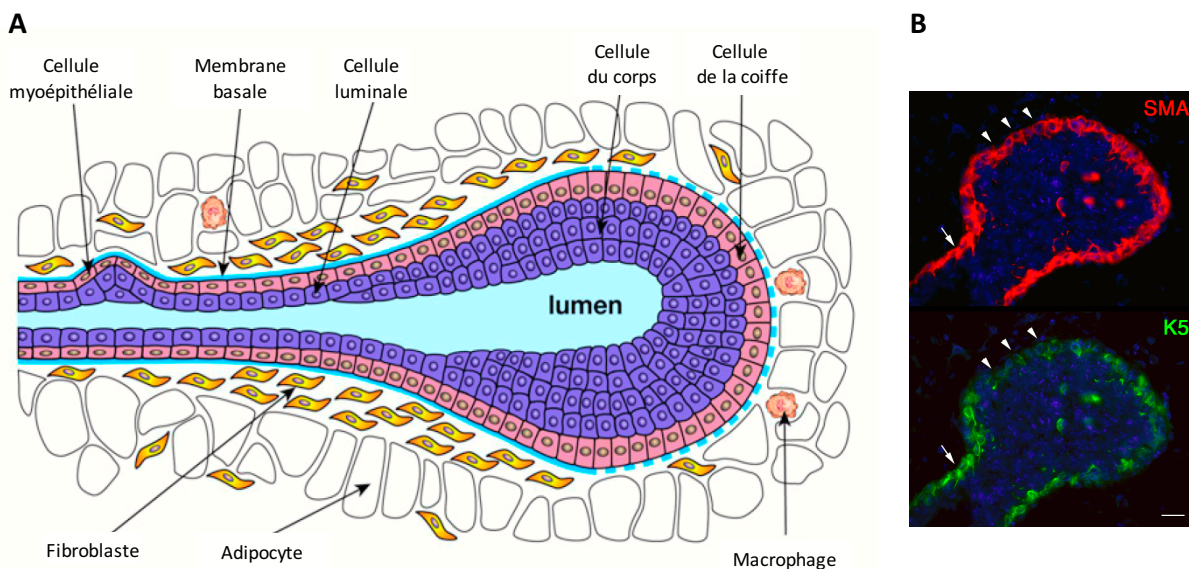


Figure 7 : Organisation morphologique et histologique du bourgeon terminal (TEB) en puberté

(A) Les TEBs sont composés de cellules apicales ou cellules de la coiffe, de type basal, qui constituent les précurseurs des cellules basales myoépithéliales canalaire. Le corps des TEBs est organisé en multicouche de cellules majoritairement luminales (modifié d'après Visvader, 2009). (B) Immunofluorescence K5/ α -Sma sur une coupe histologique de glande mammaire de souris en puberté. Le TEB présente un faible marquage anti-K5 dans les cellules de la coiffe (flèches) Barre d'échelle : 50 μ m.

Les TEBs sont le siège d'une prolifération cellulaire intense et permettent aux canaux de progresser par élongation et ramification dans le stroma jusqu'à atteindre les limites du coussin adipeux (pour revue, Macias et Hinck, 2012). La ramification canalaire et les bifurcations effectuées par les structures hautement dynamiques que sont les TEBs ne suivent pas un schéma architectural préétabli comme l'ont montré Scheele et Coll. (Scheele *et al.*, 2017). Les études *in vivo* ou en culture organotypique ont révélé grâce à des méthodes d'imagerie des processus de migration cellulaire individuelle notamment dans le corps du bourgeon ainsi que des mécanismes de migration cellulaire collective préservant l'intégrité épithéliale (Ewald *et al.*, 2012).

Les principaux régulateurs endocriniens de la croissance et ramification canalaire des TEBs pendant la puberté sont les estrogènes et l'hormone de croissance (pour revues, Daniel *et al.*, 1987; Brisken et O'Malley, 2010). L'hormone de croissance induit l'expression du facteur de croissance Igf1 (de l'anglais « insulin-like growth factor-1 ») dans le foie et le stroma mammaire alors que son récepteur, IgfR, est présent dans l'épithélium. Les données obtenues dans les souris GhR et Igf1 KO indiquent qu'Igf1 est un des médiateurs majeurs de la signalisation mammaire en aval de GhR (Ruan et Kleinberg, 1999).

Les estrogènes peuvent se lier à deux types de récepteurs : α (Er α codé par le gène Esr1) et β (Er β codé par le gène Esr2). Er α est présent dans les cellules luminales et stromales mais seule son ablation dans les cellules luminales inhibe le développement mammaire. Le récepteur Er β ne semble pas être essentiel au développement de la glande. Durant la puberté et maturité, 30 à 50% des cellules luminales expriment Er α alors qu'en fin de gestation, lorsque l'épithélium mammaire est majoritairement constitué d'alvéoles, ce pourcentage est réduit à environ 5% (pour revue, Brisken et Ataca, 2015).

L'amphiréguline (Areg, membre de la famille des facteurs de croissance épidermique Egf) a été identifié comme l'un des médiateurs essentiels des estrogènes durant la puberté (Ciarloni *et al.*, 2007). Des données récentes indiquent qu'Areg, produit par les cellules Er α + et clivé par ADAM17, active le récepteur à l'Egf (Egfr) situé sur les cellules stromales. En réponse, celles-ci produisent différents facteurs de croissance fibroblastiques (Fgfs) qui vont stimuler la croissance de l'épithélium. D'autres facteurs impliquant la voie de signalisation Wnt sont essentiels à l'établissement de l'architecture mammaire comme nous le précisons plus loin en page 56 de la section I) ; 5) (pour revues, Macias et Hinck, 2012; Brisken et Ataca, 2015).

A la fin de la puberté, lorsque les extrémités canalaire ont atteint les limites du coussin adipeux, les TEBs régressent. Le coussin mammaire est alors complètement rempli d'un épithélium ramifié mature qui entre dans une phase de quiescence relative jusqu'à la gestation. Cette période de

maturité est marquée par de courtes phases de prolifération et d'apoptose stimulées de façon cyclique par la progestérone ovarienne et résultant en de courtes ramifications canalaire latérales dites tertiaires ([pour revue, Joshi et al., 2012](#)).

- **Gestation-Lactation : développement lobulo-alvéolaire**

Durant la gestation, on observe d'abord une augmentation des ramifications canalaire secondaires et tertiaires de l'épithélium puis la formation des structures alvéolaires ([Fig. 5](#)). Les cellules basales et luminales mammaires prolifèrent activement puis s'engagent dans une différenciation qui sera complète au moment de la lactation. Les analyses de distribution des cellules luminales et basales par cytométrie révèlent que la proportion du compartiment basal durant la gestation augmente considérablement, atteignant 50 à 60% des cellules épithéliales alors que chez la souris vierge, elle est d'environ 25% ([Asselin-Labat et al., 2010](#); [Di-Cicco et al., 2015](#)). Le développement lobulo-alvéolaire et la différenciation lactogénique sont majoritairement sous le contrôle de la progestérone et de la prolactine, via leurs récepteurs PR et PrLR ([pour revue, Brisken et Ataca, 2015](#)).

PR est localisé à la fois dans l'épithélium mammaire et dans le stroma mais seule sa localisation épithéliale est critique pour le développement de la glande. La majeure partie des cellules luminales positives pour ER α co-exprime PR, les estrogènes régulant positivement l'expression de PR. Des deux isoformes de PR, PR-A et PR-B, seul PR-B est nécessaire au développement mammaire. Les souris déficientes pour PR-B présentent un délai d'élongation canalaire durant la puberté et ne forment ni ramifications canalaire latérales, ni structures alvéolaires lors de la gestation ([Mulac-Jericevic et al., 2003](#)).

Il a été montré que la progestérone induit la prolifération de l'épithélium en deux vagues. Dans une courte première vague dépendante de la Cycline D1, les cellules PR+ prolifèrent puis au cours d'une phase plus longue, les cellules luminales PR- ainsi que les cellules basales sont stimulées via des mécanismes paracrines impliquant les cellules PR+ ([Brisken et al., 1998](#); [Beleut et al., 2010](#)).

Plusieurs médiateurs locaux en aval de PR ont été identifiés, et les plus étudiés appartiennent aux voies de signalisation Wnt et Rank/RankL. En début de gestation, Wnt4, ligand de la famille Wnt sécrété par les cellules luminales ER/PR+, participe à la stimulation de la croissance des ramifications latérales ([Brisken et al., 2000](#)). Des travaux plus récents indiquent que Wnt4 fonctionne en synergie avec Rspo1, ligand de la voie de signalisation Wnt/ β cat exprimé par les cellules luminales ER/PR- ([Cai et al., 2014](#)). RankL, ligand de la famille des TNF, dont l'expression dans les cellules luminales ER/PR+ est graduellement augmentée pendant la gestation, est aussi

un acteur essentiel du développement lobulo-alvéolaire (Fata *et al.*, 2000). Il induit l'expression du facteur de transcription Id2 et active la voie NF- κ B/Cycline D1 qui joue un rôle essentiel dans la prolifération des structures alvéolaires (Fantl *et al.*, 1999; Gonzalez-Suarez *et al.*, 2010). Nous reviendrons plus loin sur ces régulations paracrines, dans la partie dédiée à la signalisation Wnt (page 56- section I) ; 5) ; d)).

La prolactine intervient dans la deuxième partie de la gestation (Fig. 6). En l'absence du récepteur à la prolactine, PrLR, l'élongation et la ramification canalaire sont normales mais l'alvéologénèse et la différenciation lactogénique ne peuvent pas s'effectuer. Les facteurs de transcription, Stat5a et Elf5 sont les médiateurs essentiels de la signalisation via PrLR, leur absence inhibant totalement le développement lobulo-alvéolaire (pour revues, Hennighausen et Robinson, 2008; Lee et Ormandy, 2012; Briskin et Ataca, 2015).

La liaison de la prolactine sur son récepteur entraîne l'homodimérisation de ce dernier et active la voie de signalisation Jak/Stat. Plus précisément, le recrutement de la tyrosine kinase Jak2 au niveau du récepteur de la prolactine permet la phosphorylation des deux isoformes du facteur de transcription Stat5 (Stat5a et Stat5b). Seul Stat5a semble avoir une implication directe dans la différenciation de la glande pendant la gestation car son inactivation conduit à un défaut de lactation (pour revue, Hennighausen et Robinson, 2008). L'activation de Stat5 induit l'expression de gènes impliqués dans la prolifération et la différenciation alvéolaires tels que RankL, IGF-2, Cycline D1, et les protéines du lait telles que WAP et β -caséine (dont les promoteurs sont directement activés par Stat5). Le facteur de transcription Elf5 agirait en amont de Stat5a puisqu'il se fixe directement sur son promoteur (pour revue, Lee et Ormandy, 2012).

La progestérone peut induire l'expression de PrLR et inversement, la prolactine peut induire celle de PR, suggérant que ces hormones orchestrent de manière synergique le développement alvéolaire en activant les voies de signalisation citées précédemment. On soulignera qu'en l'absence d'anticorps fiable, la localisation précise des cellules luminales PrLR+ n'est pas connue. De façon surprenante, les profils transcriptionnels établis à partir des cellules luminales isolées chez la souris adulte vierge indiquent que les transcrits de PrLR sont présents dans la fraction enrichie en cellules ER/PR+ tandis que les transcrits des gènes du lait sont exprimés par la population ER/PR- (Kendrick *et al.*, 2008; Di-Cicco *et al.*, 2015). Des mécanismes paracrines, impliquant Igf2 et RankL, pourraient intervenir dans la signalisation de la prolactine (pour revue, Briskin et Ataca, 2015).

Les récepteurs à tyrosine kinase de la famille des Egf (ErbB) et leurs ligands sont capables d'activer les Stats et jouent également un rôle important dans la morphogénèse alvéolaire. En effet, la

délétion du gène ErbB4 dans l'épithélium mammaire entraîne des défauts de développement alvéolaire (Long *et al.*, 2003). En liaison avec cette voie de signalisation, des données récentes montrent que la neuréguline 1 (Nrg1), ligand d'ErbB4 produit par les cellules basales, stimule de façon paracrine la prolifération et différenciation des cellules luminales durant le développement lobulo-alvéolaire (Forster *et al.*, 2014).

La différenciation lobulo-alvéolaire terminale est atteinte à la fin de la gestation lors de la naissance des petits. La glande mammaire est alors prête à sécréter le lait. Au moment de la naissance, la production des protéines du lait est accrue, les jonctions serrées entre les cellules luminales alvéolaires se ferment et les gouttes lipidiques cytoplasmiques de lait formées au cours de la gestation se déplacent vers le pôle apical afin de permettre leur sécrétion dans la lumière alvéolaire (pour revue, Macias et Hinck, 2012). A ce stade, la stimulation par la progestérone est stoppée. La prolactine, dont le niveau est toujours élevé, permet de maintenir l'expression des gènes des protéines du lait. Par ailleurs, la stimulation hormonale par l'ocytocine induit la contraction des cellules basales myoépithéliales entourant les alvéoles afin d'expulser le lait vers les canaux puis jusqu'au mamelon.

L'utilisation de méthodes d'imagerie sophistiquées *in vivo* ont confirmé récemment d'anciennes observations faites en microscopie électronique montrant que les cellules luminales sécrétrices en fin de gestation et début de lactation sont souvent binucléés et de grande taille (Rios *et al.*, 2016b). Ces cellules polyploïdes présentent un défaut de cytokinèse impliquant la kinase Aurora A et semblent importantes pour maximiser la production et la sécrétion de lait.

- **Involution : apoptose et remodelage de la glande mammaire**

Le processus d'involution a été étudié en détail par le groupe de C. Watson, dont nous résumerons ci-dessous les travaux (pour revue, Watson et Kreuzaler, 2011). La phase d'involution de la glande mammaire débute après 3 à 4 semaines d'allaitement, lorsque les petits sont sevrés et arrêtent progressivement de stimuler la production de lait par leur succion. Le processus d'involution est complexe, il requiert non seulement une mort cellulaire massive pour éliminer les cellules épithéliales productrices de lait mais également une régulation des cellules immunitaires sollicitées afin de faire disparaître les cellules mortes, le lait résiduel et les débris. Durant cette phase, des modifications du stroma s'effectuent, dont la régénération du coussin adipeux, le remodelage du réseau sanguin et la reformation de la matrice extracellulaire.

L'involution mammaire s'effectue en suivant deux phases distinctes. La première est réversible et dure environ deux jours chez la souris. Elle est caractérisée par le détachement des cellules

luminales mortes dans la lumière des alvéoles. Cette phase, pendant laquelle le lait s'accumule dans la lumière alvéolaire, ne semble pas être contrôlée par les hormones. Elle est régulée, entre autres, par le facteur de transcription Stat3 et les cytokines Lif et TGF β 3. La deuxième partie de l'involution est, quant à elle, irréversible et s'accompagne d'une apoptose massive et d'un remodelage important du tissu mammaire. Les MMPs (protéases de la matrice extracellulaire) sont fortement exprimées pendant cette phase et participent à la dégradation de la matrice. Comme Stat3, il semble que la voie des NF- κ B et plus particulièrement le régulateur IKK β soit nécessaire pour accomplir une involution mammaire complète. L'activation des voies de signalisation Stat3 et NF- κ B pendant cette période suggère que la réaction inflammatoire pourrait être un élément important de l'involution. Celle-ci semble finement régulée afin de ne pas provoquer de réaction excessive du système immunitaire.

A la fin de l'involution, la glande mammaire possède un aspect morphologique et architectural très similaire à son état post-pubertaire et entre dans un état de semi-quiescence jusqu'à la gestation suivante.

3) Les cellules souches mammaires

Les cellules souches ont la capacité de se diviser indéfiniment. Elles sont caractérisées par leur aptitude à s'auto-renouveler, c'est à dire à générer une autre cellule souche fonctionnellement identique à la cellule mère, et par leur capacité à produire des cellules filles, dites progénitrices (pour revue, Fuchs et Chen, 2013). Après une amplification transitoire, les cellules progénitrices s'engagent dans une succession irréversible d'étapes menant à une différenciation terminale. La nature des divisions des cellules souches, symétrique (une cellule souche donne 2 cellules souches) ou asymétrique (une cellule souche donne une cellule souche et une cellule progénitrice) contrôle l'expansion et l'homéostasie d'un tissu (Fig. 8A).

Différentes catégories de cellules souches contribuent au développement d'un organisme : totipotentes, pluripotentes, multipotentes et unipotentes (NIH: <https://stemcells.nih.gov>). Une cellule totipotente, telle que l'ovule fécondé, est capable de générer tous les types cellulaires, embryonnaires et extra-embryonnaires. Les cellules pluripotentes, comme les cellules souches embryonnaires (ES) issues de la masse interne du blastocyste, donnent naissance aux différents tissus de l'embryon, somatique et germinale.

Les cellules souches multipotentes contribuent à la formation des lignages cellulaires du tissu où elles résident. Elles sont souvent définies comme cellules non différenciées et peuvent à l'état clonal reconstituer leur tissu d'origine dans sa structure et sa fonction en générant, à long-terme, des cellules différenciées. Différents essais ont permis d'identifier des cellules souches multipotentes dans les tissus adultes, notamment dans le système hématopoïétique, le follicule pileux, l'intestin et le muscle ([pour revues, Fuchs et Chen, 2013](#); [Visvader et Clevers, 2016](#)). Dans certains tissus, comme l'épiderme, le muscle et le testicule, il existe des cellules souches unipotentes, dont le potentiel est restreint à un lignage unique. Les cellules souches tissulaires adultes constituent en général une population mineure où selon les tissus, coexistent des cellules souches quiescentes et en division. Le microenvironnement des cellules souches, ou niche, est composé de multiples éléments impliquant des interactions matricielles et intercellulaires complexes qui vont réguler leur destin ([Fig. 8B](#)).

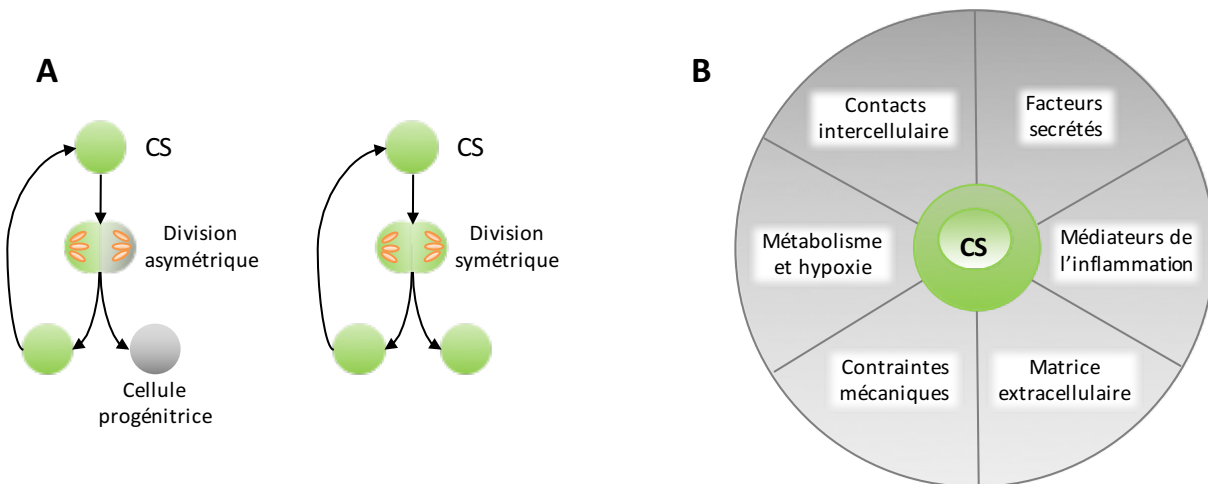


Figure 8 : Destin cellulaire et composants de la niche des cellules souches

(A) Une cellule souche (=CS) est destinée à se diviser soit asymétriquement, pour donner une cellule souche et une cellule progénitrice, soit symétriquement, pour donner deux cellules souches ([modifié de Fuchs et Chen, 2013](#)). (B) Les cellules souches résident dans une niche ou microenvironnement complexe qui régule leurs fonctions et destin. Les facteurs sécrétés comprennent les hormones, les chimiokines et les ligands des voies de signalisation majeures ([modifié de Lane et al., 2014](#)).

En raison du développement post-natal de la glande mammaire et de ses phases alternatives d'expansion et de repos, l'hypothèse de l'existence de cellules souches dans l'épithélium mammaire adulte a été avancée dès 1959 ([Deome et al., 1959](#)). Cependant, c'est seulement depuis les années 2000 que leur caractérisation moléculaire et fonctionnelle a débuté. Leur importance dans le développement et la tumorigénèse mammaire est depuis intensivement étudiée.

a) Mise en évidence des propriétés de régénération de l'épithélium mammaire

DeOme et ses collaborateurs furent les premiers à démontrer les propriétés de régénération remarquables de l'épithélium mammaire en établissant une méthode de transplantation orthotopique (Deome *et al.*, 1959). Cette méthode consiste à greffer des fragments de glande mammaire murine (ou des cellules épithéliales mammaires isolées) issus d'une souris donneuse dans les coussins adipeux de souris receveuses prépubères âgées de 3 semaines desquels on a supprimé, par chirurgie, l'épithélium endogène (Fig. 9). Après quelques semaines, l'épithélium greffé se développe, formant des canaux ramifiés chez l'hôte vierge, et des structures alvéolaires si la souris receveuse est gestante.

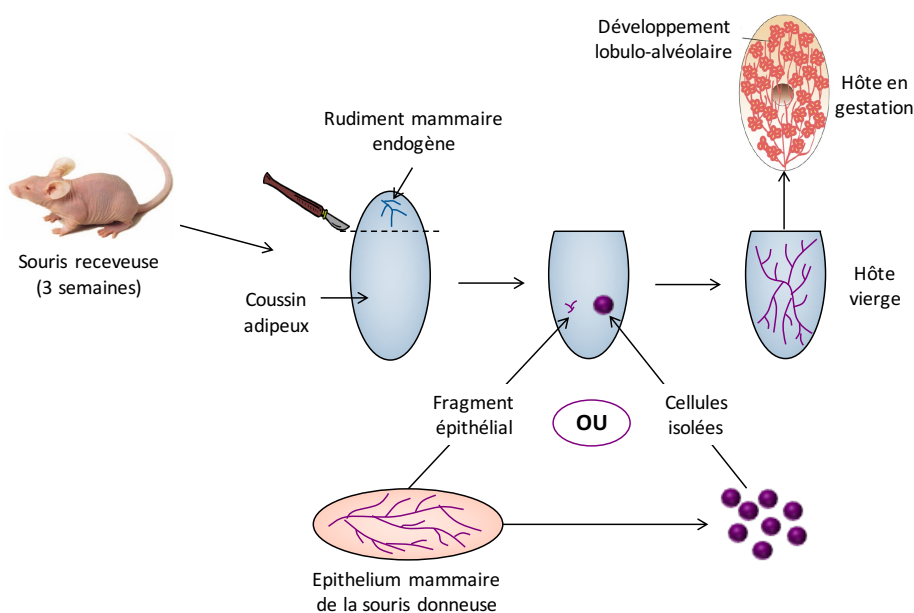


Figure 9 : Principe de la technique de transplantation mammaire orthotopique

Après l'ablation chirurgicale du rudiment mammaire endogène chez la souris hôte immunodéficitaire prépubère, on procède à la transplantation de fragments épithéliaux ou de cellules isolées provenant d'une souris donneuse. Après quelques semaines, les greffons mammaires sont analysés afin d'évaluer la croissance épithéliale issue de la transplantation ou le développement lobulo-alvéolaire si la souris receveuse est gestante.

Les expériences pionnières de DeOme et coll. ont établi que des fragments d'épithélium isolés à partir de n'importe quelle portion de la glande mammaire et à des stades distincts du développement post-natal sont capables de reconstituer une arborescence canalaire mammaire complète. Ces travaux ont également montré qu'une succession de sept transplantations sériées étaient réalisables sans perte de potentiel de développement, suggérant l'existence de cellules souches capables d'autorenouvellement (Deome *et al.*, 1959; Smith et Medina, 1988; Kordon et Smith, 1998).

La transplantation orthotopique reste un des essais majeurs pour révéler l'activité de régénération du tissu mammaire, attribuée aux cellules souches y résidant ([pour revue, Visvader et Smith, 2011](#)). L'existence de glandes bilatérales permet de greffer dans la même souris receveuse des fragments épithéliaux ou cellules mammaires isolées issus de donneurs différents et ainsi de comparer leur développement dans un contexte hormonal identique. Cette stratégie est particulièrement utile pour l'analyse du développement mammaire de souris KO, dont les régulations hormonales peuvent être perturbées, ou de souris dont la survie post-natale est compromise ([pour revue, Brisken et Ataca, 2015](#)). Par ailleurs, la transplantation de cellules mammaires isolées en concentrations décroissantes, dite transplantation en dilution limite, donne accès à une estimation de la fréquence des cellules à pouvoir régénératif ([Hu et Smyth, 2009](#)).

Les méthodes de transplantation ont également permis d'étudier l'importance du microenvironnement mammaire dans le contrôle du destin des cellules souches. Les travaux de G. Smith et coll. indiquent que des cellules souches testiculaires, neurales, hématopoïétiques et des cellules ES transplantées dans le coussin adipeux mammaire peuvent contribuer à la génération de cellules épithéliales mammaires différenciées ([Boulanger et al., 2007](#); [Booth et al., 2008](#)). Toutefois, la reprogrammation des cellules non mammaires n'a lieu qu'en co-transplantant des cellules épithéliales mammaires.

b) Activité clonogénique des cellules épithéliales mammaires

En complément des expériences de transplantation, différents essais ont été développés pour analyser *in vitro* l'activité clonogénique des cellules épithéliales mammaires : la formation de colonies dans des cultures adhérentes et la génération de sphères, ou mammosphères, en 3D. Mises en culture à faible densité sur un tapis de fibroblastes nourriciers irradiés, les cellules épithéliales mammaires forment en une semaine des colonies dont l'origine est attribuée à des cellules progénitrices ([Stingl et al., 2006](#); [Shackleton et al., 2006](#); [Sleeman et al., 2007](#)). Le nombre et la taille des colonies formées permettent d'évaluer la fréquence et la capacité de prolifération des cellules progénitrices dans les populations étudiées.

La formation de mammosphères est obtenue environ deux semaines après la mise en culture des cellules épithéliales mammaires en condition non adhérente en présence de 2% de Matrigel, un substitut de la matrice extracellulaire ([Dontu et al., 2003](#); [Spike et al., 2012](#)). La culture des mammosphères offre la possibilité de passages sériés, permettant d'estimer la fréquence en cellules clonogéniques à long terme, témoin de la présence de cellules souches à capacité d'autorenouvellement. Elles sont de plus transplantables pour évaluer leur contenu en cellules

capables de régénération *in vivo* (Spike *et al.*, 2012; Chiche *et al.*, 2013; Di-Cicco *et al.*, 2015). Enfin, l'étude de leur composition cellulaire et de leur organisation fournit des éléments sur les capacités de différenciation et de morphogenèse des cellules étudiées.

c) Les cellules souches multi-potentes basales, les progéniteurs luminaux et les cellules luminales matures murines

La séparation des cellules basales et luminales par cytométrie de flux a permis d'analyser leurs caractéristiques moléculaires et leurs propriétés fonctionnelles, *in vivo*, par transplantation et, *in vitro*, par les essais de clonogénicité (Fig. 10).

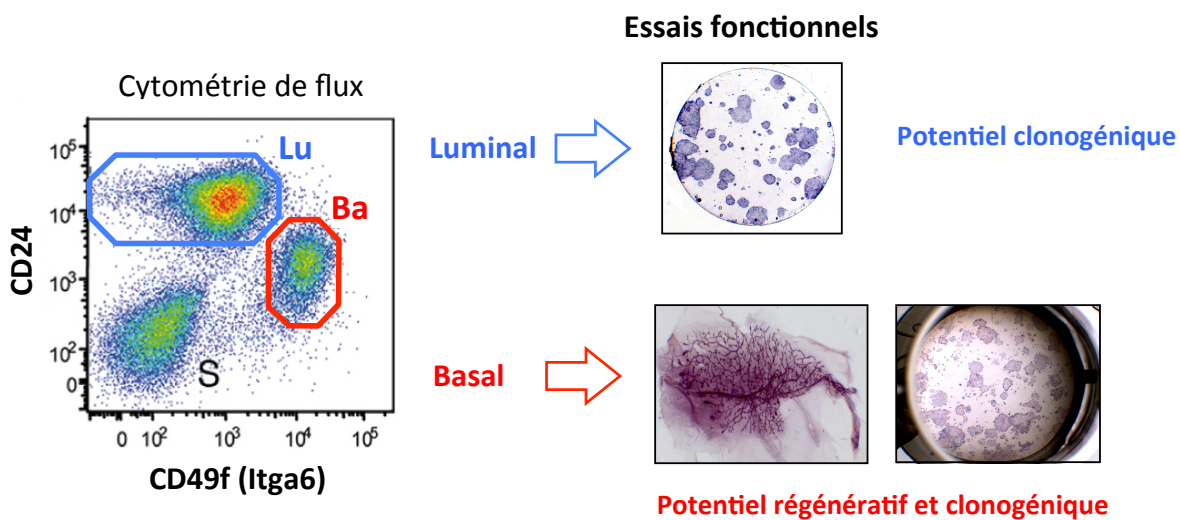


Figure 10 : Séparation par cytométrie de flux et propriétés fonctionnelles des populations mammaires basales et luminales

Après transplantation *in vivo*, seules les cellules basales sont capables de régénérer un épithélium mammaire ramifié. Les cellules basales et luminales contiennent des cellules clonogéniques qui forment des colonies et mammosphères *in vitro*.

- **Hétérogénéité moléculaire et fonctionnelle des deux compartiments épithéliaux mammaires**

-Compartiment basal :

Chez la souris, les essais de transplantation ont établi que seules les cellules de type basal étaient capables de régénérer une bicouche épithéliale mammaire (Stingl *et al.*, 2006; Shackleton *et al.*, 2006; Sleeman *et al.*, 2007; Fig. 10). Ces études ont montré qu'une cellule basale unique avait la capacité de régénérer une glande entière fonctionnelle après transplantation et que les greffons primaires étaient aptes à des transplantations sériées, indiquant que le compartiment basal contient des cellules souches bipotentes, c'est à dire donnant naissance aux lignages basal et

luminal. La fréquence en cellules souches bipotentes dans le compartiment basal évaluée par transplantation en dilution limite est comprise entre 2 et 10%. Cette variabilité dépend du fond génétique des souris analysées, des méthodes de dissociation utilisées, du tri cellulaire en cytométrie de flux, et des protocoles de transplantations en présence ou absence de Matrigel, celui-ci favorisant la prise de greffe (Vaillant *et al.*, 2011; pour revue, Visvader et Stingl, 2014).

Le compartiment basal comprend également des cellules clonogéniques, aptes à former des colonies à court-terme et des mammosphères en culture à long-terme (Stingl *et al.*, 2006; Shackleton *et al.*, 2006; Chiche *et al.*, 2013; Fig. 10). Leur fréquence est d'environ 2-5%. Les cultures dérivées des cellules basales comprennent de nombreuses cellules exprimant la kératine luminaire K8, indiquant la présence initiale de cellules souches/progénitrices bipotentes. Cependant, les conditions de culture ne sont pas favorables à la différenciation en cellules lumineuses matures ER/PR+.

De nombreuses études ont été menées afin de disséquer l'hétérogénéité du compartiment basal et ainsi identifier et caractériser des sous-populations mineures de cellules souches multipotentes et progénitrices. Les études d'immunomarquage réalisées sur les cellules basales isolées ont montré que la quasi totalité de celles-ci contenait la protéine α -SMA, et présentait donc des caractéristiques de cellules myoépithéliales (Prater *et al.*, 2014).

Durant la puberté, la phosphatase s-SHIP (pour « SH2 domain-containing 5'-inositol phosphatase » en anglais) est exclusivement exprimée par les cellules de type basal de la coiffe des TEBs. C'est le seul marqueur spécifique des cellules de la coiffe identifié à ce jour mais il ne ségrège pas de façon notable les cellules à activité de régénération (Bai et Rohrschneider, 2010). Chez l'adulte, certains travaux rapportent que les cellules exprimant fortement l'Itg α 6 ont une fréquence en cellules souches et progénitrices plus élevée que le reste de la population basale (Stingl *et al.*, 2006; Soady *et al.*, 2015). Par ailleurs, d'après l'étude de dos Santos *et al.*, 2013, une sous-population basale exprimant CD1d (une glycoprotéine exprimée par les cellules immunitaires présentatrices d'antigène) présente un enrichissement important en activité de régénération.

L'utilisation des souris Lgr5-GFP a montré que Lgr5, un récepteur de la voie de signalisation Wnt connu pour marquer les cellules souches de différents tissus épithéliaux, distingue une sous-population basale d'environ 5-10%, concentrée dans la partie proximale de la glande pubertaire et adulte (Plaks *et al.*, 2013). Malgré cette distribution remarquable, plusieurs études rapportent que les cellules basales mammaires Lgr5+ ne sont pas enrichies de façon considérable en activité souche et progénitrice et que par conséquent, la grande majorité des cellules souches et progénitrices mammaires résident dans les 90-95% de cellules Lgr5- (de Visser *et al.*, 2012; Rios *et*

al., 2014; Wang *et al.*, 2015; Trejo *et al.*, 2017). On notera néanmoins, qu'un travail récent indique que la sous-fraction de cellules basales Lgr5+ exprimant la tétraspanine 8 (Tspan8) est enrichie en activité de régénération et que ces cellules sont majoritairement quiescentes *in vivo* (Fu *et al.*, 2017). Cette sous-fraction Lgr5+ pourrait constituer un réservoir de cellules souches au repos, et serait issue de celle présente dans la glande embryonnaire (Trejo *et al.*, 2017).

Enfin, chez l'adulte, ProcR, une cible de la voie de signalisation Wnt, identifie une petite population (3%) de cellules basales qui semble très enrichie en activité de régénération et activité clonogénique (Wang *et al.*, 2015). Mais cette étude n'a pas reçu de confirmation à ce jour. Nos analyses suggèrent que l'expression de ProcR varie selon le fond génétique des souris.

L'ensemble de ces travaux montre que malgré de nombreux efforts, aucun marqueur de surface spécifique de la population souche et progénitrice mammaire du compartiment basal n'a pu encore être identifié et confirmé.

-Compartiment Luminal :

Contrairement aux cellules basales, les cellules luminales ne possèdent pas de potentiel de régénération après transplantation. Cependant, elles comprennent une sous-population clonogénique, identifiable par les essais de formation de colonies et de sphères (Sleeman *et al.*, 2007; Chiche *et al.*, 2013; Di-Cicco *et al.*, 2015; Fig. 10). Cette activité est attribuée à des cellules progénitrices, restreintes au lignage luminal.

L'utilisation de différents marqueurs de surface séparant les cellules ER/PR+ et ER/PR- du compartiment luminal, tels que Sca-1, Itgβ3, Itgα2, c-Kit et ICAM-1 (Tableau 1), a permis de montrer que l'activité clonogénique était concentrée dans la population ER/PR- (Asselin-Labat *et al.*, 2007; Sleeman *et al.*, 2007; Regan *et al.*, 2012; Shehata *et al.*, 2012; Di-Cicco *et al.*, 2015). Cependant, une fraction de cellules luminales ER/PR+, double positives pour Sca-1/Itgα2 ou Sca-1/ICAM-1, possède un potentiel clonogénique important (Shehata *et al.*, 2012; Di-Cicco *et al.*, 2015). Il est probable que ces cellules représentent des progéniteurs luminaux canaux tandis que la population clonogénique ER/PR-, exprimant fortement le déterminant alvéolaire Elf5, comprend essentiellement des progéniteurs destinés à la différenciation alvéolaire (Di-Cicco *et al.*, 2015).

- **Traçage cellulaire**

L'introduction de modèles murins permettant un traçage cellulaire *in vivo* a apporté un nouvel éclairage sur les cellules souches mammaires (Lloyd-Lewis *et al.*, 2017). Le traçage cellulaire

repose sur l'utilisation de promoteurs spécifiques contrôlant l'expression de la recombinaise Cre dans une sous-population cellulaire, de façon constitutive ou inducible par le tamoxifène ou la doxycycline. Ce modèle est croisé avec des souris rapporteuses qui, sous l'action de la Cre, expriment un gène codant pour des protéines marquées (Fig. 11). Les cellules ciblées transmettent le gène rapporteur recombiné à leur descendance cellulaire permettant le suivi de leur destin (pour revue, Haegebarth et Clevers, 2009).

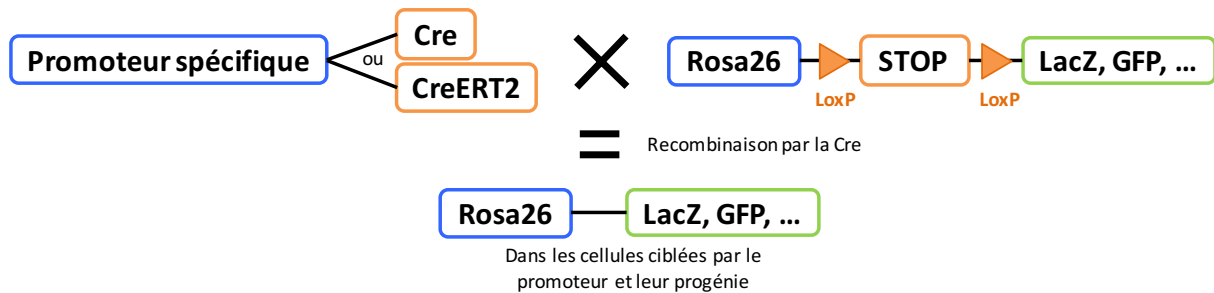


Figure 11 : Principe du traçage cellulaire *in vivo* par la recombinaise Cre

Le traçage cellulaire peut être initié par l'induction de l'expression de la recombinaise Cre par le tamoxifène ou la doxycycline, schématisé par le cadre orange annoté « CreERT2 » (Modifié de van der Flier *et al.*, 2009).

Le suivi du destin cellulaire des cellules basales positives pour les kératines basales K5 et K14 a montré que leur potentiel varie au cours du développement de la glande. Marquées durant l'embryogenèse, elles donnent naissance à une bicouche épithéliale mammaire complète, démontrant leur nature bipotente à ce stade (Van Keymeulen *et al.*, 2011; Moumen *et al.*, 2012). Cependant, quand l'induction est faite après la naissance de l'animal, la descendance des cellules marquées est exclusivement basale, dans les canaux comme dans les alvéoles, tandis qu'après induction post-natale sous contrôle d'un promoteur luminal comme K8, K18 ou Elf5, la progénie est exclusivement luminale (Van Keymeulen *et al.*, 2011; Rios *et al.*, 2014). Ces données indiquent que les deux lignages mammaires basal et luminal se séparent à la naissance, puis sont amplifiés et maintenus durant les phases du développement de la glande par des cellules souches distinctes unipotentes.

Plusieurs modèles transgéniques utilisant d'autres types de promoteur basal, notamment Lgr5 et des promoteurs spécifiques des cellules myoépithéliales (Acta2 et Myh11) soutiennent cette hypothèse (de Visser *et al.*, 2012; Prater *et al.*, 2014; Wuidart *et al.*, 2016). Néanmoins, d'autres études de traçage à l'aide des promoteurs Lgr5 et ProcR indiquent que, même après la naissance, des cellules basales conservent leur propriété de bipotence et contribuent au développement et à l'homéostasie post-natale de la glande (Rios *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015). L'origine de ces

discordances reste débattue (Wuidart *et al.*, 2016; Rios *et al.*, 2016a; Lloyd-Lewis *et al.*, 2017). Des artefacts de traçage cellulaire pourraient être induits par une fiabilité relative des promoteurs, des fenêtres variables d'induction, et des techniques limitées ou biaisées pour détecter l'expansion d'une population mineure marquée au sein du tissu mammaire. Par ailleurs, le tamoxifène, en tant que modulateur sélectif de la signalisation ER, peut altérer de façon significative le développement de la glande mammaire s'il est utilisé à forte dose pour l'induction.

Récemment, une méthode de traçage cellulaire par saturation a été mise au point, elle permettrait d'éviter certains des biais énoncés ci-dessus. Elle repose sur le marquage de la quasi-majorité des cellules basales mammaires et le suivi de leur descendance. Cette approche n'a révélé aucune cellule luminale marquée après induction post-natale du gène rapporteur, argumentant à nouveau en faveur de cellules souches basales unipotentes (Wuidart *et al.*, 2016). Enfin, le lignage luminal a fait l'objet d'études récentes démontrant que les lignages luminaux ER+ et ER- sont séparés et maintenus par des cellules souches unipotentes lumineales ER+ ou ER- respectivement (Rodilla *et al.*, 2015; Van Keymeulen *et al.*, 2017). Ces résultats soutiennent les observations faites *in vitro* montrant l'existence de deux populations clonogéniques lumineales distinctes résidant dans les compartiments ER+/ER- (Shehata *et al.*, 2012; Di-Cicco *et al.*, 2015).

- **Modèle de ségrégation des lignages mammaires.**

L'ensemble des données obtenues à partir des essais de transplantation, formation de colonies et traçage cellulaire chez la souris a permis d'établir un modèle de ségrégation des lignages mammaires (Fig. 12). Il est admis que :

- la bicouche épithéliale mammaire adulte dérive de cellules souches embryonnaires bipotentes positives pour K5.
- Le développement post-natal de la glande et son homéostasie sont principalement assurés par des cellules souches et progénitrices unipotentes distinctes, basales, lumineales ER+, lumineales ER-, avec une possible contribution d'un réservoir mineur de cellules souches bipotentes.
- Seules les cellules basales sont capables de régénérer une bicouche épithéliale mammaire après transplantation à l'état isolé. Dans ces conditions non physiologiques de stress, il est postulé que les cellules basales pourraient réacquérir des propriétés embryonnaires.

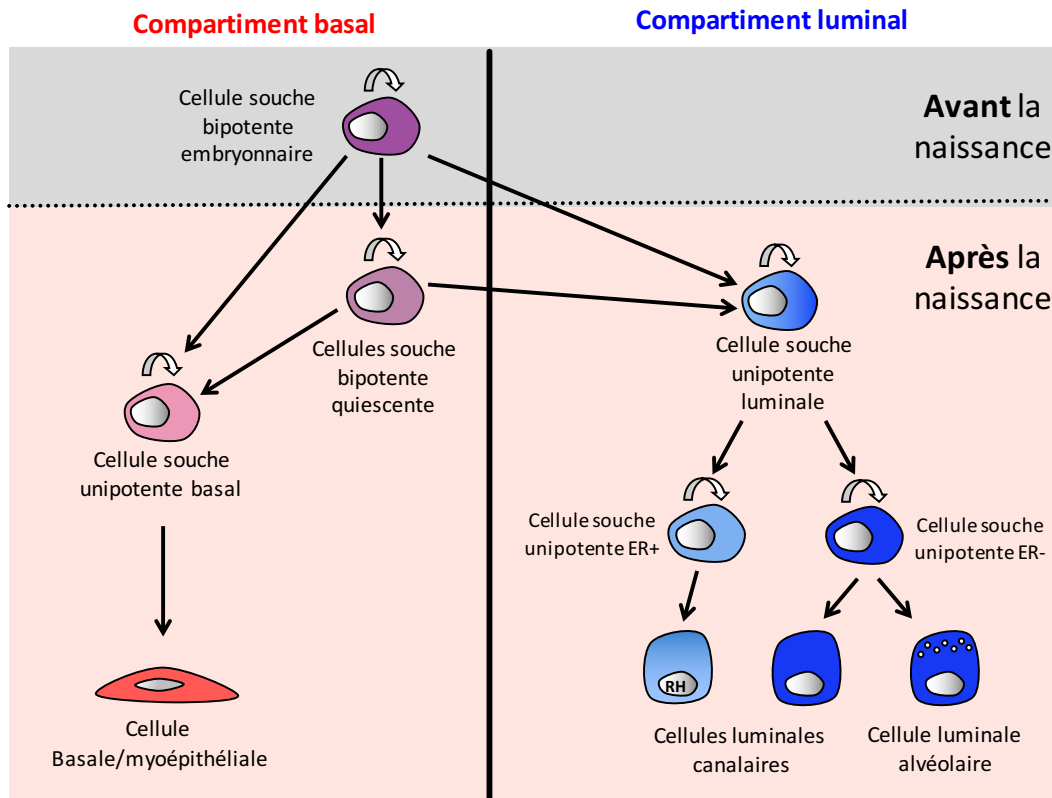


Figure 12 : Schéma modélisant la hiérarchie hypothétique des lignages cellulaires mammaires.

Les cellules souches bipotentes sont présentes chez l'embryon. La séparation des lignages mammaires basal et luminal s'effectue probablement après la naissance. Par conséquent, le développement post-natal reposerait sur des cellules souches basales et lumineales unipotentes. Les cellules souches unipotentes lumineales ER⁻ se diviseraient en cellules canalaire et alvéolaire. La sous-population positive pour ER serait maintenue par un progéniteur luminal ER⁺ (Van Keymeulen *et al.*, 2017). Dans le compartiment basal, l'existence de cellules canalaire et alvéolaire distinctes n'est pas clairement établie. Outre ces populations cellulaires capables de maintenir les lignages mammaires dans des conditions physiologiques, il existerait des cellules basales quiescentes et potentiellement bipotentes. Cette population dériverait probablement des cellules souches bipotentes embryonnaires qui resteraient dans un état de quiescence à l'âge adulte (cette population n'a pas été détecté par les expériences de traçage cellulaire) (modifié de Visvader et Stingl, 2014; Lloyd-Lewis *et al.*, 2017).

On mentionnera qu'on trouve selon la littérature différentes terminologies. Le terme « bipotent » peut être remplacé par le terme « multipotent » si on prend en compte la ségrégation des lignages lumineaux ER⁺ et ER⁻ et le terme « cellule progénitrice basale et lumineale » est utilisé au lieu de « cellule souche unipotente ».

d) Cellules souches mammaires adultes chez l'humain.

L'épithélium mammaire humain présente des caractéristiques de développement très similaires à celles de la souris. Les méthodes d'analyse actuelle permettent la séparation des cellules basales et luminales mammaires humaines, l'étude de leur activité clonogénique et de leur potentiel de régénération après « humanisation » du stroma mammaire des souris receveuses comme décrit précédemment (Kuperwasser *et al.*, 2004; Lim *et al.*, 2009). Dans leur ensemble, les résultats indiquent que les propriétés fonctionnelles des cellules basales et luminales ainsi que le modèle de ségrégation des lignages sont analogues chez l'humain et la souris (pour revue, Visvader et Stingl, 2014). Une étude récente, menée à l'aide d'un modèle innovant de mise en culture sur gel de collagène flottant, a confirmé que les cellules basales étaient enrichies en activité morphogénétique, puisqu'elles forment dans ces gels des structures de type organoïdes mimant les TDLUs (Linnemann *et al.*, 2015). Ce type d'essai devrait permettre de faciliter l'étude des caractéristiques et des régulateurs des cellules souches et progénitrices humaines.

On mentionnera qu'en dehors des stratégies de séparation des cellules basales et luminales, certains biomarqueurs ont été utilisés pour enrichir la population de cellules souches et progénitrices. Il a été rapporté que les cellules épithéliales mammaires humaines présentant une forte activité en ALDH, une enzyme de la famille des aldéhydes déshydrogénases, possèdent un potentiel de cellule souche et progénitrice accrue observable *in vivo* et *in vitro* (Ginestier *et al.*, 2007). Par ailleurs, l'utilisation du colorant fluorescent lipophile, PKH26, a permis de marquer *in vitro*, dans les cellules mammaires humaines et murines isolées, une population qui retient la fluorescence et semble enrichie en cellules souches (Cicalese *et al.*, 2009; Pece *et al.*, 2010). Cette caractéristique de rétention est attribuée à la relative quiescence des cellules souches par rapport à leur progénie dont le marquage se dilue au cours de leur amplification transitoire avant différenciation.

4) Les régulateurs des cellules souches de la glande mammaire murine

La glande mammaire est un tissu dynamique dont le développement et l'homéostasie sont finement régulés. Grâce aux profils d'expression génique des cellules basales et luminales, aux essais développés et aux nombreux modèles transgéniques explorés, il a été possible d'identifier certains des régulateurs majeurs des cellules souches et progénitrices mammaires et de démontrer que ces populations jouent un rôle important dans le contrôle de l'expansion et de la différenciation de l'épithélium mammaire (pour revues, Macias et Hinck, 2012; Visvader et Stingl,

2014; Inman *et al.*, 2015; Yu *et al.*, 2016). Le Tableau 3 résume les régulateurs essentiels des cellules souches et progénitrices basales et luminales établis à ce jour. On décrira succinctement les régulateurs des cellules luminales et de façon plus détaillée ceux des cellules souches basales dont la voie de signalisation Wnt.

Cellules souches basales		Cellules souches luminales		Cellules luminales différenciées	
Régulateurs positifs	Régulateurs négatifs	Régulateurs positifs	Régulateurs négatifs	Régulateurs positifs	Régulateurs négatifs
Itgβ1 Wnt/βcat Rank/RankL Myc ΔNp63 Slug Stat3 Bmi1 Pygo2 CEBPβ Bcl11a Par3L	Notch Wnt non canonique p53	Stat5a Notch Rank/RankL Met	p53	Stat5a Stat6 Elf5 Ezh2 Gata3 FoxA1 PML	Zfp157 FoxM1

Tableau 3 : Tableau résumant les principaux régulateurs des lignages mammaires.

a) Les régulateurs majeurs du compartiment luminal

- **Elf5 et Stat5, régulateurs majeurs de l'alvéologénèse.**

Elf5 est fortement exprimé dans la population des cellules luminales progénitrices mammaires (Kendrick *et al.*, 2008; Lim *et al.*, 2010; Di-Cicco *et al.*, 2015). En l'absence d'Elf5, lors de la gestation, les progéniteurs luminaux s'accumulent de façon anormale au détriment des cellules luminales alvéolaires différenciées. A l'inverse, l'expression forcée d'Elf5 dans l'épithélium mammaire de souris vierges entraîne une alvéologénèse précoce (Oakes *et al.*, 2008). L'ensemble de ces résultats montre qu'Elf5 est nécessaire à la différenciation lactogénique des progéniteurs luminaux.

Comme Elf5, Stat5a est nécessaire à la formation des alvéoles. Son inactivation entraîne une diminution du compartiment des progéniteurs luminaux (Yamaji *et al.*, 2009). Elf5 contribuerait à réguler Stat5a pour contrôler la population alvéolaire luminaire progénitrice (Lee *et Ormandy*, 2012).

- **Gata3 et FoxA1, régulateurs des cellules luminales ER+**

Dans l'épithélium mammaire, les cellules luminales positives pour Er α expriment Gata3 (Kouros-Mehr *et al.*, 2006). L'inactivation de Gata3 dans l'épithélium mammaire entraîne une inhibition de la croissance canalaire en puberté ainsi qu'une accumulation des progéniteurs luminaux accompagnée d'un défaut de différenciation lobulo-alvéolaire en gestation (Kouros-Mehr *et al.*, 2006; Asselin-Labat *et al.*, 2007). Un des facteurs régulé par Gata3 est le facteur de transcription FoxA1, requis pour l'expression de Er α . Les souris déficientes en FoxA1 présentent une incapacité à maintenir la population luminale ER+ ce qui provoque des défauts de croissance canalaire en puberté (Bernardo *et al.*, 2010).

Le facteur de transcription Stat6 est un régulateur de Gata3. Il réprime l'expression de la protéine en doigt de zinc, ZFP-157 (de l'anglais « zinc finger protein 157 ») qui régule la balance entre les populations luminales, exprimant Gata3 et Er α , et les progéniteurs luminaux (Oliver *et al.*, 2012).

- **La voie de signalisation Notch et la spécification du lignage luminal**

Les ligands Notch (Delta et Serrate : Dll1, Dll3, Dll4 et Jag1 Jag2) sont localisés sur les cellules basales mammaires alors que les récepteurs transmembranaires (Notch1-Notch4) se situent majoritairement à la surface des cellules luminales (Raafat *et al.*, 2011).

Lors de l'interaction entre le ligand et son récepteur Notch, celui-ci subit des processus de clivage qui aboutissent à la libération de sa partie cytoplasmique dans le domaine intracellulaire jusqu'au noyau où, associée avec des cofacteurs, ce complexe va activer la transcription de gènes cibles, notamment les facteurs de transcription des familles Hes et Hey (pour revue, Hori *et al.*, 2013). Ces facteurs sont fortement exprimés dans les progéniteurs luminaux, et l'activation de Notch1 stimule leur expansion. Par ailleurs, l'activation ectopique de Notch1 dans les cellules basales induit des caractéristiques luminales, indiquant que cette voie est déterminante dans la spécification du lignage luminal (Bouras *et al.*, 2008; Rodilla *et al.*, 2015).

- **Signalisation HGF/ Met et plasticité des progéniteurs luminaux**

Le récepteur à activité tyrosine kinase Met et son ligand majeur le facteur de croissance hépatocytaire HGF sont connus pour contrôler de nombreuses fonctions des cellules épithéliales (Trusolino *et al.*, 2010). L'inactivation de Met dans l'épithélium mammaire murin entraîne des défauts de morphogénèse canalaire (Garner *et al.*, 2011). Deux études récentes, dont une menée au laboratoire, ont montré que seuls les progéniteurs luminaux exprimaient Met dans l'épithélium mammaire et que, l'HGF stimulait leur activité clonogénique *in vitro* (Gastaldi *et al.*, 2013; Di-Cicco

et al., 2015). De plus, l'activation paracrine de Met par l'HGF induit des caractéristiques moléculaires basales dans les progéniteurs luminaux, et leur confère un potentiel régénératif *in vivo*, mettant en évidence leur plasticité phénotypique (*Di-Cicco et al.*, 2015).

b) Les régulateurs majeurs des cellules souches basales

• Le facteur de transcription DNp63

Le facteur de transcription de la famille de p53, p63 (codé par le gène *Trp63*), est un marqueur spécifique des cellules basales/myoépithéliales (*Barbareschi et al.*, 2001). Il existe deux isoformes de p63 obtenus à partir de deux promoteurs différents : TAp63 et Δ Np63. Δ Np63, tronqué dans sa partie N-terminale, est l'isoforme majoritairement exprimé dans la glande mammaire (*Yalcin-Ozuysal et al.*, 2010; *Chakrabarti et al.*, 2014). Des expériences de perte et de gain de fonction dans des cellules épithéliales mammaires humaines isolées ont montré que Δ Np63 est essentiel au maintien de l'identité basale et qu'il est régulé négativement par l'activation de Notch, mettant en évidence les rôles antagonistes de Δ Np63 et Notch dans la spécification des lignages basal et luminal mammaires (*Yalcin-Ozuysal et al.*, 2010).

Chez la souris adulte, Δ Np63 est un régulateur positif du potentiel de cellules souches de type basal et la surexpression de Δ Np63 dans le compartiment luminal entraîne l'acquisition de ce potentiel. Au plan moléculaire, Δ Np63 stimule l'expression de *Fzd7*, un récepteur de la voie de signalisation Wnt présent à la surface des cellules basales (*Chakrabarti et al.*, 2014).

La perte de Δ Np63 dans la couche épithéliale basale en amont d'une gestation entraîne une incapacité à allaiter qui s'accompagne d'une accumulation de cellules luminales progénitrices et d'un blocage de leur différenciation. Ce défaut serait relatif à une diminution de l'activation transcriptionnelle de *Nrg1*, une protéine de la famille des EGF sécrétée par les cellules basales, nécessaire à l'activation de la signalisation de la différenciation luminale via *ErbB4/Stat5a* (*Forster et al.*, 2014).

• Snail2/Slug et la transition épithélio-mésenchymateuse

Slug/Snail2, un des facteurs de transcription impliqué dans la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT de l'anglais « epithelial to mesenchymal transition »), est spécifiquement exprimé dans les cellules basales mammaires (*Nassour et al.*, 2012; *Guo et al.*, 2012). Le processus d'EMT est défini par la perte des interactions cellule-cellule et de la polarité apico-basale, ainsi que l'acquisition de propriétés motiles et l'expression de marqueurs mésenchymateux (*Nieto et al.*,

2016). Cette régulation de la plasticité cellulaire est essentielle pour un ensemble de processus durant le développement embryonnaire et semble jouer un rôle important dans certaines situations pathologiques, telles que la progression tumorale. Selon le contexte cellulaire, différents facteurs de transcription des familles Snails, Twists, Zeb1 et Ovol1 contrôlent les mécanismes d'EMT (Gonzalez et Medici, 2014; Nieto *et al.*, 2016).

Plusieurs travaux ont montré que Snail2 participe au contrôle de la fonction des cellules souches basales mammaires. En particulier, l'absence de Snail2 entraîne un défaut d'activité de régénération des cellules basales isolées tandis que son expression forcée dans les progéniteurs luminaux induit une capacité régénérative (Guo *et al.*, 2012; Phillips *et al.*, 2014). Associé au facteur de transcription Sox9, Snail2 confère des propriétés de cellules souches à la population luminaire différenciée (Guo *et al.*, 2012). Il est intéressant de souligner que le régulateur luminaire Elf5 réprime directement l'expression de Snail2 (Chakrabarti *et al.*, 2014). Comme Dnp63/Notch, le couple Snail2/Elf5 participe donc à la régulation de la balance entre les lignages basal et luminaire mammaires. Par ailleurs, le facteur de transcription en doigts de zinc Ovol2 a récemment été décrit comme un répresseur majeur de Zeb1. La perte d'Ovol2 dans l'épithélium mammaire entraîne un sous-développement très important du réseau canalaire durant la puberté (Watanabe *et al.*, 2014).

- **Autres facteurs impliqués dans le contrôle de la fonction des cellules souches et progénitrices basales.**

En dehors de Dnp63 et Snail2, de nombreux facteurs de transcription ont été décrits comme régulateurs positifs de la fonction des cellules souches basales définies par leur capacité régénérative. On citera notamment C/EBP- β , Myc, Stat3, Bcl11a (LaMarca *et al.*, 2010; Staniszewska *et al.*, 2012; Moumen *et al.*, 2012; Khaled *et al.*, 2015). Les modulateurs épigénétiques Bmi1 et Pygo2 sont également des régulateurs positifs (Pietersen *et al.*, 2008; Gu *et al.*, 2009) ainsi que Par3L, une protéine liée au contrôle de la polarité cellulaire (Huo et Macara, 2014).

A l'inverse, le facteur de transcription p53, régulateur majeur du cycle cellulaire et de l'apoptose, restreint l'amplification et l'autorenouvellement des cellules souches basales mammaires (Tao *et al.*, 2011; Chiche *et al.*, 2013). Les mécanismes évoqués incluent une inhibition de la division cellulaire, une modulation des voies de signalisation Notch et Wnt ainsi qu'une induction de la division asymétrique des cellules souches (Cicalese *et al.*, 2009; Spike et Wahl, 2011; Chiche *et al.*, 2013).

- **Les intégrines et le contrôle de la nature des divisions des cellules souches basales**

Les cellules souches basales expriment fortement les intégrines de la famille $\beta 1$ ainsi que $\alpha 6\beta 4$, récepteurs majeurs des composants de la membrane basale (pour revue, [Glukhova et Streuli, 2013](#)). La perte ciblée de la chaîne $\beta 1$ dans le compartiment basal mammaire a montré que l'expression de $\beta 1$ est essentielle à la morphogenèse mammaire et au maintien du potentiel régénératif des cellules souches ([Taddei et al., 2008](#)). Dans ces mutants, les cellules basales présentent une perturbation de leur plan de division de sorte que leur progénie est trouvée dans le compartiment luminal. Ces résultats indiquent que les interactions matricielles constituent un élément important de la niche des cellules souches mammaires et du contrôle de la nature de leur division.

Aurora A (Aurka), une kinase oncogénique impliquée dans les processus mitotiques, a également été impliquée dans le contrôle de la nature des divisions des cellules souches basales ([Regan et al., 2013](#)). D'après cette étude, un fort taux d'expression d'Aurka favoriserait une orientation des fuseaux mitotiques perpendiculaire à la membrane basale entraînant une activation de la voie de signalisation Notch, la division asymétrique des cellules souches basales et l'acquisition d'un destin luminal pour l'une des deux cellules filles.

- **La voie Rank/RankL, un acteur controversé de l'expansion des cellules souches**

Rank est exprimée dans les cellules basales et les cellules luminales progénitrices mammaires tandis que son ligand RankL est produit par les cellules ER/PR+ ([Asselin-Labat et al., 2010](#); [Di-Cicco et al., 2015](#)). Le couple Rank/RankL est indispensable au développement lobulo-alvéolaire, et participe au contrôle de l'expansion des progéniteurs luminaux ([Fata et al., 2000](#); [Joshi et al., 2015](#)). Certains travaux suggèrent que cette voie serait impliquée dans l'expansion du compartiment basal et l'amplification des cellules souches observée durant la gestation ([Asselin-Labat et al., 2010](#); [Joshi et al., 2015](#)). Cependant, des travaux de transplantation sériée de fragments épithéliaux indiquent que l'épithélium mammaire déficient en RankL ne présente pas de défaut de régénération à long-terme chez l'adulte vierge ([Rajaram et al., 2015](#)).

5) La voie de signalisation Wnt et son implication dans le développement mammaire

C'est en cherchant à identifier les gènes responsables de la formation de tumeurs mammaires dans des souris MMTV (de l'anglais « mouse mammary tumor virus ») que le premier gène de la voie de signalisation Wnt, *Int1/Wnt1*, fut découvert (Nusse et Varmus, 2012). L'identification de *Wnt1* fait partie des grandes avancées dans la découverte des oncogènes et représente le début des études sur cette voie de signalisation. Depuis 1982, de nombreux composants de la voie Wnt ont été décrits et la voie impliquée dans un large spectre de processus biologiques, incluant la prolifération, la survie, la migration, la différenciation et la polarité cellulaires (pour revues, Nusse et Varmus, 2012; Gomez-Orte *et al.*, 2013; Nusse et Clevers, 2017).

Il existe 19 gènes Wnt chez l'humain et la plupart des mammifères, ils codent pour des facteurs sécrétés dans le milieu extracellulaire qui activent une cascade de signalisation hautement conservée et finement régulée. Les Wnts peuvent activer la voie canonique, dépendante de la β -caténine (β cat) et les voies non-canoniques indépendantes de la β cat. Certains d'entre eux sont connus pour activer les deux types de voie sans distinction. On décrira plus particulièrement la voie canonique, dite Wnt/ β cat, car son rôle est majeur dans le développement, la fonction des cellules souches et la tumorigenèse mammaires (pour revues, Roarty et Rosen, 2010; Yu *et al.*, 2016).

a) Signalosome de la voie Wnt

- **Les ligands Wnts :**

Les ligands Wnts sont des glycoprotéines riches en cystéines d'approximativement 350-400 acides aminés qui contiennent un peptide signal dans leur partie N-terminale nécessaire pour leur sécrétion (pour revue, Nusse et Clevers, 2017). Toutes les protéines Wnts possèdent une modification covalente lipidique : un groupe palmitate, ajouté par la palmitoyltransférase Porcupine. La protéine multi-pass Wntless (Wls) se lie exclusivement aux ligands Wnt palmitoylés afin de les transporter depuis l'appareil de Golgi vers la membrane cellulaire et ainsi permettre leur sécrétion. L'ajout lipidique donne aux Wnts un caractère fortement hydrophobe, ils sont donc difficilement transportables dans le milieu extracellulaire hydrophile. Ils agissent en général de façon autocrine ou paracrine sur de courtes distances et plusieurs modes de transport ont été décrits (Fig. 13). Ceux-ci impliquent une diffusion latérale, des protéines de transport, des exovésicules et plus récemment des « cytonèmes » où les Wnts seraient acheminées via les

extensions cytoplasmiques des cellules receveuses du signal ([pour revue, Stanganello et Scholpp, 2016](#)).

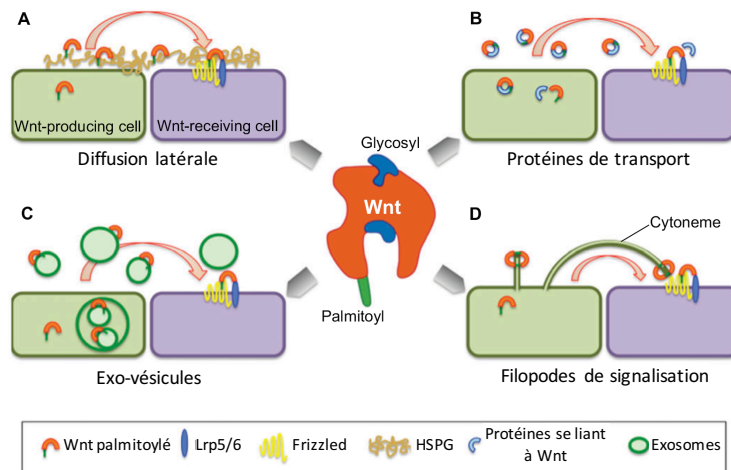


Figure 13 : Différents modes de transport des ligands Wnt entre les cellules productrices (= « Wnt-producing cell ») et les cellules répondant à la signalisation Wnt (= « Wnt-receiving cell »). ([De Stanganello et Scholpp, 2016](#))

- **Les récepteurs des ligands Wnts :**

Les ligands Wnts initient la transduction du signal en engageant un complexe de récepteurs hétérodimériques composé de récepteurs transmembranaires de la famille des Frizzled (Fzds) et de co-récepteurs Lrp5/6 (de l'anglais « low density lipoprotein related proteins 5 or 6 ») ([pour revues, Driehuis et Clevers, 2017; Nusse et Clevers, 2017; Fig. 14](#)). L'interaction des ligands Wnt avec les récepteurs Fzds n'est pas exclusive, c'est à dire qu'un ligand Wnt peut interagir avec plusieurs récepteurs Fzds et *vice versa*. Chez les mammifères, il existe 10 gènes codants pour les récepteurs Fzds. Ce sont des protéines transmembranaires à 7 domaines qui contiennent une partie riche en cystéine localisée en N-terminal (appelé CRD pour « Cystein rich domain » en anglais). Les CRD sont les domaines des Fzds qui interagissent directement avec les structures lipidiques des ligands.

Les récepteurs et co-récepteurs Fzds et Lrps peuvent induire une signalisation Wnt canonique ou non-canonique selon le contexte cellulaire et les ligands Wnts associés. Il existe de plus deux récepteurs à activité tyrosine kinase, reconnaissant les ligands Wnts, qui induisent préférentiellement une signalisation Wnt non-canonique : Ror et Ryk ([pour revue, Green et al., 2014](#)). Par ailleurs, des ligands, autres que les Wnts, peuvent se lier aux Fzds, comme la Norrin sur Fzd4, et les Fzds peuvent contribuer à activer les voies Wnt via leur fonction de récepteurs couplés aux protéines G (GPCR, de l'anglais « G protein-coupled receptor » ; [pour revue, Driehuis et Clevers, 2017](#)).

- **Les ligands Rspo et leurs récepteurs Lgrs :**

Les R-spondins (Rspo) sont des protéines sécrétées découvertes en 2004 qui, en synergie avec les Wnts, potentialisent la signalisation Wnt canonique (Kazanskaya *et al.*, 2004). Il existe 4 Rspos (1-4) qui partagent une structure similaire, ils sont constituées de deux domaines furines dans leur partie N-terminale et d'un domaine TSP1 (de l'anglais « thrombospondin type 1 domain ») en C-terminal (pour revue, Schuijers et Clevers, 2012). Les domaines furines sont essentiels à l'activation de la voie Wnt via les Rspos.

L'identification des Lgrs en tant que récepteurs des Rspos est récente puisqu'elle date des années 2011. Les ligands Rspos potentialisent la voie Wnt par l'intermédiaire des récepteurs Lgrs et des cofacteurs ZNRF3/RNF43 (pour revue, de Lau *et al.*, 2014; Fig. 14). Comme les Fzds, les récepteurs Lgrs sont des protéines transmembranaires multipass, riches en domaine leucine et couplés aux protéines G. Parmi les différentes sous-classes de Lgrs, Lgr4, Lgr5 et Lgr6 ont fait l'objet de nombreuses études car ils sont exprimés par les cellules souches et progénitrices de différents tissus adultes (pour revues, Schuijers et Clevers, 2012; Clevers *et al.*, 2014). Lgr5 est notamment considéré comme un marqueur des cellules souches de la crypte intestinale, du follicule pileux et de l'estomac. Tous les ligands Rspos semblent pouvoir interagir avec les récepteurs Lgr4/5/6. RNF43 et ZNRF3 sont des protéines transmembranaires à activité ubiquitine ligase E3 de type RING. Il a été montré que les domaines furines des Rspos pouvaient se lier directement aux ecto-domaines de RNF43 et ZNRF3 (pour revue, de Lau *et al.*, 2014).

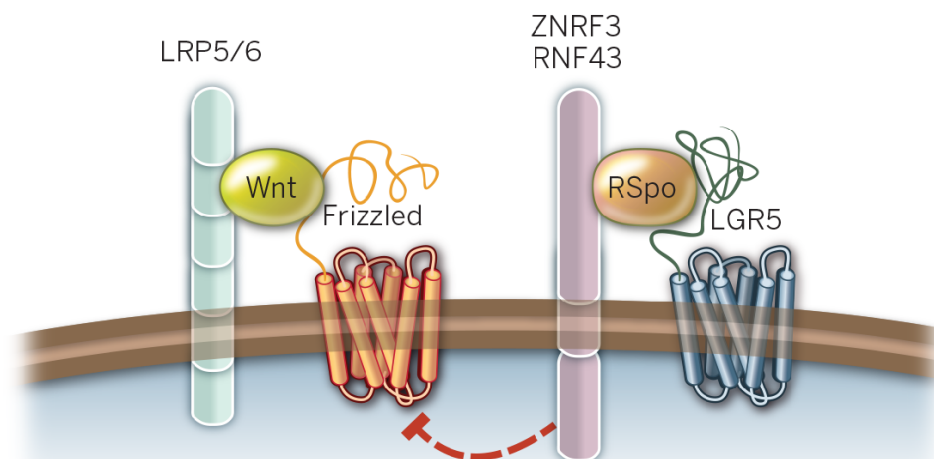


Figure 14 : Schéma des composants du signalosome de Wnt
(Clevers *et al.*, 2014)

b) Voie de signalisation Wnt canonique

La voie de signalisation Wnt canonique activée est définie par une accumulation nucléaire de la β cat. La β cat est une protéine multifonction. En tant que membre du complexe protéique lié au domaine cytoplasmique des cadhérines, elle régule l'adhérence intercellulaire des épithélia. La stimulation de la voie Wnt entraîne son accumulation dans le cytoplasme et sa translocation vers le noyau où elle va déclencher l'activation de nombreux gènes cibles, contrôlant la prolifération, la survie, la migration et la différenciation cellulaires. La liaison de la β cat aux jonctions contribue à diminuer le pool cytoplasmique disponible pour la signalisation Wnt.

- **Mécanisme d'activation de la voie de signalisation Wnt/ β cat:**

En l'absence de ligands Wnts, la phosphorylation de la β cat cytoplasmique suivie de sa dégradation permet de réguler négativement la voie de signalisation Wnt/ β cat. Plus précisément, un complexe de destruction composé des protéines « squelettes » suppressives de tumeurs, Axin (Axin1 ou Axin2) et APC (de l'anglais « adenomatous polyposis coli »), de deux kinases, Ck1 (de l'anglais « casein kinase 1 ») et GSK3 β (de l'anglais « glycogen synthase kinase 3 β »), interagit avec la β cat permettant sa phosphorylation au niveau des résidus Sérines et Thréonines conservés dans la région N-terminale. Ainsi phosphorylée par les kinases, la β cat devient un substrat pour l'ubiquitine ligase E3 (β -Trcp). Elle est alors ubiquitinylée et dégradée par le protéasome 26S ([pour revue, MacDonald et al., 2009](#)). En l'absence de signalisation Wnt, les facteurs de transcription Tcf (de l'anglais « T-cell factor »)/Lef (« lymphoid enhancer factor ») sont associés aux répresseurs transcriptionnels Groucho chez la souris ou Tle1 chez l'humain (de l'anglais « transducin-like enhancer of split ») qui recrutent des histone-déacétylases (HDACs) et entraînent la compaction de la chromatine afin de réprimer la transcription des gènes cibles ([Fig. 15](#)).

La liaison des protéines Wnts sur leurs récepteurs Fzd et Lrp entraîne la relocalisation du complexe de destruction à la membrane. Lorsqu'un ligand Wnt vient se fixer sur son récepteur Fzd, cela entraîne la dimérisation des récepteurs de Wnt (Lrp/Fzd). Les kinases Ck1 et GSK3 β sont alors recrutées pour phosphoryler les domaines cytoplasmiques des co-récepteurs Lrp5/6 qui peuvent ainsi interagir directement avec l'Axin ([pour revue, Nusse et Clevers, 2017](#)). Les récepteurs Fzds, quant à eux, recrutent Dishevelled (Dvl) qui est une protéine normalement liée à l'Axin. Dvl participerait au recrutement de l'Axin et à l'initiation de la phosphorylation des Lrps par GSK3 β ([Zeng et al., 2008](#)). Cette cascade de processus entraîne l'inactivation du complexe de destruction et l'accumulation de la β cat non dégradée dans le cytoplasme ([pour revue, Nusse, 2012](#)). La β cat

est transportée dans le noyau où elle se lie au complexe de facteur de transcription, Tcf/Lef à la place de Groucho/TLE. Pour activer la transcription des gènes cibles de la voie Wnt/ β cat, l'histone-acétyltransférase CBP (de l'anglais « CREB-binding protein ») est recrutée. Pygopus (ou Pygo2) s'associe à la β cat via la protéine adaptatrice Legless (appelée aussi BCL9). Ce complexe de co-activateurs transcriptionnels semble essentiel à l'activité transcriptionnelle de la β cat lors du développement de la drosophile et agit probablement comme un anti-répresseur en inhibant l'activité de Groucho/TLE1 (pour revue, MacDonald *et al.*, 2009; Fig. 15).

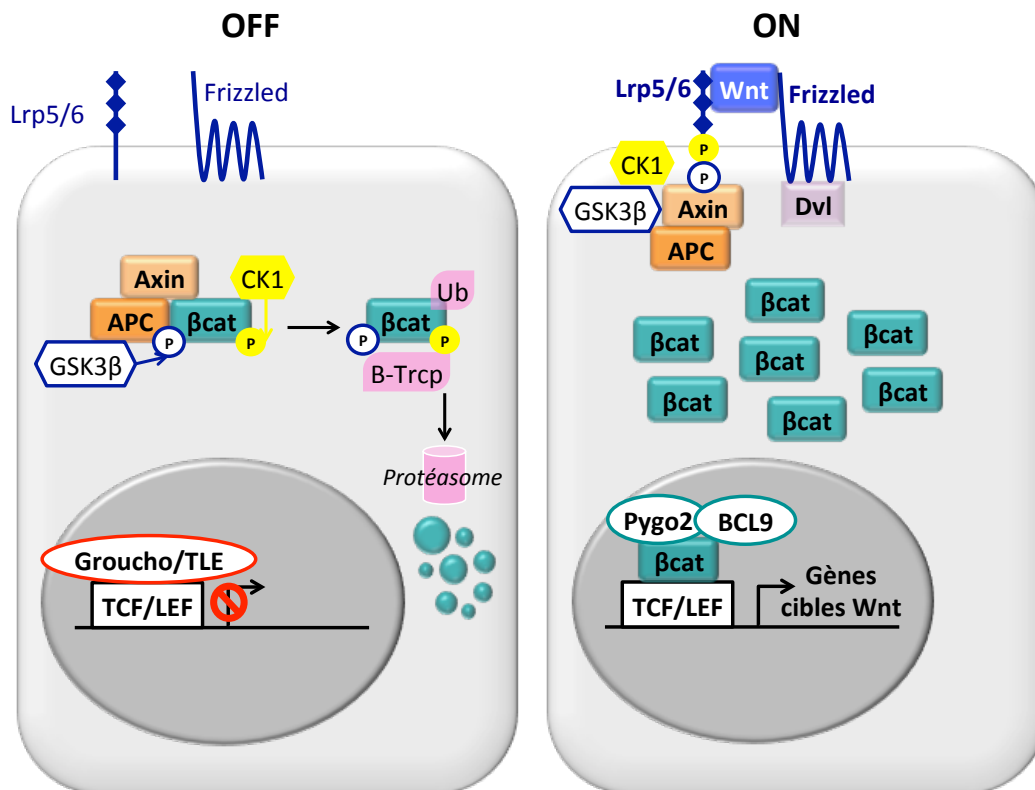


Figure 15 : Schéma modélisant le mécanisme d'activation de la voie de signalisation Wnt/ β cat

Gauche : état non activé, en absence de ligands Wnts. Le complexe de destruction (Axin, APC, Ck1 et GSK3 β), assure l'élimination de la β cat cytoplasmique. **Droite** : état activé, en présence de ligands Wnt. La liaison des Wnts sur leurs récepteurs Fzds et Lrp5/6 permet le recrutement du complexe de destruction à la membrane. Celui-ci n'assure plus l'élimination de la β cat cytoplasmique qui s'accumule. Sa translocation dans le noyau entraîne l'activation de la transcription de gènes cibles via les facteurs de transcriptions Tcf/Lef (Modifié de MacDonald *et al.*, 2009).

- **Régulation de la translocation nucléaire de β cat et gènes cibles :**

La translocation nucléaire de la β cat est un processus encore mal décrit. La β cat se lie probablement aux pores nucléaires indépendamment des systèmes classiques de transport Ran/Importin (pour revue, Jamieson *et al.*, 2014).

Il a été montré que la translocation nucléaire de la β cat en réponse à la signalisation Wnt était dépendante de l'activation de Rac1/Jnk2 (Wu *et al.*, 2008). En effet, le traitement par Wnt3a de

lignées cellulaires épithéliales induit une augmentation de l'activité de Rac1 suivie de l'activation de Jnk2 qui phosphoryle la β cat sur ses sérines 191 et 605, une étape essentielle à son passage dans le noyau. On notera que la phosphorylation de la β cat par Jnk2 est différente de celle effectuée par le complexe de dégradation (Wu *et al.*, 2008).

FoxM1 (de l'anglais « Forkhead box M1 ») est un facteur de transcription connu pour son implication dans la régulation du cycle cellulaire qui est également un gène cible de la signalisation Wnt/ β cat. Suite à l'activation de la voie Wnt, les niveaux d'expression de FoxM1 sont significativement élevés. Celui-ci contient une séquence fonctionnelle NLS (de l'anglais « nuclear localization sequence ») qui permet son transport dans le noyau et un domaine se liant à la β cat. Sous l'effet de l'activation de la voie Wnt, l'interaction de FoxM1 avec la β cat entraîne son transport vers le noyau (pour revue, Kim *et al.*, 2013).

Les protéines Axin et APC possèdent également des séquences fonctionnelles NLS et NES (de l'anglais « nuclear export sequence »). Elles peuvent interagir avec la β cat nucléaire et moduler dynamiquement son transport vers le cytoplasme afin de réprimer son action transcriptionnelle (pour revue, Kim *et al.*, 2013).

Le panel de gènes cibles, directs ou indirects, de la voie Wnt est très large (<http://web.stanford.edu>) Son hétérogénéité et son étendue dépendent principalement du type cellulaire étudié, de l'organe ou l'espèce (pour revue, Driehuis et Clevers, 2017). L'Axin2 est considéré comme un gène cible de référence dans la plupart des modèles cellulaires et utilisé comme gène rapporteur, témoin de l'activation de la voie Wnt/ β cat. Le gène SP5 a également été décrit comme cible de référence. On notera que plusieurs gènes codants pour des protéines actrices de la voie Wnt sont sous le contrôle de cette même voie de signalisation. Ces composants du signalosome Wnt permettent un rétrocontrôle positif ou négatif de la signalisation Wnt (« feed-back genes »).

- **Inhibiteurs naturels de la voie de signalisation Wnt/ β cat :**

En raison de sa place centrale dans les fonctions cellulaires, la cascade de signalisation Wnt/ β cat est régulée à de nombreux niveaux. La combinaison des différents types de Wnts et Fzds selon le contexte cellulaire représente une des premières étapes de contrôle. Mais celles-ci incluent également des inhibiteurs et activateurs naturels dont la liste est en constante progression (pour revue, Driehuis et Clevers, 2017). Notum, une enzyme de type carboxylestérase cible de la voie Wnt/ β cat, peut supprimer la modification lipidique de type palmytoleate des ligands Wnts et ainsi réguler l'activation de la voie (Kakugawa *et al.*, 2015; Canal *et al.*, 2016).

Les antagonistes incluant les protéines Dkk (DKK) et la famille des SOSTDC1/WISE (de l'anglais « Sclerostin domain-containing 1 ») inhibent la voie Wnt/ β cat en se liant à Lrp5/Lrp6 ce qui permet de rompre la dimérisation des récepteurs Fzds/Lrps. D'autres molécules sont capables de se lier directement aux Wnts ou à leurs récepteurs et inhiber leurs actions dans les voies Wnt canonique et non canonique : les protéines sécrétées relatives aux Fzds aussi appelées sFRPs (de l'anglais « secreted Fzd-related proteins ») et les protéines inhibitrices de Wnt, également nommées WIF (de l'anglais « Wnt inhibitory factor ») ([pour revue, Cruciat et Niehrs, 2013](#)).

RNF43 et ZNRF3 sont deux gènes cibles de Wnt dont les séquences sont très homologues. Leur interaction avec Dvl induit spécifiquement l'ubiquitination des récepteurs Fzds conduisant à leur endocytose rapide et destruction par les lysosomes. Les récepteurs de Wnt ne sont donc plus stabilisés à la membrane, ce qui permet de réguler négativement la signalisation Wnt/ β cat ([pour revue, Hao et al., 2016; Fig. 16](#)).

- **Agonistes et amplification de la voie de signalisation Wnt/ β cat :**

-Le module d'amplification Rspos/Lgrs/Rnf43/Znrf3 :

Les ligands Rspos en association avec les Wnts permettent de potentialiser l'activation de la voie Wnt/ β cat ([Fig. 16](#)). Les ligands Rspos se fixent sur les domaines extracellulaires des récepteurs Lgrs (4/5/6) ce qui permet leurs interactions avec RNF43/ZNRF3 ([pour revue, de Lau et al., 2014](#)). Ils induisent ainsi l'auto-ubiquitination de RNF43 et ZNRF3 qui perdent leur activité sur l'endocytose et la dégradation des récepteurs Fzds, permettant la stabilisation de ces derniers à la membrane. L'absence d'activité des régulateurs négatifs de la voie Wnt/ β cat, RNF43 et ZNRF3, permet la potentialisation du signal Wnt/ β cat.

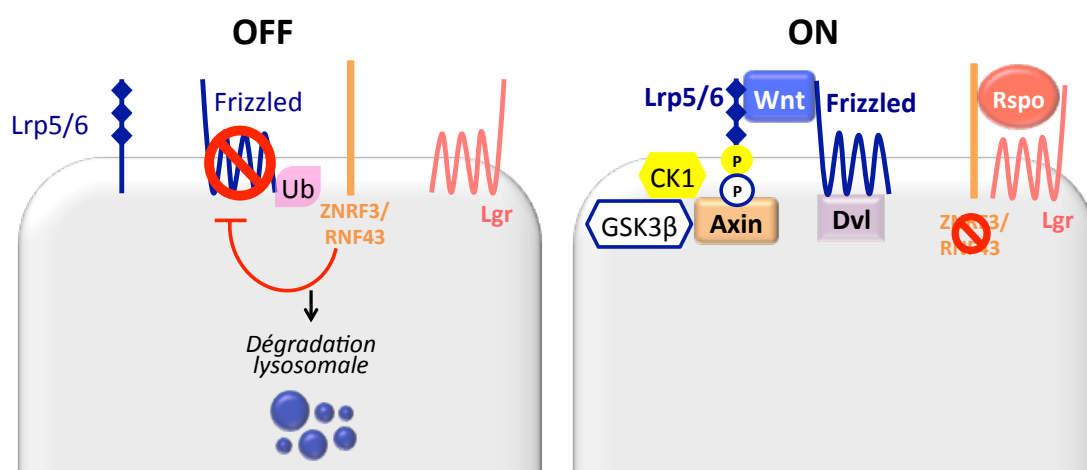


Figure 16 : Mécanisme d'action du module potentialisateur de la signalisation Wnt : Rspo/Lgrs/ZNRF3-RNF43

Le signalosome Rspo/Lgrs/ZNRF3-RNF43 potentialise la voie de signalisation Wnt par la stabilisation des récepteurs aux ligands Wnt, Fzds. Les ligands Rspos se lient aux récepteurs Lgrs et à ces corécepteurs ZNRF3/RNF43. ZNRF3 et RNF43 ne sont alors plus disponibles pour catalyser l'ubiquitination des Fzds et par conséquent entrainent son endocytose et dégradation. Ce dernier se retrouve donc stabilisé à la membrane ce qui permet d'augmenter la signalisation Wnt/ β cat intracellulaire.

-Autres mécanismes :

Deux phosphatases permettant de réguler le processus de phosphorylation/dégradation de la β cat ont été décrites dans des lignées cellulaires : PP1 et PP2A. PP1 déphosphoryle l'Axin et entraîne le démantèlement du complexe de destruction (Luo *et al.*, 2007), alors que PP2A déphosphoryle la β cat qui est donc stabilisée dans le cytoplasme (Su *et al.*, 2008). Toutes deux induisent une diminution de la dégradation de la β cat et donc une potentialisation de la voie de signalisation Wnt/ β cat.

Un autre mécanisme régulant la phosphorylation et dégradation de β cat repose sur l'enzyme GSK3 β . En effet, cette enzyme semble pouvoir être séquestrée dans des vésicules appelées MVBs (de l'anglais « multivesicular bodies) sous l'effet de la liaison des ligands Wnts à leurs récepteurs, ainsi la concentration de GSK3 β dans le cytoplasme diminue. La phosphorylation et dégradation de β cat sous le contrôle de GSK3 β est atténuée, entraînant une augmentation du signal Wnt/ β cat (Taelman *et al.*, 2010).

c) Les voies de signalisation Wnt non canoniques

Les voies de signalisation Wnt non canoniques agissent indépendamment du complexe d'activation transcriptionnelle β cat/Tcf-Lef et n'incluent pas obligatoirement les ligands Wnts. Ces voies de signalisation peuvent induire des réponses cellulaires transcriptionnelles ou non-transcriptionnelles. On les décrira ci-dessous brièvement (Fig. 17).

- **Wnt PCP :**

La voie de signalisation non canonique appelée Wnt/PCP (de l'anglais « planar cell polarity ») est impliquée dans l'établissement de la polarité cellulaire planaire et le contrôle de la migration cellulaire polarisée (pour revue, Gomez-Orte *et al.*, 2013). Chez la drosophile, mais pas chez les vertébrés, cette voie de signalisation peut agir de façon indépendante des ligands Wnts mais nécessite dans tous les cas les récepteurs Fzds ainsi que Dvl. Ces acteurs, par une cascade de signalisation, entraînent l'activation des petites protéines Rho GTPases modulatrices du

cytosquelette d'actine telles que RhoA et Rac1 ainsi que leurs régulateurs en aval : la kinase associée aux Rho appelée Rock (de l'anglais « Rho-associated kinase ») et la kinase Jnk (Fig. 17). Cette voie permet de contrôler les réarrangements du cytosquelette d'actine ainsi que l'expression de certains gènes participant à la régulation de processus morphogénétiques chez les vertébrés tels que la gastrulation, la fermeture du tube neural et l'orientation des stéréocils dans l'oreille interne.

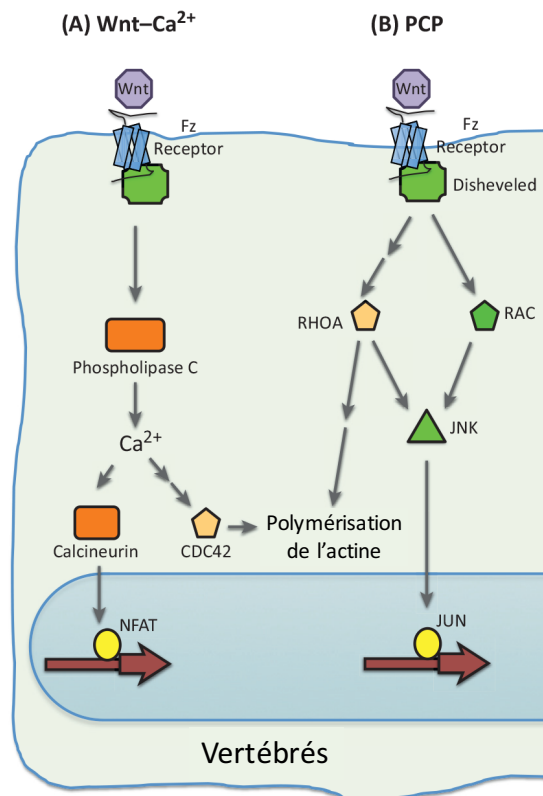


Figure 17 : Les deux voies de signalisation Wnt non canoniques majeures.
(Modifié de Gomez-Orte *et al.*, 2013).

- **Wnt Ca²⁺**

Les ligands Wnts permettent d'activer la signalisation intracellulaire relative au Ca²⁺ (Fig. 17). Suite à la liaison des Wnts sur leurs récepteurs Fzds et l'activation de Dvl, on observe une augmentation des taux intracellulaires de Ca²⁺ permettant l'activation de plusieurs kinases, comme par exemple la kinase Calmoduline (CaMKII de l'anglais « calmodulin-dependant protein kinase II »), la protéine kinase C (PKC) et la phosphatase dépendante du Ca²⁺ calcineurine. Cette voie induit l'activation de la famille de facteurs de transcription Nfat (facteur nucléaire des lymphocytes T activés, de l'anglais « nuclear factor of activated T-cells ») qui régulent l'expression de plusieurs cytokines pro-inflammatoires. Cette voie de signalisation a été impliquée dans les processus tumorigéniques

et inflammatoires ainsi que la neuro-dégénération. Elle aurait également une action antagoniste sur la voie de signalisation canonique Wnt/ β cat ([pour revue, Xiao et al., 2017](#)).

- **Voie Wnt/stabilisation des protéines (STOP)**

Un nouvel axe de la signalisation Wnt indépendante de la β cat a été décrit récemment chez le Xénope ([Huang et al., 2015](#)). Les auteurs montrent que durant la mitose, en absence de Wnts, GSK3 β induit l'ubiquitination d'effecteurs mitotiques, les conduisant à la dégradation. La voie STOP requiert GSK3 β mais contrairement aux voies précédentes, GSK3 β n'y exerce pas ses fonctions habituelles via la régulation transcriptionnelle.

d) La voie de signalisation Wnt dans le développement de la glande mammaire

Les voies de signalisation Wnt, canoniques et non-canoniques, sont impliquées dans la plupart des étapes du développement de la glande mammaire mais la majeure partie des travaux porte sur la voie Wnt/ β cat.

- **La signalisation Wnt dans le développement mammaire embryonnaire :**

Chez l'embryon de souris, la voie de signalisation Wnt canonique permet de définir les cellules qui deviendront à terme les lignes mammaires puis les placodes. Wnt10b est exprimé dans les lignes mammaires durant leur formation, c'est le premier évènement détecté dans le développement embryonnaire mammaire ([Veltmaat et al., 2004](#)). Au même moment, Wnt6 est exprimé dans l'ectoderme entourant les lignes mammaires. Ces deux ligands Wnts ont ensuite une expression restreinte aux placodes mammaires ([Veltmaat et al., 2004](#)). De nombreuses expériences ont permis de montrer que la voie Wnt canonique est impliquée dans l'établissement précoce des placodes ([pour revues, Howard et Lu, 2014; Yu et al., 2016](#)). En effet, le traitement d'embryons en culture avec des activateurs de la voie Wnt canonique (Wnt3a ou LiCl, un activateur de la voie Wnt) entraîne la formation de placodes fonctionnelles avec une élévation d'expression de Wnt10b. La perturbation d'expression des régulateurs positifs de la voie Wnt canonique, Lrp5, Lrp6, Lef1, Pygo2, induit des défauts dans la formation des placodes. Par ailleurs, la stimulation de la signalisation par la β cat accélère l'apparition des placodes et de leurs marqueurs. Les embryons des modèles murins dans lesquels Dkk1 est surexprimé, ou ceux dans lesquels Lef1 et Lrp6 sont inactivés, n'ont pas de placodes.

Lef1 semble être un élément clé de la voie Wnt pour la morphogénèse mammaire précoce. Lef1 est d'abord exprimé dans l'épithélium mammaire à E11/E12. Son expression, restreinte ensuite au mésenchyme entourant chaque bourgeon embryonnaire, est essentielle à la morphogénèse canalaire à E16. Les communications paracrines entre l'épithélium et le mésenchyme sont essentielles à la formation des bourgeons mammaires et de leurs premières ramifications. Notamment, la PTHrP (de l'anglais « prathyroid hormone-related protein »), exprimée dans l'épithélium mammaire, régule l'expression de Lef1 par stimulation paracrine de son récepteur situé dans le mésenchyme, PTHR ([pour revue, Macias et Hinck, 2012](#)).

- **La signalisation Wnt dans la morphogénèse post-natale de la glande mammaire**

La puberté, une phase intense de prolifération, est caractérisée par un pic d'expression de plusieurs ligands Wnts, dont Wnt4, Wnt5a et Wnt7b, qui sont fortement enrichies dans les TEBs ([Kouros-Mehr et al., 2006](#)). Un travail récent indique que Wnt4 est indispensable à l'expansion canalaire périnatale et pubertaire ([Rajaram et al., 2015](#)). L'expression de Wnt4 périnatale est indépendante de la signalisation hormonale tandis que celle durant la puberté est sous contrôle de la progestérone. L'utilisation du modèle murin *Axin2;LacZ*, rapporteur de l'activation de la voie Wnt canonique, confirme que Wnt4 active la voie Wnt/ β cat dans l'épithélium mammaire *in situ*. Dans la glande mammaire adulte, l'analyse de l'expression des ligands Wnts dans les cellules épithéliales basales et luminales isolées a révélé une forte expression de Wnt5a, Wnt5b, Wnt6, Wnt10a, Wnt11 et leurs antagonistes DKK3, Sfrp1, Wif1 dans les cellules basales et de Wnt4, Wnt5a, Wnt5b, Wnt7b et l'agoniste Rspo1 dans les cellules luminales ([Cai et al., 2014](#); [Roarty et al., 2015](#) ; [pour revue, Yu et al., 2016](#)). Les récepteurs Fzds (notamment Fzd7), Lrp5/6, Lgr4/5/6 sont exprimés par les cellules du compartiment basal, cibles majeures de la signalisation Wnt/ β cat ([Badders et al., 2009](#); [de Visser et al., 2012](#); [Wang et al., 2013](#); [Chakrabarti et al., 2014](#); [Blaas et al., 2016](#)).

L'utilisation de modèles murins transgéniques a permis de montrer directement l'implication de la voie de signalisation Wnt dans la morphogénèse mammaire. Dans le modèle murin MMTV-Wnt1, l'épithélium mammaire présente une croissance canalaire accélérée visible dès l'âge d'une à deux semaines et une hyperplasie lobulo-alvéolaire ([Tsukamoto et al., 1988](#); [Lin et al., 1992](#)). Les souris MMTV-Wnt4 ne semblent pas présenter de phénotype mammaire notable ([Kim et al., 2009](#)). Par contre, les greffons épithéliaux déficients en Wnt4 ont un défaut de ramification en début de gestation ([Briskin et al., 2000](#)). Les greffes de fragments tissulaires de souris Rspo1 KO ont révélé un défaut majeur de développement lobulo-alvéolaire ([Chadi et al., 2009](#)). Par ailleurs,

l'expression d'une forme stabilisée de β cat dans l'épithélium mammaire induit un développement alvéolaire précoce (Imbert *et al.*, 2001; Teuliere *et al.*, 2005). Inversement, l'inhibition de la β cat endogène, par surexpression de l'Axin, empêche une différenciation alvéolaire normale pendant la gestation (pour revue, Incassati *et al.*, 2010).

Les souris déficientes en Wnt5a présentent un développement pubertaire précoce, une ramification canalaire plus rapide associée à des TEBs plus larges, ainsi qu'une fréquence de ramification accrue à l'âge adulte. Ceci suggère une implication importante de Wnt5a (dont l'expression est induite par le TGF β) dans la régulation négative du développement de la glande, notamment pour l'établissement des ramifications mammaires (Roarty et Serra, 2007). Dans la glande mammaire, Ror2 est décrit comme un récepteur alternatif des Wnt5 (Wnt5a et Wnt5b). La liaison de Wnt5 sur Ror2 entraîne l'activation de voies Wnt non-canoniques (Roarty *et al.*, 2015). La délétion de Ror2 induit un phénotype similaire à celui décrit pour Wnt5a. L'inhibition de la croissance canalaire par Wnt5/Ror2 semble être reliée à leur interaction dans le milieu extracellulaire avec la métallo-protéase MMP3. Cette protéase inhiberait l'action du ligand Wnt5a par séquestration moléculaire et clivage protéolytique entraînant ainsi une croissance épithéliale hypermorphique et l'activation de la voie Wnt canonique. MMP3 étant exprimée majoritairement dans le stroma alors que Wnt5 est produit par les cellules luminales, il a été suggéré des communications paracrines stroma/épithélium mammaire permettent de maintenir la balance entre l'activation des voies Wnt canoniques/non-canoniques (Kessenbrock *et al.*, 2013).

e) La voie de signalisation Wnt dans le contrôle des cellules souches basales

De nombreuses études indiquent le rôle majeur de la voie Wnt et notamment de la signalisation Wnt/ β cat dans l'expansion et la régulation des populations souches/progénitrices du compartiment basal au cours du développement mammaire.

- **Wnts, Rsp0s et contrôle de la voie Wnt/ β cat**

Dans des conditions de culture 3D en présence de Matrigel, le traitement des cellules basales primaires avec Wnt3a entraîne une augmentation du nombre de colonies obtenues au deuxième passage. Les cellules basales traitées peuvent subir de nombreux passages et conservent leur capacité de régénération *in vivo*, montrant que Wnt3a stimule les propriétés d'auto-renouvellement des cellules souches (Zeng et Nusse, 2010).

Bien que Wnt3a soit capable de stimuler l'activation de la voie Wnt/ β cat *in vitro*, il est à noter que ce n'est pas un ligand endogène exprimé dans la glande mammaire. Au contraire, les ligands Wnt4 et Rspo1, sécrétés par les cellules luminales mammaires, font partie intégrante de la signalisation Wnt régulant les cellules souches et progénitrices mammaires. D'une part, les greffons déficients en Wnt4 présentent un défaut de régénération à partir de la 3^{ème} série de transplantation *in vivo* (Rajaram *et al.*, 2015). D'autre part, la délétion de Wnt4 et Rspo1 dans les cellules épithéliales mammaires entraîne l'abolition totale de leur capacité de régénération (Cai *et al.*, 2014). Les conclusions de ces études indiquent que Wnt4, sécrété par les cellules luminales ER/PR+, et Rspo1, produit par les cellules luminales ER/PR-, provoquent, par un signal paracrine synergique, l'activation de la voie Wnt/ β cat dans les cellules basales et l'expansion du compartiment de cellules souches et progénitrices (Fig. 18). Une étude récente propose que RankL, qui est produit par les cellules ER/PR+ comme Wnt4, agirait de façon paracrine sur les cellules luminales ER/PR- pour y induire l'expression de Rspo1 (Joshi *et al.*, 2015).

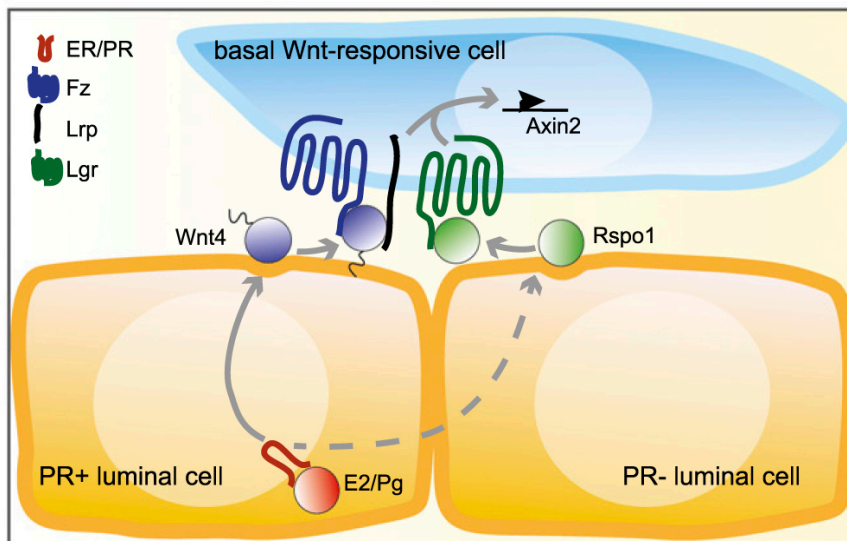


Figure 18 : Modèle des interactions luminal-basal impliquant la voie Wnt/ β cat.

Wnt4 et Rspo1, produits par les cellules luminales, agissent de façon synergique sur les cellules basales. (De Cai *et al.*, 2014).

Un nouveau modèle de culture d'organoïdes a été établi à partir de fragments épithéliaux stimulés par Nrg1 et une faible dose de Rspo1 (Jarde *et al.*, 2016). Les organoïdes obtenus comprennent des cellules luminales des deux lignages, ER+ et ER-, et des cellules basales, incluant des cellules souches qui permettent aux organoïdes d'être passés en culture pendant 2 mois et demi. Ce système modélise *in vitro* les régulations paracrines complexes entre cellules basales et luminales. Nrg1, ligand de ErbB3/4, permet de maintenir la population ER+, productrice de Wnt4, qui en

association avec Rspo1 va stimuler la population basale souche. L'utilisation du modèle rapporteur *Axin2-LacZ* indique que la voie Wnt/ β cat est activée dans la population basale maintenue dans les organoïdes.

En corrélation avec les études précédentes, il a été montré que l'atténuation de la voie de signalisation Wnt/ β cat réduisait l'auto-renouvellement des cellules souches et progénitrices mammaires (Macias *et al.*, 2011; Harburg *et al.*, 2014). Slit2, secrété par les cellules basales et luminales mammaires, se lie au récepteur Robo1, dont l'expression est restreinte aux cellules basales et induite par le TGF β . L'interaction Slit2/Robo1 ou Slit2/Robo2 inhibe la signalisation Wnt par l'augmentation de la β cat cytoplasmique et membranaire au dépens de la β cat nucléaire, entraînant une diminution de la prolifération des cellules basales mammaires. La perte de Robo1 entraîne une prolifération accrue des cellules basales tandis que celle de Robo2 résulte en une capacité d'auto-renouvellement augmentée. Au plan moléculaire, Slit/Robo2 agirait contre la répression du régulateur de la sénescence, p16^{INK4a}, induite par Wnt.

- **Modulation d'expression des récepteurs et corécepteurs Fzds/Lrps**

Chakrabarti et Coll. ont montré que Δ Np63 favorise l'activité des cellules souches mammaires de type basal en régulant positivement l'expression de Fzd7, et ainsi renforcent la signalisation Wnt/ β cat (Chakrabarti *et al.*, 2014).

Les co-récepteurs des ligands Wnts, Lrp5 et Lrp6, semblent eux aussi impliqués dans le contrôle de la fonction des cellules souches et de la morphogenèse mammaires (Badders *et al.*, 2009; Lindvall *et al.*, 2009). L'ablation non ciblée de Lrp5 entraîne une réduction de la population basale et les capacités de régénération de fragments épithéliaux issus d'un mutant hétérozygote Lrp6+/- sont diminués.

Récemment, un mécanisme d'activation de la voie Wnt relatif à la phosphorylation du corécepteur Lrp6 a été rapporté (Zeng *et al.*, 2016). En mitose, les cyclines CCnys (Ccn1 et Ccn11) localisées à la membrane recrute une kinase appelée Cdk14 afin de phosphoryler Lrp6, ce qui permet de le sensibiliser aux signaux Wnts. L'inactivation des Ccnys diminue la capacité de régénération des cellules souches et progénitrices basales après transplantation. Cette activation de la voie Wnt alternative a été identifiée dans les cellules de la coiffe des TEBs en puberté.

- **Perte de fonction des récepteurs Lgrs**

Les effets de la perte de Lgr4 ont été étudiés dans un modèle de souris KO (Wang *et al.*, 2013). Ces souris présentent des défauts de morphogenèse canalaire et de ramifications latérales, associés à

une perte significative de l'activité des cellules souches basales. La formation des mammosphères issues des cellules épithéliales Lgr4^{-/-} est restaurée en présence de Wnt3a et Rspo1.

Un premier travail indiquait que la sous-population basale Lgr5⁺ était indispensable au développement normal de la glande mammaire (Plaks *et al.*, 2013). Une étude plus récente montre que l'absence totale de Lgr5 n'affecte pas le potentiel régénératif à long terme des cellules basales, issues du bourgeon embryonnaire et de l'épithélium adulte (Trejo *et al.*, 2017).

- **Altération des gènes cibles majeurs**

Le facteur de transcription Myc, cible majeure de la voie Wnt/ β cat, est essentiel aux fonctions des cellules souches et progénitrices mammaires. Son ablation ciblée dans l'épithélium mammaire perturbe le développement mammaire canalaire et alvéolaire. Dans ce modèle, les cellules basales dépourvues de Myc perdent complètement leur capacité régénérative après transplantation (Moumen *et al.*, 2012).

LBH, une cible de la signalisation Wnt/ β cat, est exprimée dans les cellules basales de l'épithélium mammaire. Son inactivation dans le compartiment basal entraîne un retard de développement mammaire et une différenciation luminale accrue au dépens du lignage basal (Lindley *et al.*, 2015). LBH induirait l'expression de Δ Np63 afin de promouvoir un destin cellulaire de type basal et réprimerait la différenciation luminale.

- **Populations cibles de la voie de signalisation Wnt/ β cat et leur destin *in situ*.**

Comme on l'a vu précédemment (section I) ; 3) ; c) page 35), différentes sous-populations basales enrichies en activité souche et associées à la voie de signalisation Wnt/ β cat ont été définies : Axin2⁺, Lgr5⁺ et ProcR⁺ (van Amerongen *et al.*, 2012; Plaks *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2015; Fu *et al.*, 2017).

Les travaux de traçage cellulaire de van Amerongen *et al.*, 2012 ont révélé un « switch » du destin des cellules Axin2⁺ au cours du développement mammaire. Marquées durant l'embryogénèse, elles donnent naissance principalement au lignage luminal, tandis que chez l'adulte elles génèrent essentiellement des cellules basales. Lorsqu'elles sont transplantées, les cellules basales Axin2⁺ à l'état isolé sont capables de régénérer une bicouche épithéliale, confirmant que la transplantation permet de débloquent des capacités de bipotence non utilisées lors du développement *in situ*.

Dans plusieurs épithélia adultes, Lgr5 est un marqueur des cellules souches dont l'expression corrèle avec celle de l'Axin2, montrant que ces cellules présentent une activation de la voie Wnt/ β cat (pour revue, Clevers *et al.*, 2014). Dans la glande mammaire, des travaux indiquent que

les cellules basales Lgr5+ ne sont pas enrichies en expression d'Axin2 et que ce marqueur ne fait pas partie des gènes induits après stimulation *in vitro* par Wnt3a (Plaks *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2015). Récemment, une étude a révélé l'hétérogénéité de la population basale Lgr5+ après ségrégation par le marqueur de surface Tspan8 (Fu *et al.*, 2017). Les cellules Lgr5+/Tspan8+ sont enrichies en cellules souches dont le profil comprend plusieurs indices de répression du cycle cellulaire et des inhibiteurs de la voie Wnt, dont Dkk2 et des Sfrps. Le potentiel de développement de la fraction basale Lgr5+, bipotent ou unipotent, est encore sujet à controverse comme on l'a mentionné précédemment (section I) 3) c) page 35 ; pour revue, Lloyd-Lewis *et al.*, 2017).

La sous-population basale Procr+ comprend une proportion mineure de cellules Axin2+ et n'exprime pas Lgr5 (Wang *et al.*, 2015). De plus, elle présente une régulation négative des kératines basales et une surexpression de plusieurs marqueurs mésenchymateux. Les expériences de traçage cellulaire utilisant le modèle Procr^{creERT2} indiquent que les cellules Procr+ adultes donnent naissance aux deux lignages, basal et luminal. Une étude toute récente rapporte que les cellules Procr+ expriment la neuropiline 1 (Nrp1), une glycoprotéine transmembranaire co-réceptrice de divers facteurs de croissance et cible de la voie Wnt/ β cat (Liu *et al.*, 2017). L'expression de Nrp1 est critique pour l'activité souche des cellules basales, *in vitro* et *in vivo*.

L'ensemble de ces travaux indique que les populations basales Lgr5+, Axin2+ et Procr+ sont essentiellement distinctes (Fig. 19) et souligne la complexité de la dynamique des populations associées à la signalisation Wnt/ β cat durant le développement mammaire.

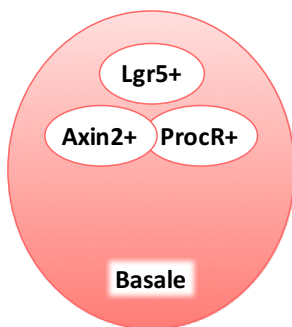


Figure 19 : Hétérogénéité des cellules basales associées à la voie de signalisation Wnt/ β cat.

II) La Tumorigénèse mammaire

Le développement tumoral comprend plusieurs étapes : initiation, croissance, invasion locale puis dans certains cas dissémination métastatique. Au cours de ce processus, une cellule normale subit différentes altérations génétiques et épigénétiques et se transforme progressivement en une cellule cancéreuse, présentant une dérégulation des mécanismes dont ceux contrôlant la prolifération, survie, différenciation et migration.

1) Les cancers du sein : Caractéristiques et Classification

Le cancer du sein touche environ une femme sur 8, ce qui le définit comme le 1^{er} cancer féminin en terme de fréquence ([Source WHO](#)). La plupart des cancers du sein (95%) ont pour origine la dérégulation des cellules épithéliales ([Source FRM](#)). L'apparition d'hyperplasies, résultants d'une prolifération anormale de cellules épithéliales, constitue la première étape de la tumorigénèse mammaire. Ces hyperplasies peuvent évoluer ensuite en carcinomes *in situ* (CIS), localisés dans les canaux ou les lobules (carcinomes canaux ou lobulaires respectivement). La croissance progressive de ces carcinomes peut entraîner leur expansion au delà de la membrane basale, les rendant invasifs. Les cellules tumorales envahissent alors le tissu conjonctif mammaire et peuvent, via le système circulatoire sanguin ou lymphatique, atteindre les ganglions lymphatiques et d'autres organes dans lesquels elles forment des métastases ([Fig. 20](#)).

Le compartiment stromal mammaire joue également un rôle important et évolutif par ses communications avec les cellules tumorales. En particulier, les fibroblastes associés au cancer (CAFs, de l'anglais « cancer associated fibroblasts ») favorisent la progression tumorale en participant aux contrôles de l'angiogenèse, du remodelage de la matrice extracellulaire, de la reprogrammation métabolique, de l'invasion cellulaire, du potentiel métastatique et de certaines résistances thérapeutiques ([pour revue, Xie et al., 2017](#)).

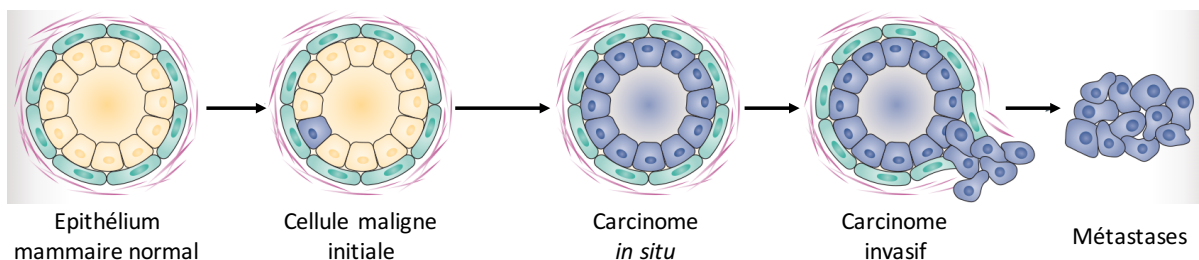


Figure 20 : Schéma de la progression tumorale mammaire ([Modifié de Briskin, 2013](#)).

Plusieurs facteurs de risque de cancer du sein ont été identifiés, comme par exemple une puberté précoce, une grossesse tardive ou une absence de grossesse ([pour revue, Britt et al., 2007](#)). Il existe également une proportion non négligeable de cancers du sein héréditaires (environ 10% des cas), qui sont caractérisés par des mutations germinales localisées au niveau des gènes *Brca1* et *Brca2*, impliqués dans le système de réparation de l'ADN et le contrôle du cycle cellulaire. Mis à part ces formes héréditaires, 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 mieux les caractériser afin de développer les thérapies appropriées.

a) Classification morphologique et histologique des tumeurs du sein

L'analyse histologique des tumeurs du sein a révélé une grande hétérogénéité à la fois au niveau architectural mais aussi au niveau cellulaire. Les cancers du sein peuvent être séparés en deux groupes : les carcinomes d'origine canalaire (70 à 80% des cas) et les carcinomes d'origine lobulaire (10 à 15%). Les carcinomes canauxaires présentent un pronostic clinique variable, dépendant des caractéristiques morphologiques de la tumeur, ainsi que de l'expression des récepteurs hormonaux ER et PR, ou encore du marqueur de prolifération Ki67. Outre l'expression des récepteurs hormonaux, les carcinomes lobulaires sont caractérisés par un risque élevé de développer des tumeurs invasives, notamment par la perte ou l'inactivation du gène codant pour la molécule d'adhérence intercellulaire E-cadhérine ([pour revue, Dossus et Benusiglio, 2015](#)). Les autres types de cancers du sein, plus rares, comprennent notamment les carcinomes médullaires, papillaires ou tubulaires, qui sont généralement associés à un bon pronostic clinique.

La prédiction de l'évolution des tumeurs et l'orientation thérapeutique sont généralement déterminées à l'aide de différents facteurs pronostiques basés sur des observations histologiques (morphologie tissulaire, cellulaire et nucléaire, index mitotique) ou sur l'expression de marqueurs moléculaires. La détection immunohistochimique des récepteurs hormonaux ER et PR (dans 75% des cancers du sein; [pour revue, Russnes et al., 2017](#)), donne une information essentielle sur la réponse prévisible des tumeurs mammaires aux thérapies hormonales. L'expression du récepteur à tyrosine kinase Her2 (appelé aussi ErbB2 chez la souris), impliqué dans le contrôle de la croissance cellulaire, est également un facteur prédictif de la réponse thérapeutique des tumeurs mammaires. Depuis les années 1990, les patientes développant des tumeurs Her2+ (environ 10 à 15%) bénéficient d'un traitement thérapeutique ciblé, l'Herceptine, un anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur Her2. D'autres marqueurs moléculaires sont également utilisés pour prévoir la progression des cancers du sein, comme la détection immunohistochimique de Ki67, un

marqueur de prolifération cellulaire présent à tous les stades du cycle cellulaire, excepté à l'état quiescent.

b) Classification moléculaire des cancers du sein

La stratification moléculaire des cancers du sein a permis de révéler de nouveaux gènes moteurs (dits « drivers » en anglais) de la tumorigénèse, d'affiner le diagnostic et de chercher des facteurs prédictifs de l'évolution de la maladie, dans le but final d'améliorer le ciblage thérapeutique des patients.

Les analyses transcriptionnelles des tumeurs du sein réalisées initialement par Perou et Coll., ont permis de ségréger les cancers du sein en 5 sous-types sur la base de l'expression de 550 gènes (Perou *et al.*, 2000; Sorlie *et al.*, 2001; Russnes *et al.*, 2017). Une majorité des tumeurs sont ER+, et expriment des marqueurs du lignage luminal. Parmi ceux-ci, deux sous-types ont été identifiés : les luminaux A et les luminaux B. Ces derniers sont caractérisés par un enrichissement en expression des gènes associés à la mitose et la prolifération cellulaire. Le reste des cancers du sein sont négatifs pour les récepteurs hormonaux et peuvent être séparés en deux sous-groupes : les Her2+, qui ont une surexpression du récepteur Her2 (généralement suite à une augmentation du nombre de copies du gène) et les tumeurs de type basal, qui expriment des gènes typiques du lignage basal/myoépithélial de la glande mammaire. La grande majorité des tumeurs basales ne présentent pas d'expression des récepteurs hormonaux (ER, PR), ni de Her2, elles sont donc nommées globalement « triples négatives » (TN). Les tumeurs ER/PR- sont très souvent de haut grade, à fort index mitotique, non différenciées et associées à un mauvais pronostic clinique. Un dernier sous-type est appelé « normal-like » car il a un patron d'expression similaire à celui de l'épithélium mammaire normal, il reste peu défini à l'heure actuelle.

Suite aux données de Perou *et al.* (2000), une étude de Parker et Coll. a identifié une signature basée sur l'expression transcriptionnelle de 50 gènes (PAM50) qui permet la ségrégation des quatre sous-types intrinsèques principaux ; Luminal A, Luminal B, Her2 positif et « basal-like » (Parker *et al.*, 2009; Fig. 21). Cette signature comprend des marqueurs de cellules basales (K5, K14, Egfr, P-cadhérine), des marqueurs de cellules luminales (ER, PR, Foxa1) ainsi que des régulateurs et effecteurs du cycle cellulaire (Cyclines B1 et E1, Myc, Mdm2, Mki67). PAM50 est la signature qui s'ajuste le mieux à la protéomique des tumeurs. De ce fait, elle est largement utilisée aujourd'hui en clinique comme facteur pronostique et prédictif et sert notamment à stratifier les tumeurs luminales sur la base de la prolifération (Wallden *et al.*, 2015).

Des études postérieures ont mis en évidence des nouveaux sous-types moléculaires de cancers du sein englobés dans le groupe des tumeurs triples négatifs (pour revue, Reis-Filho et Pusztai, 2011) : les tumeurs apocrines, définis par l'expression des récepteurs aux androgènes (Farmer *et al.*, 2005) et le groupe des « Claudin-low », caractérisé par une expression faible des marqueurs de jonctions cellulaires, une surexpression des gènes spécifiques de l'EMT (α -Sma, Slug, FoxC2 et cadhérine N) et une faible expression des marqueurs de différenciation luminaire (Prat *et al.*, 2010; Tan *et al.*, 2014). Une autre étude confirmant l'hétérogénéité du groupe de cancers triple-négatifs a permis de ségréger ces derniers en 6 sous-types: deux « basal-like » (BL1 et BL2), un immuno-modulateur (IM), un mésenchymateux (M), un cellule souche mésenchymateuses (de l'anglais "mesenchymal stem cells" = MSL), et un « luminal-like » présentant les récepteurs aux hormones androgènes (LAR ; Lehmann *et al.*, 2011). Cette analyse, fondée sur l'expression de 2188 gènes, a été récemment affinée, permettant la même classification des cancers du sein triple-négatifs sur la base de l'expression de 101 gènes seulement (Ring *et al.*, 2016).

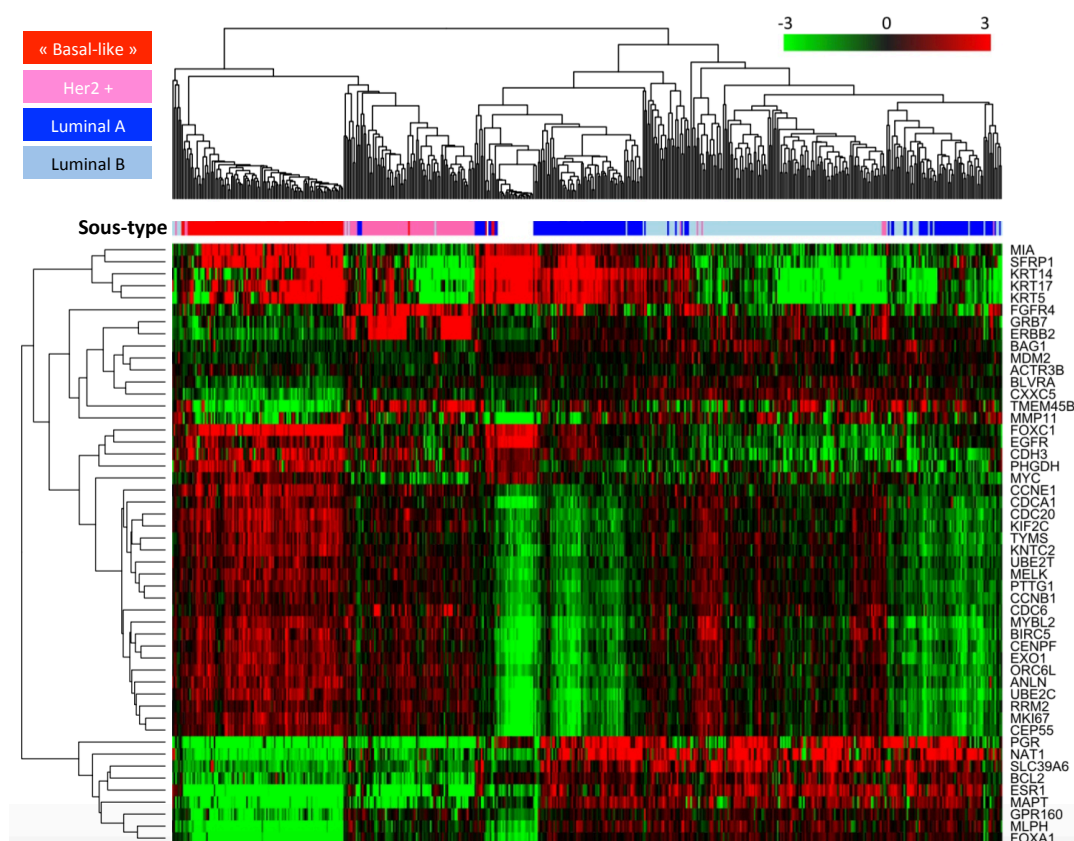


Figure 21 : Classification hiérarchique des échantillons de cancers du sein sur la base de PAM50.

Chaque sous-type tumoral est caractérisé par une couleur indiquée dans les rectangles colorés en haut à gauche de la figure. L'analyse des 546 échantillons de patientes permettant d'aboutir à cette classification a été faite sur la médiane centrée normalisée avec un Log2 de l'expression des gènes (Walden *et al.*, 2015).

Dans les dernières années de nombreux travaux ont combiné des approches à grande échelle comprenant l'étude du nombre de copies d'ADN génomique ou des méthylations de l'ADN, les profils transcriptionnels, le séquençage des miRNAs, l'analyse des protéines en chromatographie en phase reverse et les profils métaboliques. Globalement, ces études ont confirmé la convergence des différentes altérations génétiques et épigénétiques vers les quatre groupes majoritaires de cancers du sein et révèlent par ailleurs de nouveaux sous-groupes à l'intérieur des ceux-ci, souvent associés à des pronostics cliniques différents ([pour revues, Kalita-de Croft et al., 2016](#); [Russnes et al., 2017](#)). Récemment, une étude utilisant une corrélation de plusieurs des techniques d'analyse citées ci-dessus a révélé l'existence d'un nouveau groupe issu de la séparation des cancers luminal A en deux sous-groupes, distingués sur la base de l'analyse des miRNAs ([Aure et al., 2017](#)).

2) Les tumeurs mammaires de type basal

Le terme basal a été choisi pour définir ce groupe car les cellules tumorales expriment des marqueurs de la population basale de la glande mammaire normale, telles que les cytokératines K5, K6, K14, K17, le récepteur à l'EGF (EGFR), la cadhérine P, l'intégrine $\beta 4$, le facteur de transcription p63 et la métalloprotéase CD10 ([pour revues, Bertucci et al., 2012](#); [Bianchini et al., 2016](#)). Ces tumeurs présentent également une surexpression des gènes activateurs du cycle cellulaire, de l'angiogenèse et de la motilité cellulaire. La grande majorité des tumeurs de type basal est triple-négative (entre 75 et 90% selon l'étude ; [pour revue, Bianchini et al., 2016](#)). Réciproquement, les tumeurs de type basal représentent le sous-type le plus fréquent des cancers du sein triple-négatifs (68% ; [pour revue, Bertucci et al., 2012](#)).

Les altérations moléculaires les plus fréquentes dans les tumeurs de type basal affectent les gènes codant pour les protéines BRCA1 (mutations inactivatrices), TP53 (mutations conduisant souvent à une perte de fonction) ainsi que des gènes conduisant à l'hyperactivation de la voie PI3K : PTEN, (perte de fonction) et PIK3CA (surexpression ; [Cancer Genome Atlas, 2012](#)). Comme nous le verrons plus tard, la voie de signalisation Wnt/ β cat est souvent dérégulée dans les tumeurs basales ([pour revue, Pohl et al., 2017](#)).

Les cancers de type basal/TN sont généralement associés à un mauvais pronostic comparé aux autres sous-types tumoraux, ceci est notamment expliqué par l'agressivité de la tumeur et une absence de thérapie ciblée ([pour revue, Bianchini et al., 2016](#)). A ce jour, la chimiothérapie reste le traitement standard pour les patientes atteintes de cancers du sein TN, même si de nombreuses rechutes sont constatées. Néanmoins, des thérapies ciblées pour le cancer du sein basal/TN sont

en évaluation clinique. Il s'agit des inhibiteurs de PARP, de PI3K, de MEK, de HSP90 (de l'anglais « heat shock protein 90 »), des thérapies anti-androgéniques, des inhibiteurs d'histone déacétylases ou de la combinaison de certains d'entre eux. Par ailleurs, les tumeurs basales/TN sont fortement hétérogènes en termes de microenvironnement tumoral comme par exemple l'infiltration lymphocytaire. La présence de lymphocytes dans l'environnement de la tumeur est corrélée avec un bon pronostic et une réponse aux chimiothérapies efficace, ce qui prouve l'importance actuelle du développement des immunothérapies ([pour revue, Bianchini et al., 2016](#)).

3) L'hétérogénéité tumorale : hypothèses

Comme on l'a vu, les cancers du sein provenant de différentes patientes présentent une grande diversité (hétérogénéité inter-tumorale) à laquelle s'ajoute une diversité cellulaire et génétique au sein d'une même tumeur (hétérogénéité intra-tumorale).

a) Le concept de la cellule tumorale d'origine

Le concept de cellule tumorale d'origine définit la cellule normale initialement affectée par la transformation génétique ou épigénétique. L'identification de ces cellules d'origine dans le cancer du sein pourrait permettre de détecter les lésions tumorales plus tôt, d'avoir une meilleure prédiction de la progression tumorale, et de développer des thérapies préventives pour les individus à risque ([pour revues, Visvader, 2011; Skibinski et Kuperwasser, 2015](#)). Deux hypothèses fondamentales tenant compte de la cellule d'origine sont avancées pour expliquer l'hétérogénéité inter-tumorale :

- des mutations différentes qui prendraient place dans la même cellule d'origine,
- et/ou, une même mutation qui aurait lieu dans des types cellulaires différents ([Fig. 22](#)).

La cellule d'origine subirait une expansion clonale permettant de transmettre à sa descendance les caractéristiques génétiques ou épigénétiques acquises par certaines mutations conférant un avantage de survie ou proliférative. Les analyses génomiques à grande échelle ont permis de déterminer un panel de gènes agissant potentiellement comme oncogènes dont l'activation favoriserait un sous-type spécifique de cancer ([pour revue, Skibinski et Kuperwasser, 2015](#)).

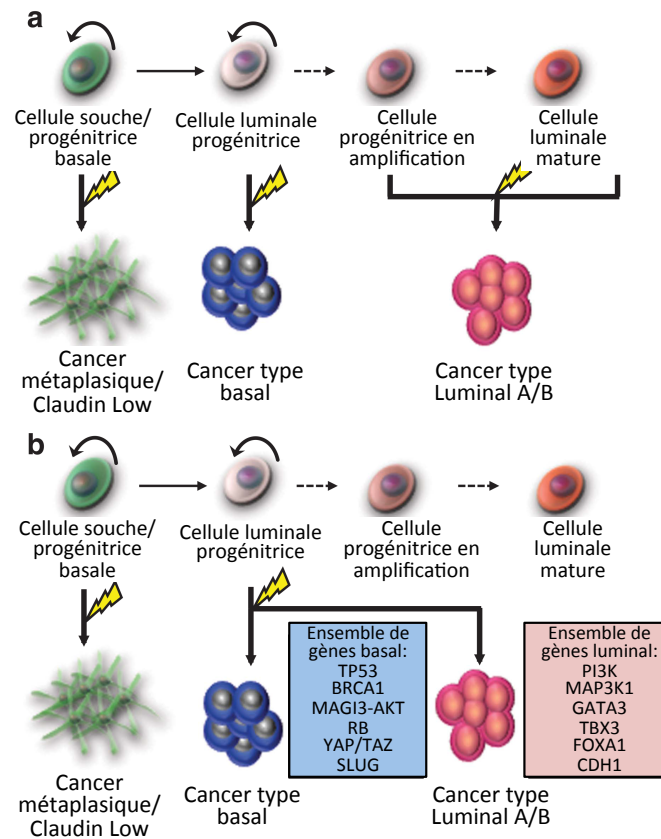


Figure 22 : Origines de l'hétérogénéité inter-tumorale dans le cancer du sein.

(a) Le modèle de la cellule d'origine. Dans ce modèle, les cancers du sein de type luminal (Luminal A et B) proviennent d'une dérégulation des cellules lumineuses normales différenciées et maintiennent cette différenciation luminale pendant toute la progression tumorale. Au contraire, les cancers du sein de type basal proviendraient d'une population moins différenciée, probablement des progéniteurs lumineux. **(b)** Le modèle des mutations génétiques. Dans ce cas, les tumeurs du sein basales et lumineuses pourraient provenir de la même cellule d'origine qui aurait subi des transformations génétiques différentes favorisant plutôt le caractère basal, ou le phénotype luminal (Modifié de Skibinski et Kuperwasser, 2015).

Les cancers du sein de type basal présentent des profils d'expression génique qui se rapprochent de ceux des progéniteurs lumineux de la glande mammaire normale (Lim *et al.*, 2009). De plus, les femmes porteuses de mutations du gène *BRCA1* sont prédisposées au développement de tumeurs mammaires de type basal et montrent une amplification de la population des progéniteurs lumineux avant même de développer une tumeur (Lim *et al.*, 2009). Chez la souris, la délétion conditionnelle de p53 et *Brca1* spécifiquement dans les progéniteurs lumineux entraîne la formation de tumeurs mammaires invasives qui phénotypent histologiquement les carcinomes mammaires humains de type basal ainsi que leur signature transcriptionnelle (Molyneux *et al.*, 2010). Les cancers du sein de type basal avec mutation *Brca1* proviendraient donc des cellules lumineuses progénitrices. Par ailleurs, Smalley et Coll. ont rapporté que l'inactivation de *Pten* et *Brca2* dans les progéniteurs lumineux entraîne la formation de tumeurs de type luminal indiquant

que la cellule d'origine et le type d'altération oncogénique contribuent tous deux à la diversité tumorale (Melchor *et al.*, 2014).

Les cellules basales souches et progénitrices seraient, quant à elles, à l'origine des cancers du sein dits « Claudin-low ». En effet, la transformation des cellules basales humaines induit, après transplantation chez la souris, la formation de tumeurs de morphologie métaplasique avec une signature génique corrélée avec celles des cancers « Claudin-low » (Keller *et al.*, 2012).

b) Hétérogénéité intra-tumorale

L'instabilité génétique des populations cellulaires est considérée comme un facteur majeur favorisant l'hétérogénéité tumorale. Les cellules cancéreuses sont ainsi prédisposées à subir un nombre élevé de mutations entraînant l'émergence de sous-populations tumorales présentant des phénotypes différents (pour revue, Haynes *et al.*, 2017). Deux modèles hypothétiques ont été proposés pour expliquer l'hétérogénéité intra-tumorale :

- le modèle stochastique, dit d'évolution clonale,
- et le modèle hiérarchique, dit des cellules souches cancéreuses.

-Modèle stochastique, dit d'évolution clonale

Dans ce modèle, toutes les populations cellulaires de l'épithélium mammaire peuvent acquérir des mutations leur conférant un avantage de survie ou prolifération. Il peut coexister différentes mutations dans différents types cellulaires, mais seules les cellules mutées les plus aptes à survivre dans des environnements spécifiques seront sélectionnées. L'instabilité génétique s'accroît au fur et à mesure que la tumeur progresse. Ceci, ajouté à une prolifération incontrôlée, induit l'accumulation de mutations additionnelles alimentant l'hétérogénéité intrinsèque de la tumeur (pour revues, Skibinski et Kuperwasser, 2015; Haynes *et al.*, 2017).

Le modèle stochastique repose sur le fait que la tumeur primaire et les métastases d'un même patient présentent souvent des mutations génétiques communes. Cependant, certaines mutations additionnelles dans les métastases n'existent pas dans la tumeur primaire, elles sont acquises afin de donner les propriétés nécessaires aux cellules tumorales pour la formation de foyers tumoraux à distance (pour revue, Polyak, 2011). Par ailleurs, ce modèle ne tient pas compte des mécanismes non héréditaires, ni des possibles interactions entre les clones au sein de l'écosystème tumoral.

-Modèle hiérarchique ou dit des cellules souches cancéreuses

Ce modèle repose sur l'existence d'une petite population de cellules souches cancéreuses (=CSC) au sein de la tumeur qui dirigeraient la progression, la récurrence tumorale et l'établissement de métastases grâce à leur propriété d'autorenouvellement illimité ([pour revues, Clevers, 2011; A et Lopes, 2017](#)). La notion de cellule souche cancéreuse (cellule « propagatrice » de la tumeur) ne doit donc pas être confondue avec celle de cellule d'origine. Originellement décrite dans certains types de leucémies, l'existence des CSC a été rapportée dans d'autres organes incluant le sein. Une des caractéristiques des CSCs est la propriété, après transplantation en xénogreffe, de former une nouvelle tumeur phénotypiquement similaire à la tumeur d'origine. Ce type d'essai a été utilisé par Al Hajj et Coll., dans une étude pionnière, pour montrer l'existence d'une population de CSCs avec une forte expression de CD44 à leur surface ([Al-Hajj et al., 2003](#)). L'identification d'autres marqueurs des CSCs, dans le but final de mieux les cibler et éradiquer, a fait l'objet de nombreuses études ces dernières années ([pour revue, A et Lopes, 2017](#)).

L'origine des CSCs est encore débattue. Elles pourraient résulter de la transformation oncogénique des cellules souches ou progénitrices de la glande normale. Cette hypothèse se base sur plusieurs observations. Tout d'abord, les cellules souches et progénitrices mammaires se maintiennent à long terme dans le tissu, elles sont donc des candidates idéales pour l'accumulation de mutations. Par ailleurs, de nombreux mécanismes moléculaires régulant les cellules souches normales sont communs à ceux contrôlant les cellules souches tumorales ([pour revues, Visvader, 2009; Skibinski et Kuperwasser, 2015](#)). Alternativement, les cellules différenciées pourraient acquérir des propriétés de CSCs dans certaines conditions (après mutations des gènes impliqués dans l'EMT, par exemple ; [pour revue, Ye et Weinberg, 2015](#)). Aujourd'hui, il est accepté que l'hétérogénéité intra-tumorale ne soit pas simplement expliquée par l'une ou l'autre des théories, mais par une combinaison des deux ([pour revue, Polyak, 2011](#)). Ainsi, l'initiation tumorale pourrait prendre place dans des cellules souches/progénitrices normales ou dans des cellules différenciées. Les CSC qui en résultent pourraient s'auto-renouveler et se différencier permettant d'alimenter la croissance tumorale. L'instabilité génétique associée au fort index mitotique des cellules tumorales mènerait à l'apparition de mutations distinctes. Ces mutations donneraient des sous-populations cellulaires différentes, en compétition au sein de la tumeur, et participeraient à l'hétérogénéité intra-tumorale. Par ailleurs, une forte plasticité des cellules tumorales pourrait contribuer à l'hétérogénéité au sein de la tumeur ([pour revue, Ye et Weinberg, 2015](#)).

4) Rôle de la voie Wnt/ β cat dans la tumorigénèse mammaire

Comme il a été mentionné précédemment, la voie Wnt/ β cat joue un rôle important dans la régulation des cellules souches et progénitrices mammaires. La dérégulation de cette voie dans le cancer du sein a été largement rapportée aussi bien dans les modèles murins que chez les patientes ([pour revues, Roarty et Rosen, 2010; Yu et al., 2016](#)).

A la différence du cancer du colon, qui présente des mutations très fréquentes d'APC ou *Ctnnb1* (codant pour la β cat), dans le cancer du sein de telles mutations sont rares (APC muté dans 6% des cas), voire inexistantes (pour *Ctnnb1*) ([pour revue, Yu et al., 2016](#)). Cependant, de nombreux travaux ont mis en évidence une association entre l'hyperactivation de la voie de signalisation Wnt/ β cat et la progression tumorale dans le cancer du sein. Sur les modèles murins de tumorigénèse mammaire, le rôle oncogénique des ligands Wnts (Wnt1, Wnt10b), du récepteur Lrp6 et d'une forme activée de la β cat a été rapporté. De plus, les souris porteuses de mutations avec perte de fonction d'APC développent des carcinomes mammaires ([pour revue, Incassati et al., 2010](#)). Dans le cancer du sein, une diminution de la β cat membranaire est corrélée avec un mauvais pronostic de survie des patientes ([Dolled-Filhart et al., 2006](#)). Par ailleurs, l'inhibition épigénétique des antagonistes extracellulaires de la voie Wnt (DKK1, DKK3 et sFRPs) a été identifiée et souvent associée avec un mauvais pronostic dans le cancer du sein ([Suzuki et al., 2008b](#)). Inversement, l'inactivation de Fzd (récepteur de Wnt) dans des lignées cellulaires tumorales TN entraîne une réduction de la capacité tumorigénique de ces cellules *in vitro* et *in vivo*, quand elles sont transplantées dans des souris hôtes ([Yang et al., 2011](#)).

De façon intéressante, l'hyperactivation de la voie de signalisation Wnt/ β cat a été souvent associée aux tumeurs basales et TN ([pour revue, Pohl et al., 2017](#)). Une étude récente a montré une surexpression de Rspo2 et Rspo4, deux agonistes potentialisant le signal Wnt, dans des tumeurs de patientes triples négatives et métaplasiques ([Coussy et al., 2017](#)). L'inhibition des ligands Rspos, permettrait de diminuer significativement la croissance cellulaire tumorale dans des greffes dérivées de patientes (PDX ; [Coussy et al., 2017](#)). BCL9, cofacteur nucléaire de la β cat et inducteur de son activité transcriptionnelle, est surexprimé dans les tumeurs de type basal. Son inhibition empêche la progression des carcinomes *in situ* vers des carcinomes invasifs ([Elsarraj et al., 2015](#)).

Différents travaux indiquent que la signalisation Wnt/ β cat contribue à la progression tumorale par le maintien des cellules souches cancéreuses. La population basale enrichie en cellules souches, est amplifiée dans le modèle MMTV- Wnt1, alors qu'elle ne l'est pas dans les tumeurs induites par la surexpression de Hras ou Erbb2 ([Shackleton et al., 2006](#)). Dans ce même modèle l'ablation de

p63 entraîne une atténuation de la voie Wnt associée à une diminution de la population de CSC et de la tumorigénèse (Chakrabarti *et al.*, 2014). Par ailleurs, les cellules à forte activité Wnt/ β cat isolées par cytométrie de flux à l'aide d'un rapporteur TOP-GFP sont enrichies en propriétés de CSC dans un modèle de tumeurs déficientes en p53 (Zhang *et al.*, 2010).

Notre laboratoire a généré des souris transgéniques développant à partir de 10-12 mois des tumeurs mammaires de type basal suite à une dérégulation de la voie Wnt/ β cat (Teulière *et al.*, 2005). Ces souris, nommées *K5 Δ N β cat*, expriment spécifiquement dans la couche basale de l'épithélium mammaire une forme de la β cat tronquée en N-terminal, non-phosphorylable et, par conséquent, constitutivement active. Dans ces souris, des hyperplasies canalaire constituées essentiellement de cellules basales peu différenciées (positives pour K5 et négatives pour α -SMA) évoluent par la suite en carcinomes mammaires *in situ* puis en carcinomes invasifs (Fig. 23A et B). Les tumeurs *K5 Δ N β cat* sont riches en cellules K5+, mais négatives pour les récepteurs hormonaux (estrogènes/progestérone) et ne possèdent pas de surexpression d'ErbB2 (Fig. 23C et D). Au niveau histologique, elles sont comparables à des tumeurs métaplasiques (Fig. 23C). Nos résultats indiquent que ces tumeurs résultent de l'amplification des progéniteurs de type basal indifférenciés (Moumen *et al.*, 2013). Par ailleurs, l'ablation dans ce modèle de Myc (cible majeure de Wnt/ β cat) inhibe complètement l'amplification des progéniteurs de type basal induite par la β cat et entraîne l'abolition de la tumorigénèse.

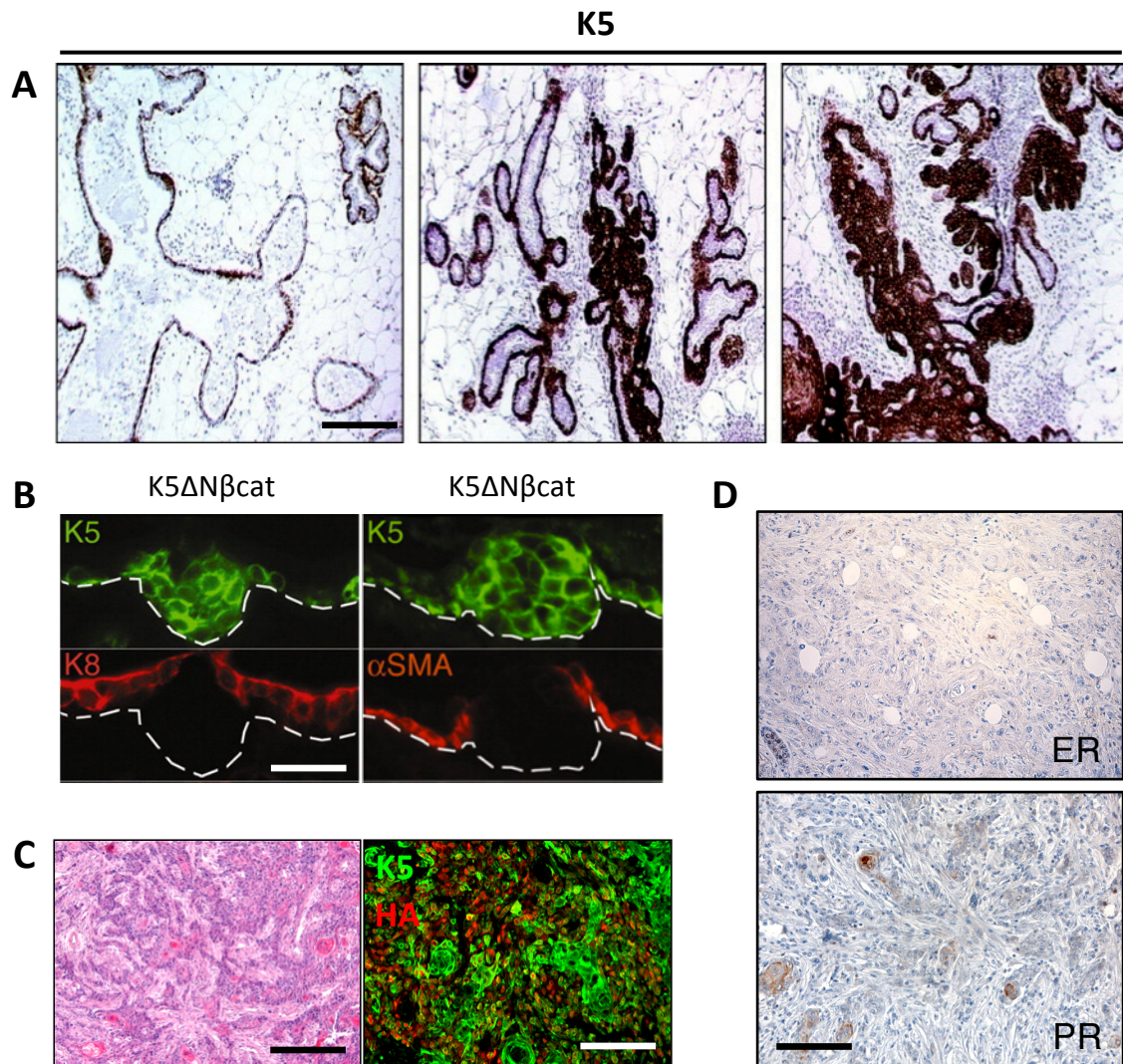


Figure 23 : Les souris $K5\Delta N\beta cat$ développent des tumeurs mammaires de type basal triples négatives

(A) Immunohistochimie sur coupe de glande mammaire de souris nullipare $K5\Delta N\beta cat$ avec un anticorps anti-K5. Les cellules épithéliales basales positives pour K5 prolifèrent d'abord localement (pointes de flèches) puis se développent pour former de larges zones hyperplasiques (flèches). Barre d'échelle = 150 μm . **(B)** Immunofluorescence sur coupes de glandes mammaires de souris nullipare $K5\Delta N\beta cat$ avec les anticorps anti-K5, anti-K8 et anti- αSMA . Les cellules dans la région hyperplasique sont de type basal (positives pour K5 et négatives pour K8) et non-différenciées (négatives pour αSMA). La ligne discontinue indique la position de la membrane basale. Barre d'échelle = 30 μm . **(C)** Gauche : Coloration hématoxyline et éosine sur une coupe de carcinome mammaire invasif $K5\Delta N\beta cat$. Droite : Immunofluorescence sur coupes de carcinomes mammaires invasifs d'une souris $K5\Delta N\beta cat$ avec les anticorps anti-K5 et anti-HA (HA : Hémagglutinine co-exprimée avec le transgène $\Delta N\beta cat$ dans le modèle transgénique). Barre d'échelle = 100 μm . **(D)** Immunohistochimie sur coupe de carcinome mammaire invasif $K5\Delta N\beta cat$ avec un anticorps anti-ER (Image du haut) et anti-PR (Image du bas), Barre d'échelle = 125 μm (Modifié d'après Teuliere *et al.*, 2005; Moumen *et al.*, 2013).

III) La Podoplanine

1) Introduction et historique

La Podoplanine (Pdpn) est une petite glycoprotéine transmembranaire de type mucine, impliquée dans le développement tissulaire et la tumorigenèse. Elle a été identifiée dans les années 1990 dans différents types cellulaires d'origine murine ou humaine sous des noms variés, notamment OTS-8, GP38, GP40, T1a, PA2.26, et AGGRUS/GP44.

La Pdpn est décrite, à l'origine, par [Nose et al., 1990](#) sous le nom de OTS-8 dans des cellules ostéoblastiques murines où elle est induite par un traitement de longue durée avec le promoteur de tumeur, 12-O tetradecanoylphorbol-13-acétate (TPA). Peu d'années après, [Farr et al., 1992](#) identifient dans les organes lymphoïdes une glycoprotéine homologue à OTS-8 qu'ils nomment GP38, en raison de son poids moléculaire de 38 kDa.

Plusieurs travaux décriront ensuite des glycoprotéines homologues à OTS-8/GP38 à la surface de cellules épithéliales, qui s'avèreront être la Pdpn. On mentionnera notamment T1 α , GP40 et PA2.26 respectivement exprimées par les cellules alvéolaires pulmonaires de type 1, la lignée de cellules épithéliales rénales canines MDCK, et les kératinocytes murins lors de la cicatrisation et de la carcinogénèse induite chimiquement ([Rishi et al., 1995](#); [Zimmer et al., 1997](#); [Gandarillas et al., 1997](#)). En parallèle, le groupe de D. Kerjaschki produit un anticorps qui reconnaît une protéine de 43 kDa à la surface des podocytes de rat ([Breiteneder-Geleff et al., 1997](#)). Cette protéine présente un patron d'expression très similaire à celui d'OTS-8 et une forte identité de séquence avec OTS-8, T1a et GP38. L'équipe la nomme « podoplanine » car elle semble impliquée dans le phénomène d'aplanissement des podocytes lors de la néphrose, une maladie rénale dégénérative atteignant les glomérules du rein.

C'est le nom « Podoplanine » qui depuis les années 2000, est le plus largement utilisé et le comité de nomenclature des gènes HUGO a retenu *Pdpn* comme abréviation du nom du gène codant pour cette protéine. Soulignons aussi que les pathologistes désignent souvent la Pdpn par D2-40, du nom de l'anticorps utilisé pour la détecter en immuno-marquage dans les tissus humains.

On sait maintenant que la Pdpn est exprimée par de nombreux types cellulaires mais elle reste surtout connue comme marqueur sélectif des cellules endothéliales lymphatiques, absent de l'endothélium vasculaire ([Schacht et al., 2003](#)). Son rôle physiologique *in vivo*, essentiellement exploré dans le système immunitaire, reste peu documenté dans les cellules épithéliales. Sa distribution dans les tumeurs solides a fait par contre l'objet de nombreuses études descriptives ([pour revue, Ugorski et al., 2016](#)).

2) Données structurales

a) Structure du gène

La structure du gène et les différents domaines protéiques de la Pdpn humaine et murine ont été particulièrement étudiés par le groupe de M. Quintanilla ([pour revue, Renart et al., 2015](#)).

Chez l'humain, la *Pdpn* est localisée sur le chromosome 1 (locus 1p63.21) et mesure 32,4 kb. Le gène de la Pdpn possède 6 exons et 5 introns. Le premier exon code essentiellement pour la séquence signal et l'extrémité 5'UTR. La partie extracellulaire de Pdpn provient des exons 2 à 4. L'exon 5 code pour la partie transmembranaire et les 8 premiers acides aminés de la queue cytoplasmique. Le sixième exon code pour le dernier acide aminé de la partie intracellulaire ainsi que le codon stop et approximativement 2kb de l'extrémité 3'UTR.

Les gènes de la Pdpn humaine et murine possèdent des compositions très similaires. Néanmoins, des différences existent ; chez la souris (espèce *Mus musculus*), la *Pdpn* est localisée sur le chromosome 4. Le gène murin contient 6 exons et on peut retrouver deux variants d'ARN messagers issus de l'épissage alternatif, codant pour des protéines de 172 et 159 acides aminés respectivement. De même chez l'humain, il a été rapporté deux variants d'ARN messenger de 2.7 et 0.9kb.

b) Structure de la protéine

La Pdpn est une petite protéine transmembranaire de type I, classée parmi les protéines de type mucinique en raison de sa forte glycosylation qui correspond à un tiers de sa masse totale. La Pdpn est une protéine hautement conservée chez les mammifères notamment entre les espèces humaines, canines et les rongeurs ([pour revue, Renart et al., 2015](#)). La Pdpn des espèces murines et humaines présente un poids moléculaire de 38 à 40-kDa, ce qui en fait l'une des plus petites protéines de la famille des mucines. Les mucines sont en général des protéines de grande taille (jusqu'à 500 nm). La longueur de la partie extracellulaire de la Pdpn est de 30 nm, ce qui la classe plutôt dans la gamme des protéines d'adhésion telles que les intégrines ou les cadhérines.

Elle comporte un domaine extracellulaire (appelé aussi ecto-domaine ou EC), riche en résidus sérine/thréonine sites potentiels des O-glycosylations ainsi que des « platelet activating domain » (PLAG), une partie transmembranaire (TM) et une courte queue cytoplasmique ou intracellulaire (IC ; [Fig. 24A](#)).

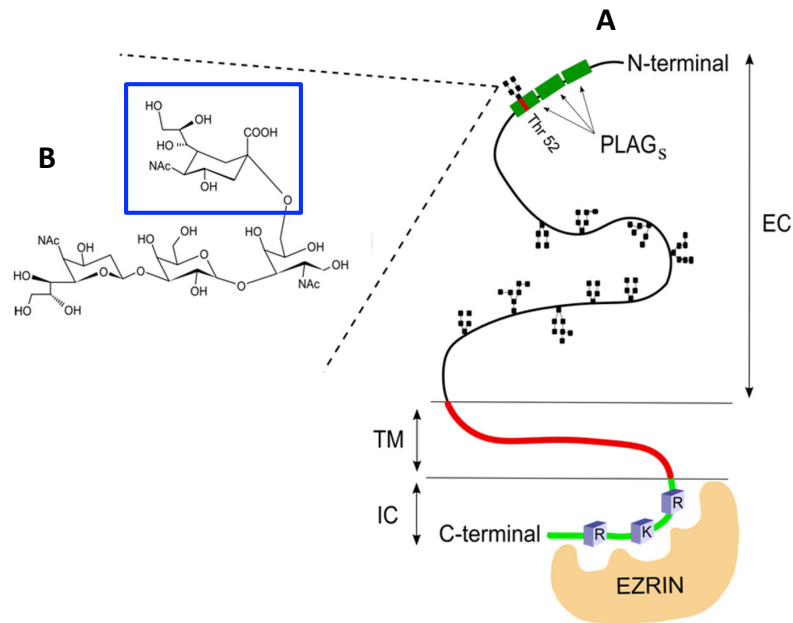


Figure 24 : Schéma de la structure de Pdpn et des carbohydrates présents dans sa partie extracellulaire. (A) Représentation schématique de la structure de Pdpn. EC : Extracellulaire. TM : Domaine transmembranaire. IC : Domaine intracellulaire. PLAG : Domaine activant l'agrégation plaquettaire. (B) Structure des O-glycans. Le cadre bleu indique l'acide sialique lié en α2-6, responsable de l'interaction avec Clec-2 (Ugorski *et al.*, 2016).

- L'ecto-domaine : partie extracellulaire responsable de l'interaction Pdpn/Clec-2

L'ecto-domaine (ED) de la Pdpn lui permet de se lier à Clec-2 (C-type lectin-like receptor 2), le seul récepteur de Pdpn identifié à ce jour (Suzuki-Inoue *et al.*, 2007). De nombreux travaux montrent que le motif PLAG3 (EDDVVTPG) (de l'anglais «PLatelet AGgregation-stimulating domain»), comprenant un carbohydrate sialyl en T52 chez l'humain, est essentiel pour cette interaction (Fig. 24B ; pour revue, Suzuki-Inoue *et al.*, 2017). Récemment, il a été montré qu'un autre domaine de type PLAG (PLAG4), en association avec PLAG3, était très important pour l'interaction de la Pdpn humaine avec Clec2 (Sekiguchi *et al.*, 2016). La partie extracellulaire particulièrement glycosylée de Pdpn est également nécessaire pour son interaction avec la Galectine 8 dans les cellules endothéliales lymphatiques (Chen *et al.*, 2016).

- Le domaine transmembranaire : site d'homodimérisation et de clivage

Le domaine transmembranaire de Pdpn contient un motif hautement conservé, GXXXG. Ce dernier est généralement impliqué dans les homodimérisations de protéines transmembranaires (pour revue, Renart *et al.*, 2015). Il semble que ce motif soit essentiel pour la dimérisation et la localisation membranaire de Pdpn dans les radeaux lipidiques (Fernandez-Munoz *et al.*, 2011). De

plus, ce domaine transmembranaire est un site de protéolyse par la γ -secrétase et les métallo-protéases. Ces dernières clivent la Pdpn afin de générer une partie C-terminale qui demeure rattachée à la membrane. Puis, l'enzyme PS1/ γ -secrétase peut de nouveau cliver la Pdpn permettant la libération de son domaine intracellulaire dans le cytoplasme (Yurrita *et al.*, 2014). Il semblerait que le domaine cytoplasmique libre de Pdpn ne possède pas de fonction autonome de signalisation mais ces processus de clivage permettraient de moduler la stabilisation et la fonction de Pdpn.

- La queue cytoplasmique : responsable des interactions moléculaires intracellulaires

La partie cytoplasmique de la Pdpn est courte, 9 acides aminés seulement, et bien conservée entre l'homme et la souris. Elle ne possède aucune activité enzymatique connue. Le groupe de 3 acides aminés basiques (Fig. 25) est responsable de l'interaction directe entre Pdpn et les protéines de la famille des ERM (Ezrin, Radixin, Moesin) (Martin-Villar *et al.*, 2006). Ce groupement d'acides aminés basiques a été détecté dans d'autres protéines transmembranaires, présentes dans les microvillus, qui sont connues pour interagir directement avec les protéines ERM (pour revue, Arpin *et al.*, 2011).

Le domaine cytoplasmique de Pdpn contient également deux résidus sérine, Ser-157 et Ser-161 chez l'humain (Ser-167 et Ser-171 chez la souris) qui sont des sites potentiels de phosphorylation (Fig. 25).

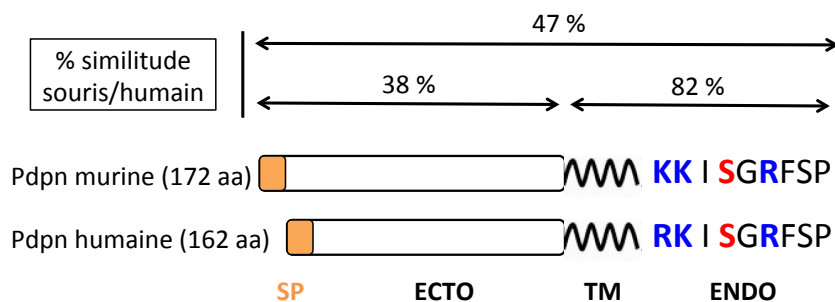


Figure 25 : Schéma des différents domaines des protéines Pdpn humaine et murine.

SP : Peptide signal ; ECTO : Ecto-domaine ; TM : domaine transmembranaire ; ENDO : Endo-domaine. Les pourcentages sont le reflet du degré d'identité entre les protéines humaines et murines. Les acides aminés en bleu sont ceux responsables de l'interaction avec les protéines ERM. Les deux résidus sérine en rouge sont des sites de phosphorylation potentiels des protéine kinases A et C (Modifiée à partir de Martin-Villar *et al.*, 2005).

3) Expression tissulaire

L'existence de plusieurs anticorps robustes dirigés contre la Pdpn humaine et murine a permis d'analyser la distribution de cette protéine dans différents tissus. Les analyses ont montré que la Pdpn était exprimée dans de nombreux tissus épithéliaux et non-épithéliaux provenant des trois couches germinales primaires, ectoderme, mésoderme et endoderme. Son expression au cours de l'embryogenèse et du développement post-natal paraît finement régulée de manière spatio-temporelle.

a) Expression au cours du développement embryonnaire

Chez la souris, la Pdpn est exprimée au jour embryonnaire 9 (E9) dans le feuillet endodermique (avant la formation des bourgeons pulmonaires), l'organe pro-épicardique et le précurseur du système nerveux central ([pour revue, Renart et al., 2015](#)). Plus tard, la Pdpn est exprimée dans la totalité du tissu pulmonaire embryonnaire et dans le tube neural précoce. Tout au long du développement, on la trouve dans les organes précurseurs de l'œsophage, la trachée, l'estomac, l'intestin et les reins. Cependant, cette expression est transitoire et diminue graduellement jusqu'à devenir pratiquement indétectable au jour 19 de la gestation. Dans ces organes, l'expression de la protéine et de l'ARN messager de la Pdpn corrèle parfaitement. Les différents patrons d'expression spatio-temporelle cités ci-avant indiquent qu'il existe des mécanismes actifs régulant l'expression génique de la Pdpn afin d'aboutir au profil d'expression chez l'adulte.

b) Expression chez l'adulte

A l'âge adulte, la Pdpn est présente dans de nombreux tissus mais son expression est restreinte à certains types cellulaires ([Tableau 4](#)). Absente de l'endothélium vasculaire, elle reste à ce jour l'un des principaux marqueurs des vaisseaux lymphatiques chez l'humain comme chez la souris et le rat ([Breiteneder-Geleff et al., 1999](#); [Schacht et al., 2005](#)). Au sein du système immunitaire, la Pdpn présente une forte expression, dans les cellules fibroblastiques réticulaires des organes lymphoïdes ([Astarita et al., 2015](#)). Elle a été également décrite dans les ostéocytes et les fibromyocytes entourant les tubes séminifères ([Wetterwald et al., 1996](#); [Schacht et al., 2005](#)). Dans l'ovaire, seules les cellules des follicules immatures primaires et secondaires expriment Pdpn, son expression s'éteignant dans les follicules tardifs ([Schacht et al., 2005](#)).

Organe	Type cellulaire
Système vasculaire	Cellules endothéliales lymphatiques
Organes lymphoïdes (ganglion lymphatique, rate, thymus)	Fibroblastes réticulaires et cellules épithéliales thymiques
Poumons	Cellules alvéolaires de type I Plèvre
Reins	Podocytes glomérulaires du rein Épithélium de la capsule de Bowman
Peau	Expression focale dans les kératinocytes de type basal
Foie	Canaux biliaires et péritoine
Œsophage	Kératinocytes de type basal
Intestin	Péritoine
Système nerveux central	Plexus choroïde Épendymocytes et méninges
Système nerveux périphérique	Fibroblastes périneuronaux
Ovaires	Cellules de la granulosa des follicules ovariens primaires et secondaires
Col de l'utérus	Kératinocytes de type basal
Glande mammaire et glandes salivaires	Cellules myoépithéliales
Prostate	Myofibroblastes
Testicules	Fibromyocytes
Système osseux	Ostéoblastes and ostéocytes matures

Tableau 4 : Résumé des principaux organes et types cellulaires adultes exprimant la Pdpn

La Pdpn est exprimée par divers types de cellules épithéliales appartenant à des épithélia simples ou stratifiés. On citera notamment les cellules alvéolaires pulmonaires de type I, les podocytes glomérulaires du rein, les épendymocytes du système nerveux, et une sous-population de cellules épithéliales thymiques. La peau et l'épithélium intestinal sont dépourvus d'expression. Les épithélia sécrétoires pseudo-stratifiés, typiquement ceux des glandes sudoripares, salivaires et mammaires, expriment la Pdpn essentiellement dans la couche basale myoépithéliale qui les caractérise (Schacht *et al.*, 2005).

Les données immunohistochimiques dans les tissus épithéliaux indiquent que l'expression de Pdpn est essentiellement membranaire mais le niveau de résolution souvent insuffisant ne permet pas une localisation précise. Il est intéressant de noter qu'un certain nombre de cellules épithéliales spécialisées exprimant la Pdpn, comme les podocytes, les épendymocytes, les cellules thymiques et les cellules myoépithéliales présentent *in situ* des extensions cytoplasmiques particulièrement importantes.

c) Expression dans le cancer

La Pdpn est exprimée dans une large diversité de cancers épithéliaux ou non-épithéliaux, souvent au front invasif des tumeurs (Tableau 5 ; pour revues, Renart *et al.*, 2015; Suzuki-Inoue *et al.*, 2017). La Pdpn est notamment présente dans les carcinomes à cellules squameuses (CCS) de la cavité orale, du larynx, des poumons, du col de l'utérus, de l'œsophage, et de la peau. De nombreux travaux rapportent par ailleurs que la Pdpn est exprimée fortement dans les fibroblastes associés au cancer (CAFs) (pour revue, Ugorski *et al.*, 2016). Les CAFs sont des fibroblastes activés, nommés aussi myofibroblastes, car ils expriment certains marqueurs de muscle lisse tel que α -SMA.

Type de cancer	Fréquence
Carcinomes squameux	80% des carcinomes squameux (poumon, larynx, col de l'utérus, peau et œsophage), 25% des carcinomes oraux
Tumeurs germinales	Séminomes (98%), carcinomes embryonnaires (69%), tératomes (29%), cancer de la vésicule vitelline (25%)
Tumeurs du cerveau	Astrocytome (25%), glioblastome (45%), germinome cérébral (98%), tératome immature (71%)
Autres	Mésothéliome (93%), sarcome de Kaposi (90-100%), lymphangiome ou malformation lymphatique (100%)

Tableau 5 : Résumé des principaux types de cancer exprimant la Pdpn

4) Régulation de l'expression de Podoplanine

a) Signaux inducteurs

Plusieurs facteurs de croissance appartenant à des voies de signalisation distinctes ont été identifiés comme inducteurs de l'expression de Pdpn. L'interleukine 3 (IL-3), nécessaire au maintien des cellules lymphatiques endothéliales (LEC), semble essentielle pour l'expression des marqueurs spécifiques des LECs : le facteur de transcription Prox-1 et Pdpn (Groger *et al.*, 2004). Le TGF β , via la voie canonique des Smads, et l'interferon- γ (IFN γ), via JAK/STAT, induisent l'expression de Pdpn dans les kératinocytes humains de l'épiderme néonatal (Honma *et al.*, 2012), tandis que celle-ci est stimulée par l'EGF (Epidermal Growth Factor) et dans une moindre mesure par FGF2 et TGF- β dans la lignée cellulaire humaine d'adénocarcinome mammaire, MCF-7 (Wicki *et al.*, 2006).

Les travaux de Shen et Coll. ont impliqué Pdpn dans les mécanismes de « normalisation cellulaire par contact », un phénomène par lequel des cellules normales inhibent les caractéristiques

tumorales de cellules voisines transformées ([pour revue, Rubin, 2006; Shen et al., 2010](#)). En utilisant un modèle de fibroblastes embryonnaires transformés par Src, les auteurs montrent que Src régule positivement *Pdpn* par l'intermédiaire de la phosphorylation de Cas (adaptateur protéique des adhésions focales) et que l'induction de *Pdpn* est requise pour favoriser le phénotype migratoire de ces cellules. De façon intéressante, *Pdpn* fait partie des rares gènes dont l'expression est inhibée dans les cellules transformées mises au contact des cellules sauvages.

b) Régulation transcriptionnelle

Etant donné la grande variété de tissus dans lesquels la *Pdpn* est exprimée, son promoteur devrait avoir de nombreux sites de liaison aux facteurs de transcription. Cependant, peu d'informations sont disponibles à ce sujet.

L'extrémité 5'-UTR du gène humain de la *Pdpn* a été clonée par deux groupes. Le premier a montré que la région 5' contient plusieurs sites de liaison des facteurs de transcription Sp1 et Sp3, qui régulent positivement et de manière synergique l'expression de l'ARN messager de *Pdpn* ([Hantusch et al., 2007](#)). Pan et Coll. ont identifié 4 sites de liaison de Prox1, un régulateur majeur de la lymphangiogenèse ([Pan et al., 2014](#)). Cependant, dans certains types cellulaires, les expressions de Prox1 et *Pdpn* ne sont pas corrélées. Les facteurs de transcription AP-1, Sox2 et des membres de la famille des Stats ont également des sites potentiels de liaison au promoteur de la *Pdpn* ([pour revue, Renart et al., 2015](#)).

c) Régulation post-transcriptionnelle

- miRNAs

L'ARNm de *Pdpn* possède approximativement 2kb en 3'-UTR, il n'est donc pas surprenant que son expression soit régulée par des micro-ARNs (=miRNAs). Les miRNAs sont des petits ARN simple brin non-codant d'une longueur d'environ 21-22 nucléotides qui permettent de réguler l'expression de certains gènes généralement en l'inhibant ([pour revue, Li et al., 2017](#)). Deux travaux ont étudié la régulation d'expression de *Pdpn* par les miRNAs. Cortez et Coll. ont montré que les miR-29b et miR-125a, dérégulés dans les glioblastomes, peuvent cibler l'extrémité 3' de *Pdpn*, et ainsi inhiber son expression ([Cortez et al., 2010](#)). Sun et Coll. ont rapporté que *Pdpn* était régulée négativement par miR-363 dans les carcinomes squameux ([Sun et al., 2013](#)).

- Glycosylations

Comme mentionné précédemment, l'ecto-domaine de la Pdpn est fortement O-glycosylé. Chez l'humain, l'O-glycosylation en T52 est essentielle pour l'interaction entre Pdpn et CLEC-2 (Fig. 24). Les O-glycosylations sont initiées par une famille de polypeptides conservée durant l'évolution et appelée : N-acetylgalactosaminyltransférases (ou ppGalNAc-Ts) dont l'expression est spatialement et temporellement régulée. La Pdpn a été décrite comme substrat de ppGalNAc-T13 (Xu *et al.*, 2016) et peut être glycosylée de manière aberrante dans certaines cellules cancéreuses (pour revue, Renart *et al.*, 2015).

- Maturation protéolytique

La Pdpn peut subir plusieurs traitements protéolytiques. La dégradation par la Calpaïne peut expliquer l'absence de Pdpn dans certaines lignées cellulaires alors qu'elle est exprimée significativement au niveau ARNm (Martin-Villar *et al.*, 2009).

De plus, le domaine extracellulaire de la Pdpn peut être clivé, d'abord par une métallo-protéase, puis le fragment restant est protéolysé par une presenilin1/ γ -secretase ce qui permet la libération du domaine intracellulaire (Yurrita *et al.*, 2014). A ce jour, il n'a pas été démontré qu'un fragment de la Pdpn pouvait jouer un rôle dans la signalisation intracellulaire.

- Phosphorylation

Les travaux de Krishnan et Coll. ont montré que la queue cytoplasmique de la Pdpn murine pouvait être phosphorylée *in vitro* par PKA en S167 et S171 et par la cycline CDK5 (de l'anglais « cyclin-dependant kinase 5 ») en S171 (Krishnan *et al.*, 2013; Krishnan *et al.*, 2015). L'usage de constructions non-phosphorylables et phospho-mimétiques a montré que la Pdpn phosphorylée inhibe la migration de cellules fibroblastiques. Par ailleurs, dans le système immunitaire, il semble que Clec2 régule négativement la phosphorylation de Pdpn en S167 afin d'inhiber son action sur la contraction du cytosquelette d'actine (Acton *et al.*, 2014).

5) Partenaires moléculaires de Pdpn

Les différents domaines de Pdpn ont été impliqués dans des interactions moléculaires dont certaines sont clairement essentielles à sa fonction (Fig. 26). Trois types majeurs d'interactions ont été décrites : Pdpn/Clec-2 (Suzuki-Inoue *et al.*, 2007), Pdpn/ezrine et moesine, les molécules de la

famille ERM, (Wicki *et al.*, 2006; Martin-Villar *et al.*, 2006), et Pdpn/CD44 (Ohizumi *et al.*, 2000; Martin-Villar *et al.*, 2010). D'autres interactions moléculaires ont été décrites mais elles restent pour l'instant moins documentées : Pdpn/CD9 (Tétraspaline 29), Pdpn/Galectin 8 et Pdpn/HSPA9 (Heat shock protein A9), et Pdpn/CCL21 (Kerjaschki *et al.*, 2004; Nakazawa *et al.*, 2008; Cueni et Detmar, 2009; Tsuneki *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2016; Tejchman *et al.*, 2017).

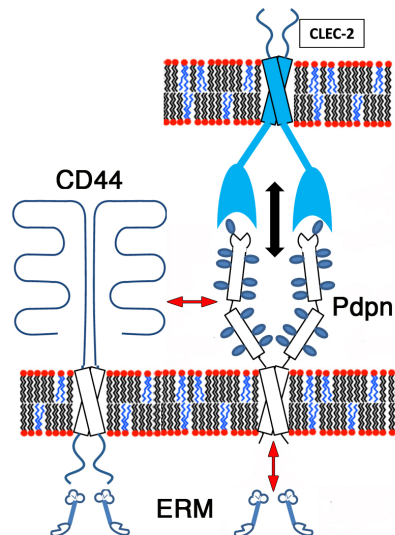


Figure 26 : Schéma des interactions principales de Pdpn avec ses partenaires moléculaires.

a) Clec-2

La protéine de type lectine, Clec-2, a d'abord été identifiée comme un récepteur plaquettaire fixant la rhodocytine, une toxine du venin de serpent qui induit l'agrégation plaquettaire par activation des tyrosine-kinases Src et Syk. Sa fonction physiologique restait peu définie jusqu'aux études montrant que Clec-2 se lie au domaine extracellulaire de Pdpn (Suzuki-Inoue *et al.*, 2007). L'expression de Clec-2 a ensuite été révélée à la surface d'autres types cellulaires du système immunitaire, notamment les mégacaryocytes et les cellules dendritiques des ganglions lymphatiques (Acton *et al.*, 2014; Astarita *et al.*, 2015; Nakamura-Ishizu *et al.*, 2015). Les interactions cellulaires hétérotypiques mettant en jeu le couple Pdpn-Clec2 sont essentielles pour le développement du système lymphatique et le contrôle de la réponse immunitaire dans les ganglions lymphatiques, comme nous le développerons plus loin en pages 86 et 88 (Uhrin *et al.*, 2010; Acton *et al.*, 2014; Astarita *et al.*, 2015). Il est important de souligner la dualité de l'interaction Pdpn-Clec2, Pdpn comme Clec-2 pouvant transmettre un signal dans les cellules partenaires.

b) ERM

Dans les cellules du système immunitaire et diverses cellules épithéliales en culture, la Pdpn co-localise avec des protéines de la famille ERM (Ezrine/Moesine/Radixine). Des expériences d'immunoprécipitation réalisées dans des cellules épithéliales ont montré que Pdpn interagit directement avec l'eitrine et la moesine (Scholl *et al.*, 1999; Wicki *et al.*, 2006; Martin-Villar *et al.*, 2006). Les protéines ERM sont connues pour leurs rôles importants dans l'organisation du cytosquelette d'actine, et leurs impacts sur l'adhésion, la migration, la survie et la morphogénèse cellulaires (pour revues, Arpin *et al.*, 2011; Clucas et Valderrama, 2015). Leur activation est régulée par des changements de conformation induits par des phospholipides et par phosphorylation via de nombreuses kinases. La phosphorylation entraîne la libération et l'activité des deux domaines FERM (en N-terminal) et C-ERMAD (en C-terminal) des ERM. Cela leur permet d'interagir à la fois avec des protéines membranaires et le cytosquelette d'actine (Fig. 27). La surexpression de Pdpn semble moduler positivement la phosphorylation des protéines ERM et favorise la réorganisation du cytosquelette d'actine, avec pour effets principaux une diminution des fibres de stress et une augmentation des filopodes associées à un phénotype migratoire (Fig. 27 ; Wicki *et al.*, 2006; Martin-Villar *et al.*, 2006; Acton *et al.*, 2014; Astarita *et al.*, 2015).

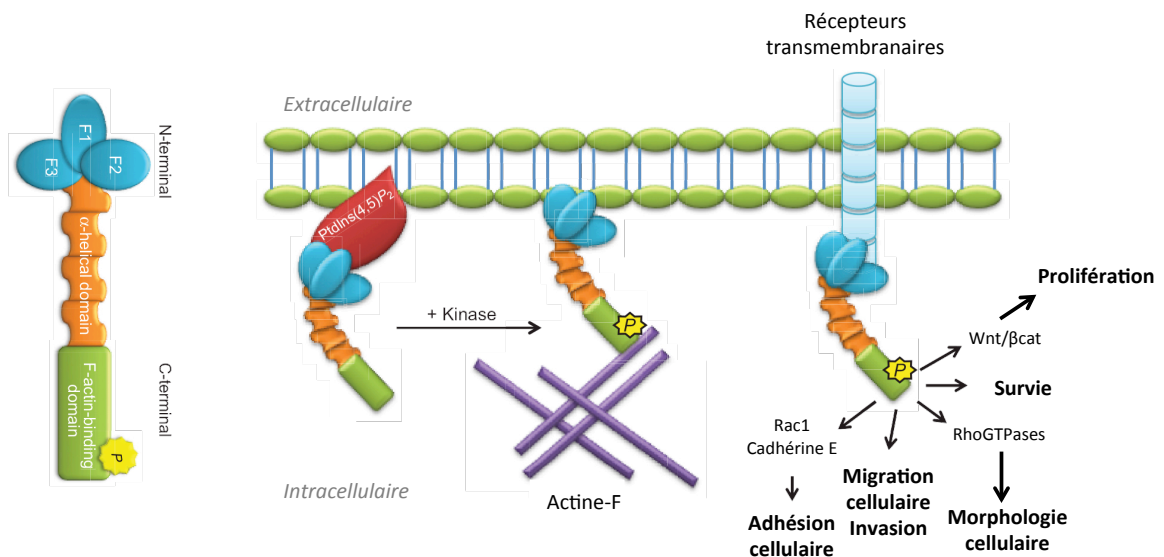


Figure 27 : Mécanisme d'activation des protéines de l'ERM et voies de signalisation régulées.

Les protéines ERM se lient aux PIP₂ localisés à la membrane plasmique. Leur recrutement à la membrane dans des endroits spécifiques, via leurs domaines FERM situés dans la partie N-terminale, permet d'exposer les résidus thréonine conservés. Des kinases spécifiques sont alors recrutées afin de phosphoryler ces résidus et permettre aux protéines ERM de faire le lien entre les protéines transmembranaires et le cytosquelette d'actine. Une fois qu'elles sont activées, les protéines ERM transmettent, directement ou indirectement, des signaux initiés par les protéines transmembranaires (adapté de Clucas et Valderrama, 2015).

c) CD44

CD44 est le récepteur majeur de l'acide hyaluronique (HA), composant de la matrice extracellulaire. C'est une glycoprotéine membranaire dont il existe de multiples isoformes issues d'un épissage alternatif complexe (pour revue, Orian-Rousseau et Ponta, 2015). Chacune d'elles possède le site de liaison à HA, un domaine transmembranaire et une partie cytoplasmique qui peut se lier aux protéines ERM. En plus de sa fonction dans l'adhésion matricielle, CD44 est un corécepteur essentiel de certains récepteurs tyrosine kinase, comme Met et VegfR, auxquels il confère une liaison avec le cytosquelette d'actine via les protéines ERM (Olaku *et al.*, 2011; Hasenauer *et al.*, 2013). Il a été montré que l'isoforme CD44s est co-localisée avec Pdpn à la surface de cellules endothéliales lymphatiques (Ohizumi *et al.*, 2000; Acton *et al.*, 2014) et dans les cellules des carcinomes squameux (Martin-Villar *et al.*, 2010). L'association moléculaire en *cis* (c'est à dire dans la même cellule) de Pdpn et CD44s induit et maintient la migration cellulaire directionnelle dans les cellules de carcinome en culture (Fig. 26). De plus, Pdpn et CD44s sont tous deux régulés positivement lors de la progression des tumeurs de peau induite par des carcinogènes chimiques. Des expériences de co-immunoprécipitation et de FRET (de l'anglais «fluorescence resonance energy transfer») dans divers types de cellules épithéliales suggèrent que Pdpn et CD44 pourraient interagir directement via leurs domaines extracellulaires (Martin-Villar *et al.*, 2010).

6) Rôles physiologiques et pathologiques de Pdpn

a) Pdpn et développement embryonnaire

La Pdpn est critique pour le développement précoce et la morphogénèse de certains tissus. La majorité des souris génétiquement déficientes pour Pdpn (Pdpn^{-/-}) meurent à la naissance en raison de graves malformations respiratoires, cardiaques et d'un sévère dysfonctionnement du système lymphatique. Les défauts observés chez les souris Pdpn^{-/-} apparaissent à partir du 10^{ème} jour de l'embryogénèse (E10), ce qui corrèle avec l'émergence de l'expression de Pdpn. Plus précisément, environ 40% des embryons meurent avant la naissance (entre E10 et E16), ceux qui survivent meurent dans les premiers jours suivants la naissance (Mahtab *et al.*, 2008). Curieusement, quand les souris sont croisées sur un fond génétique C57Bl/6, approximativement 20% des souris Pdpn^{-/-} atteignent l'âge adulte et sont alors viables et fertiles (Uhrin *et al.*, 2010; Astarita *et al.*, 2012). Une pénétrance incomplète a été évoquée pour expliquer cette observation, mais ses bases moléculaires restent à préciser.

-Système lymphatique : interaction Pdpn-Clec-2

Pendant l'embryogénèse, les sacs lymphatiques doivent se séparer de la veine cardinale afin de former un réseau lymphatique fonctionnel (Fig. 28). La séparation définitive entre le bourgeon lymphatique naissant et les vaisseaux sanguins en développement s'effectue : soit de manière mécanique par l'agrégation des plaquettes activées ; soit par la libération de granules contenant des facteurs angiogéniques, de croissance et de la matrice extracellulaire favorisant la séparation (pour revue, Suzuki-Inoue *et al.*, 2017). Les souris $Pdpn^{-/-}$ et $Clec2^{-/-}$ ont un processus d'activation plaquettaire inexistant et présentent un phénotype de non-séparation du système lymphatique et sanguin caractérisé par un réseau lymphatique où se mélangent sang et lymphes à E13.5. Les souris transgéniques exprimant la Pdpn dépourvue de sa queue cytoplasmique ne développent pas de phénotype de non-séparation sang/lymphe, montrant le rôle essentiel du domaine extracellulaire de Pdpn dans le phénotype délétère des souris $Pdpn^{-/-}$ (Suzuki-Inoue *et al.*, 2010; Uhrin *et al.*, 2010; pour revue, Suzuki-Inoue *et al.*, 2017).

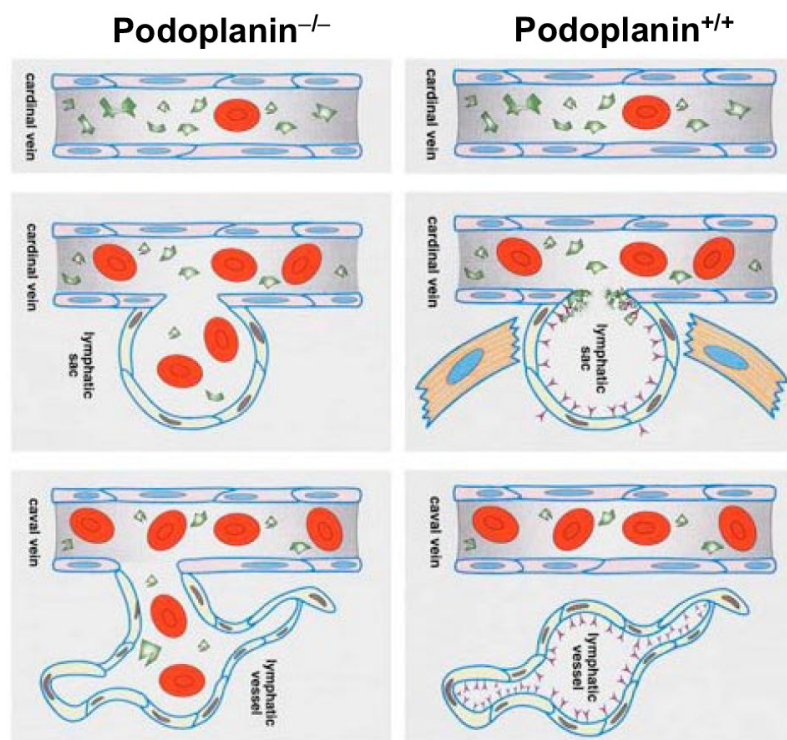


Figure 28 : Schéma des mécanismes impliqués dans la séparation du sac lymphatique de la veine cardinale et rôle de la Pdpn dans ce processus.

Droite : À E12, les cellules endothéliales du sac lymphatique acquièrent un phénotype lymphatique et expriment la Pdpn («Y» rouge/violet) à leur surface, responsable de l'activation des plaquettes circulant dans la veine cardinale (vert). Un caillot de plaquette se forme autour de l'orifice du sac lymphatique et provoque sa séparation. A partir d'E14, le sac lymphatique est séparé de la veine cardinale qui formera un réseau lymphatique fonctionnel. **Gauche :** En l'absence de Pdpn, la connexion entre le système lymphatique et sanguin n'est pas rompue, ce qui provoque la diffusion de sang dans le réseau lymphatique (Uhrin *et al.*, 2010).

-Pdpn et développement pulmonaire

La perte de Pdpn est délétère pour la morphogénèse pulmonaire ainsi que le montre l'étude de [Ramirez et al., 2003](#). Ces auteurs ont observé que les souris Pdpn^{-/-} meurent à la naissance en présentant des défauts respiratoires sévères, dont une impossibilité à remplir correctement leurs poumons d'air. Le phénotype est expliqué par une altération de la morphologie des poumons dans leur partie distale accompagnée d'une inhibition de la différenciation des cellules alvéolaires de type I mais aucune autre étude moléculaire n'a été menée.

-Pdpn et développement cardiaque

Les souris Pdpn^{-/-} présentent un myocarde et des coussins atrio-ventriculaires hypoplasiques ([Mahtab et al., 2008](#)). Des malformations sévères de la valve atrio-ventriculaire et des artères coronaires résultent de ces défauts précoces. L'étude du phénotype cardiaque révèle l'implication de la Pdpn dans le développement de l'organe pro-épicardique, en particulier dans l'adhésion, la dissémination et la migration des cellules dérivées de l'épicarde, phénomènes essentiels au développement correct du cœur. Au plan moléculaire, la perte de Pdpn entraînerait une régulation positive de la cadhérine E.

b) Fonctions de la Pdpn dans le système immunitaire adulte

A ce jour, le rôle de la Pdpn dans les tissus adultes a été majoritairement analysé dans le système immunitaire où il est lié à son interaction possible avec Clec-2. On distingue deux types d'études : celles qui sont liées à la fonction de Pdpn en tant qu'inducteur d'une signalisation dans les cellules exprimant Clec-2, et celles qui ont exploré la fonction de Pdpn *per se* dans des cellules adultes l'exprimant, en présence ou absence d'une interaction avec Clec-2.

- Pdpn et signalisation dans les cellules exprimant Clec-2

- **Maintien du système lymphatique**

L'interaction entre les vaisseaux lymphatiques et les plaquettes via Pdpn-Clec2 dépend de la glycosylation de Pdpn par la T-synthase. En utilisant un modèle de souris dans lequel la délétion en T-synthase dans les cellules endothéliales lymphatiques est inductible, [Fu et al., 2008](#) ont montré qu'un défaut d'interaction entre Pdpn et Clec2 entraîne, après six mois, un phénotype de sang et lymphes mélangés. L'interaction de Pdpn avec Clec-2, permet donc de maintenir la séparation entre le réseau lymphatique et le réseau sanguin tout au long de la vie adulte.

- **Contrôle de l'intégrité des veinules à endothélium épais**

Les veinules à endothélium épais ou « high endothelial venules (HEV) » sont des vaisseaux sanguins spécialisés, contrôlant la pénétration des lymphocytes dans les ganglions lymphatiques. Lors d'une réponse immunitaire, le processus d'infiltration lymphocytaire est accru et les lymphocytes doivent transmigrer sans que l'intégrité vasculaire soit affectée. Il a été montré que la Pdpn présente à la surface des cellules fibroblastiques réticulaires (=FRCs de l'anglais « Fibroblastic Reticular Cells ») entourant les HEVs stimule l'activation plaquettaire en se liant à Clec-2 (Herzog *et al.*, 2013). Les souris présentant une délétion post-natale de Pdpn ou de Clec-2 ont des défauts d'intégrité des HEVs qui conduisent à des saignements spontanés dans les ganglions lymphatiques. L'activation de Clec-2 par Pdpn permet aux plaquettes de libérer localement des facteurs comme la sphingosine-1-phosphate qui stimule l'expression de la cadhérine VE, une molécule d'adhésion essentielle à l'intégrité vasculaire.

- **Maturation des mégacaryocytes**

Un travail récent a révélé que Pdpn est exprimée par les cellules stromales entourant les artérioles de la moelle osseuse (Tamura *et al.*, 2016). Ces dernières interagissent avec les mégacaryocytes, précurseurs des plaquettes, qui portent Clec-2 à leur surface. Dans ce système, l'interaction Pdpn-Clec-2 favorise la croissance des mégacaryocytes et la formation des pro-plaquettes en stimulant l'expression de CCL5 (chemokine ligand 5) dans les cellules stromales artériolaires.

- **Migration des cellules dendritiques**

Les cellules dendritiques (DCs) présentatrices d'antigène assurent la veille immunitaire dans les tissus de l'organisme. En cas d'infection, elles migrent vers les ganglions lymphatiques où elles rencontrent et peuvent activer les lymphocytes T. Les travaux d'Acton *et al.* (2012) montrent qu'au sein du ganglion, les DCs activés, positifs pour Clec-2, migrent au contact du réseau de FRCs exprimant Pdpn. L'interaction Pdpn/Clec-2 est nécessaire aux DCs pour s'étaler et migrer le long des FRCs. L'activation de Clec-2 par Pdpn induit une réorganisation du cytosquelette d'actine et une augmentation des protrusions dans les DCs, phénomènes qui s'accompagnent d'une diminution de l'activité de RhoA et une activation de Rac.

- Signalisation par Pdpn

- **Contrôle de la lymphangiogenèse**

L'utilisation d'une protéine de fusion Pdpn-Fc a permis de montrer que Pdpn régule la fonction des cellules endothéliales lymphatiques et stimule leur croissance *in vitro* et *in vivo* (Cueni *et al.*, 2010a). Par ailleurs, une étude indique que les exosomes/microvésicules sécrétées par des cellules exprimant Pdpn transportent l'ARNm et la protéine Pdpn. Ces vésicules contribuent au développement lymphangiogénique *in vitro* et *in vivo*. Le domaine extracellulaire de Pdpn serait impliqué dans ce processus puisque l'anticorps bloquant qui cible cette partie inhibe la lymphangiogenèse induite par Pdpn *in vitro* (Carrasco-Ramirez *et al.*, 2016).

- **Contrôle de la contractilité des fibroblastes réticulaires dans les ganglions lymphatiques**

Deux études récentes ont analysé le rôle de Pdpn dans le contrôle du phénotype des FRCs, en présence ou absence d'interaction avec Clec-2 (Acton *et al.*, 2014; Astarita *et al.*, 2015). Les auteurs ont utilisé des FRCs déficients en Pdpn issus du pool mineur de souris Pdpn^{-/-} qui survivent à l'état adulte. Ils rapportent qu'en l'absence d'interaction avec Clec-2, Pdpn favorise la contraction de l'acto-myosine des FRCs, en diminuant la phosphorylation des ERMs et l'activité de RhoA. L'interaction Clec2-Pdpn inhibe la signalisation induite par la Pdpn dans les fibroblastes, entraînant leur relaxation. Il semble que Clec2 empêche le domaine extracellulaire de Pdpn d'interagir *en cis* avec un partenaire transmembranaire, potentiellement CD44. Ces mécanismes joueraient un rôle important dans la régulation de la rigidité du stroma ganglionnaire, permettant l'expansion du ganglion lors de la réponse immune.

c) Pdpn dans le contrôle de la migration cellulaire

Plusieurs travaux impliquent Pdpn dans le contrôle de la migration des cellules épithéliales, la plupart d'entre eux utilisent des modèles de lignées cellulaires (pour revue, Wicki et Christofori, 2007; Renart *et al.*, 2015).

L'expression ectopique de Pdpn dans la lignée cellulaire de kératinocytes MCA3D induit un phénotype fibroblastoïde migratoire, marqué par une réorganisation du cytosquelette et l'extension de filopodes, la diminution de l'expression de la K14, la perte aux jonctions des cadhérines E et P, et une induction de la vimentine. Implantées chez des souris athymiques, les cellules MCA3D transfectées avec Pdpn acquièrent des propriétés tumorigéniques et métastatiques (Scholl *et al.*, 1999; Scholl *et al.*, 2000). L'expression de Pdpn dans les cellules MDCK

induit également une transition vers un phénotype fibroblastoïde migratoire avec perte d'expression de la cadhérine E et diminution de la β -caténine, suggérant un processus d'EMT (Martin-Villar *et al.*, 2006). L'utilisation de différentes constructions exprimant des formes mutées de la Pdpn a permis aux auteurs de montrer que ce phénotype fonctionnel et moléculaire dépend du domaine cytoplasmique de la Pdpn. En effet, des mutations ponctuelles des acides aminés impliqués dans l'interaction entre Pdpn et les protéines ERM (R154, K155 et R159 ; Fig. 27) diminuent ou abrogent complètement le phénotype observé avec la protéine Pdpn entière. L'utilisation de formes dominantes négatives de Ezrin et RhoA indique que le phénotype de transition induit par Pdpn est associé à son interaction avec les protéines ERM mais également à l'activation de RhoA.

L'expression forcée de Pdpn dans les cellules humaines d'adénocarcinome du sein, MCF7, augmente leurs capacités d'adhésion, d'invasion et de migration cellulaire (Wicki *et al.*, 2006). La migration observée est de type collective, l'expression de la cadhérine E est maintenue. Dans ce modèle, Pdpn co-localise avec l'ezrine phosphorylée dans les protrusions membranaires et induit une diminution d'activation de RhoA.

Dans les kératinocytes, l'expression de Pdpn augmente progressivement au cours du processus de cicatrisation, notamment au front de la blessure (Asai *et al.*, 2016). La diminution d'expression de Pdpn dans des kératinocytes humains primaires inhibe leur capacité de migration dans des essais de blessure *in vitro* en induisant une surexpression de la cadhérine E et une diminution de l'activité de RhoA. Ces résultats indiquent que Pdpn joue un rôle essentiel dans les processus de ré-épithélialisation après blessure.

Il apparaît clair, à partir de ces études, que la Pdpn participe au contrôle de la plasticité des cellules épithéliales et peut favoriser leur migration en induisant la réorganisation du cytosquelette. Les mécanismes évoqués impliquent essentiellement les protéines ERM et une modulation de l'activité des Rho-GTPases. L'activation de processus de type EMT semble dépendre du contexte cellulaire et reste à documenter précisément.

d) Implications pathologiques de la Podoplanine

-Pdpn et carcinomes

Comme on l'a vu précédemment, la Pdpn est exprimée dans de nombreux cancers solides (Tableau 5), souvent localisée au front invasif de ces tumeurs. Son rôle dans la stimulation de la migration cellulaire individuelle et collective observée *in vitro* suggère une implication directe de

Pdpn dans la progression tumorale. La surexpression de Pdpn dans les cellules tumorales est souvent un facteur de mauvais pronostic ; caractérisé par une survie diminuée des patients, une dissémination accrue des cellules tumorales dans les vaisseaux sanguins ou ganglions lymphatiques périphériques et un risque métastatique élevé (pour revues, Pula *et al.*, 2013; Dang *et al.*, 2014).

Le rôle de Pdpn a été étudié *in vivo* dans un modèle murin de carcinomes de cellules β pancréatiques (Wicki *et al.*, 2006). La progression de ces tumeurs invasives est caractérisée par une altération profonde des jonctions adhérentes avec perte d'expression de la cadhérine E, de la β -caténine jonctionnelle et une induction de la cadhérine N. La génération de mutants surexprimant Pdpn dans les cellules β a montré que Pdpn accélère la progression des tumeurs pancréatiques sans affecter l'expression de la cadhérine E. Par contre, en présence de Pdpn, les cellules tumorales au front invasif présentent une relocalisation des protéines ERM dans des extensions cytoplasmiques de type filopodes. Les conclusions de ce travail argumentent en faveur d'un rôle de Pdpn dans la migration collective des cellules épithéliales, sans activation d'un processus d'EMT, comme observé *in vitro* dans la lignée MCF7 (Wicki *et al.*, 2006 ; pour revue, Wicki et Christofori, 2007).

Deux études distinctes rapportent que Pdpn est un composant des invadopodes, structures membranaires spécialisées riches en actine, impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire et l'invasion tumorale (pour revue, Poincloux *et al.*, 2009). La stimulation de l'expression de Pdpn dans une lignée de carcinome squameux augmente la formation d'invadopodes et la dégradation de matrice, tandis que son inhibition réduit ces processus (Hwang *et al.*, 2012). Dans ce même modèle cellulaire, Martin-Villar *et al.*, 2015 rapportent que Pdpn stabilise la formation des invadopodes. Le recrutement de Pdpn dépend de son association aux radeaux lipidiques et de son interaction avec les protéines ERM.

La Pdpn a été proposée comme marqueur des cellules initiatrices de tumeurs dans certains cancers de type squameux. Les données obtenues sur des lignées cellulaires indiquent que le potentiel tumorigénique des cellules exprimant fortement Pdpn est supérieur à celles l'exprimant faiblement (Atsumi *et al.*, 2008; Rahadiani *et al.*, 2010). Un travail récent précise que dans ces modèles, Pdpn favorise la survie cellulaire et suggère que ce processus serait dépendant de ROCK, l'effecteur majeur de RhoA (Miyashita *et al.*, 2017).

Récemment, des gènes de fusion entre la Pdpn entière et la partie catalytique de la protéine kinase C (PKC) ont été identifiés dans l'histiocytome fibreux (Plaszczycza *et al.*, 2014). Ces fusions ont été retrouvées au niveau génomique mais aussi dans les transcrits d'ARN. C'est la première

fois qu'un gène de fusion associé à la Pdpn est décrit. Il pourrait aboutir à la présence de protéines chimères comportant la partie liée à la membrane de la Pdpn et le domaine catalytique de PKC. Cela résulterait en une activité constitutive aberrante de la kinase au niveau membranaire. Ces résultats ouvrent une nouvelle direction de recherche qui pourrait permettre l'identification de nouvelles protéines de fusion associées à la Pdpn pouvant être impliquées dans la tumorigénèse et la signalisation moléculaire d'autres types de cancers.

-Pdpn et microenvironnement tumoral

La Pdpn est impliquée dans plusieurs processus cellulaires connus pour favoriser la progression et l'invasion tumorales, notamment l'activation plaquettaire et la lymphangiogenèse ([pour revues, Suzuki-Inoue et al., 2017; Takemoto et al., 2017](#)). De plus, la Pdpn est exprimée par les CAFs qui constituent une composante stromale jouant un rôle très important dans le développement tumoral.

L'agrégation et l'activation plaquettaires induites par les cellules tumorales sont connues pour faciliter la progression tumorale et l'établissement de métastases, en créant des micro-embolies, délivrant des facteurs de croissance et protégeant les cellules tumorales des défenses immunitaires. Des essais de thérapies ciblant la protéine Pdpn ont été élaborés à l'aide d'un anticorps reconnaissant des motifs spécifiques de la partie extracellulaire de la Pdpn se liant à Clec2 ([pour revue, Takemoto et al., 2017](#)).

La Pdpn est très utilisée comme marqueur immunohistochimique spécifique des vaisseaux lymphatiques par les pathologistes afin d'évaluer la lymphangiogenèse dans les tumeurs. La lymphangiogenèse est un paramètre très important dans la progression tumorale, notamment dans les cas de mélanomes et de cancers du sein ([pour revue, Ran et al., 2010](#)). Les vaisseaux lymphatiques, de par leurs jonctions cellulaires lâches et leur débit lent, sont considérés dans certains cancers comme les voies principales empruntées pour la dissémination métastatique. Les vaisseaux lymphatiques peuvent être intra- ou péri-tumoraux et permettraient aux cellules tumorales de s'échapper plus facilement de la tumeur primaire que les vaisseaux sanguins. Un travail récent révèle que les interactions entre Pdpn, Galectin 8 et les intégrines potentialisent la stimulation lymphangiogénique induite par le VegfC, révélant que Pdpn est un acteur essentiel de la lymphangiogenèse pathologique ([Chen et al., 2016](#)).

L'expression de Pdpn dans les CAFs a été observée dans de nombreux carcinomes et souvent associée à la présence de métastases dans les ganglions lymphatiques, une sévérité de la progression tumorale, un faible grade de différenciation et une survie réduite des patients ([pour](#)

revue, Dang *et al.*, 2014). Notamment, dans le cancer du sein invasif, l'expression de Pdpn dans les CAFs a été associée à un mauvais pronostic corrélant avec une invasion des ganglions lymphatiques, un faible grade de différenciation et des tumeurs agressives négatives pour les récepteurs hormonaux (Schoppmann *et al.*, 2012; Pula *et al.*, 2013). Le rôle de Pdpn dans les CAFs reste à déterminer de façon précise.

Contexte, objectifs de l'étude et approches expérimentales

L'analyse transcriptionnelle comparée des cellules basales et luminales isolées à partir d'épithélium mammaire murin et humain, a classé la *Pdpn* parmi les gènes les plus fortement exprimés dans les cellules basales, au même titre que *Krt5/14*, *Acta2*, *Snai2* et *Trp63* (Lim *et al.*, 2010). Par immuno-marquage, nous avons confirmé que l'expression de *Pdpn* était restreinte à la couche basale de l'épithélium mammaire (Fig. 29). Celle-ci abrite des cellules souches et progénitrices qui gouvernent le développement de la glande et dont la dérégulation pourrait être à l'origine de certains cancers du sein (pour revues, Visvader, 2009; Macias et Hinck, 2012).

La *Pdpn* est essentielle au développement précoce, au maintien de l'intégrité de nombreux tissus et joue un rôle important dans la morphogenèse, la plasticité, la migration et la contractilité cellulaires (Wicki *et al.*, 2006; Martin-Villar *et al.*, 2006; Astarita *et al.*, 2012; Acton *et al.*, 2014; Renart *et al.*, 2015; Astarita *et al.*, 2015). De plus, elle est exprimée au front invasif de diverses tumeurs solides, suggérant son implication dans la progression et l'invasion tumorales (pour revue, Wicki et Christofori, 2007). La distribution précise et le rôle potentiel de la *Pdpn* dans le tissu mammaire n'ont pas été étudiés à ce jour.

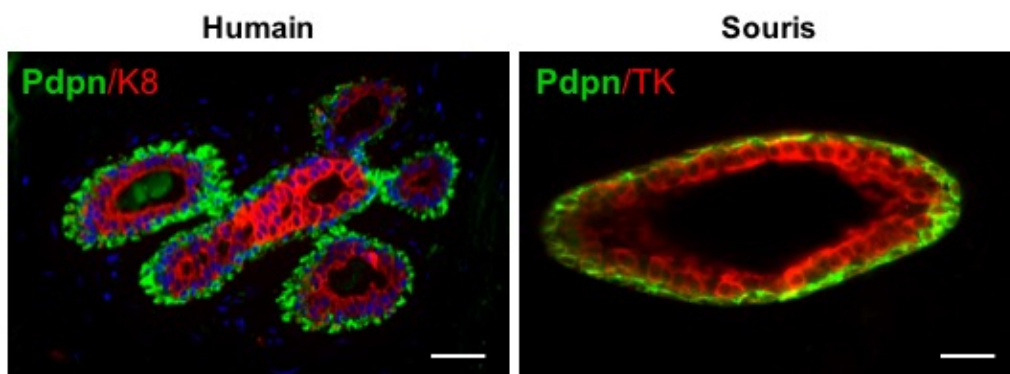


Figure 29 : Expression de la *Pdpn* dans l'épithélium mammaire humain et murin

Gauche : Immunofluorescence avec les anticorps anti-K8 et anti-*Pdpn* sur coupe histologique de glande mammaire normale humaine issue de mammoplastie chirurgicale. Les noyaux sont marqués au Dapi (bleu). Barre d'échelle = 30 μ m. **Droite :** Coupe transversale d'un canal mammaire murin marqué avec les anticorps anti-pan kératine (TK) et anti-*Pdpn*. Barre d'échelle = 60 μ m.

Le but de mon travail de thèse consistait en l'étude du rôle joué par la *Pdpn* dans le développement, la fonction des cellules souches et la tumorigenèse mammaires. Les points essentiels de cette étude sont développés ci-après. J'ai notamment :

- analysé la distribution de *Pdpn* au cours du développement de la glande mammaire ;

- généré des souris *K5Cre;Pdpn^{F/F}* présentant une inactivation de la Pdpn ciblée dans la couche basale mammaire et étudié leur phénotype mammaire aux stades essentiels du développement post-natal, puberté, maturité, gestation et lactation;
- isolé les cellules basales et luminales, contrôles et mutantes, et comparé leur activité souche/progénitrice par des essais de transplantation, de formation de colonies et de mammosphères;
- analysé les caractéristiques moléculaires des cellules basales et luminales, contrôles et mutantes ;
- précisé les mécanismes moléculaires impliquant la Pdpn à l'aide d'expériences de gain de fonction dans une lignée de cellules basales mammaires établie dans le groupe (Deugnier *et al.*, 1999; Deugnier *et al.*, 2002).
- étudié l'impact de la perte de la Pdpn dans le modèle murin de tumorigenèse mammaire, *K5ΔNβcat* qui exprime une forme constitutivement active de la βcat dans la couche basale mammaire et développe des carcinomes mammaires triple-négatifs de type basal (Teulière *et al.*, 2005; Moumen *et al.*, 2013).

Les résultats obtenus dans les modèles murins sont présentés dans l'article joint avec un résumé des données principales (page 98) et une partie de résultats additionnels (page 140).

En complément de ces études et pour évaluer si la Pdpn peut représenter un facteur pronostique ou diagnostique intéressant, j'ai analysé son expression dans différents sous-types de cancers du sein, grâce à une collection d'échantillons de tumeurs de patientes sur « tissue microarrays » (TMA) établie par l'équipe médicale de l'Institut Curie (programme Pic-BIM).

Par ailleurs, j'ai contribué à la caractérisation d'un nouveau marqueur de la population luminale clonogénique, ICAM-1, qui fait l'objet d'une étude publiée et jointe en annexe 1 du document (Di-Cicco *et al.*, 2015).

RESULTATS

I) La perte de Podoplanine perturbe la fonction des cellules souches et la tumorigénèse mammaires par la modulation de la voie de signalisation Wnt/ β caténine

Cette étude a fait l'objet d'un article scientifique soumis dans le journal « Development » dont le résumé des principaux résultats est présenté ci-dessous.

1) Dans l'épithélium mammaire post-natal, la Pdpn est exprimée exclusivement dans le compartiment basal, incluant les cellules souches bipotentes

Nous avons analysé l'expression de la Pdpn par immunohistofluorescence au cours du développement mammaire (Bresson et al., Fig.1). Elle est présente au jour 15 de l'embryogénèse dans la totalité du bourgeon mammaire largement positif à ce stade pour K5. Après la naissance, durant la puberté, la maturité, et la gestation, son expression est restreinte à la couche basale de l'épithélium mammaire, comprenant les cellules de la coiffe des TEBs et les cellules myoépithéliales canalaire et alvéolaires. A ces stades, l'expression de Pdpn est concentrée aux contacts intercellulaires et co-localise avec pERM (Bresson et al., Fig.1). La Pdpn est absente des cellules myoépithéliales dans la glande au 4^{ème} jour de lactation.

En cytométrie de flux, l'expression de Pdpn et CD24 dans les cellules épithéliales a permis de discriminer, à tous les stades du développement post-natal, une population distincte positive pour CD24 et exprimant fortement Pdpn. En accord avec les données *in situ*, la population isolée positive pour Pdpn exprime les gènes spécifiques du lignage basal. Elle contient de plus la totalité de la capacité de régénération après transplantation, démontrant que les cellules souches bipotentes expriment Pdpn (Bresson et al., Fig.1 et Sup.1).

2) La perte de Pdpn dans l'épithélium mammaire entraîne un défaut fonctionnel des cellules souches basales et luminales

Le modèle murin *K5Cre;Pdpn^{F/F}* présente une perte totale d'expression de Pdpn dans la couche basale mammaire. Comme attendu, les cellules stromales non ciblées par le promoteur K5 conservent leur expression en Pdpn. Par croisement des souris *K5Cre;Pdpn^{F/F}* avec les souris rapporteuses *Rosa26-LacZ*, nous avons montré que les cellules déficientes en Pdpn donnaient naissance à la totalité de l'épithélium mammaire, basal et luminal, et ainsi confirmé la délétion

initiale de Pdpn dans une cellule souche embryonnaire bipotente, positive pour K5 (Bresson et al., Fig.2).

L'épithélium mammaire des souris déficientes en Pdpn (dit mutant) a été analysé à différents stades du développement, notamment en puberté et maturité présentés dans cet article (Bresson et al., Fig.2), et en gestation/lactation qui font l'objet de résultats supplémentaires (page 140). Au stade adulte vierge, les souris mutantes présentent un épithélium plus simple avec une quantité de ramifications secondaires et tertiaires inférieure à leurs contrôles de portée, et les analyses par cytométrie de flux révèlent un compartiment basal réduit (Bresson et al., Fig.2). Les cellules basales mutantes ont une fréquence en cellules souches bipotentes capables de régénération trois fois plus faible que les contrôles et un potentiel clonogénique diminué de moitié, en culture 2D et condition mammosphère (Bresson et al., Fig.2, Fig.3 et Sup. 3). Les mammosphères de première génération obtenues à partir de cellules basales déficientes en Pdpn contiennent moins de cellules métaboliquement actives, et sont enrichies en cellules double-positives pour les marqueurs spécifiques des lignages basal et luminal, K5 et K8. De plus, la capacité des sphères mutantes à générer des sphères de seconde et troisième générations, est réduite (Bresson et al., Fig.3). Le défaut de clonogénicité apparaît dès la puberté, bien que le développement canalaire et l'organisation des TEBs semblent normaux (Bresson et al., Fig.2 et Sup.2). L'ensemble de ces résultats indique que la perte de Pdpn affecte la fonction des cellules souches basales, en perturbant leurs capacités de prolifération ou survie, d'auto-renouvellement et de différenciation. En ligne avec ces perturbations, la population luminale mutante dérivant de cellules souches basales déficientes en Pdpn présente une réduction de 25% de cellules progénitrices capables de former des colonies en culture (Bresson et al., Fig.4).

Pour confirmer que les défauts observés sont inhérents à l'épithélium, des transplantations en série de fragments d'épithélium ont été réalisées. L'analyse de ces greffons a montré que le potentiel régénératif de l'épithélium mutant adulte était restreint après 3 transplantations, indiquant qu'en accord avec la diminution d'activité des cellules souches basales et luminales, la perte de Pdpn induit une réduction de développement tissulaire à long-terme (Bresson et al., Fig.2).

3) L'épithélium mammaire déficient en Pdpn présente une perturbation d'expression des composants de la voie de signalisation Wnt/ β cat

La fonction des cellules souches mammaires est maintenue par un ensemble complexe de régulateurs, comprenant notamment des acteurs majeurs de la voie Wnt/ β cat, comme Wnt4 et Rspo1 (Cai *et al.*, 2014). Dans le compartiment basal isolé à partir de souris adultes déficientes en Pdpn, nous avons observé, par qPCR, une perturbation de l'expression génique de certains composants du signalosome de Wnt. Les cellules basales déficientes en Pdpn présentent une expression plus élevée des récepteurs *Fzd7* et *Lgr5* et une régulation négative de certains gènes cibles de la voie Wnt, dont *Ccnd1*, *Krt15*, *Vcan* et *Jag1* (codant pour la Cycline D1, K15, Versican et Jag1). L'expression différentielle des gènes cités ci-dessus permet de ségréger clairement les cellules basales contrôles et mutantes (Bresson *et al.*, Fig.3 et Sup.4).

L'analyse de l'expression d'ICAM-1 dans le compartiment luminal des souris mutantes a révélé une surreprésentation de la population ER/PR+ au détriment de celle des progéniteurs luminaux majoritairement ER/PR-. Cette perturbation de balance des lignages luminaux est associée à une légère augmentation de l'expression génique de *Wnt4*, produit par les cellules ER/PR+, et une diminution de *Rspo1*, exprimé par les cellules progénitrices ER/PR- (Bresson *et al.*, Fig.4).

L'ensemble de ces résultats indique que la perte de Pdpn *in vivo* est associée à une perturbation d'expression de différents éléments de la voie Wnt/ β cat, dans les cellules basales et luminales mammaires et suggère une modulation négative de la signalisation Wnt/ β cat dans les cellules basales déficientes en Pdpn.

4) La Pdpn module positivement la voie de signalisation Wnt/ β cat dans les cellules basales mammaires

Afin d'étudier l'implication de la Pdpn dans la voie Wnt/ β cat en dehors de la complexité du contexte *in vivo*, nous l'avons surexprimé, de manière stable, dans une lignée de cellules basales mammaires murines établie au laboratoire à partir de la lignée mammaire murine HC11 (Deugnier *et al.*, 1999; Deugnier *et al.*, 2002). La lignée BC44 utilisée exprime les marqueurs majeurs du lignage basal, comprenant K5, K14, Cdh3, DNp63 et les intégrines β 1, α 6 et β 4 mais est dépourvue de Pdpn (Bresson *et al.*, Fig.5). La stimulation avec Wnt3a des cellules BC44 exprimant de façon forcée la Pdpn, en présence ou en absence de Rspo1, a révélé une augmentation significative de la réponse à la signalisation Wnt/ β cat, analysée au niveau moléculaire par l'expression de l'*Axin2*,

par l'activation et la translocation nucléaire de la β cat (Bresson et al., Fig.5 et Sup. 5). Dans ce modèle, la Pdpn est donc un acteur positif de la signalisation Wnt/ β cat induite par Wnt3a et amplifiée par Rspo1. De plus, la transfection transitoire d'une forme tronquée de la β cat, non phosphorylable et constitutivement active, dans les cellules BC44 positives pour Pdpn entraîne le même type de réponse potentialisée quantifiée à l'aide du système rapporteur TopFlash (Bresson et al., Fig.5). L'ensemble de ces expériences de gain de fonction nous a permis de révéler le rôle potentiateur de la Pdpn dans la signalisation Wnt/ β cat.

5) La perte de Pdpn atténue la formation de tumeurs triple-négatives dans un modèle murin de tumorigénèse mammaire induite par l'activation de la voie Wnt/ β cat

La voie Wnt/ β cat étant impliquée dans le développement des tumeurs du sein triple-négatives, nous avons analysé le rôle potentiel de la Pdpn dans le développement de tumeurs de ce type en utilisant le modèle murin de tumorigénèse $K5\Delta N\beta cat$ établi au laboratoire. L'analyse des tumeurs développées par les souris $K5\Delta N\beta cat$ en immunohistofluorescence et cytométrie de flux a montré que la Pdpn est exprimée dans la majorité des cellules tumorales positives pour K5 et plus fortement au front invasif de ces tumeurs (Bresson et al., Fig.6).

L'impact de la perte de Pdpn sur la formation des tumeurs mammaires a été analysé dans des souris $K5\Delta N\beta cat$ croisées avec les souris $K5Cre;Pdpn^{F/F}$. Les tumeurs déficientes en Pdpn apparaissent plus tardivement et en moindre nombre que chez les contrôles. La population tumorale déficiente en Pdpn, isolée par cytométrie de flux, présente une capacité de formation de sphère en 3D réduite. L'analyse des caractéristiques moléculaires des cellules tumorales mutantes, par qPCR et Western blot, a confirmé leur identité basale, et révélé qu'elles présentaient une surexpression de la cadhérine E et une diminution de l'expression de certains marqueurs mésenchymateux (Vimentine, Snai1, Twist1 ; Bresson et al., Fig.6). Ces résultats suggèrent que la perte de Pdpn dans les tumeurs mammaires induites par l'activation ectopique de la β cat entraîne une atténuation de leur formation associée à un phénotype moléculaire plus épithélial ainsi qu'à un défaut fonctionnel de la sous-population de cellule tumorale initiatrice de tumeurs. Comme dans le modèle cellulaire BC44, la présence de Pdpn semble donc entraîner une potentialisation de la voie Wnt/ β cat.

L'analyse de l'épithélium mammaire des souris *K5ΔNβcat* déficientes en Pdpn à l'état nullipare, avant l'apparition des tumeurs, est présentée dans la partie des résultats supplémentaires (page [151](#)).

6) Conclusion de l'article

Dans leur ensemble, nos résultats indiquent que la Pdpn, exprimée spécifiquement dans la couche basale de l'épithélium mammaire, participe à la régulation des cellules souches/progénitrices normales et des cellules tumorales initiatrices de tumeurs, probablement par la potentialisation de la voie de signalisation Wnt/βcat.

Article soumis dans le journal « Development » : Podoplanin regulates mammary stem cell function and tumorigenesis by modulating Wnt/βcat signaling.

Podoplanin regulates mammary stem cell function and tumorigenesis by modulating Wnt/ β -catenin signaling

Laura Bresson^{a, b, c, d}, Marisa M. Faraldo^{a, d, e}, Amandine Di-Cicco^{a, d}, Miguel Quintanilla^f, Marina A. Glukhova^{a, d, e} and Marie-Ange Deugnier^{a, d, e}

The authors have no conflict of interest to disclose

^a Institut Curie, PSL Research University, CNRS, UMR144, Paris, F-75248, France

^b Université Paris Sud, Université Paris-Saclay, F-91405 Orsay, France

^c Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, F-75005, Paris, France

^d Equipe labellisée Ligue Nationale Contre le Cancer, 2013

^e INSERM, Paris, F-75013, France

^f Instituto de Investigaciones Biomedicas Alberto Sols , CSIC-UAM, Madrid, Spain

Corresponding author: Marie-Ange Deugnier , Institut Curie, PSL Research University, CNRS, UMR 144, 26 rue d'Ulm, F-75005, Paris, France.

marie-ange.deugnier@curie.fr

ABSTRACT

Stem cells (SC) drive mammary development, giving rise postnatally to an epithelial bilayer composed of luminal and basal myoepithelial cells. The molecular identity of SCs and the factors regulating their function remain poorly defined. We identified the transmembrane protein, Podoplanin (Pdpn), as a specific marker of the basal compartment, including multipotent SCs, and found Pdpn localized at the basal-luminal interface. Embryonic deletion of Pdpn targeted to basal cells diminished basal and luminal SC activity and affected expression of several Wnt/ β -catenin (Wnt/ β -cat) signaling components. Moreover, Pdpn loss attenuated mammary

tumor formation in a mouse model of β -cat-induced breast cancer, limiting tumor-initiating cell expansion and promoting molecular features associated with mesenchymal-to-epithelial cell transition. In line with the loss-of-function data, we demonstrated that mechanistically, Pdpn enhanced Wnt/ β -cat signaling in mammary basal cells. Overall, our study reveals a role for Pdpn in mammary development and tumorigenesis through the control of Wnt/ β -cat -responsive SCs.

KEY WORDS: Mammary gland, Stem cells, Breast cancer, Wnt signaling, Podoplanin

INTRODUCTION

Mammary development initiates during embryogenesis however, its major part occurs postnatally. During puberty, the mammary ducts elongate and ramify extensively, generating a ductal network in sexually mature females. Pregnancy is characterized by ductal side branching and alveoli formation. Lactational differentiation is followed by involution at weaning. Systemic hormonal cues and various local stimuli, including growth factors, cell-cell and cell-matrix interactions, control the morphogenesis and remodeling of the postnatal mammary gland ([Macias and Hinck, 2012](#); [Glukhova and Streuli, 2013](#)).

The mammary epithelium is organized as a bilayer, with an outer layer of basal myoepithelial cells and an inner layer of luminal cells. During lactation, the luminal cells produce milk, whereas the myoepithelial cells are contractile and serve for milk expulsion. Basal myoepithelial cells express basal-specific keratins (including K5/14), P-cadherin, smooth muscle-specific contractile proteins, and the transcription factors DNp63 and Slug/Snail2, which are essential for the maintenance of basal cell identity ([Yalcin-Ozuyal et al., 2010](#); [Guo et al., 2012](#)). The

luminal cell layer is characterized by the expression of K8/18. It includes a subset of hormone-sensing cells that express estrogen, progesterone and prolactin receptors (ER, PR and PrIR, respectively), essential for mammary development ([Briskin and O'Malley, 2010](#)).

It is established that both mammary lineages, basal and luminal, originate from a common embryonic stem cell (SC) expressing basal keratins ([van Keymeulen et al., 2011](#); [Moumen et al., 2012](#)). In the postnatal mammary gland, multipotent SCs able to repopulate the entire epithelium upon transplantation have been localized to the basal compartment ([Visvader and Stingl, 2014](#)). Data from lineage-tracing studies have revealed the existence of basal and luminal lineage-restricted SCs ([van Keymeulen et al., 2011](#); [Prater et al., 2014](#); [Rios et al., 2014](#)). The precise molecular characteristics of multipotent and lineage-restricted SCs remain unknown, and their respective contributions to mammary bilayer development and homeostasis after birth are still a matter of debate ([Lloyd-Lewis et al., 2017](#)). Nevertheless, in recent years, considerable interest has focused on these cell subsets, from which certain breast cancers are

thought to originate, particularly cancers of the triple-negative subtype (TNBC), lacking ER, PR and amplified HER2, often associated with a poor prognosis (Visvader and Stingl, 2014; Skibinski and Kuperwasser, 2015).

Many studies have shown that canonical Wnt signaling (Wnt/ β -cat) is essential for normal mammary development (Yu et al., 2016). In addition, this pathway is frequently deregulated in TNBCs (Pohl et al., 2017). Wnt/ β -cat signaling has been shown to play a major role in controlling the expansion of the basal cell population during postnatal mammary development (Teulière et al. 2005; Zeng and Nusse, 2010; Macias et al., 2011; van Amerongen et al., 2012; Cai et al., 2014; Rajaram et al., 2015). Basal cells display a complex Wnt receptor machinery, including Fzd7, Lrp5/6 and the R-spondin (Rspo) receptors Lgr4/5/6, known to modulate Wnt/ β -cat signal strength (Badders et al., 2009; de Visser et al., 2012; Wang et al., 2013; Chakrabarti et al., 2014; Blaas et al., 2016; Driehuis and Clevers, 2017). Luminal cells have been identified as a major source of Wnt-associated ligands. In particular, they produce Wnt4 and Rspo1, two major regulators of paracrine Wnt/ β -cat activation in basal cells (Cai et al., 2014; Rajaram et al., 2015).

Comparative transcriptome analyses of basal and luminal cells isolated from adult mouse and human mammary glands indicated that podoplanin (*Pdpn*) was among the top ranking genes characterizing the basal cell signature (Lim et al., 2010). However, its functional importance remains unknown. *Pdpn* is a small mucin-type transmembrane protein composed of a glycosylated extracellular domain, a transmembrane region and a short cytoplasmic tail devoid of enzymatic activity (Renart et al., 2015). Widely used as a marker of lymphatic endothelial cells, *Pdpn* is also displayed by various other cell types, including

certain epithelial cells, and is overexpressed in human carcinomas of different tissular origin (Schacht et al., 2005; Wicki and Christophori, 2007; Ugorski et al., 2016).

Pdpn-null mice die before or shortly after birth, exhibiting defects in lung organogenesis, cardiac function and blood-lymph separation (Astarita et al., 2012). *Pdpn* is therefore critical for the early development of several tissues. Most of the data concerning the physiological function of *Pdpn* comes from studies on the immune system focusing on the ability of the extracellular domain of *Pdpn* to bind the C-type lectin, Clec2 (Suzuki-Inoue et al., 2007). Heterotypic signaling from *Pdpn*- to Clec2-expressing immune cells is crucial for platelet activation, blood-lymph separation and dendritic cell migration (Astarita et al., 2012).

Pdpn function in epithelial cells has been mostly investigated in culture. The ectopic expression of *Pdpn* in various epithelial cell lines promotes cell motility, modifying actin cytoskeleton organization (Martin-Villar et al., 2006; Wicki et al., 2006; Cueni et al., 2010). At the molecular level, *Pdpn* has been shown to interact, via its intracellular domain, with the membrane cytoskeleton linkers Ezrin and Moesin (members of the ERM family). Moreover, *Pdpn* has been reported to modulate RhoGTPases activity, in fibroblasts and epithelial cells (Martin-Villar et al., 2006; Wicki et al., 2006; Cueni et al., 2010; Acton et al., 2014; Astarita et al., 2015).

We used a conditional gene deletion approach to investigate the role of *Pdpn* in mammary development and tumorigenesis. Our data reveal that *Pdpn* participates in the control of basal SC function, through positive regulation of the Wnt/ β -cat signaling pathway. Moreover, using a mouse model of β -cat-induced TNBC, we found that *Pdpn* loss limited tumor-initiating cell (TIC) expansion, attenuating mammary tumorigenesis.

RESULTS

In the postnatal mammary gland, *Pdpn* is expressed exclusively in the basal compartment including multipotent SCs

Pdpn was present throughout the mammary bud on embryonic day 15 (E15), and was strongly expressed at cell-cell contacts (Fig. 1A). After birth, *Pdpn* expression was restricted to the basal cell layer. Ductal myoepithelial cells and the basal cap cells of the terminal end buds (TEB), specialized structures driving ductal growth and branching during puberty, expressed *Pdpn*, as did ductal and alveolar myoepithelial cells in pregnant mouse glands (Fig. 1B and C). Differentiated myoepithelial cells on day 4 of lactation stained negative for *Pdpn* (Fig. 1D). Of note, *Pdpn* was concentrated at the apical and lateral surfaces of myoepithelial cells in ducts and alveoli and colocalized with p-ERM at the basal-luminal interface (Fig. 1B and C). Basal cells, unlike luminal cells, expressed moesin rather than ezrin (Fig. S1A).

To complement immunohistological data, we performed flow cytometry analyses. Mammary cells were isolated at representative stages of the postnatal development, including puberty, maturity, early and late gestation, and stained for CD45, CD31, CD24 and *Pdpn*. At each stage of development, two distinct populations, *Pdpn*⁺ and *Pdpn*⁻, were detected within the pool of CD31/45⁻ CD24⁺ epithelial cells (Fig. 1E). An analysis of gene expression showed that the *Pdpn*⁺ population consisted of cells expressing the basal-specific markers *Trp63* (encoding p63) and *Acta2* (encoding α -smooth muscle actin, SMA), while the *Pdpn*⁻ population comprised the K8⁺ luminal cells (Fig. 1F). These data demonstrate that *Pdpn* is a reliable and specific surface marker of mammary basal cells in flow cytometry experiments. The *Pdpn* receptor, *Clec2*, was absent from the CD24⁺ basal and luminal cell populations, indicating that *Pdpn*-*Clec2* interactions do not occur in the mammary bilayer (Fig. S1B).

To ascertain that the *Pdpn*⁺ cell population contained the multipotent SC subset, we compared the regenerative potential of the *Pdpn*⁺ and *Pdpn*⁻ epithelial cell populations isolated from adult virgin glands in limiting-dilution transplantation assays. Repopulating activity, characterized by ductal outgrowths in virgin hosts and alveolar development in pregnant recipients, was restricted to the *Pdpn*⁺ cell fraction (Fig. 1G and S1C), showing that *Pdpn* marked multipotent SCs.

K5Cre; Pdpn^{F/F} mice display *Pdpn* depletion in the mammary epithelium

To investigate the role of *Pdpn* in mammary development and SC function, we generated *K5Cre;Pdpn*^{F/F} mice, in which *Pdpn* was deleted specifically in K5-expressing epithelial cells. Flow cytometry and immunohistofluorescence analyses showed *Pdpn* to be absent from the entire basal cell compartment of adult *K5Cre;Pdpn*^{F/F} mammary glands (Fig. 2A and S2A). As expected, the non-targeted CD24⁻ mammary stromal cells expressed *Pdpn* (Fig. 2A).

We monitored *Pdpn* deletion from the mutant epithelium, by crossing *K5Cre;Pdpn*^{F/F} mice with the *Rosa26-LacZ* reporter mouse strain (R26) and analyzing *LacZ* activity in five-month-old virgin mouse mammary glands. As in the control *K5Cre;R26* mammary epithelium, both basal and luminal cells were *LacZ*-positive in mutant *K5Cre;Pdpn*^{F/F}; R26 glands (Fig. 2B), indicating that the entire mutant epithelium was derived from *Pdpn*-null multipotent SCs.

The *K5Cre;Pdpn*^{F/F} mice were healthy, fertile and displayed normal postnatal development. We did not observe any deleterious phenotype in skin, a tissue targeted by the K5 promoter (Ramirez et al., 2004). Mutant dams were able to feed their pups, indicating that *Pdpn* loss did not compromise lactation.

The mammary basal population of pubescent *Pdprn*-deficient mice has a reduced SC content

To evaluate the role of *Pdprn* in mammary morphogenesis during puberty, we performed whole mount and histological analyses on glands from six-week-old *K5Cre;Pdprn^{F/F}* mutant females and their control *Pdprn^{F/F}* littermates. Overall, ductal elongation and branching were similar in mutant and control glands (Fig. 2C and S2B). *Pdprn*-deficient ducts and TEBs had a normal organization, with inner luminal cells and outer K5- and SMA-expressing myoepithelial cells (Fig. S2C). As in the control epithelium, a large proportion of luminal cells in mutant ducts and TEBs expressed nuclear PR (Fig. S2C).

Flow cytometry data showed that the proportion of basal cells was unaffected in the mutant epithelium (Fig. S2D). However, *ex vivo* mammosphere-formation assays, used to assess stem/progenitor cell activity (Spike et al., 2012; Chiche et al., 2013), revealed that purified *Pdprn*-null basal cells were significantly less clonogenic than control cells (Fig. 2D). Thus, although *Pdprn* loss had no measurable effect on mammary ductal morphogenesis during puberty, it caused a decrease in basal SC content.

Pdprn loss affects mammary duct branching and SC activity in adult virgin mice

We then compared the mammary glands of adult virgin mutant and control mice. Whole mount analyses revealed a lower degree of mammary branching in *Pdprn*-deficient females than in their control littermates (Fig. 2E). Mutant mammary ducts appeared normally organized, however flow cytometry data revealed that the percentage of basal cells was significantly lower in the *Pdprn*-deficient than in the control epithelium (Fig. S3A and 2F). Expression levels for the integrin $\alpha 6$ (*Itga6/CD49f*) and $\beta 1$ chains (*Itgb1/CD29*) were identical in control and mutant basal cells (Fig. 2F and S3B).

Colony formation assays showed that adult *Pdprn*-null basal cells were half clonogenic as control cells (Fig. 2G). We explored the functional importance of *Pdprn* for

SC activity further, by comparing the regenerative potential of control and mutant basal cells isolated from mammary glands of adult virgin mice in limiting-dilution transplantation assays. When transplanted in large numbers, *Pdprn*-null basal cells were able to fully colonize cleared fat pads, giving rise to well-organized mammary ducts. However, their SC content was reduced by a factor 2.8, compared to the control basal cell population (Fig. 2H and S3C).

We next investigated the long-term regenerative potential of *Pdprn*-deficient mammary epithelium, by serially transplanting epithelial fragments. *Pdprn* deletion was confirmed by qPCR in mutant basal cells isolated from grafted tissues (Fig. S3D). Basal cells isolated from the primary, secondary and tertiary outgrowths were assessed for their clonogenic capacities. Unlike their control counterparts, mutant basal cells displayed a marked decrease in their clonogenic ability after one round of transplantation (Fig. S3E). Consistent with these findings, whole mount analyses of tertiary outgrowths showed that *Pdprn*-deficient epithelial fragments were less competent than control grafts for the production of highly ramified ductal structures occupying more than 25% of the cleared fat pad (Fig. 2I).

Altogether, these data indicated that *Pdprn* deletion affected SC activity in the mammary basal compartment and restricted the developmental capacity of the mammary epithelium at long-term.

The expression of Wnt signaling components is affected in *Pdprn*-null basal cells

To analyze the molecular alterations induced by *Pdprn* loss, we first compared expression of a panel of lineage-specific genes in mammary basal cells purified from control and *K5Cre; Pdprn^{F/F}* adult virgin mice, by qPCR. As expected, the six analyzed mutant cell preparations were devoid of *Pdprn* expression (Fig. S4A). Mutant and control basal cells displayed similar levels of expression for essential basal-specific genes including *Krt5*, *Krt14*, *Cdh3* (encoding P-

cadherin), the transcription factors *Trp63* and *Snai2*, and the smooth muscle-specific genes *Acta2*, *Cnn1* (encoding calponin) and *Myh11* (encoding smooth muscle-specific myosin heavy chain) (Fig. 3A). Basal/myoepithelial lineage specification therefore appears to occur normally in the absence of Pdpn.

Interestingly, two genes encoding components of the Wnt signalosome, *Lgr5* and *Fzd7*, were more strongly expressed in Pdpn-null than in control basal cells (Fig. 3A). We therefore investigated the expression of several Wnt-related genes previously implicated in the control of epithelial cell function

(<http://web.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/>; Rodilla et al., 2009; Moumen et al., 2012; van Amerongen et al., 2012; Meier-Abt et al., 2014; Wang et al., 2015; Yu et al., 2016). Expression of the established Wnt/ β -cat target genes, *Axin2*, *Myc*, *Id2*, *Cdh1* (encoding E-cadherin) and *Procr* (encoding protein C receptor), and the Wnt pathway-associated genes, *Lrp5*, *Lrp6*, *Lgr4* and *Lgr6*, was not significantly modulated in Pdpn-null basal cells (Fig S4B). However, *Ccnd1* (encoding cyclin D1), *Krt15*, *Vcan* (encoding versican) and *Jag1* were less strongly expressed in mutant than in control basal cells (Fig. 3B). Notably, hierarchical clustering of the qPCR data, including those for *Lgr5*, *Fzd7*, *Ccnd1*, *Krt15*, *Vcan* and *Jag1* expression, clearly separated Pdpn-null from control basal cells (Fig. 3B).

We could not analyze *Lgr5* and *Fzd7* expression at the protein level, because no validated antibodies against these receptors in mouse tissues or isolated cells are currently available. However, consistent with the qPCR data, immunofluorescence labeling showed that unlike K5 and K14, K15 was poorly expressed in the basal cell layer of adult virgin Pdpn-deficient glands, whereas, as previously reported (Meier-Abt et al., 2014), the vast majority of control basal myoepithelial cells strongly expressed K15 (Fig. S4C).

Collectively, our data revealed that Pdpn loss affected the expression of Wnt signaling components, including Wnt receptors and Wnt/ β -cat target genes, in mammary basal cells. The low level of *Ccnd1* in Pdpn-null

basal cells is suggestive of impaired cell cycle progression *in vivo*.

Pdpn-null basal SCs have an impaired developmental potential in 3D mammosphere culture

We next compared the developmental potential of control and Pdpn-null basal cells in mammosphere formation assays. In agreement with the data from colony-formation assays (Fig. 2G), Pdpn-null basal cells isolated from adult virgin glands generated half as many primary spheres as control basal cells (Fig. 3C). Moreover, after three serial passages, almost no spheres had formed in the Pdpn-deficient samples (Fig. 3C), indicating a long-term impairment of basal SC maintenance.

The primary spheres derived from mutant basal cells were smaller than those derived from control basal cells (Figs 3C and S4D) and contained more cells expressing K5 (Fig. 3D). The number of metabolically active cells, as measured by the CellTiter-Glo® assay, was smaller in mutant spheres (Fig. 3E), indicating lower levels of cell survival and/or proliferation. Both *Trp63* and *Lgr5* were expressed more strongly in mutant than in control spheres whereas transcript levels for the luminal-specific gene *Krt18* were identical (Fig. 3F). Double immunofluorescence labeling consistently revealed that the K5⁺ cells, particularly abundant in mutant spheres, coexpressed the luminal marker K8 (Fig. 3G).

Thus, in 3D cultures, Pdpn-null basal SCs displayed an impairment of growth and self-renewal relative to control basal cells and they generated more uncommitted K5⁺/K8⁺ cells, indicating an alteration of their developmental potential.

Loss of Pdpn perturbs the luminal compartment of adult virgin mice

The mammary epithelium of adult virgin K5Cre; *Pdpn*^{F/F} mice displayed an increase in the proportion of luminal cells, as a corollary to basal cell depletion (Fig. 2F and 4A). However, in colony-formation assays, the mutant luminal cell population was less clonogenic than the control population, indicating a smaller

progenitor content (Fig. 4B). As luminal progenitors are mostly negative for hormone receptor (HR) (Visvader and Stingl, 2014), these data suggest that Pdpn loss perturbed the balance between the HR⁻ and HR⁺ luminal cell subsets. To analyze the distribution of these subsets, we used ICAM-1, a surface marker that robustly discriminates the clonogenic subset (ICAM1⁺) from the non-clonogenic, mature HR⁺ luminal cells (ICAM1⁻) (Di-Cicco et al., 2015). Consistent with the functional assay, ICAM-1 expression profiles revealed an underrepresentation of the ICAM1⁺ progenitor fraction in the mutant relative to the control luminal population (Fig. 4C).

Wnt4 and Rspo1 are secreted by the HR⁺ and HR⁻ luminal cell fractions, respectively, and play an important role in the paracrine control of Wnt/β-cat activation in basal SCs (Cai et al., 2014; Rajaram et al., 2015; Di-Cicco et al., 2015). Using qPCR, we revealed a lower level of Rspo1 expression and higher levels of Wnt4 and HR transcripts in the mutant than in the control luminal cell population (Fig. 4D). Thus, consistent with its lower progenitor content and higher proportion of mature HR⁺ cells, the mutant luminal cell population is characterized by altered levels of Rspo1 and Wnt4 expression.

Pdpn acts as a positive regulator of Wnt/β-cat signaling in mammary basal SCs

To directly investigate the role of Pdpn in the response of mammary basal cells to Wnt signaling, we took advantage of the mouse mammary cell line BC44, characterized in previous studies (Deugnier et al., 2002). Parental BC44 cells display basal progenitor features, but lack Pdpn expression. We therefore established stable derivatives expressing full-length Pdpn (BC44-Pdpn). BC44 cells transfected with an empty vector were used as controls. Flow cytometry analysis showed that more than 90% of the BC44-Pdpn cells expressed Pdpn whereas Pdpn was completely absent from control cells (Fig. 5A). Surface levels of Pdpn expression were similar in BC44-Pdpn cells and basal cells freshly isolated from control mammary

epithelium (Figs. 2A and 5A). Like parental BC44 cells, the transfectants stained positive for the basal-specific markers, Itga6, K5 and p63 (Fig. 5A and B). Moreover, they strongly expressed basal-specific components of the Wnt signalosome, including *Fzd7*, *Lrp5/6* and the Rspo receptor, *Lgr4* (Fig. S5A and B).

We compared the Wnt response of BC44 cell transfectants, by first stimulating them with Wnt3a, a Wnt ligand known to activate Wnt/β-cat signaling in mammary basal cells, inducing expression of target genes, such as *Axin2* (Zeng and Nusse, 2010). Dose-response assays showed that BC44 control cells significantly upregulated *Axin2* upon stimulation with 40 ng/ml Wnt3a (Fig. S5C). Strikingly, Wnt3a treatment induced much higher levels of *Axin2* expression in BC44-Pdpn than in control cells (Fig. 5C). A similar differential response was observed after cotreatment with Wnt3a and Rspo1, Rspo1 potentiating the Wnt signal as expected (Fig. 5D). Consistent with the gain-of-function studies in BC44 cells, Wnt3a/Rspo1 cotreatment induced higher levels of *Axin2* expression in Pdpn-expressing than in Pdpn-null basal cells isolated from control and mutant adult virgin glands respectively (Fig. 5E).

As an additional readout for Wnt/β-cat activation, we performed western blot analysis to assess the levels of activated β-cat in BC44 transfectants. In agreement with the data of the *Axin2* induction assays, BC44-Pdpn cells treated with Wnt3a were found to contain larger amounts of activated β-cat than stimulated control cells (Fig. 5F). Moreover, following stimulation with Wnt3a, β-cat was detected in the nuclei of multiple BC44-Pdpn cells whereas control cells displayed rare β-cat-containing nuclei (Fig. 5G).

Finally, we performed TOPFlash reporter assays in BC44-Pdpn and control cells transiently transfected with a construct encoding a constitutively active N-terminally truncated β-cat (ΔNβ-cat). The induction of TOPFlash reporter activity in BC44-Pdpn cells was three times as strong as that in control cells (Fig. 5H). Thus, collectively, our data strongly indicate that Pdpn can potentiate

Wnt/ β -cat signaling events in mammary basal SCs.

Loss of Pdpn attenuates β -cat-induced mammary tumorigenesis

There is a large body of data supporting a critical role for Wnt/ β -cat signaling in TNBCs (Pohl et al., 2017). We therefore investigated the possible role of Pdpn in TNBCs, using a mouse model of tumorigenesis established in our previous studies. *K5 Δ N β -cat* mice express Δ N β -cat in the mammary basal cell layer and develop triple-negative basal-like mammary tumors (Teuliere et al., 2005; Moumen et al., 2013). Double immunofluorescence labeling of *K5 Δ N β -cat* tumors revealed that Pdpn was expressed in most tumor cells, colocalizing with K5 (Fig. 6A). Bright Pdpn⁺ cells were often detected at the edge of the tumor (Fig. 6A). Flow cytometry analysis confirmed that almost all the CD24⁺ epithelial cells in *K5 Δ N β -cat* tumors expressed Pdpn (Fig. 6B).

To study the contribution of Pdpn to tumor formation, we crossed *K5 Δ N β -cat* mice with *K5Cre; Pdpn^{F/F}* mice and compared tumors developed in the presence (*K5 Δ N β -cat; K5Cre⁻; Pdpn^{F/F}* control mice) and absence (*K5 Δ N β -cat; K5Cre⁺; Pdpn^{F/F}* mutant mice) of Pdpn. The absence of Pdpn in the CD24⁺ cell population of the tumors developed by mutant mice was confirmed by flow cytometry (Fig. 6B). Expression of Δ N β -cat was not affected

by Pdpn loss (Fig. 6C). Like control, the mutant tumors consisted essentially of K5-positive basal cells that did not express K8, as shown by qPCR (Fig. 6C). Interestingly, we found that E-cadherin levels were higher and vimentin levels lower in Pdpn-deficient tumors, for both mRNA and protein (Fig. 6D and E). *Snai2* expression was unaffected, but the expression of *Snai1* and *Twist1*, two master epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)-inducing transcription factors (Nieto et al., 2016), was weaker in the absence of Pdpn (Fig. 6D).

Cohorts of Pdpn-mutant females and their control littermates were monitored for mammary tumor formation until the age of 15 months. Tumor onset was slightly but significantly delayed in the absence of Pdpn (Fig. 6F). Moreover, the number of mammary tumors per mouse was markedly smaller in mutant females (Fig. 6F), suggesting a possible effect on the tumor-initiating cell (TIC) pool. We tested this hypothesis by assessing the ability of purified CD24⁺ tumor cells to form spheres in 3D culture. These assays revealed a significantly smaller tumorsphere-forming cell content in Pdpn-deficient than in Pdpn-proficient tumors (Fig. 6G).

Thus, Pdpn deletion attenuated the formation of β -cat-induced mammary tumors and caused TIC depletion. In addition, Pdpn-deficient tumors displayed molecular features associated with a mesenchymal-to-epithelial cell transition (MET) program.

DISCUSSION

Our study uncovers a role for Pdpn in mammary SC function and tumorigenesis. In particular, we report that Pdpn i) is a specific marker of the basal cell layer, including multipotent SCs ii) participates in the control of basal SC activity and iii) favors mammary tumorigenesis in a model of TNBC. Mechanistically, Pdpn was found to potentiate Wnt/ β -cat signaling in basal SCs.

Pdpn expression in the mammary gland is spatially and temporally regulated

We found that Pdpn was exclusively displayed by basal cells in pubescent or sexually mature virgin and pregnant mice. The cap cells of TEBs, ductal and alveolar myoepithelial cells displayed intense staining for Pdpn whereas luminal cells were negative. This non-overlapping pattern of expression makes Pdpn a robust surface marker for separating basal and luminal cells by flow cytometry. Importantly, Pdpn labels adult multipotent SCs residing in the basal compartment.

Recent studies have identified Pdpn as a regulator of the fibroblastic reticular cell contractility, controlling the acto-myosin cytoskeleton through Rho GTPase activation (Acton et al., 2014; Astarita et al., 2015). Pdpn does not appear to be essential for the contractile function of myoepithelial cells, as it is absent from the lactating gland. Conceivably, the functional importance of Pdpn for acto-myosin contractility depends on cell type.

Although we cannot exclude the existence of specific Pdpn receptors in the mammary bilayer, neither basal nor luminal cells expressed Clec2, the partner of Pdpn in immune cells (Suzuki-Inoue et al., 2007; Astarita et al., 2012). Nonetheless, Pdpn was concentrated at basal-to-basal and basal-to-luminal cell contacts, indicating a role in cell-cell communication processes. Pdpn colocalizes with p-ERM, further suggesting that its cytoplasmic tail might transmit signals into basal cells, as reported for immune and epithelial cells of various origin (Martin-Villar et al., 2006; Acton et al., 2014; Astarita et al., 2015).

Pdpn loss causes basal SC depletion and functional impairment

We found that the *K5Cre*-driven embryonic deletion of *Pdpn* affected mammary SC activity in the virgin gland. Pdpn loss caused a depletion of basal SCs and impaired *ex vivo* growth and self-renewal potential. It also resulted in a smaller proportion of clonogenic luminal progenitors. Consistent with these data, Pdpn-deficient epithelial fragments displayed a limited potential for development upon serial transplantation.

In line with the diminished basal SC activity, the basal cell fraction was smaller in the adult virgin mutant epithelium. These alterations were accompanied by a decreased ductal branching complexity. Postnatal mammary development is locally regulated by a complex molecular crosstalk between basal and luminal cells, including direct intercellular and paracrine interactions (Briskin and O'Malley, 2010; Macias and Hinck, 2012). Basal cells are known to produce soluble

growth factors that regulate the luminal progenitor population and are involved in controlling branching morphogenesis (Macias et al., 2011; Forster et al., 2014; Di-Cicco et al., 2015). In turn, hormone-induced paracrine signals from luminal to basal cells, particularly those mediated by Wnt ligands, play an important role in the expansion of basal SCs and branch formation (Yu et al., 2016). Notably, Pdpn is localized at the basal-luminal interface, where paracrine interactions take place, and could thereby contribute to the mechanisms controlling basal SC expansion and mammary morphogenesis.

The lack of Pdpn attenuates Wnt/ β -cat signaling events in basal SCs

The expression of several Wnt-associated genes was altered in Pdpn-null basal cells. In particular, we observed decreased levels of *Ccnd1*, *Krt15*, *Vcan* and *Jag1*, indicating an attenuation of Wnt/ β -cat signaling in Pdpn-null basal cells and providing a molecular basis for their reduced SC activity. Consistently, freshly isolated Pdpn-null basal cells displayed lower levels of *Axin2* induction than control cells following cotreatment with Wnt3a and Rspo1.

Wnt signaling events, triggered by Wnt/Fzd and Rspo/Lgr couples in mammary basal cells, are highly complex and remain poorly deciphered (Yu et al., 2016). Distinct Wnt-associated cell populations have been identified in the basal layer of the postnatal gland, including, in particular, minor subsets consisting of *Axin2*⁺, *Procr*⁺ and *Lgr5*⁺ cells (Zeng and Nusse, 2010; van Amerongen et al., 2012; de Visser et al., 2012; Wang et al., 2015). In addition, *Lgr4* is widely expressed in the basal cell layer (Wang et al., 2013). The *Axin2*⁺ and *Procr*⁺ cell subsets contain Wnt/ β -cat-responsive SCs whereas *Lgr5*⁺ cells do not display the hallmarks of activated Wnt/ β -cat signaling (Zeng and Nusse, 2010; Wang et al., 2015; Fu et al., 2017). Most adult SCs belong to the *Lgr5*⁻ cell population, which accounts for 90% of the basal compartment (Rios et al., 2014; Wang et al., 2015; Trejo et al., 2017). However, according to recent studies, the *Lgr5*⁺ cell subset includes a pool of quiescent

multipotent SCs that may have persisted from the fetal gland (Fu et al., 2017; Trejo et al., 2017).

Pdprn-null basal cells contained higher levels of *Lgr5* transcript than control cells. It remains unclear whether loss of Pdprn results in *Lgr5*⁺ cell enrichment. However, this would be consistent with the lower proliferation activity of Pdprn-null basal cells and their propensity to generate spheres enriched in uncommitted K5⁺/K8⁺ cells, a phenotype characteristic of fetal mammary SCs (Spike et al., 2012).

The production of Wnt ligands by luminal cells in response to ovarian hormones is a major mechanism controlling mammary SC expansion (Briskin and O'Malley, 2010; Yu et al., 2016). *K5Cre; Pdprn^{F/F}* mice had higher levels of *Wnt4* and lower amounts of *Rspo1* transcripts in the luminal compartment. These Wnt ligands are thought to act synergistically to adjust Wnt signal strength in basal cells (Cai et al., 2014; Rajaram et al., 2015). Low *Rspo1* levels might therefore account, in part, for the basal SC depletion observed in *K5Cre; Pdprn^{F/F}* mice.

Pdprn interferes with the Wnt/ β -cat signaling cascade in mammary basal cells

To get mechanistic insights into Pdprn function out of the complexity of the *in vivo* context, we used the previously established mammary basal cell line, BC44 (Deugnier et al., 2002). These cells express the Wnt signalosome components *Fzd7*, *Lrp5/6* and *Lgr4*, but are devoid of Pdprn. Notably, the forced expression of Pdprn in BC44 cells strongly enhanced early Wnt/ β -cat signaling events triggered by *Wnt3a* with or without *Rspo1*, as demonstrated by the nuclear localization of β -cat, and the higher levels of active β -cat and *Axin2* induction. Moreover, Pdprn enhanced the induction of TOPFlash reporter activity by $\Delta N\beta$ -cat. The Wnt/ β -cat pathway being sharply regulated from the cell surface to the nucleus (Driehuis and Clevers, 2017), the level at which Pdprn contributes to the signaling cascade remains to be precisely determined. However, data from the TOPFlash reporter assay suggest that Pdprn may

contribute to the control of cytoplasmic/nuclear signaling events, starting from the nuclear translocation of β -cat. Interestingly, RhoGTPase signaling, a pathway modulated by Pdprn in certain epithelial cells, has been reported to regulate the nuclear accumulation of β -cat (Schlessinger et al., 2009).

The different functional domains of Pdprn may contribute to various steps in Wnt signal transduction. The transmembrane and cytoplasmic parts of Pdprn have been implicated in the targeting of this protein to lipid rafts, specialized membrane domains potentially involved in Wnt signalosome activation (Renart et al., 2015; Ozhan et al., 2013). The cytoplasmic association of Pdprn with ERM proteins and cytoskeleton may be required for Wnt/ β -cat activation, as recently described for CD44, a cell adhesion molecule that, like Pdprn, appears to potentiate this pathway in epithelial cells (Schmitt et al., 2015). Moreover, Pdprn can interact with CD44 (Martin-Villar et al., 2010). As mammary basal cells express CD44 (Louderbough et al., 2011), a molecular cooperation with Pdprn is therefore possible.

Pdprn loss attenuates the mammary tumorigenesis induced by the constitutive activation of Wnt/ β -cat signaling

Pdprn over-expression has been documented in various types of carcinomas and is associated with faster tumor progression and invasiveness in models of pancreatic and skin tumors (Wicki et al., 2006; Renart et al., 2015). We found that Pdprn was strongly expressed in a mouse model of β -cat-induced TNBCs. In this context, the loss of Pdprn resulted in fewer mammary tumors and an impairment of tumorsphere formation in culture, consistent with probable TIC depletion. As mammary tumors in *K5DN β cat* mice originate from a deregulated amplification of basal SCs (Moumen et al., 2013), attenuated tumorigenesis in the absence of Pdprn may be due, in part, to the depletion of basal SCs, the population targeted for oncogenic transformation by β -cat.

Pdprn expression in epithelial cells has been found to favor the acquisition of

fibroblastoid hallmarks, but its involvement in an EMT program remains unclear (Wicki and Christophori, 2007; Renart et al., 2015). We found that the b-cat-induced tumors that developed in the absence of Pdpn displayed features of a MET program. In particular, they presented increased amounts of E-cadherin, lower levels of vimentin and reduced expression of *Snai1* and *Twist1* than Pdpn-proficient control tumors. Canonical Wnt signaling is closely connected to EMT processes, characterized by the down-regulation of E-cadherin expression via the induction of members of the Snail and Twist family (Heuberger and Birchmeier, 2010). Thus, in our model of TNBCs, Pdpn probably favored EMT features by potentiating Wnt/b-cat signaling. It is interesting to mention that expression of Snail1, rather than its paralogue Snail2/Slug, has been associated with EMT activation in mammary tumors (Ye et al.,

2015).

Overall, our study reveals that Pdpn is specifically expressed by the mammary basal cell layer and participates in the regulation of mammary stem cell function and tumorigenesis, by potentiating Wnt/b-cat signaling. The conserved expression of Pdpn between mouse and human mammary tissue strongly suggests a conserved molecular function. It would be of interest to investigate if Pdpn expression in the myoepithelium can serve as a predictive marker for progression from *in situ* to invasive breast cancer, as this cell layer is thought to display tumor suppressive function (Russell et al., 2015). Additionally, a precise analysis of Pdpn expression in tumor cells in the different breast cancer subtypes could provide new insights into prognostic factors and therapeutic strategies.

MATERIAL AND METHODS

Mouse strains and transgenic mice

K5Cre transgenic mice, expressing the Cre recombinase under the control of the K5 promoter, were kindly provided by Dr. J. Jorcano (Ramirez et al., 2004) and the *Rosa26LacZ* reporter strain by Dr. P. Soriano (Soriano et al., 1999). *K5ΔNβcat* mice were previously described (Teuliere et al., 2005). *Pdpn^{F/F}* mice were generated by Ozgene company (Bentley DC, Australia). LoxP sites, flanking the *Pdpn* exon 1 comprising the starting codon, were introduced through homologous recombination in C57BL6 mouse embryonic stem cells. *Pdpn^{F/F}* mice were mated in a 129SV/C57BL6 mixed genetic background with either *K5Cre* or *K5Cre;Rosa26LacZ* or *K5ΔNβcat* mice. Age-matched *Pdpn^{F/F}* or *Pdpn^{F/F};K5ΔNβcat* littermates were used as controls. Mice carrying tumors were sacrificed when at least one palpable tumor (1 cm³) was detected and all glands were analyzed for the presence of lesions. The care and use of animals were conducted in accordance with the European and National Regulation for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and

other Scientific Purposes (Facility licence C750517/18). All experimental procedures were ethically approved (Ethical approval 02265.02).

BC44 cell line culture

BC44 cells, established from the mammary mouse epithelial cell line, HC11, were grown in RPMI 1640 medium (Gibco Life Technologies) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco Life Technologies), 2mM L-Glutamine, 5μg/mL bovine insulin (Sigma-Aldrich), and penicillin-streptomycin (Gibco Life Technologies), as described (Deugnier et al., 2002).

Dissociation of mouse mammary glands or tumors

Thoracic and inguinal mammary glands from three to six pubertal (6-weeks-old) or virgin (16 to 25-weeks-old) mice were pooled for the preparation of a single cell suspension suitable for flow cytometry, as described in detail elsewhere (Di Cicco et al., 2015). Briefly, minced tissues were transferred to a digestion solution containing 3mg/mL collagenase

(Roche), 100 units/mL hyaluronidase (Sigma-Aldrich) in CO₂-independent medium (Gibco Life Technologies) completed with 5% fetal bovine serum (FBS, Lonza) and 2mM L-glutamine (Sigma-Aldrich), and incubated for 90 min at 37°C with shaking. Pellets of digested samples were centrifuged and successively treated at 37°C with solutions of 0.25% trypsin (Life Technologies) /0.1% versen (Biochrom) for 1 min, 5mg/ml dispase II (Roche)/ 0.1mg/mL DNaseI (Sigma-Aldrich) for 5 min. Pellets were treated with a cold ammonium chloride solution (Stem Cell Technologies) and filtered through a nylon mesh cell strainer with 40 mm pores (Fisher Scientific) before immunolabeling. The same procedure was applied to mammary tumors with an enzymatic dissociation time extended to 2h.

Flow cytometry cell sorting and analysis

Freshly isolated mammary cells or BC44 cells were incubated at 4°C for 20 min with the following antibodies: anti-CD24-BViolet421 (clone M1/69), anti-CD49f-PeCy7 (clone GoH3), anti-CD45-APC (clone 30-F11), anti-CD31-APC (clone MEC13.3), anti-CD54-PE (clone YN1/1.7.4), anti-Pdpr-PE (clone 8.1.1) or anti-Clec2-PE (clone **17D9**). All antibodies were from Biolegend, except anti-Clec2 (Biorad). Labeled cells were analyzed and sorted out using either a FACSVantage flow cytometer (BD Biosciences) or a MoFlo Astrios cell sorter (Beckman Coulter). Data were analyzed using FlowJo software. Sorted cell population purity was at least 95%.

Primary mammary epithelial cell culture assays

For two-dimensional clonogenic assays, sorted basal or luminal cells were plated on irradiated 3T3 cell feeders in 24-well plates at a density of 2000 or 500 cells per well respectively. Basal cells were grown in DMEM/F12 medium supplemented with 1% FBS, 2% B27 (Gibco Life Technologies), 5 µg/mL insulin (Sigma-Aldrich) and 10ng/mL EGF (Invitrogen, Life Technologies) whereas luminal cells were cultured in DMEM/F12 medium supplemented with 10% FBS, 5 µg/mL insulin, 10 ng/mL EGF

and 100 ng/ml cholera toxin (ICN Biochemicals) for 7-8 days, as previously described ([Moumen et al., 2012](#); [Chiche et al., 2013](#)).

For mammosphere 3D-culture, freshly isolated mammary basal cells or CD24-positive cells from mammary tumors were seeded on ultralow-adherence 24-well plates (Corning) at a density of 5000 or 20000 respectively in DMEM/F12 medium supplemented with 2% B27, 20 ng/mL EGF, 20 ng/mL bFGF (Gibco Life Technologies), 4 µg/mL heparin (Sigma Aldrich), 10 µg/mL insulin and 2% of Matrigel (BD Pharmingen), as described elsewhere ([Spike et al., 2012](#); [Chiche et al., 2013](#)). For second-generation sphere assays, mammospheres were dissociated during 10 min with 0,05% trypsin (Gibco, Life technologies) and reseeded as described above. ImageJ software (NIH) was used to count colonies and mammospheres and quantify their size in pixels. When specified, isolated mammary basal cells cultured for 24 hrs in mammosphere condition were treated once with 10 ng/mL of mouse recombinant Wnt-3a (R&D systems) or co-treated with Wnt3a and 50 ng/mL of mouse recombinant R-spondin 1 (R&D systems) for 6h.

Whole-mount analyses and histology

Dissected mammary fat pads were spread onto glass slides, fixed in Methacarn (1/3/6 mixture of acetic acid/chloroform/methanol) overnight at room temperature and stained with carmine alum (Stem Cell Technologies), as described elsewhere ([Chiche et al., 2013](#)) or fixed in 4% paraformaldehyde overnight at 4°C. ImageJ software (NIH) was used to determine the fat pad filling percentages. For whole-mount X-gal staining, mammary glands were fixed in 2.5% paraformaldehyde in Phosphate-Buffered Saline (PBS), pH 7.5, for 1 hour at 4°C, and stained overnight at 30°C with Xgal staining solution (1.5mg/mL X-gal; 10 mM K₃Fe(CN)₆; 10 mM K₄Fe(CN)₆; 2 mM MgCl₂; 0.01% Na-deoxycholate; 0.02% Tergitol-NP40 in PBS). For histological analyses, fixed glands were embedded in paraffin, and 6 µm-thick sections were cut, dewaxed and stain with hematoxylin-eosin or

counterstained with Fast red for X-gal stained glands.

Immunohistofluorescence and immunocytofluorescence labeling

Mammary tissue sections were dewaxed, processed for acidic antigen retrieval, incubated overnight at 4°C with primary antibodies, and then at room temperature with secondary antibodies for 2 h.

Prior to immunostaining, freshly isolated cells from mouse mammary gland were cyto-centrifuged onto slides and fixed in cold methanol for 10 min. BC44 cells were cultured onto glass slides for 24 h and then fixed in cold methanol, or paraformaldehyde 10 min at room temperature and treated with 0.5% triton X-100 for 5 min before immunostaining. Then, fixed cells were incubated with primary antibodies at room temperature for 2 h, with secondary antibodies for 1 h and mounted in Prolong Gold antifade reagent with DAPI (Invitrogen, Life Technologies).

The following primary antibodies were used: anti-Pdpn (PA2.26; [Gandarillas et al., 1997](#)), anti-K5 and anti-K8 (Covance), anti-p63 (Abcam), anti-pan-keratin (Dako), anti-SMA Cy3-conjugated (Sigma Aldrich), anti-PR (Santa Cruz) and anti-p-ERM (Cell Signaling Technologies). Alexafluor-488 or -594 conjugated secondary antibodies were from Molecular Probes. Image acquisition was performed using a Leica DM 6000B microscope (Wetzlar, Germany) and MetaMorph software.

Transplantation assays

Isolated basal cells or epithelial fragments from adult mammary tissues were transplanted into the inguinal fat pads of 3-week-old BALB/c-Nude females (purchased from Charles River) cleared of endogenous epithelium as described elsewhere ([Moumen et al., 2012](#); [Chiche et al., 2013](#)). Primary outgrowths were collected after 6-10 weeks and when specified, used for serial transplantation assays. Outgrowths were either pooled to isolate mammary cell populations or individually treated for histological analyses, as described above. Repopulating unit frequency was

calculated with Extreme Limiting Dilution Analysis software (<http://bioinf.wehi.edu.au/software/elda/>).

Reverse transcription-polymerase chain reaction

Purified RNA was reverse-transcribed using MMLV H(-) Point reverse transcriptase (Promega), and qPCR was performed by monitoring, in real time, the increase in fluorescence of the QuantiNova SYBR Green PCR Kit (Qiagen) on a LightCycler 480 Real-time PCR System (Roche). The values obtained were normalized to Gapdh levels.

The primers used for qPCR analysis were purchased from SABiosciences/Qiagen or designed using Oligo 6.8 software and synthesized by Eurogentec. The designed primers are listed in Table S1.

Western blot analysis

Protein extracts from isolated tumor cells or BC44 cells were prepared in Laemmli or RIPA buffer, respectively. The following primary antibodies were used for immunoblotting: monoclonal rat anti E-cadherin (clone ECCD-2, ThermoFisher Scientific), monoclonal mouse anti-Vimentin (clone V13.2, Sigma-Aldrich), anti- β -actin (clone A2228, Sigma-Aldrich), anti-active β -catenin (Ser33/37/Thr41, Cell Signaling Technologies) and total β -catenin (clone 14/beta-catenin, BD Biosciences).

Transfection and Luciferase reporter gene assays

Stable BC44 transfectants were obtained using Lipofectamine 3000 reagent (ThermoFisher Scientific). Cells were transfected with pcDNA3.1 empty vector or pcDNA3.1 Pdpn-full length, kindly provided by Dr. S. Acton ([Acton et al., 2014](#)). After geneticin selection (Sigma-Aldrich, 600 μ g/mL), Pdpn-expressing cells were isolated using FACSaria Fusion (BD Biosciences) and cultured as described before under geneticin selection.

Firefly/Renilla luciferase transient transfections were performed using GeneJuice® transfection reagent (EMD Millipore), following manufacturer's instructions (3 mL of reagent/mg plasmid DNA). Cells were plated

into 12-well dishes at a density of 1.2×10^5 cells/well. Twenty-four hours later, cells were transfected with 500 ng/well of TOPFlash reporter plasmid and 250 ng/well of pCGN- $\Delta N\beta$ cat plasmid, kindly provided par Dr. A. Ben-Ze'ev (Teuliere et al., 1997). TK-Renilla plasmid was used to monitor transfection efficiency (125 ng/well, Promega). Dual-Glo® luciferase (Promega) assay was performed 48 h after the beginning of the transfection procedure, using a FLUOstar OPTIMA microplate reader (BMG Labtech). Values

obtained for *Firefly* luciferase were normalized to *Renilla* luciferase activity.

Statistical analysis

p-values were determined using Student *t*-test with two-tailed distribution and Welch's correction, assuming both populations have unequal variance. For survival curve, Log rank (Mantel cox) test was used. p-values < 0.05 are considered as significant. All the statistical analyses were performed using the GraphPad prismv6 software.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

L.B., M.M.F., M.A.G., and M.A.D. designed experiments, and wrote the manuscript. L.B., A.D.C, M.M.F., and M.A.D. performed experiments. M.Q. provided reagents and expertise. M.A.G. secured funding.

ACKNOWLEDGMENTS

We are particularly grateful to the personnel of the Animal facility (Sonia Jannet, Isabelle Grandjean), and the Flow Cytometry Core facility (Annick Viguiet, Sophie Grondin and Zosia Maciorowski). We greatly thank Pierre de la Grange for generating heatmaps, Sophie Acton for providing Pdpn constructs and Mathilde Romagnoli for helpful discussions. Laura Bresson received funding from the "Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur" and from the "Fondation pour la Recherche Médicale". The work was supported by grants from Agence Nationale de la Recherche (ANR-13-BSV2-0001), La Ligue Nationale Contre le Cancer (Equipe Labelisée 2013), and Canceropôle Ile de France (2014-1-SEIN-01-ICR-1). The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Acton, S.E., Farrugia, A.J., Astarita, J.L., Mourao-Sa, D., Jenkins, R.P., Nye, E., Hooper, S., van Blijswijk, J., Rogers, N.C., Snelgrove, K.J., *et al.* (2014). Dendritic cells control fibroblastic reticular network tension and lymph node expansion. *Nature* 514, 498-502.
- Astarita, J.L., Acton, S.E., and Turley, S.J. (2012). Podoplanin: emerging functions in development, the immune system, and cancer. *Front Immunol.* 3, 283.
- Astarita, J.L., Cremasco, V., Fu, J., Darnell, M.C., Peck, J.R., Nieves-Bonilla, J.M., Song, K., Kondo, Y., Woodruff, M.C., Gogineni, A., *et al.* (2015). The CLEC-2-podoplanin axis controls the contractility of fibroblastic reticular cells and lymph node microarchitecture. *Nat. Immunol.* 16, 75-84.
- 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.
- Blaas, L., Pucci, F., Messal, H.A., Andersson, A.B., Josue Ruiz, E., Gerling, M., Douagi, I., Spencer-Dene, B., Musch, A., Mitter, R., *et al.* (2016). Lgr6 labels a rare population of mammary gland progenitor cells that are able to originate luminal mammary tumours. *Nat. Cell Biol.* 18, 1346-1356.
- Briskin, C., and O'Malley, B. (2010). Hormone action in the mammary gland. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a003178.
- Cai, C., Yu, Q.C., Jiang, W., Liu, W., Song, W., Yu, H., Zhang, L., Yang, Y., and Zeng, Y.A. (2014). R-spondin1 is a novel hormone mediator for mammary stem cell self-renewal. *Genes Dev.* 28, 2205-2218.
- Chakrabarti, R., Wei, Y., Hwang, J., Hang, X., Andres Blanco, M., Choudhury, A., Tiede, B., Romano, R.A., DeCoste, C., Mercatali, L., *et al.* (2014). DeltaNp63 promotes stem cell activity in mammary gland development and basal-like breast cancer by enhancing Fzd7 expression and Wnt signalling. *Nat. Cell Biol.* 16, 1004-1015, 1001-1013.
- 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* 31, 1857-1867.
- Cueni, L.N., Hegyi, I., Shin, J.W., Albinger-Hegy, A., Gruber, S., Kunstfeld, R., Moch, H., and Detmar, M. (2010). Tumor lymphangiogenesis and metastasis to lymph nodes induced by cancer cell expression of podoplanin. *Am. J. Pathol.* 177, 1004-1016.
- de Visser, K.E., Ciampricotti, M., Michalak, E.M., Tan, D.W., Speksnijder, E.N., Hau, C.S., Clevers, H., Barker, N., and Jonkers, J. (2012). Developmental stage-specific contribution of LGR5(+) cells to basal and luminal epithelial lineages in the postnatal mammary gland. *J. Pathol.* 228, 300-309.
- Deugnier, M.A., Faraldo, M.M., Janji, B., Rousselle, P., Thiery, J.P., and Glukhova, M.A. (2002). EGF controls the in vivo developmental potential of a mammary epithelial cell line possessing progenitor properties. *J. Cell Biol.* 159, 453-463.
- Di-Cicco, A., Petit, V., Chiche, A., Bresson, L., Romagnoli, M., Orian-Rousseau, V., Vivanco, M., Medina, D., Faraldo, M.M., Glukhova, M.A., *et al.* (2015). Paracrine Met signaling triggers epithelial-mesenchymal transition in mammary luminal progenitors, affecting their fate. *elife* 4, e06104.
- Driehuis, E., and Clevers, H. (2017). WNT signalling events near the cell membrane and their pharmacological targeting for the treatment of cancer. *Br J Pharmacol.* doi: 10.1111/bph.13758, Feb. 28.
- Forster, N., Saladi, S.V., van Bragt, M., Sfondouris, M.E., Jones, F.E., Li, Z., and Ellisen, L.W. (2014). Basal cell signaling by p63 controls luminal progenitor function and lactation via NRG1. *Dev. Cell* 28, 147-160.
- Fu, N.Y., Rios, A.C., Pal, B., Law, C.W., Jamieson, P., Liu, R., Vaillant, F., Jackling, F., Liu, K.H., Smyth, G.K., *et al.* (2017). Identification of quiescent and spatially restricted mammary stem cells that are hormone responsive. *Nat. Cell Biol.* 19, 164-176.
- Gandarillas, A., Scholl, F.G., Benito, N., Gamallo, C., and Quintanilla, M. (1997). Induction of PA2.26, a cell-surface antigen expressed by active fibroblasts, in mouse epidermal keratinocytes during carcinogenesis. *Mol Carcinog* 20, 10-18.
- Glukhova, M.A., and Streuli, C.H. (2013). How integrins control breast biology. *Curr. Opin. Cell Biol.* 25, 633-641.

- Guo, W., Keckesova, Z., Donaher, J.L., Shibue, T., Tischler, V., Reinhardt, F., Itzkovitz, S., Noske, A., Zurrer-Hardi, U., Bell, G., et al.** (2012). Slug and Sox9 cooperatively determine the mammary stem cell state. *Cell* *148*, 1015-1028.
- Heuberger, J., and Birchmeier, W.** (2010). Interplay of cadherin-mediated cell adhesion and canonical Wnt signaling. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *2*, a002915.
- Lim, E., Wu, D., Pal, B., Bouras, T., Asselin-Labat, M.L., Vaillant, F., Yagita, H., Lindeman, G.J., Smyth, G.K., and Visvader, J.E.** (2010). Transcriptome analyses of mouse and human mammary cell subpopulations reveal multiple conserved genes and pathways. *Breast Cancer Res.* *12*, R21.
- Lloyd-Lewis, B., Harris, O.B., Watson, C.J., and Davis, F.M.** (2017). Mammary Stem Cells: Premise, Properties, and Perspectives. *Trends Cell Biol.* doi: 10.1016/j.tcb.2017.04.001, May 6.
- Louderbough, J.M., Brown, J.A., Nagle, R.B., and Schroeder, J.A.** (2011). CD44 Promotes Epithelial Mammary Gland Development and Exhibits Altered Localization during Cancer Progression. *Genes Cancer* *2*, 771-781.
- Macias, H., and Hinck, L.** (2012). Mammary gland development. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* *1*, 533-557.
- Macias, H., Moran, A., Samara, Y., Moreno, M., Compton, J.E., Harburg, G., Strickland, P., and Hinck, L.** (2011). SLIT/ROBO1 signaling suppresses mammary branching morphogenesis by limiting basal cell number. *Dev. Cell* *20*, 827-840.
- Martin-Villar, E., Fernandez-Munoz, B., Parsons, M., Yurrita, M.M., Megias, D., Perez-Gomez, E., Jones, G.E., and Quintanilla, M.** (2010). Podoplanin associates with CD44 to promote directional cell migration. *Mol. Biol. Cell* *21*, 4387-4399.
- Martin-Villar, E., Megias, D., Castel, S., Yurrita, M.M., Vilaro, S., and Quintanilla, M.** (2006). Podoplanin binds ERM proteins to activate RhoA and promote epithelial-mesenchymal transition. *J. Cell Sci.* *119*, 4541-4553.
- Meier-Abt, F., Brinkhaus, H., and Bentires-Alj, M.** (2014). Early but not late pregnancy induces lifelong reductions in the proportion of mammary progesterone sensing cells and epithelial Wnt signaling. *Breast Cancer Res.* *16*, 402.
- 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. *Mol. Cancer* *12*, 132.
- 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*, 1246-1254.
- Nieto, M.A., Huang, R.Y., Jackson, R.A., and Thiery, J.P.** (2016). Emt: 2016. *Cell* *166*, 21-45.
- Ozhan, G., Sezgin, E., Wehner, D., Pfister, A.S., Kuhl, S.J., Kagermeier-Schenk, B., Kuhl, M., Schwill, P., and Weidinger, G.** (2013). Lypd6 enhances Wnt/beta-catenin signaling by promoting Lrp6 phosphorylation in raft plasma membrane domains. *Dev. Cell* *26*, 331-345.
- Pohl, S.G., Brook, N., Agostino, M., Arfuso, F., Kumar, A.P., and Dharmarajan, A.** (2017). Wnt signaling in triple-negative breast cancer. *Oncogenesis* *6*, e310.
- Prater, M.D., Petit, V., Alasdair Russell, I., Girardi, R.R., Shehata, M., Menon, S., Schulte, R., Kalajic, I., Rath, N., Olson, M.F., et al.** (2014). Mammary stem cells have myoepithelial cell properties. *Nat. Cell Biol.* *16*, 942-950, 941-947.
- Rajaram, R.D., Buric, D., Caikovski, M., Ayyanan, A., Rougemont, J., Shan, J., Vainio, S.J., Yalcin-Ozuysal, O., and Briskin, C.** (2015). Progesterone and Wnt4 control mammary stem cells via myoepithelial crosstalk. *EMBO J.* *34*, 641-652.
- 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.
- Renart, J., Carrasco-Ramirez, P., Fernandez-Munoz, B., Martin-Villar, E., Montero, L., Yurrita, M.M., and Quintanilla, M.** (2015). New insights into the role of podoplanin in epithelial-mesenchymal transition. *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.* *317*, 185-239.
- Rios, A.C., Fu, N.Y., Lindeman, G.J., and Visvader, J.E.** (2014). In situ identification of bipotent stem cells in the mammary gland. *Nature* *506*, 322-327.
- Rodilla, V., Villanueva, A., Obrador-Hevia, A., Robert-Moreno, A., Fernandez-Majada, V., Grilli, A., Lopez-Bigas, N., Bellora, N., Alba, M.M., Torres, F., et al.** (2009). Jagged1 is the pathological link between Wnt and Notch pathways

in colorectal cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 106, 6315-6320.

Russell, T.D., Jindal, S., Agunbiade, S., Gao, D., Troxell, M., Borges, V.F., and Schedin, P. (2015). Myoepithelial cell differentiation markers in ductal carcinoma in situ progression. *Am J Pathol* 185, 3076-3089.

Schacht, V., Dadras, S.S., Johnson, L.A., Jackson, D.G., Hong, Y.K., and Detmar, M. (2005). Up-regulation of the lymphatic marker podoplanin, a mucin-type transmembrane glycoprotein, in human squamous cell carcinomas and germ cell tumors. *Am. J. Pathol.* 166, 913-921.

Schlessinger, K., Hall, A., and Tolwinski, N. (2009). Wnt signaling pathway meet Rho GTPases. *Genes & Dev.* 23, 265-277.

Schmitt, M., Metzger, M., Gradl, D., Davidson, G., and Orian-Rousseau, V. (2015). CD44 functions in Wnt signaling by regulating LRP6 localization and activation. *Cell Death Differ.* 22, 677-689.

Skibinski, A., and Kuperwasser, C. (2015). The origin of breast tumor heterogeneity. *Oncogene* 34, 5309-5316.

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.

Suzuki-Inoue, K., Kato, Y., Inoue, O., Kaneko, M.K., Mishima, K., Yatomi, Y., Yamazaki, Y., Narimatsu, H., and Ozaki, Y. (2007). Involvement of the snake toxin receptor CLEC-2, in podoplanin-mediated platelet activation, by cancer cells. *J. Biol. Chem.* 282, 25993-26001.

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.

Trejo, C.L., Luna, G., Dravis, C., Spike, B.T., and Wahl, G.M. (2017). Lgr5 is a marker for fetal mammary stem cells, but is not essential for stem cell activity or tumorigenesis. *Npj Breast Cancer* 3, doi:10.1038/s41523-017-0018-6, April 24.

Ugorski, M., Dziegiel, P., and Suchanski, J.

(2016). Podoplanin - a small glycoprotein with many faces. *Am. J. Cancer Res.* 6, 370-386.

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., 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.

Visvader, J.E., and Stingl, J. (2014). Mammary stem cells and the differentiation hierarchy: current status and perspectives. *Genes Dev.* 28, 1143-1158.

Wang, D., Cai, C., Dong, X., Yu, Q.C., Zhang, X.O., Yang, L., and Zeng, Y.A. (2015). Identification of multipotent mammary stem cells by protein C receptor expression. *Nature* 517, 81-84.

Wang, Y., Dong, J., Li, D., Lai, L., Siwko, S., Li, Y., and Liu, M. (2013). Lgr4 regulates mammary gland development and stem cell activity through the pluripotency transcription factor Sox2. *Stem Cells* 31, 1921-1931.

Wicki, A., and Christofori, G. (2007). The potential role of podoplanin in tumour invasion. *Br. J. Cancer* 96, 1-5.

Wicki, A., Lehembre, F., Wick, N., Hantusch, B., Kerjaschki, D., and Christofori, G. (2006). Tumor invasion in the absence of epithelial-mesenchymal transition: podoplanin-mediated remodeling of the actin cytoskeleton. *Cancer Cell* 9, 261-272.

Yalcin-Ozuysal, O., Fiche, M., Guitierrez, M., Wagner, K.U., Raffoul, W., and Briskin, C. (2010). Antagonistic roles of Notch and p63 in controlling mammary epithelial cell fates. *Cell Death Differ.* 17, 1600-1612.

Ye, X., Tam, W.L., Shibue, T., Kaygusuz, Y., Reinhardt, F., Ng Eaton, E., and Weinberg, R.A. (2015). Distinct EMT programs control normal mammary stem cells and tumour-initiating cells. *Nature* 525, 256-260.

Yu, Q.C., Verheyen, E.M., and Zeng, Y.A. (2016). Mammary Development and Breast Cancer: A Wnt Perspective. *Cancers* 8, pii: E65.

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.

FIGURES

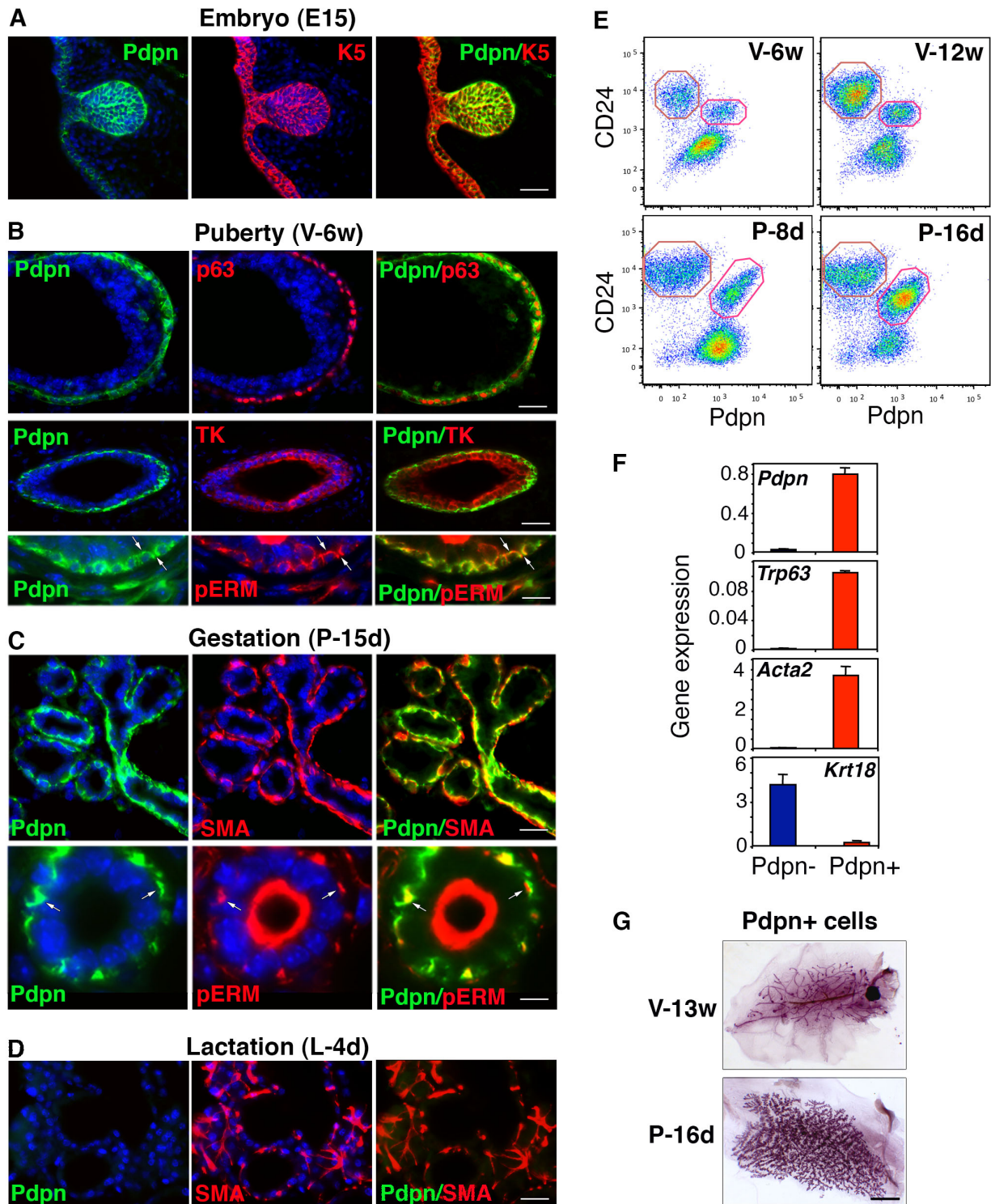


Figure 1. Pdpn specifically marks the mammary basal cell population, including multipotent SCs

(A-D): Immunofluorescence labeling of sections through (A) an embryonic mammary bud at day 15 (E15); (B) a TEB (upper panel) and epithelial ducts (middle and lower panels) from 6 week-old mice; (C) alveoli and a small duct from 15-day-pregnant (P15) mouse; and (D) 4-day lactating (L4) mouse. White arrows point to basal-basal and basal-luminal cell junctions in (B) and to cells

coexpressing Pdpn and pERM in (B and C). TK, total keratin. DAPI-stained nuclei are in blue. Bars, 50 μ m except in (B) lower panel, 25 μ m and in (C) lower panel, 10 μ m.

(E) Flow cytometry analysis of CD24 and Pdpn expression in cells isolated from mammary glands taken from 6-week- and 12-week-old virgin (V-6w, V-12w), and 8- and 16-day pregnant (P-8d, P-16d) mice. The two gated subsets within the CD24⁺ epithelial cell pool are Pdpn⁻ and Pdpn⁺, respectively.

(F) qPCR analysis of lineage-specific gene expression in Pdpn⁺ and Pdpn⁻ mammary epithelial cells isolated from adult virgin mice. Data are the mean \pm SEM of 3 separate preparations.

(G) Carmine-stained whole-mount outgrowths derived from transplantation of 200 Pdpn⁺ epithelial cells. Outgrowths were analyzed in 13-week-old (V-13w) virgin recipient mice and in late pregnant hosts (P-16d). Bar, 0.2mm.

See also Figure S1.

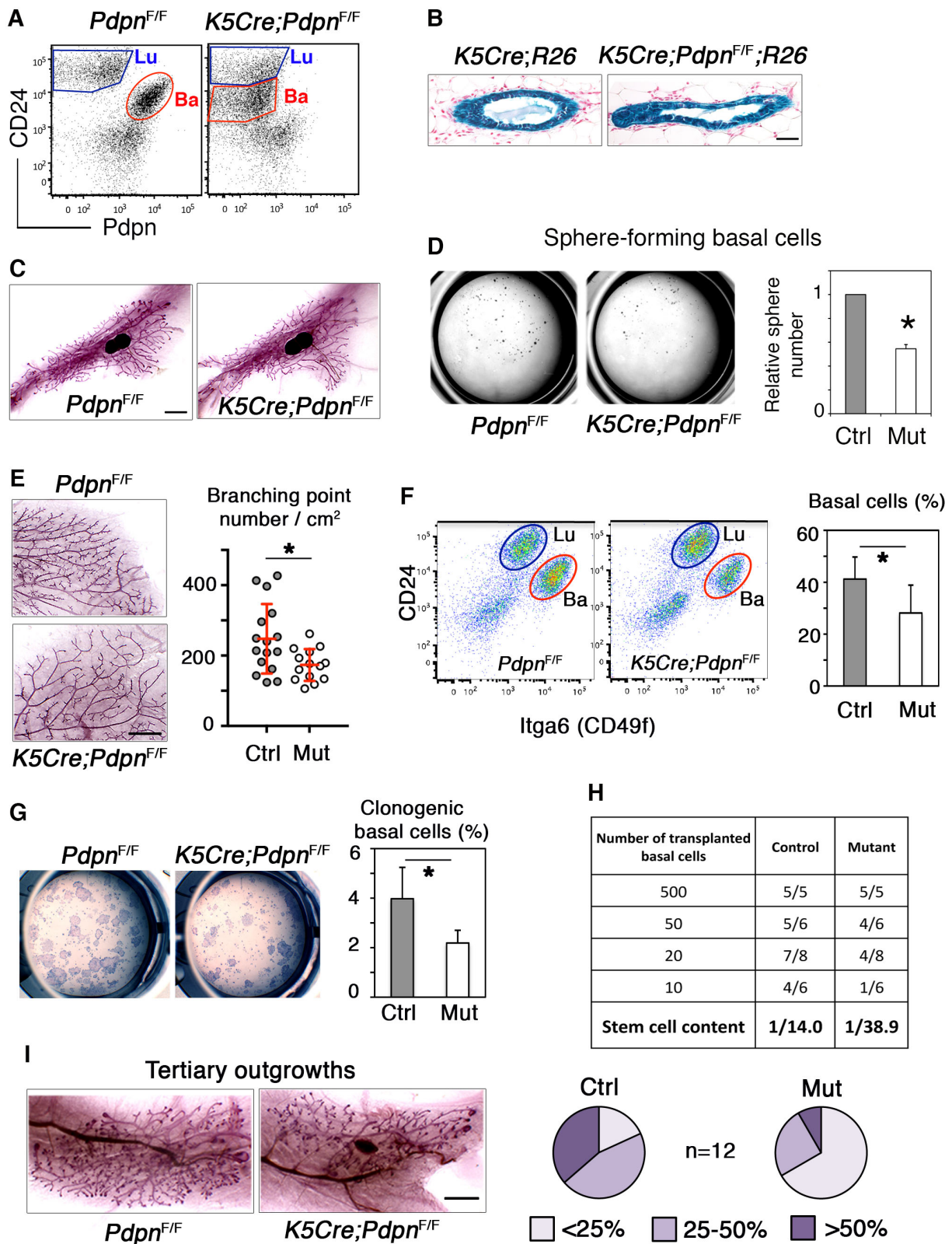


Figure 2. Loss of Pdpn affects SC activity in adult virgin mice

(A) CD24 and Pdpn expression in mammary cells isolated from *Pdpn*^{F/F} (control) and *K5Cre;Pdpn*^{F/F} (mutant) adult virgin mice. Lu, luminal cells; Ba, basal cells.

(B) Sections of X-gal-stained mammary glands from control and mutant adult virgin mice. Bar, 50 mm.

(C) Carmine-stained whole mounts of mammary glands from control (*Pdpr^{F/F}*) and mutant (*K5Cre;Pdpr^{F/F}*) 6-week-old mice. Bar, 3mm.

(D) Mammosphere formation by 5000 basal cells isolated from control and mutant 6-week-old mice. Left: Views of wells. Right: Relative quantification of sphere-forming cells (n=3). *p=0.0045.

(E) Left: Carmine-stained whole-mounts of mammary glands from 6 month-old control and mutant adult virgin mice. Bar, 1mm. Right: Quantification of the mammary branching points per cm² from 16 mutant females and 14 control littermates. *p=0.013.

(F) Left: CD24 and Itga6 expression in mammary cells isolated from control and mutant adult virgin mice. Right: Percentages of basal cells within the CD24⁺ epithelial cell pool (n=8). *p=0.0098.

(G) Left: Views of the colonies formed by 2000 control and *Pdpr*-null basal cells. Right: Percentages of clonogenic basal cells (n=6). *p=0.0239.

(H) Limiting dilution assays of control and *Pdpr*-null basal cell regenerative properties. Data are expressed as take rate success per injected fat pad. Confidence intervals (CI 95%) are 7.6-25.8 and 19.7-77.0 for control and mutant SC contents, respectively.

(I) Whole mount analysis of the tertiary outgrowths derived from serial transplantation of control and *Pdpr*-deficient mammary epithelial fragments. Two distinct mutant females and their control littermates were used as donors. Left: Views of representative carmine-stained outgrowths. Bar, 1.5mm. Right: Pie charts of fat pad filling. n, total number of fat pad analyzed.

In (D), (F) and (G), data are shown as mean ± SEM. n, number of independent preparations.

See also Figures S2 and S3.

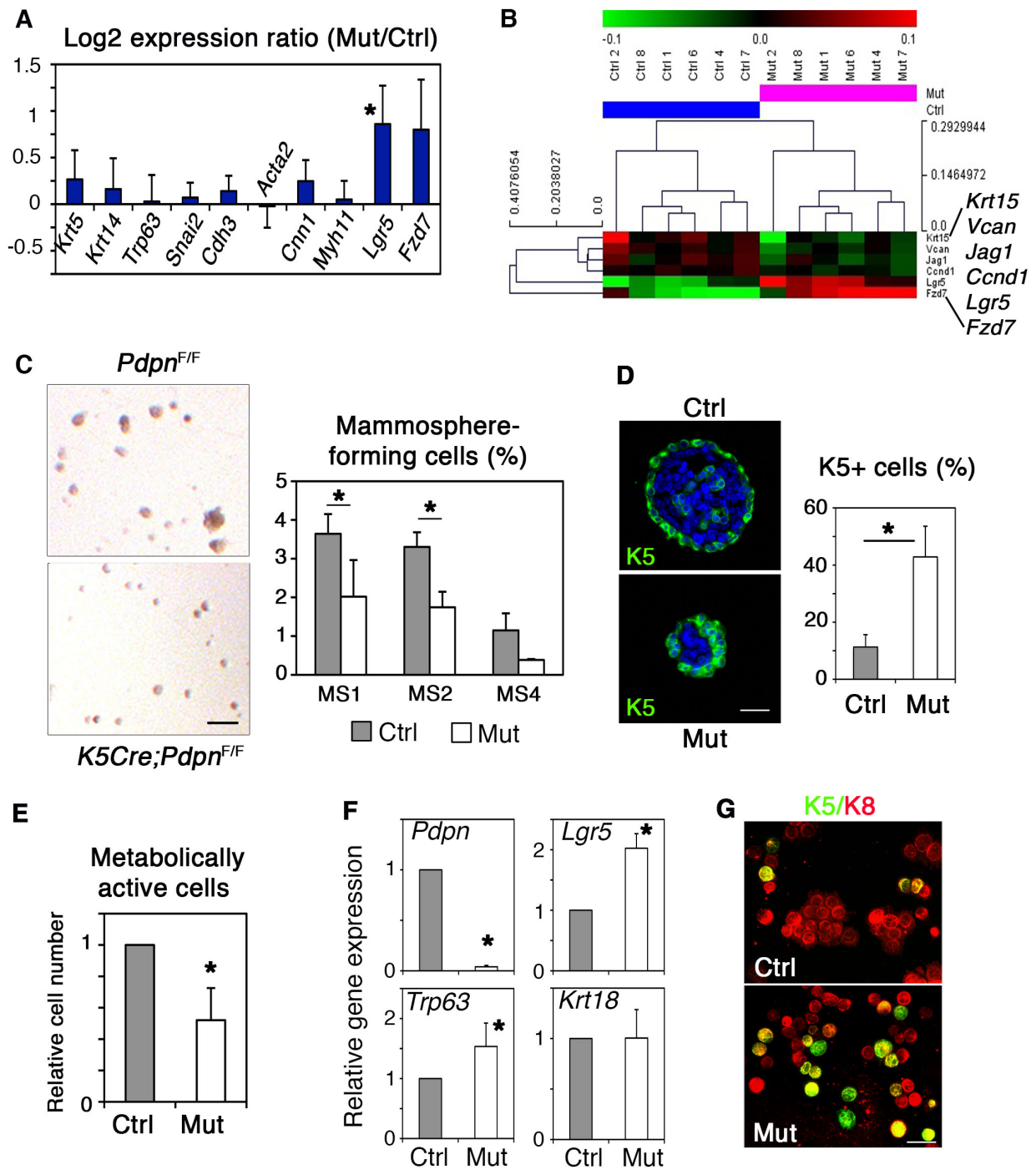


Figure 3. Loss of Pdpn perturbs expression of Wnt signaling components in mammary basal cells and affects their developmental potential ex vivo

(A) Comparative expression levels of lineage-specific genes in control and Pdpn-null basal cell preparations (n=4) from adult virgin mice. qPCR data are expressed as Log₂ ratios of values normalized to *Gapdh*. Comparator values were those obtained with control cells. *p= 0.044 (*Lgr5*), p=0.063 (*Fzd7*).

(B) Heatmap based on qPCR data showing expression of Wnt-associated genes in 6 independent samples of control and Pdpn-null basal cells.

(C) Left: High-magnification views of primary mammospheres derived from control and Pdpn-null basal cells cultured for 14 days. Bar, 200mm. Right: Percentages of sphere-forming cells after consecutive passages of 5000 control and mutant basal cells. MS1 (n=5), MS2 (n=3) and MS4 (n=2) refer to 1st, 2nd and 4th generation spheres. *p= 0.0257 (MS1); *p = 0.0231 (MS2).

(D) Left: K5 immunodetection in sections through primary spheres derived from control and Pdpn-null basal cells cultured for 14 days. DAPI-stained nuclei appear in blue. Bar, 30mm. Right: Percentages of K5⁺ cells in dissociated control and mutant spheres. A total of 600 cells from 10 distinct fields per cytospot was scored. *p = 0.0013.

(E) Relative number of metabolically active cells in mammosphere samples (n=4), as estimated by Cell titer Glo® 3D assay. Control and Pdpn-null basal cells were grown for 6 days. *p= 0.04.

(F) qPCR analysis of *Pdpn*, *Trp63*, *Krt18* and *Lgr5* expression in control and Pdpn-deficient primary spheres (n=4). *p = 0.008 (*Lgr5*), *p< 0.0001 (*Pdpn*).

(G) Double K5/K8 staining of cells isolated from control and Pdpn-deficient primary spheres. Bar, 20mm .

In (A) and (C-F) data are shown as mean \pm SEM. n, number of independent preparations.

See also Figure S4.

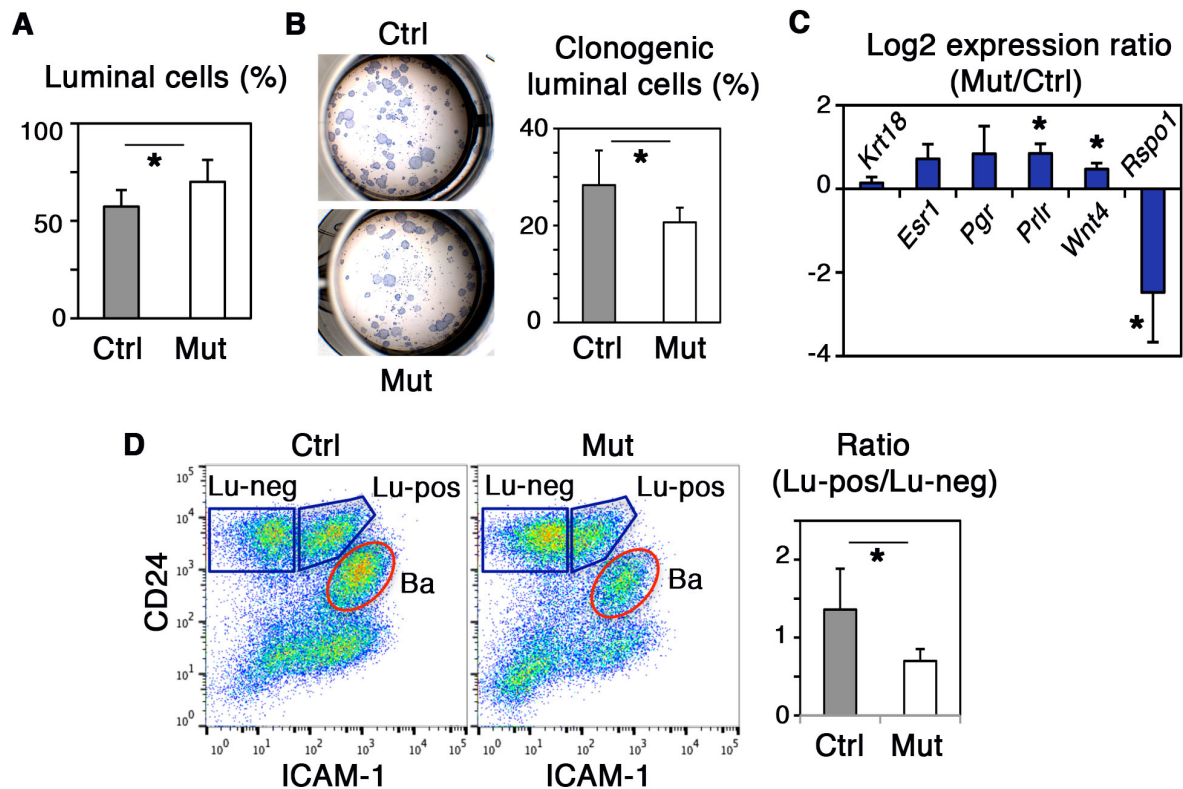


Figure 4. Loss of Pdpn perturbs the luminal compartment of adult virgin mice

(A) Percentages of luminal cells within the CD24⁺ epithelial cell pool, as defined in Fig. 2F (n=8). *p= 0.0097.

(B) Left: Views of the colonies formed by 500 control and mutant luminal cells. Right: Percentages of clonogenic luminal cells (n=4). *p = 0.011.

(C) Flow cytometry analysis of control and mutant luminal cells. Left: Dot plots of CD24 and ICAM-1 expression. ICAM-1 discriminated three distinct CD24⁺ epithelial cell fractions, including ICAM1⁻ and ICAM1⁺ luminal cells (Lu-neg and Lu-pos, respectively), and ICAM1⁺ basal cells (Ba). Right: Ratios of Lu-pos/Lu-neg proportion within the luminal population (n=5). *p = 0,0167.

(D) Gene expression level in control and mutant luminal cells (n=4). qPCR data are expressed as Log₂ ratios of values normalized to *Gapdh*. Comparator values were those obtained with control cells. *Esr1*, *Pgr* and *Prlr* encode for estrogen, progesterone and prolactin hormone receptors. *p= 0,033 (*Prlr*), *p = 0,02 (*Wnt4*), *p = 0,0055 (*Rspo1*).

In (A-D), data are shown as mean ± SEM. n, number of independent preparations.

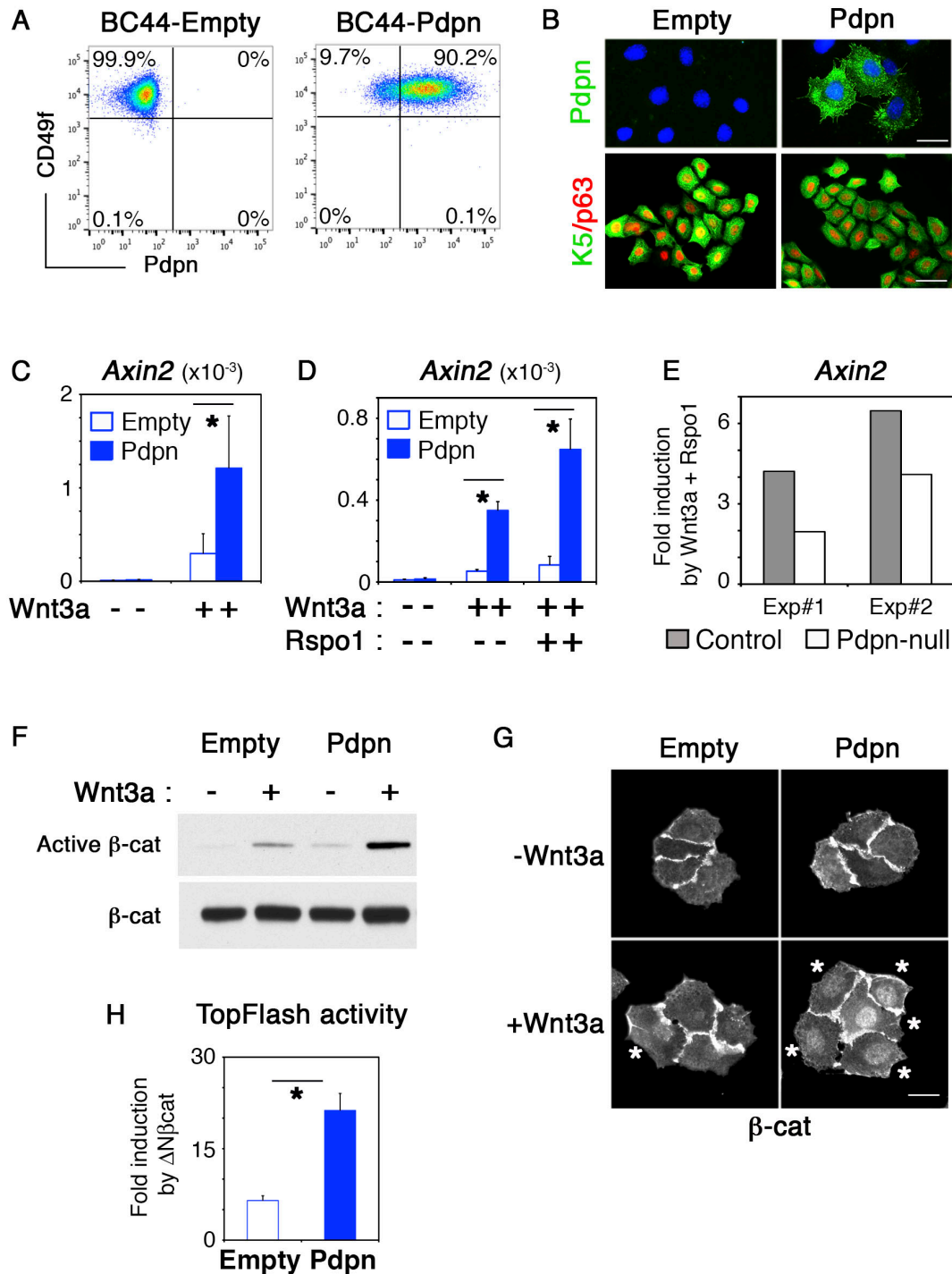


Figure 5. Pdpn acts as a positive regulator of Wnt/ β -cat signaling in mammary basal cells

(A) *Itga6* (=CD49f) and Pdpn expression in BC44 cells stably transfected with full-length Pdpn or empty vector as control.

(B) Pdpn and double K5/p63 immunostaining in BC44 transfectants. DAPI-stained nuclei appear in blue. Bars, 15 and 30mm .

(C) *Axin2* induction in BC44 transfectants after stimulation with Wnt3a (40ng/mL) for 8h (n=6). Untreated cells expressed undetectable level of *Axin2*. *p=0.024.

(D) *Axin2* induction in BC44 transfectants after stimulation by Wnt3a (10ng/mL), with or without Rspo1 (50ng/ml) for 8h (n=3). Untreated cells expressed undetectable level of *Axin2*. *p=0.010 (Wnt3a), *p=0.031 (Wnt3a/Rspo1).

(E) *Axin2* induction in freshly isolated control and Pdpn-null adult basal cells upon Wnt3a/Rspo1 co-stimulation (n=2). Fold induction is relative to untreated samples.

(F) Western blot analysis of active and total β -cat in untreated and Wnt3a-treated BC44 transfectants. Cells were stimulated with Wnt3a at 40ng/mL for 2h. One representative blot is shown.

(G) β -cat immunostaining in untreated and Wnt3a-treated BC44 transfectants. Cells were stimulated with Wnt3a as in F. Stars indicate cells containing nuclear β -cat. Bar, 15mm .

(H) Luciferase activity in BC44-Pdpn and BC44-empty cells transiently transfected with TopFlash reporter. Data are presented as fold-activation induced by $\Delta N\beta$ cat transgene (n=4). *p = 0,0027.

In (C-D) and (H), data are shown as mean \pm SEM. n, number of independent preparations.

See also Figure S5.

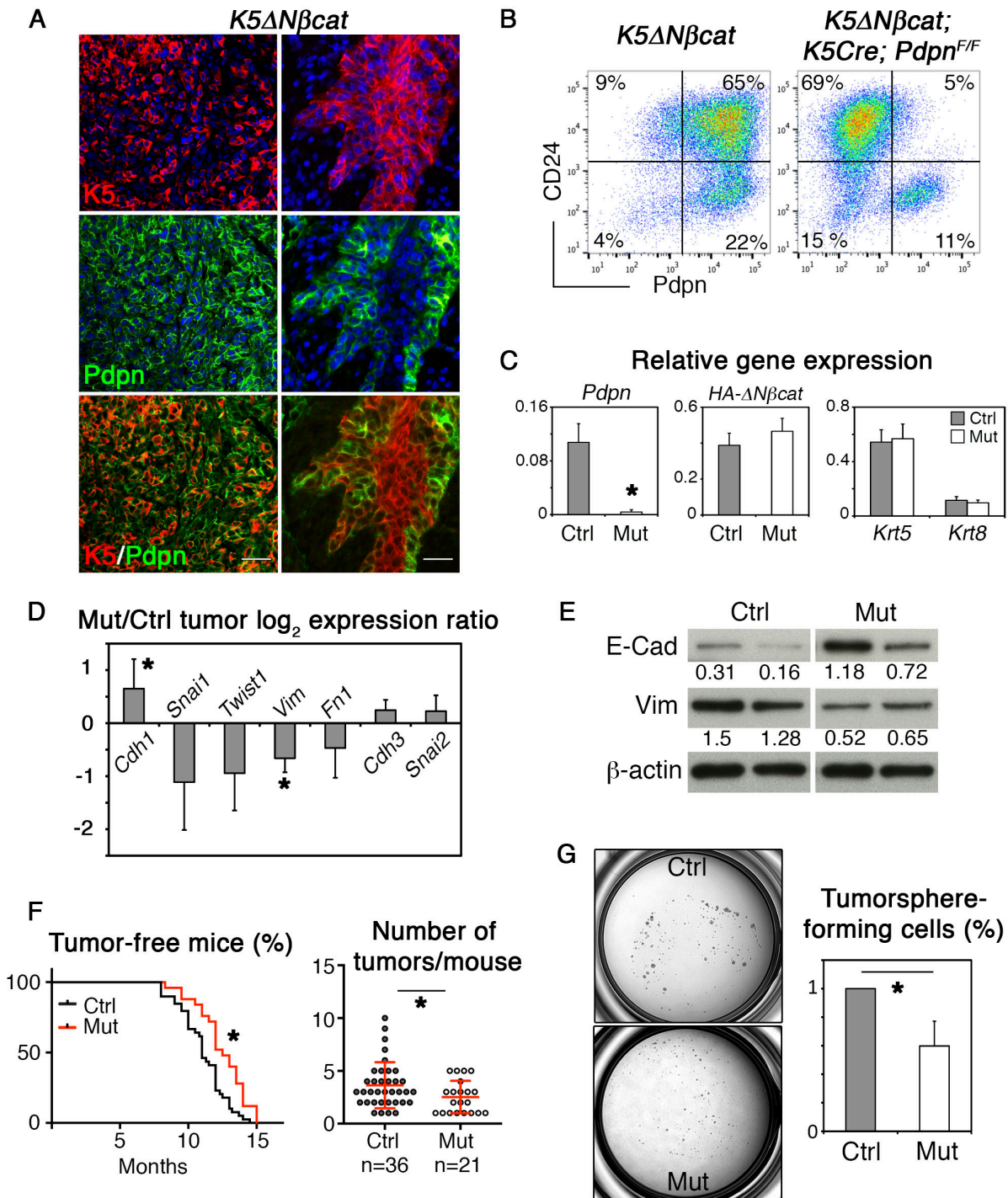


Figure 5. Loss of Pdpn attenuates β -cat-induced mammary tumor formation

(A) Double Pdpn/K5 immunostaining in *K5ΔNβcat* mouse mammary tumors. DAPI-stained nuclei appear in blue. Left and right panels show two different tumor cell areas. Bars, 30 and 20 mm.

(B) Pdpn and CD24 expression in control Pdpn-proficient (left) and mutant Pdpn-deficient (right) *K5ΔNβcat* tumor cells. Cell percentages are indicated in the square gates.

(C) Gene expression level of *Pdpn*, *HA*, *Krt5* and *Krt8* in control and mutant CD24⁺ isolated tumor cells, evaluated by qPCR (n=5). *p < 0.001.

(D) Molecular characteristics of control and mutant CD24⁺ tumor cells (n=5). qPCR data are expressed as Log₂ ratios of values normalized to *Gapdh*. Comparator values were those obtained with control cells. *p = 0.0135 (*Cdh1*), *p = 0.0378 (*Vim*).

(E) Western blot analysis of E-Cadherin (E-Cad) and Vimentin (Vim) amount in control and mutant CD24⁺ tumor cells. β -actin was used as loading control. Data from two independent samples are shown. The values indicate the ratios of E-Cad and Vim versus b-actin.

(F) Mammary tumor formation in control and mutant mice. Left: Kaplan-Meier curve of tumor-free mouse percentage as a function of time. Tumor formation was monitored in 40 control and 25 mutant females. *p = 0.0011. Right: Number of mammary tumors per mouse. n, number of analyzed mice. Mean values \pm SEM are indicated in red. *p = 0.0167.

(G) Left: Views of tumorspheres derived from 20000 control and mutant CD24⁺ tumor cells. Right: Relative tumorsphere quantification (n=5). *p = 0.0127.

In (C-D) and (G), data are shown as mean \pm SEM. n, number of independent preparations.

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Fig. S1

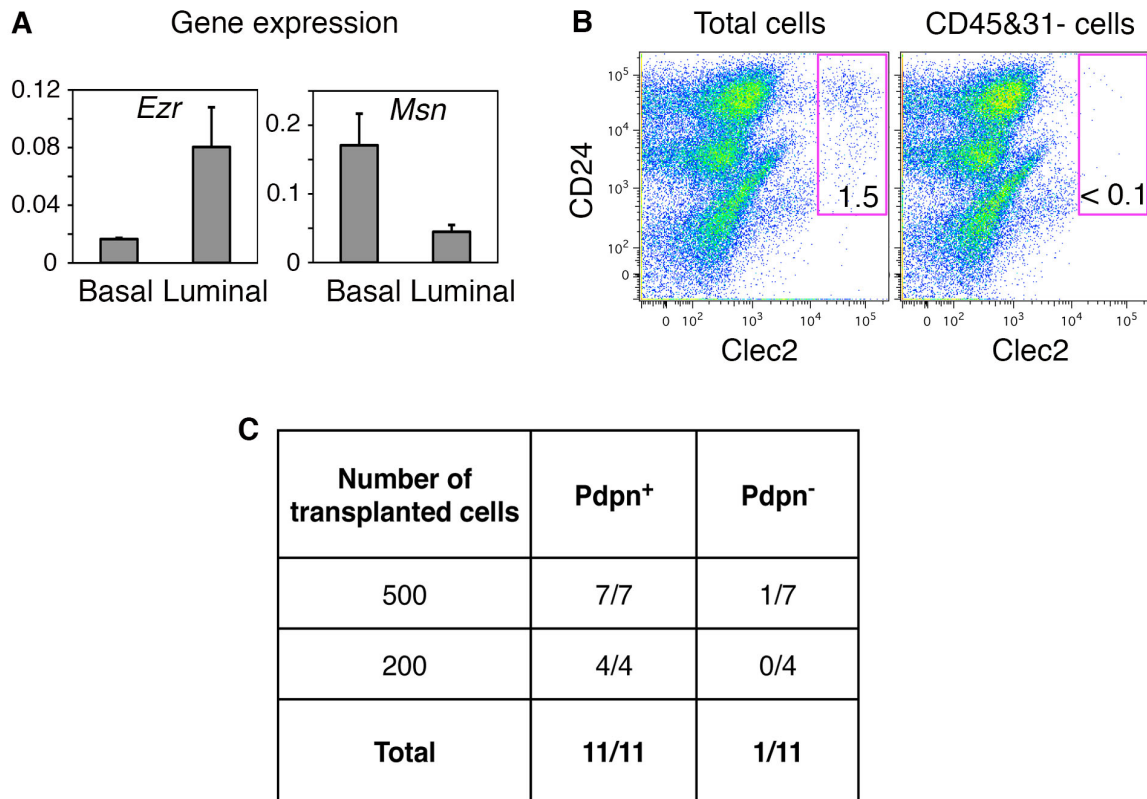


Figure S1. Related to Figure 1. Ezrin, Moesin and Clec2 expression in mammary cells and regenerative properties of Pdpn⁺ basal cells

(A) Ezrin (*Ezr*) and moesin (*Msn*) gene expression in basal and luminal cells isolated from adult virgin mice.

(B) Flow cytometry analysis of CD24 and Clec2 expression in mammary cells isolated from adult virgin mice. Left dot plot: total cells, including CD45/31⁺ stromal cells. Right dot plot: CD45/31⁻ cells. Percentages of Clec2⁺ cells are indicated in the gated populations.

(C) Regenerative properties of Pdpn⁺ and Pdpn⁻ mammary epithelial cells isolated from adult virgin mice. Data are expressed as take rate success per injected fat pad.

Fig. S2

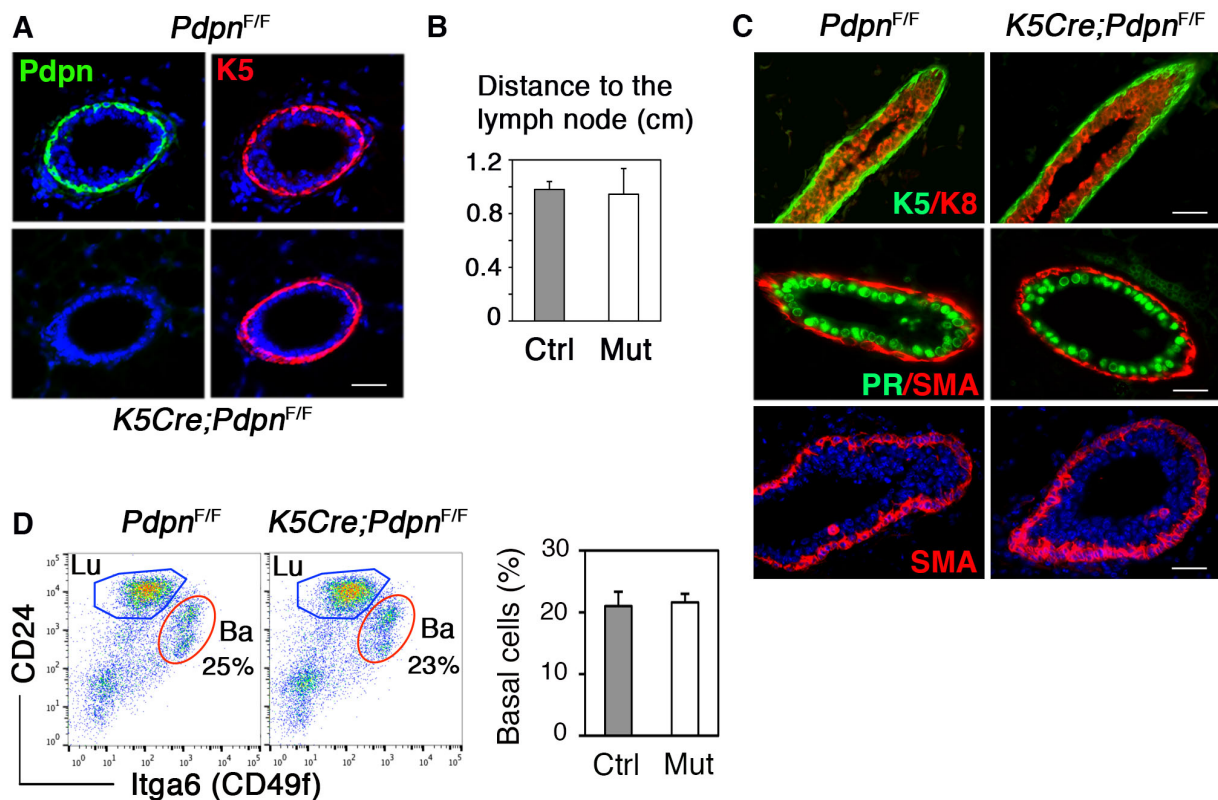


Figure S2. Related to Figure 2. Mammary phenotype of *K5Cre;Pdpn^{F/F}* pubescent mice

(A) Immunofluorescence labeling of sections through ducts from control and mutant adult mice, showing the complete deletion of Pdpn in the basal cell layer. Bar, 30mm.

(B) Distance of the epithelium forefront to the lymph node. Data, shown as mean \pm SEM, are from eleven 6-week-old mutant (Mut) females and their control (Ctrl) littermates.

(C) Immunofluorescence labeling of sections through ducts (upper and middle panels; bars, 30mm) and TEB (lower panel; bar, 50mm) from control and mutant 6-week-old mice. DAPI-stained nuclei are in blue.

(D) Left: Flow cytometry analysis of CD24 and Itga6 expression in mammary cells isolated from control and mutant 6-week-old mice. Lu, luminal cells; Ba, basal cells. Right: Percentages of basal cells within the CD24⁺ epithelial cell pool. Data are the mean \pm SEM of 3 separate sorting experiments.

Fig. S3

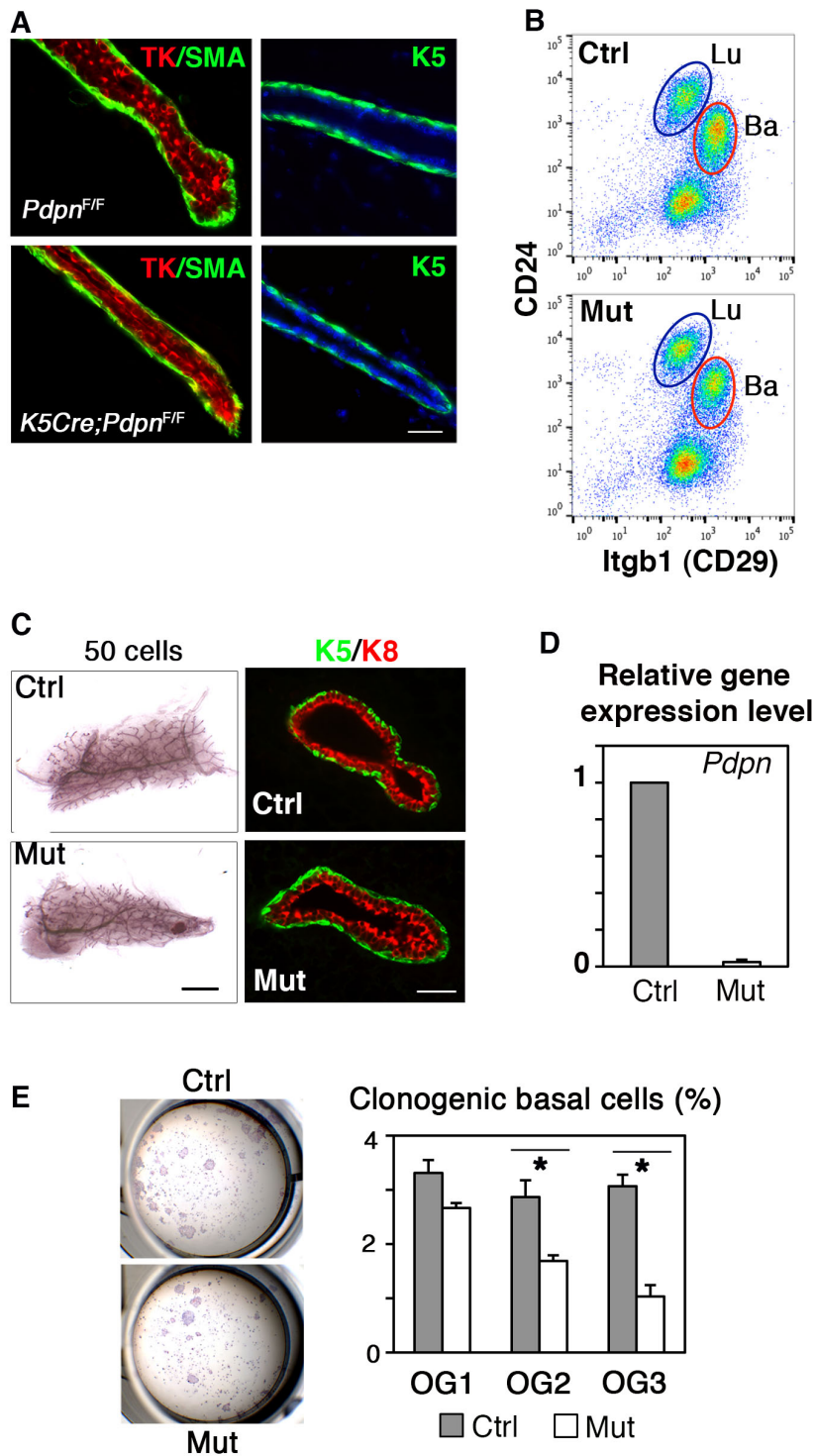


Figure S3. Related to Figure 2. Mammary phenotype of *K5Cre;Pdpn^{F/F}* adult virgin mice
 (A) Immunofluorescence labeling of sections through mammary ducts of control and mutant adult virgin mice. DAPI-stained nuclei appear in blue. Bar, 50μm.
 (B) Flow cytometry analysis of CD24 and Itgb1 (CD29) expression in mammary cells isolated from control and mutant adult virgin mice. Lu, luminal cells; Ba, basal cells.

(C) Representative carmine-stained outgrowths obtained 10 weeks after transplanting 50 control and *Pdgn*-null basal cells (left). Bar 3mm. Immunodetection of K5/K8 in ductal structures derived from transplanted control and mutant basal cells (right). Bar, 50mm.

(D) Relative *Pdgn* expression in basal cells isolated from primary, secondary or tertiary outgrowths derived from serial transplantation of control and mutant epithelial fragments. Results are the mean \pm SEM of 4 independent samples.

(E) Clonogenic properties of control and *Pdgn*-null basal cells isolated from outgrowths. Left: Views of colonies formed by 1500 basal cells isolated from secondary outgrowths by flow cytometry. Right: Percentages of clonogenic basal cells in primary (OG1), secondary (OG2) and tertiary (OG3) outgrowths. Data are the mean \pm SEM of 3 distinct experiments with triplicate wells.

Fig. S4

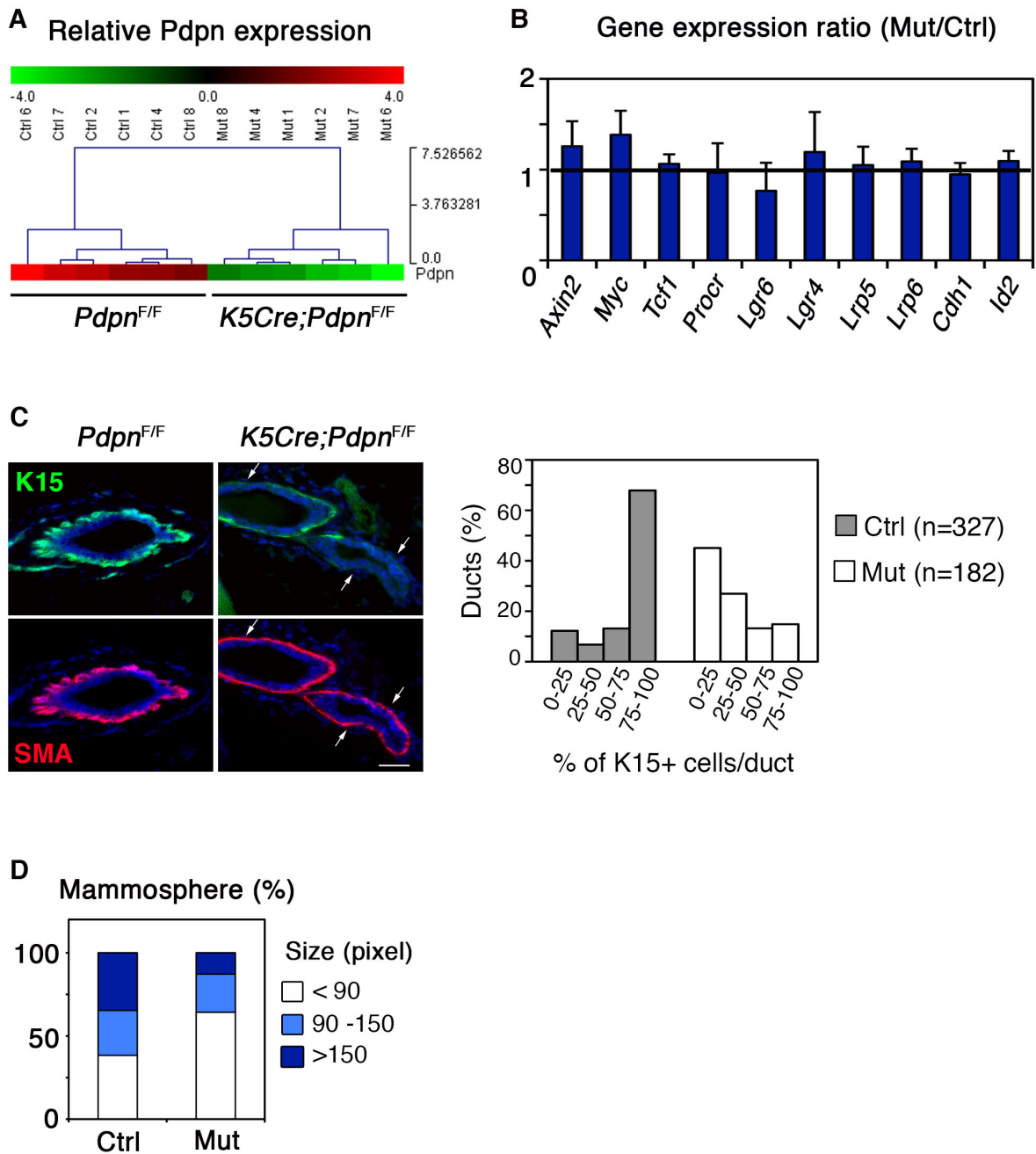


Figure S4. Related to Figure 3. Molecular characteristics of Pdpn-null basal cells

(A) Heatmap of qPCR data showing Pdpn deletion in the six separate samples analyzed in Fig. 3B. (B) qPCR analysis of Wnt-associated gene expression in control and Pdpn-null basal cells isolated from adult virgin mice. Mean expression ratios between mutant and control samples (\pm SEM) are presented. Results are from at least 3 independent sorting experiments. This set of genes was not significantly modulated in mutant cells, as indicated by ratios close to one.

(C) K15 expression in the mammary basal cell layer of control and mutant adult virgin mice. Left: Double K15/SMA immunostaining of ducts. Arrows indicate areas of SMA-positive mutant basal cells lacking K15 expression. Bar, 50mm. Right: Distribution of duct percentages according to their content in K15-positive cells. Quantification was performed on mammary tissue sections from 11 control and 7 mutant adult virgin mice. n, total number of analyzed ducts.

(D) Size distribution (in pixels) of primary mammospheres derived from control and Pdpn-null mammary basal cells, illustrated in Fig. 3C. Analysis of 1059 control and 319 mutant spheres from 3 distinct culture wells in one representative assay is shown.

Fig. S5

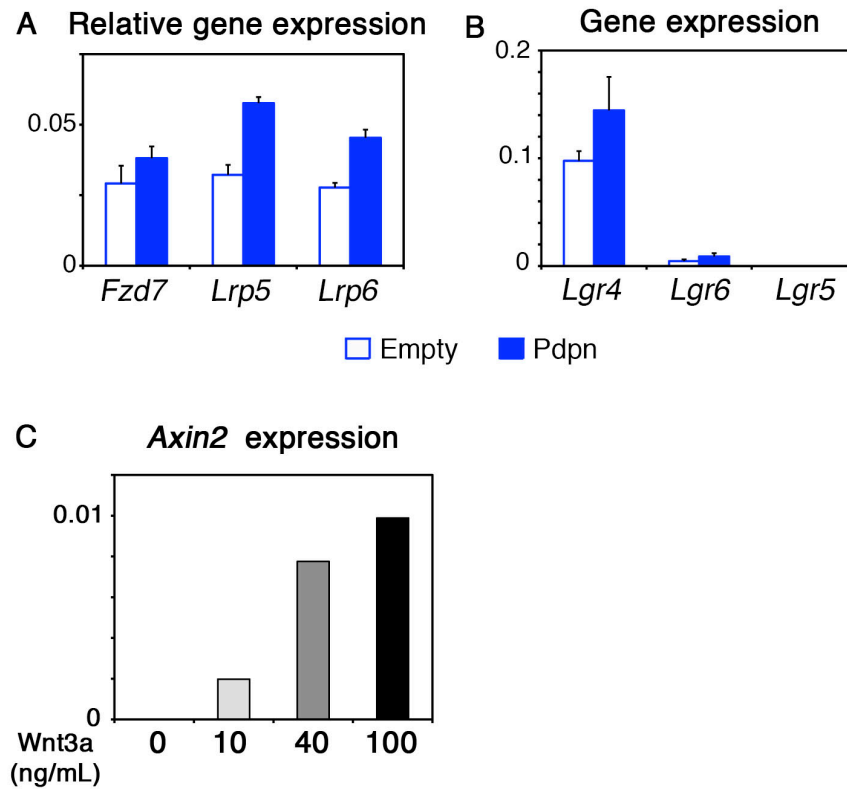


Figure S5. Related to Figure 5. Characteristics of BC44 transfectants

(A) qPCR analysis of *Fzd7*, *Lrp5* and *Lrp6* in BC44 transfectants. Data are the mean \pm SEM of 5 independent assays.

(B) qPCR analysis of *Lgr4*, *Lgr6* and *Lgr5* expression in BC44 transfectants. Data are the mean \pm SEM of 5 independent samples.

(C) Wnt3a dose response performed on Pdnp-null BC44 cells. *Axin2* induction was evaluated in untreated cells and cells treated with 10, 40 and 100 ng/ml Wnt3a by qPCR. Data are from one assay. Untreated cells expressed undetectable level of *Axin2*.

Table S1. Related to Material and Methods. List of primers for q-PCR

Acta2-as	5'- GTCCAGCACAATACCAGTTG -3'
Acta2-s	5'- GACCCAGATTATGTTTTGAGAC -3'
Axin2-as	5'- ACTGCCAGACATCCTGTGA -3'
Axin2-s	5'- GTACCTTGCCAAAACGGAAT -3'
Cdh1-as	5'- ACCACCGTTCTCCTCCGTA -3'
Cdh1-s	5'- ATCCTCGCCCTGCTGATTC -3'
Cdh3-as	5'- GTCCTGTGCGGTATAGATGC -3'
Cdh3-s	5'- ACGAAGCCCCTGTGTTTTGTT -3'
Cnn1-as	5'- AGTACTGCCTGAACCCGGAGT -3'
Cnn1-s	5'- GTTGTGCGGGTGGTATTG -3'
Esr1-as	5'- GAGGCACACAAACTCTTCTC -3'
Esr1-s	5'- CTGGACAGGAATCAAGGTAAA -3'
Fn1-as	5'- GTGCCTCCACTATGATGTTG -3'
Fn1-s	5'- GAAGAGCCCTTACAGTTCCA -3'
Gapdh -as	5'- GTTGAAGTCGCAGGAGACAAC -3'
Gapdh-s	5'- CCAATGTGTCCGTCGTGGATC -3'
HA-DNbcat-as	5'- GCCCGTCAATATCAGCTACT -3'
HA- DNbcat -s	5'- ATCCTTATGACGTGCCTGAC -3'
Krt14-as	5'- TCCAGCAGGATTTTGTACTG -3'
Krt14-s	5'- CGGCAAGAGTGAGATTTCTG -3'
Krt15-as	5'- CAGGGTCCGTCTCAGGTCT -3'
Krt15-s	5'- GAGGTGGCGTCTAACACAG -3'
Krt18-as	5'- CAGCCTTGTGATGTTGGTGT -3'
Krt18-s	5'- CCTTGCCGCCGATGACTTTA -3'
Krt5-as	5'- TGCCAACACCAATGCTGCTG -3'
Krt5-s	5'- GACCAGTCAACATCTCTGTC -3'
Lgr5-as	5'- AGGTCCCGCTCATCTTGAAC -3'
Lgr5-s	5'- ATGCCATCTGCTTACCAGTGT -3'
Myc-as	5'- CCCGACTCCGACCTCTTG -3'
Myc-s	5'- CACCAGCAGCGACTCTGAA -3'
Myh11-as	5'- CATGGACCCGCTAAATGACA-3'
Myh11-s	5'- CAATGCGGTCCACATCCTTC -3'
Pdpm-as	5'- GCCTTGCCAGTAGATTCATTA -3'
Pdpm-s	5'- ACCGTGCCAGTGTTGTTCTG -3'
Pgr-as	5'- CAACTGGGCAGCAATAACTTC -3'
Pgr-s	5'- CCACCTGTACTGCTTGAATAC -3'
Prlr-as	5'- GTCATCCACTTCCAAGAACTC -3'
Prlr-s	5'- ATAAAAGGATTTGATACTCATCTG -3'
Procr-as	5'- GAACTCCACACAAGTGCCT -3'
Procr-s	5'- CCAAAGCAGCCAACTTCACC -3'
Rspo1-as	5'- ACGGGGACCACTCGCTCAT -3'
Rspo1-s	5'- GCCTGCTTCAGCCACAATT -3'
Snai1-as	5'- TAGTTCTGGGAGACACATTG -3'
Snai1-s	5'- ACACCTGTTTCACAGCAGTT -3'
Snai2-as	5'- CCCAGTGTGAGTTCTAATGT -3'
Snai2-s	5'- GATGCCAGTCTAGGAAATC -3'
Trp63-as	5'- GAGGAGCCGTTCTGAATCTG -3'

Trp63-s	5'- TGCCCAGACTCAATTTAGTGA -3'
Vcan-as	5'- GAAGGTGTCGCTGAATGAAAC -3
Vcan-s	5'- ACCACGCTATGAAATCAACTC -3
Vim-as	5'- TAAGGGCATCCACTTCACAG -3'
Vim-s	5'- CCAAGCAGGAGTCAAACGA -3'
Wnt4-as	5'- GCCACACCTGCTGAAGAGAT -3'
Wnt4-s	5'- CGAGGAGTGCCAATACCAGT -3'

II) Analyse de l'épithélium mammaire des souris déficientes en Pdpn en gestation et lactation

L'élévation des niveaux d'hormones ovariennes durant les phases d'œstrus, puis lors du début de la gestation, déclenche le développement de ramifications latérales, résultat d'une expansion des populations souches et progénitrices particulièrement marquée durant la gestation. La voie de signalisation Wnt/ β cat est connue pour contribuer, en aval de la stimulation hormonale, à la régulation de ces processus (pour revues, Briskin et Ataca, 2015; Yu *et al.*, 2016).

Les souris *K5Cre;Pdpn^{F/F}* sont fertiles et ne présentent aucun défaut majeur de développement post-natal. Des dosages hormonaux réalisés sur des lots de souris contrôles et mutantes ont confirmé que la perte précoce et ciblée de Pdpn n'induit pas de perturbation de production d'estrogènes et progestérone au stade nullipare adulte (Fig. 30A).

Pour faciliter l'analyse de l'impact de la perte de Pdpn sur le développement mammaire durant le début de la gestation, nous avons stimulé, de manière contrôlée, les souris contrôles et mutantes d'une même portée par l'implantation de dispositifs hormonaux délivrant des concentrations d'estrogènes et progestérone constantes mimant un début de gestation (Rajkumar *et al.*, 2007).

Quatre semaines après l'implantation, nous avons comparé les glandes mammaires stimulées (Ctrl + EP et Mut + EP) entre elles et par rapport à des souris contrôles implantées avec un dispositif vide, dit placebo. L'analyse *in toto* des glandes mammaires après coloration au carmin a confirmé un développement accru de ramifications latérales chez les souris stimulées, contrôles et mutantes, par rapport au placebo (Fig. 30B). Elle a aussi révélé que les souris stimulées mutantes possèdent un épithélium moins ramifié et complexe que les souris contrôles stimulées (Fig. 30B).

L'analyse de la distribution des populations épithéliales basales et luminales à l'aide des marqueurs de surface CD24 et ICAM-1 indique que conformément aux données de la littérature (Asselin-Labat *et al.*, 2010; Di-Cicco *et al.*, 2015) les souris stimulées présentent une augmentation du pourcentage de cellules basales (56,6 et 58% dans Ctrl +EP et Mut +EP respectivement contre 16,3% dans le placebo) ainsi qu'une surreprésentation de la population luminale progénitrice qui est en phase d'expansion par rapport à la population luminales ER/PR+ (ratio LuPos/LuNeg de 0,98 et 0,79 dans Ctrl +EP et Mut +EP respectivement contre 0,26 pour Placebo ; Fig. 30C).

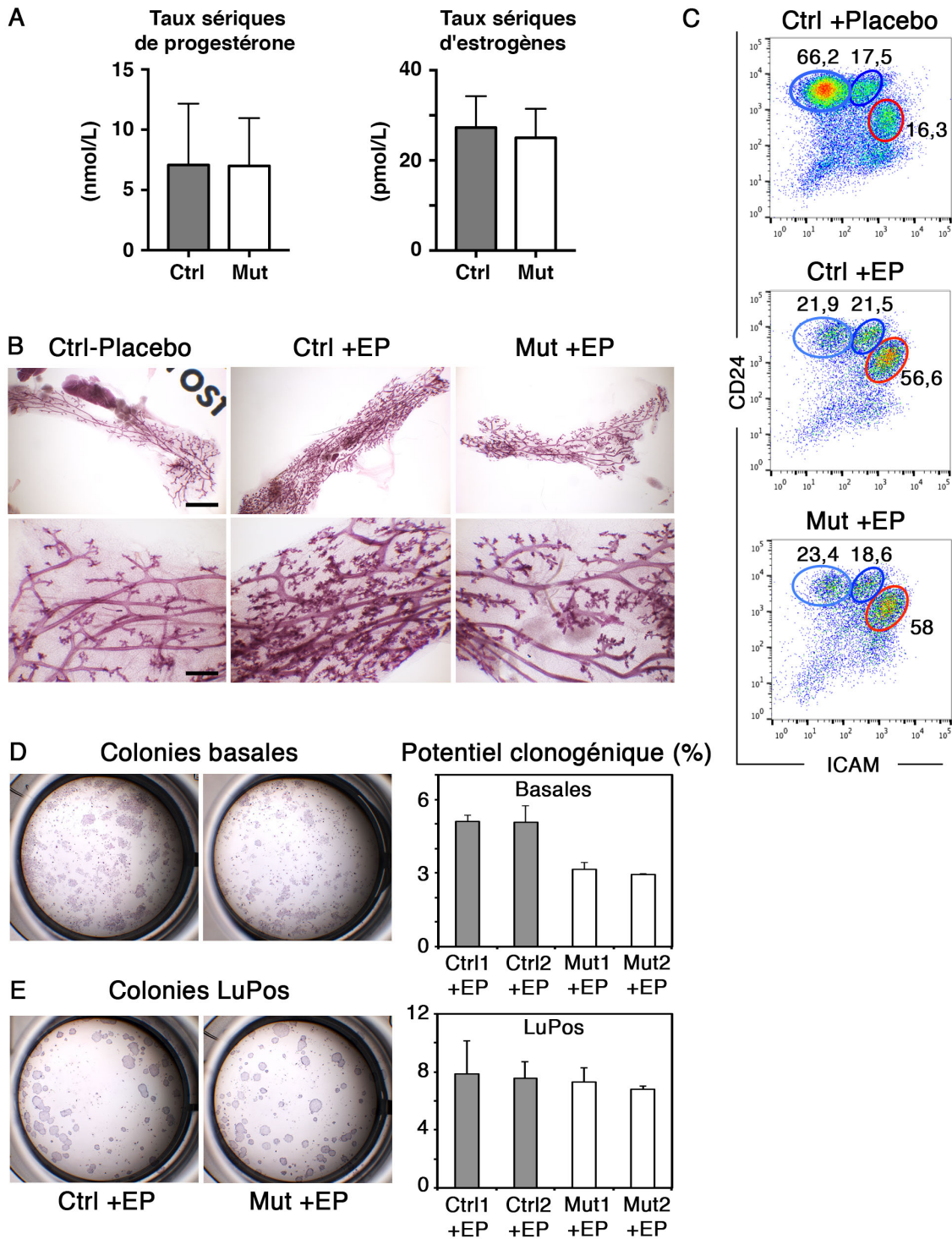


Figure 30 : Etude de la réponse à la stimulation hormonale mimant un début de gestation dans des souris déficientes en *Pdgn*

(A) Taux sériques d'hormones stéroïdiennes (estrogènes en pmol/L et progestérone en nmol/L) chez les souris contrôles, *Pdgn*^{F/F}, et mutantes, *K5Cre;Pdgn*^{F/F}. Les moyennes +/- écarts-moyens ont été réalisées à partir des données de 12 souris contrôles et 9 mutantes adultes de 24 semaines. (B) Morphologie *in toto* colorées au rouge carmin des glandes mammaires contrôles des souris *Pdgn*^{F/F} traitées avec un placebo, contrôles *Pdgn*^{F/F} traitées avec estrogène et progestérone (=EP), et mutantes *K5Cre;Pdgn*^{F/F} traitées avec EP. Barre d'échelle : 3 mm. (C) Expression des marqueurs de surface CD24 et ICAM-1 analysée en cytométrie de flux dans les cellules mammaires issues des souris contrôles traitées avec un placebo, des

souris contrôles et mutantes stimulées par EP. Les nombres affichés représentent les pourcentages des différentes populations par rapport au compartiment épithélial CD24 positif. **(D et E)** Photographies des colonies formées à partir de 2000 cellules basales **(D)** ou 1000 cellules LuPos **(E)** contrôles et mutantes stimulées par EP colorées en Hématoxyline-Eosine après 6 jours de culture. Les histogrammes représentent les potentiels clonogéniques (%). La moyenne du comptage de 3 puits individuels issus de deux expériences indépendantes est présentée +/- l'écart-moyen.

Les pourcentages de cellules basales après stimulation ne diffèrent pas de façon notable chez les contrôles et les mutants, cependant le test fonctionnel d'établissement de colonies démontre que le compartiment basal des souris *K5Cre;Pdpn^{F/F}* stimulées présente une population clonogénique diminuée de moitié par rapport aux contrôles (Fig. 30C et D). Le sous-développement mammaire des souris mutantes stimulées suggère donc que le nombre absolu de cellules souches basales est réduit en l'absence de Pdpn. La balance des populations lumineales chez les souris contrôles et mutantes stimulées n'est pas affectée significativement et les potentiels clonogéniques de la population progénitrice lumineale sont analogues (Fig. 30E).

Nos données indiquent que sous stimulation hormonale contrôlée mimant un début de gestation, la perte de Pdpn affecte l'expansion de l'épithélium mammaire et l'amplification de la population souche et progénitrice basale qui l'accompagne. Ces résultats sont en cours de confirmation sur un plus grand nombre d'animaux mais sont en accord avec le phénotype mammaire observé chez l'adulte vierge.

Les données précédentes évoquant une perturbation du développement mammaire en début de gestation chez les souris mutantes, nous avons poursuivi l'analyse du développement lobulo-alvéolaire en fin de gestation et lactation. Nous avons comparé trois souris mutantes *K5Cre;Pdpn^{F/F}*, à leurs contrôles de portée *Pdpn^{F/F}* au jour 15 de seconde gestation. Les colorations au carmin *in toto* indiquent qu'à ce stade le développement lobulo-alvéolaire n'est pas profondément affecté chez les mutants (Fig. 31A). Dans certaines zones du tissu, la densité des structures alvéolaires semble moindre mais il faudrait plus d'échantillons pour conclure sur ce point en raison de l'hétérogénéité entre animaux. Les immuno-marquages réalisés sur coupes montrent une organisation normale de la bicouche épithéliale mammaire chez le mutant. Comme chez les contrôles, les cellules basales myoépithéliales sont organisées en réseau discontinu autour des cellules lumineales alvéolaires et expriment fortement α -SMA (Fig. 31A).

Pour analyser l'impact de la perte de Pdpn sur la fonction lactogénique, nous avons procédé à des pesées de souriceaux issus de mères lactantes pour trois gestations successives. Les souriceaux

nourris par les femelles contrôles et mutantes présentent des poids similaires (Fig. 31B), indiquant que la fonction physiologique de la glande n'est pas compromise par l'absence de Pdpn.

D'après nos expériences, le développement lobulo-alvéolaire et la différenciation lactogénique terminale ne sont pas profondément altérés chez les souris déficientes en Pdpn. Il serait nécessaire de compléter cette étude par d'autres échantillons car seuls trois couples de souris contrôles et mutantes ont été analysés à ce stade tardif de la gestation.

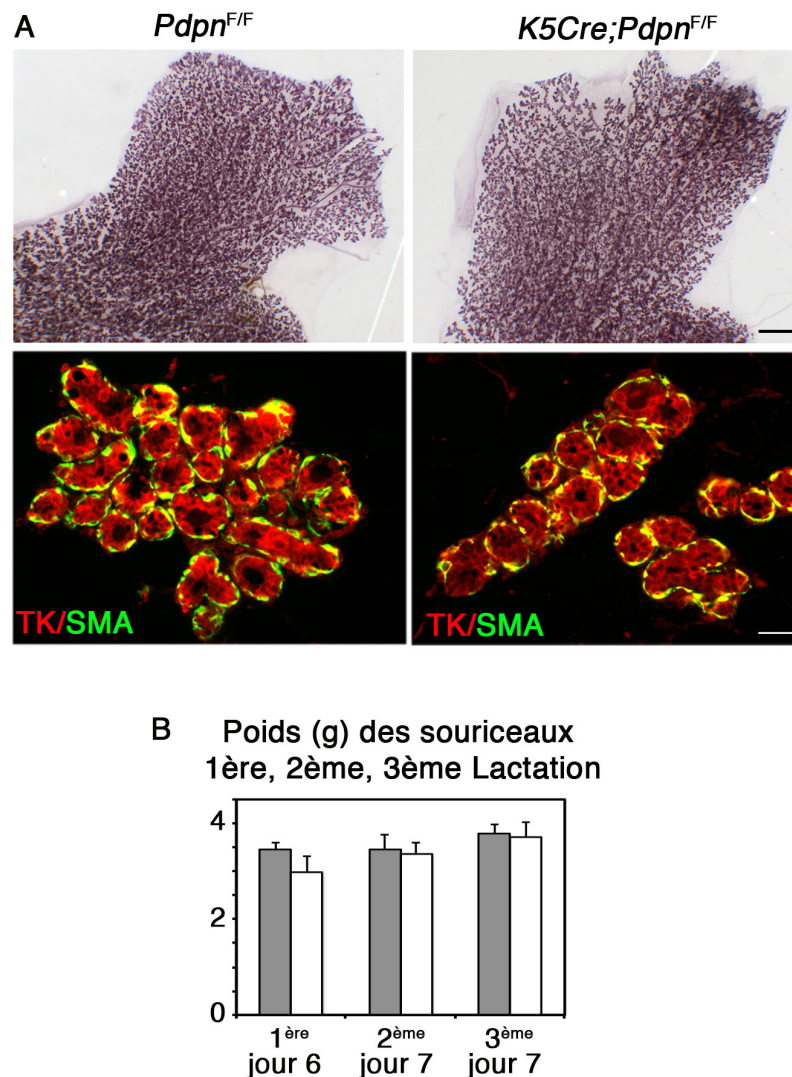


Figure 31 : Analyse des glandes mammaires de souris contrôles, *Pdpn*^{F/F}, et mutantes, *K5Cre ; Pdpn*^{F/F}, au 15^{ème} jour de deuxième gestation successive et capacité d'allaitement de ces souris.

(A) Haut : Morphologie *in toto* des glandes mammaires contrôles, *Pdpn*^{F/F}, et mutantes, *K5Cre;Pdpn*^{F/F}, au 15^{ème} jour de deuxième gestation successive (P15 pour « pregnancy day 15 »). Coloration au rouge carmin. Barre d'échelle : 3 mm. **Bas :** Immuno-marquage réalisé avec les anticorps anti pan-keratine (=TK) et anti- α SMA sur coupes histologiques de glandes mammaires en gestation (P15) de souris contrôles et mutantes. Barre d'échelle = 50 μ m. **(B)** Histogramme représentant la moyenne du poids des portées issues de mères contrôles et mutantes. Les poids moyens en g d'au moins 3 portées sont représentés +/- l'écart-moyen. Pour la première gestation (1^{ère}), les souriceaux sont pesés à jour 6 après la mise-bas, pour les seconde (2^{ème}) et troisième gestations (3^{ème}), ils sont pesés à jour 7.

III) Morphologie et cytosquelette des cellules basales myoépithéliales déficientes en Pdpn

Plusieurs études montrent que la Pdpn participe au contrôle de l'organisation du cytosquelette d'actine. L'analyse des FRCs issus des souris $Pdpn^{-/-}$ a montré que la perte de Pdpn entraînait une réduction de leur capacité d'étalement et de contractilité associés à une perte des fibres de stress et à une diminution de l'expression de pERM, pMLC, et de l'activation de RhoA (Acton *et al.*, 2014; Astarita *et al.*, 2015).

L'analyse des caractéristiques morphologiques des cellules basales mammaires est particulièrement difficile *in vivo* compte tenu de leur apparence fusiforme. Pour mettre en évidence de possibles modifications morphologiques induites par la perte de Pdpn, nous avons mis au point des cultures d'explants à partir d'organoïdes. Les organoïdes sont des petits fragments d'épithélium mammaire contenant des cellules basales et luminales. Placés sur un support d'adhésion, ils s'étalent et forment en 48h un tapis cellulaire comprenant un grand nombre de cellules basales à leur périphérie (Macias *et al.*, 2011).

Les organoïdes mammaires ont été réalisés à partir de souris adultes nullipares contrôles ($Pdpn^{F/F}$) et mutantes ($K5Cre;Pdpn^{F/F}$) et mis en culture sur Matrigel pour mimer la membrane basale. Nous avons observé que les organoïdes contrôles et mutants s'étalent de façon similaire et présentent à leur périphérie des cellules basales conservant l'expression des marqueurs spécifiques de lignage, notamment K5, p63 et α -SMA (Fig. 32A-C). L'expression de Pdpn est retenue dans les cellules basales contrôles tandis qu'elle est absente des cellules issues de l'épithélium mutant (Fig. 32B). La quantification de l'aire des cellules basales positives pour K5 indique que les surfaces d'étalement des cellules contrôles et mutantes sont similaires, sur Matrigel (Fig. 32D) et sur Collagène I (données non montrées).

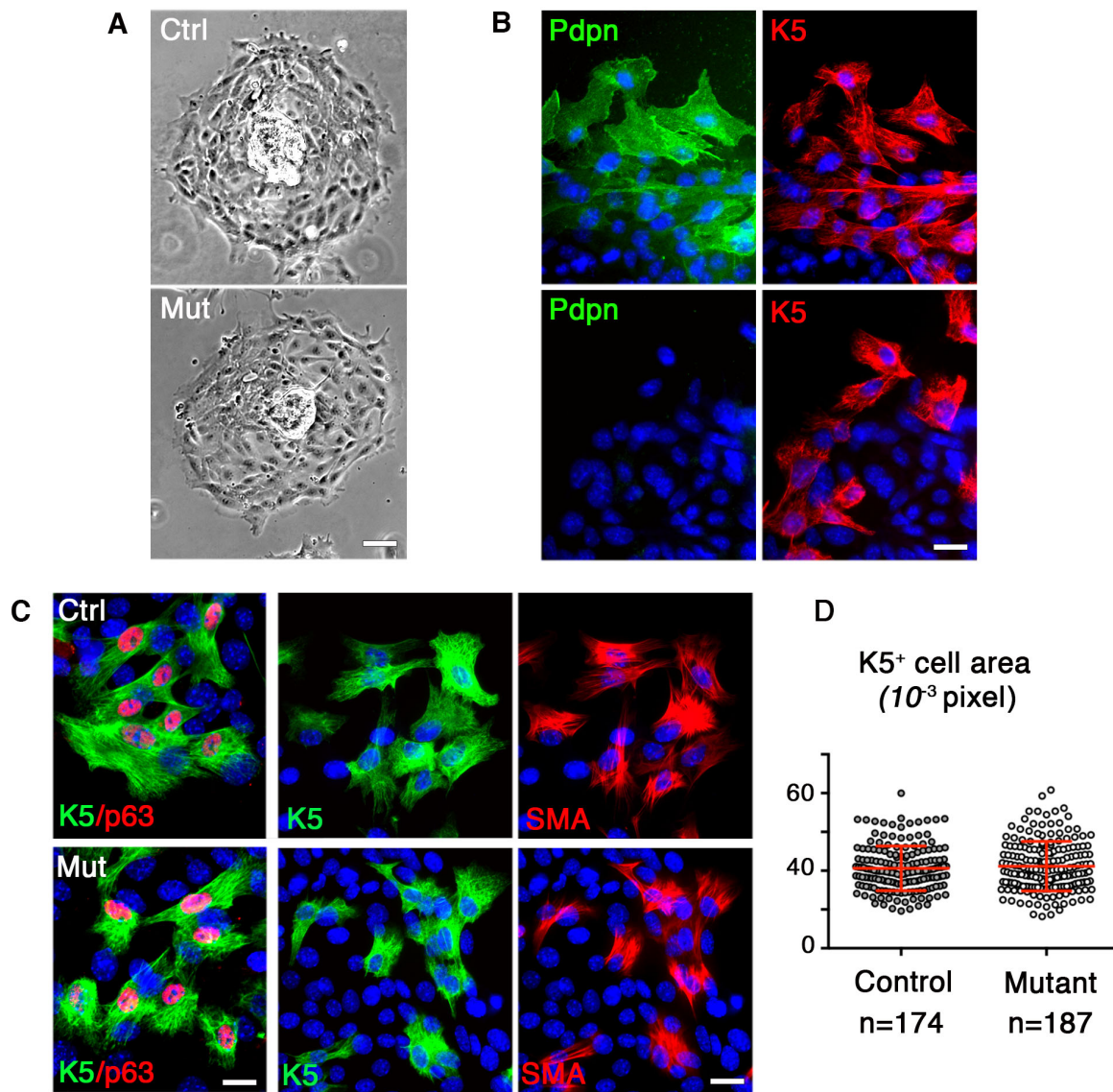


Figure 32 : Capacité d'étalement des cellules basales mammaires déficientes en Pdpn

(A) Explants en 2D issus d'épithélium de souris adultes contrôles ($Pdpn^{F/F}$) et mutantes ($K5Cre;Pdpn^{F/F}$) photographiés au vidéo-microscope inversé en contraste de phase après 24-48h en culture. Barre d'échelle = 50 μ m. (B) Immunofluorescence montrant un marquage Pdpn et K5 des explants sur Matrigel en 2D contrôles et mutants. (C) Immuno-marquages réalisés avec les anticorps anti-p63/anti-K5 (images de gauche) et anti-K5/anti- α Sma (images de droite) sur des explants en 2D (Matrigel) contrôles et mutants. Les noyaux sont marqués au Dapi (bleu). Les barres d'échelle de (B) et (C) sont de 25 μ m. (D) Diagramme représentant la quantification de l'étalement des cellules d'explants sur Matrigel en 2D contrôles et mutants marquées par l'anticorps anti-K5 en immunofluorescence. Chaque point représente l'aire d'une cellule en pixels multipliée par 10³.

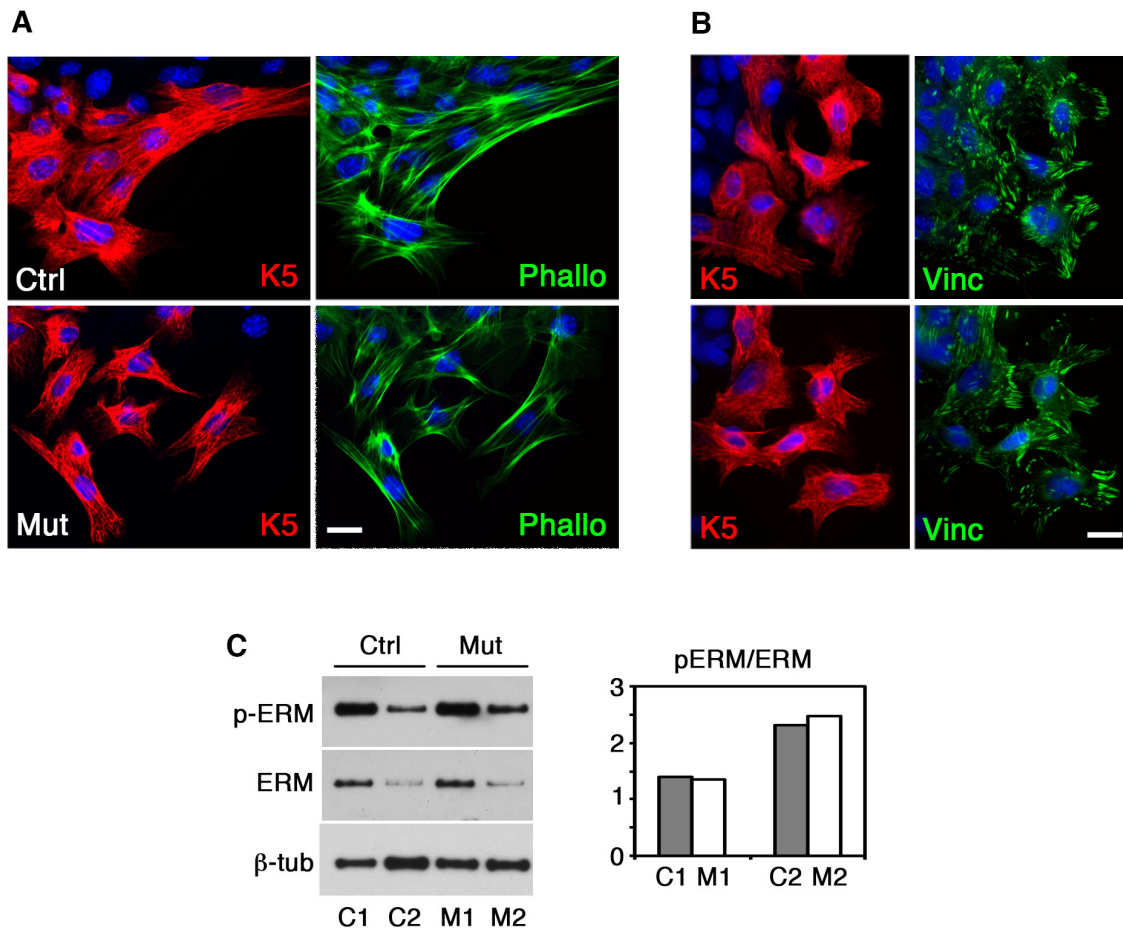


Figure 33 : Organisation du cytosquelette des cellules myoépithéliales mammaires déficientes en Pdpn

(A) Immunofluorescence des explants sur Matrigel en 2D contrôles et mutants montrant le marquage phalloïdine (Phallo) permettant de visualiser les filaments d'actine et anti-K5. Les noyaux sont marqués au Dapi (bleu). **(B)** Immunofluorescence des explants sur Matrigel en 2D contrôles et mutants montrant le marquage vinculine et K5. Les noyaux sont marqués au Dapi (bleu). Les barres d'échelle pour (A) et (B) sont de 25 μ m. **(C)** Western-Blot des protéines pERM, ERM et tubuline β dans deux échantillons pairés de cellules basales isolées contrôles et mutants. L'histogramme représente le rapport entre la quantification des protéines pERM par rapport à la quantité d'ERM totale dans deux expériences distinctes (C1, M1 et C2, M2).

Comme l'actine du muscle lisse, l'actine filamentaire révélée par un marquage à la phalloïdine, est abondante dans les cellules basales contrôles et mutantes qui présentent de multiples fibres de stress (Fig. 33A). Les contacts focaux, témoins de la connexion des filaments d'actine à la matrice sous-jacente, ont été détectés par immuno-marquage de la vinculine, une protéine présente dans le complexe d'adhésion avec les intégrines (Fig. 33B). En termes de densité, forme, taille et localisation, ces contacts semblent analogues dans les cellules basales contrôles et déficientes en Pdpn. Les données de cytométrie présentées dans l'article montraient de plus que la perte de Pdpn n'altérait pas l'expression des chaînes β 1 et α 6 des intégrines dans le compartiment basal (Bresson et al., Fig. 2 et S3).

In vivo, nous avons révélé que la Pdpn co-localise avec pERM aux contacts intercellulaires entre les cellules basales et luminales (Bresson et al., Fig. 1). Les données de la littérature montrent que la présence de Pdpn favorise la phosphorylation des protéines ERM (Wicki et al., 2006; Martin-Villar et al., 2006; Acton et al., 2014; Astarita et al., 2015). La quantification de l'expression de pERM s'est avérée impossible par immunomarquage sur coupes de tissu mammaire mais nous avons comparé, par Western-Blot, l'expression protéique des ERM totales et de pERM dans deux lots pairés de cellules basales isolées à partir de souris adultes contrôles et mutantes. Les deux échantillons testés présentent une grande hétérogénéité d'expression, mais les rapports pERM/ERM ne semblent pas altérés dans les cellules basales déficientes en Pdpn (Fig. 33C).

L'ensemble des résultats obtenus indique que l'absence de Pdpn n'influe pas de façon significative sur les propriétés d'adhésion, d'étalement et d'organisation du cytosquelette d'actine des cellules myoépithéliales, contrairement aux données décrites pour les FRCs et certaines lignées de cellules épithéliales (Wicki et al., 2006; Martin-Villar et al., 2006; Acton et al., 2014; Astarita et al., 2015).

Tout en restant très simplifiés, les modèles de culture 3D se rapprochent davantage du contexte tissulaire *in vivo*, notamment par le maintien de la bicouche épithéliale polarisée, de ses interactions et des contacts avec la membrane basale. Nous avons exploité le modèle d'organoïdes en Matrigel pour comparer les capacités de morphogénèse de l'épithélium mammaire contrôle et mutant. Dans ce modèle, une stimulation par le FGF entraîne l'établissement de bourgeons épithéliaux, réminiscent de ceux formés *in vivo* durant le développement mammaire (Nguyen-Ngoc et al., 2015).

Les organoïdes non traités par le FGF forment des sphères où les cellules basales sont localisées en surface et entourent les cellules luminales (Fig. 34A et B). Les sphères issues des organoïdes contrôles et mutantes ne présentent pas de défauts d'organisation majeurs (Fig. 34A). Comme dans le modèle d'explants, la perte de Pdpn n'affecte pas l'étalement des cellules myoépithéliales.

La plupart des organoïdes traités au FGF développe des bourgeons épithéliaux après quelques jours en culture (Fig. 34B). La quantification du pourcentage d'organoïdes branchés montre que la perte de Pdpn induit une légère diminution des capacités de bourgeonnement de l'épithélium sans affecter l'organisation de la bicouche (Fig. 34B et C). De façon intéressante, la co-stimulation des organoïdes avec FGF et Rspo1 révèle une diminution un peu plus marquée du pourcentage d'organoïdes branchés provenant de l'épithélium mutant (Fig. 34B).

En accord avec nos conclusions établies *in vivo* et dans la lignée BC44 (Bresson et al., article soumis), ces résultats argumentent en faveur d'un défaut de réponse à la stimulation Wnt/ β cat associé à la perte de Pdpn.

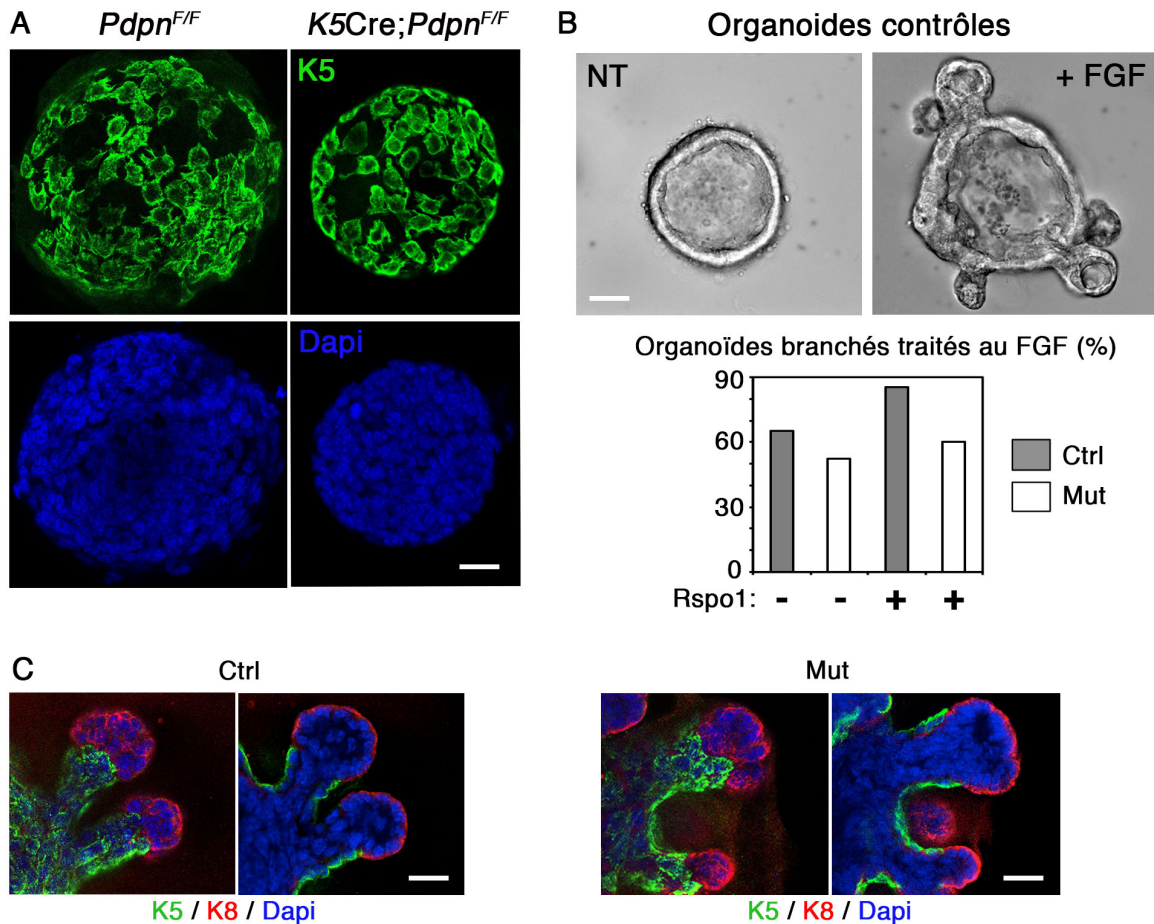


Figure 34 : Impact de la perte de Pdpn dans l'induction de morphogénèse dans des organoïdes.

(A) Immunomarquage anti-K5 (haut) et Dapi (bas) sur des organoïdes *Pdpn*^{F/F} (Ctrl) et *K5Cre;Pdpn*^{F/F} (Mut) cultivés pendant 9 jours en 3D sur Matrigel, image d'un plan prise au microscope confocal. Barre d'échelle : 50 μ m. (B) Images d'organoïdes contrôles en 3D prises au microscope à contraste interférentiel différentiel (DIC) cultivées pendant 6 à 9 jours en présence (+FGF) ou en absence (NT pour non-traité) de FGF (5nM). Barre d'échelle : 25 μ m. L'histogramme représente le pourcentage d'organoïdes branchés après stimulation avec FGF (5nM), en absence ou présence de Rspo1 (500ng/mL) par rapport au nombre total d'organoïdes. Une seule expérience quantifiée est représentée dans l'histogramme. (C) Immunomarquages des cytokératines K5 et K8 sur des organoïdes cultivés et stimulés avec du FGF (5nM) en 3D pendant 9 jours. Les images de microscopie confocale représentent la morphologie branchée d'un organoïde contrôle (gauche) et d'un organoïde mutant (droite). Dans chaque cas, deux plans à des profondeurs différentes sont donnés (vue de dessus et vue transversale). Barre d'échelle : 50 μ m.

IV) Rôle de la partie cytoplasmique de Pdpn dans la potentialisation de la signalisation Wnt

Les études moléculaires de l'interaction de Pdpn avec les protéines ERM ont identifié trois acides aminés basiques, localisés dans la queue cytoplasmique de Pdpn, cruciaux pour cette interaction (Martin-Villar *et al.*, 2006). La queue cytoplasmique de Pdpn contient également deux sérines, pouvant être phosphorylées et entraîner des modulations de sa fonction (Krishnan *et al.*, 2015).

Afin d'évaluer le rôle de la partie cytoplasmique de Pdpn dans la modulation de la signalisation Wnt/ β cat, nous avons exprimé une construction protéique Pdpn, tronquée en C-terminal (Pdpn- Δ C), dans la lignée cellulaire BC44 (Fig. 35A). Cette construction dépourvue de la queue cytoplasmique conserve sa partie extracellulaire reconnue par l'anticorps anti-Pdpn utilisé en cytométrie de flux. Comme les cellules BC44 transfectées avec la Pdpn entière (Pdpn-WT), la quasi-totalité des transfectants stables Pdpn- Δ C sont positifs pour Pdpn (Fig. 35B). Cependant, leur réponse à la stimulation de la voie Wnt/ β cat diffère notablement. Après traitement avec Wnt3a, en présence ou absence de Rspo1, les cellules BC44 exprimant Pdpn- Δ C présentent une expression d'*Axin2* significativement diminuée par rapport aux cellules Pdpn-WT (Fig. 35D). L'expression accrue des récepteurs de Wnt, Fzd7 et Lrp5/6, déjà visible dans les cellules Pdpn-WT, est également augmentée dans les cellules exprimant Pdpn- Δ C (Fig. 35C). Ces expériences démontrent que la potentialisation de la signalisation Wnt par Pdpn-WT est dépendante de sa queue cytoplasmique mais n'est pas relative à la surexpression des récepteurs membranaires de Wnt.

Plusieurs travaux montrent une interaction en *cis* de Pdpn avec CD44 et une régulation corrélée de ces deux protéines (Martin-Villar *et al.*, 2006; Acton *et al.*, 2014). Nous avons donc analysé l'expression de CD44 dans la lignée BC44 par cytométrie de flux et révélé que les trois transfectants (Empty, Pdpn-WT et $-\Delta$ C) expriment CD44. Aucune modification significative de l'expression de CD44 n'a été observée après expression forcée de Pdpn (Fig. 35E).

L'ensemble de ces données indique que la queue cytoplasmique de la Pdpn joue un rôle important dans la régulation positive de la voie Wnt/ β cat dans les cellules basales BC44 et que CD44 est un partenaire potentiel de Pdpn dans ce modèle.

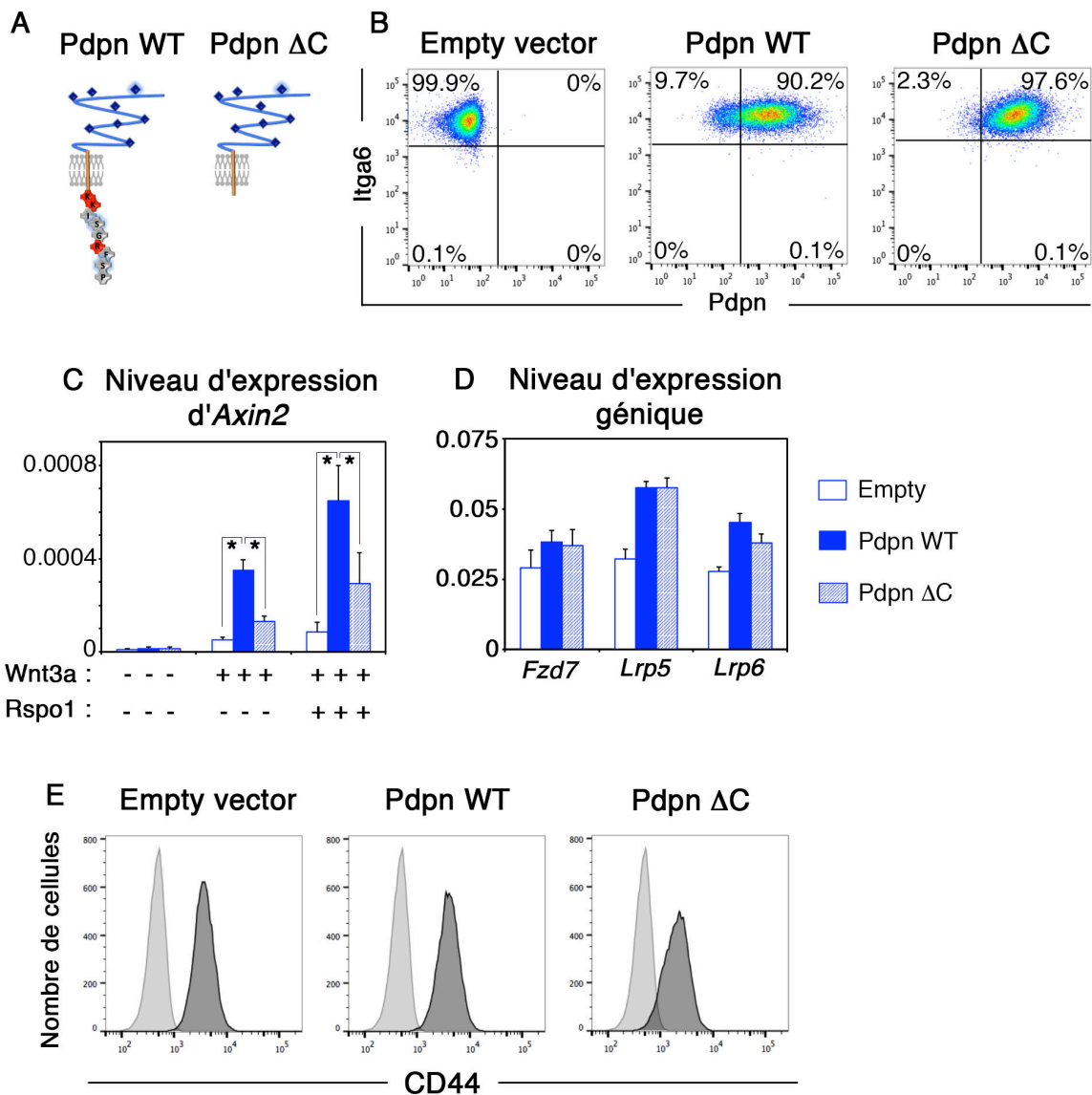


Figure 35 : Etude de la fonction de la queue cytoplasmique de la Pdpn dans la réponse à la signalisation Wnt

(A) Schéma des constructions protéiques Pdpn transfectées dans les cellules BC44. Pdpn-WT représente la forme entière de la Pdpn dite WT; Pdpn Δ C représente la forme tronquée en C-terminal dépourvue de la queue cytoplasmique. **(B)** Analyse en cytométrie de flux de l'expression de Pdpn et Itga6 dans les cellules BC44 transfectées avec un vecteur vide, Pdpn-WT ou Pdpn- Δ C. **(C)** Expression de l'*Axin2* analysée par qPCR dans les cellules BC44 transfectées traitées, pendant 8h, avec Wnt3a (10 ng/mL), seul ou en combinaison avec Rspo1 (50 ng/mL). La moyenne \pm écart-moyens de 3 expériences indépendantes est représentée dans l'histogramme. **(D)** Expression des gènes *Fzd7*, *Lrp5* et *Lrp6* analysée par qPCR sur les cellules BC44 transfectées. Les moyennes \pm écart-moyens ont été calculées à partir de 5 expériences indépendantes. **(E)** Histogrammes représentant l'expression en cytométrie de flux de CD44 (gris foncé), par rapport à l'expression d'un isotype contrôle (gris clair), dans les cellules BC44 transfectées.

V) Etude de la perte de Pdpn dans l'épithélium mammaire des souris $K5\Delta N\beta cat$

Comme nous l'avons vu, l'absence de Pdpn affecte la formation des tumeurs mammaires induites par l'expression constitutive de la βcat (section résultats page 101). Les résultats obtenus précédemment au laboratoire montraient une expansion de la population basale mammaire dans les souris $K5\Delta N\beta cat$ avant l'apparition de tumeurs (Chiche *et al.*, 2017). Pour explorer si la population basale exprimant βcat est perturbée par l'absence de Pdpn dans l'épithélium mammaire prénéoplasique, nous avons analysé les souris $K5\Delta N\beta cat;K5Cre;Pdpn^{F/F}$ à l'âge de 6 mois, bien avant l'apparition de lésions mammaires.

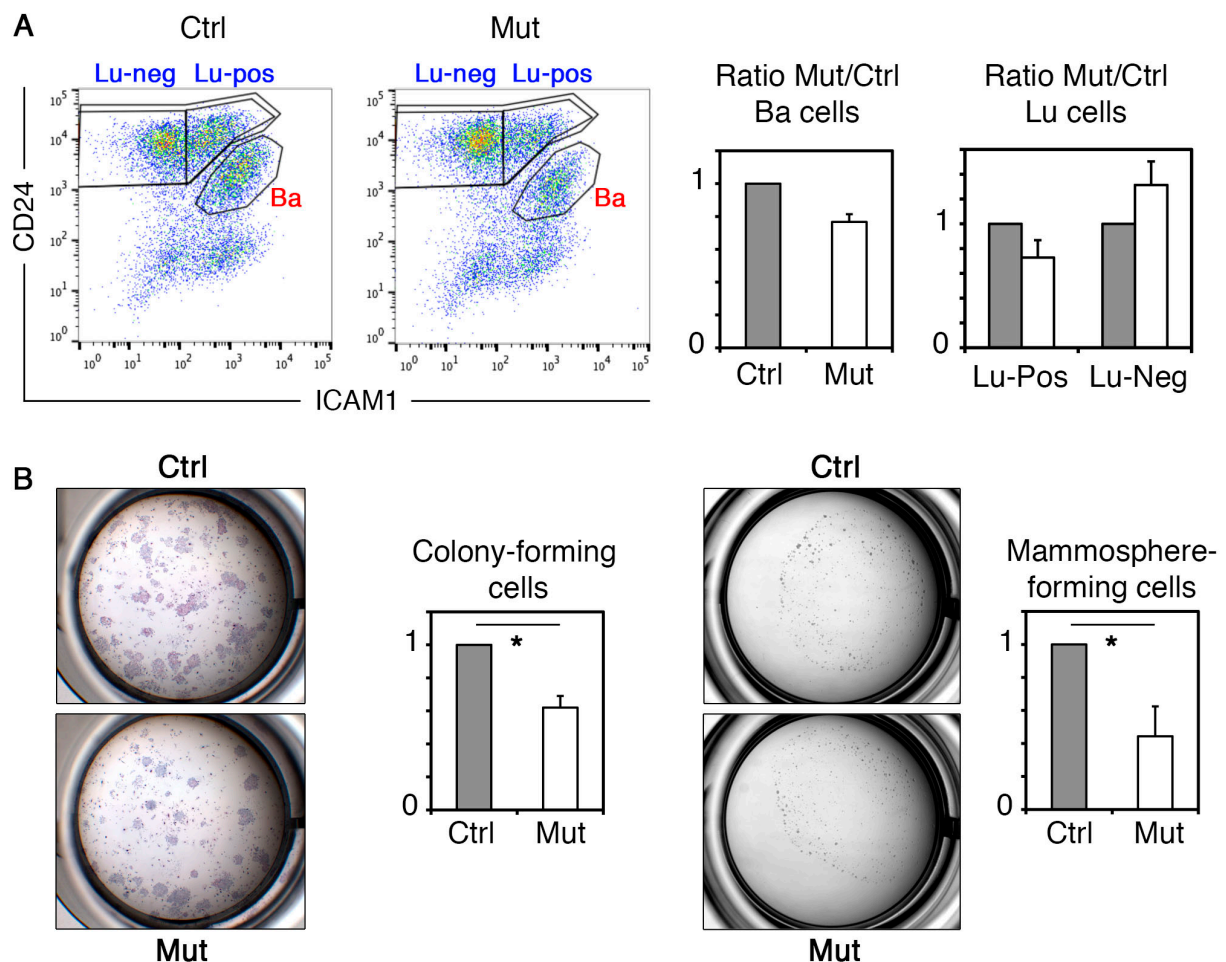


Figure 36 : Analyse des propriétés progénitrices des cellules basales issues des souris $K5\Delta N\beta cat$ (Ctrl) et $K5\Delta N\beta cat;K5Cre;Pdpn^{F/F}$ (Mut) avant l'apparition des tumeurs.

(A) Gauche : Distribution des populations mammaires épithéliales et stromales analysée en cytométrie de flux sur la base de l'expression d'ICAM-1 et CD24 dans les souris âgées de 6 mois. **Droite :** Les histogrammes représentent le pourcentage de cellules basales et lumorales au sein du compartiment épithélial. Les moyennes et écart-moyens de 3 expériences indépendantes sont représentés. **(B) Gauche :** Photographies des colonies formées à partir de 2000 cellules basales colorées en Hématoxyline-Eosine

après 7 jours de culture. **Droite** : Photographies des mammosphères formées par 5000 cellules basales. Les histogrammes représentent la quantification des colonies et mammosphères développées à partir de cellules basales. Les moyennes et écart-moyens de 3 expériences indépendantes sont représentés.

L'analyse en cytométrie de flux des glandes mammaires des souris $K5\Delta N\beta cat;K5Cre;Pdpn^{F/F}$ révèle une réduction du compartiment basal ainsi qu'une perturbation de la balance des populations luminales, au dépens des cellules ER/PR- (Fig. 36A). Les études fonctionnelles montrent une réduction de moitié du potentiel clonogénique en 2D (colonies) et en 3D (condition mammosphère) dans les cellules basales isolées déficientes en Pdpn exprimant $\Delta N\beta cat$ (Fig. 36B). Ces résultats indiquent que l'épithélium mammaire des souris $K5\Delta N\beta cat;K5Cre;Pdpn^{F/F}$ est déjà perturbé avant l'apparition des tumeurs et suggèrent que la diminution du compartiment de cellules souches basales pourrait être à l'origine de la réduction de formation des tumeurs induites par la βcat en l'absence de Pdpn.

VI) Expression et valeur pronostique de Pdpn dans les différents sous-types de cancer du sein humains

Compte tenu des résultats obtenus chez la souris et de la conservation d'expression de Pdpn dans la couche basale de la glande mammaire humaine, nous avons effectué une analyse *in silico* du niveau d'expression de Pdpn dans les différents sous-types de cancers du sein en utilisant le site internet Genexminer (<http://bcgenex.centregauducheau.fr/>). Nous n'avons pas observé de différence significative dans le taux global d'ARNm de Pdpn entre les sous-types de cancers du sein classifiés moléculairement par PAM50 (Fig. 37A).

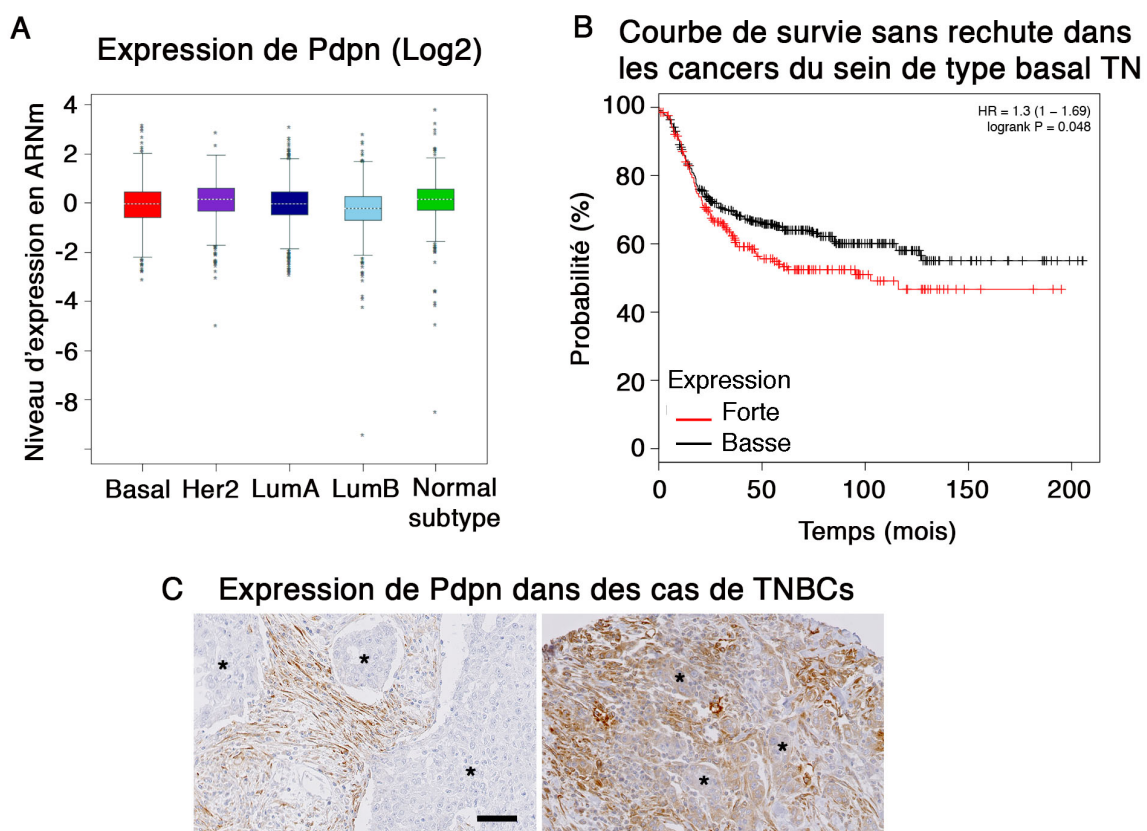


Figure 37 : Analyse *in silico* de l'expression et de la valeur pronostique de Pdpn dans les cancers du sein. (A) Le diagramme présente la moyenne de l'expression de l'ARNm de Pdpn dans les différents sous-types de cancers du sein classifiés sur la base de PAM50. Nombres de cas : Basal (1120), Her2 (802), LumA (1559), LumB (1037), Normal subtype (695 ; [source Genexminer](#)). (B) La courbe de survie dans les cancers du sein de type basal/TN a été réalisée en prenant comme seuil de séparation le tertile haut d'expression de Pdpn. En rouge, les cas où Pdpn est fortement exprimée (1^{er} tiers supérieur, n=204), en noir le reste des cas (2 tiers inférieurs, n=414) ([source KMplotter](#)). (C) Marquage immunohistochimique de Pdpn réalisé sur des tumeurs TN. Dans la tumeur de gauche, le marquage est essentiellement concentré dans les zones péri-tumorales, alors que la tumeur de droite est marquée à la fois dans les zones tumorales (*) et stromales. Barre d'échelle : 80 μ m.

Le site internet KMplotter (<http://kmplot.com>) permet de déterminer *in silico* la valeur pronostique de l'expression d'une protéine spécifique dans les différents sous-types de cancer. Cette approche a révélé qu'une expression forte de Pdpn (tiers supérieur) dans les cancers du sein de type basal constituait un marqueur significatif de mauvais pronostic sur la survie sans rechute des patientes (Fig. 37B). Dans les autres sous-types étudiés, Pdpn ne présente pas de valeur pronostique significative.

Comme pour les analyses transcriptionnelles faites sur Genexminer, la valeur pronostique de Pdpn déterminée par KMPlotter se base sur son expression globale dans la biopsie tumorale, comprenant stroma et cellules tumorales. L'expression de Pdpn dans le stroma, notamment dans les CAFs, a déjà été décrite comme un facteur de mauvais pronostic dans les carcinomes mammaires invasifs (Schoppmann *et al.*, 2012; Pula *et al.*, 2013). En immunohistochimie, l'analyse de l'expression de Pdpn sur des micro-matrices tissulaires issues de carcinomes mammaires humains de type triple-négatif a permis de confirmer que la Pdpn pouvait être fortement et spécifiquement exprimée par les CAFs du stroma tumoral (Fig. 37C). Par ailleurs, il existe de rares cas de tumeurs triples négatives dans lesquelles la Pdpn présente une expression à la fois dans le stroma et dans les cellules tumorales elles-mêmes (Fig. 37C).

D'après nos travaux, il est probable que le mauvais pronostic des cancers du sein TN surexprimant Pdpn soit relatif à son expression dans le stroma. Cependant, il serait intéressant d'explorer plus en détail les caractéristiques des cancers du sein présentant une expression atypique de Pdpn dans le compartiment tumoral.

La compréhension des mécanismes de transition des carcinomes mammaires *in situ* vers les carcinomes invasifs est un sujet de grand intérêt puisqu'elle permettrait de mettre en évidence des acteurs ou inhibiteurs de cette progression et ainsi mieux appréhender l'évolution des patientes. La transition du DCIS vers le carcinome invasif implique le passage des cellules tumorales à travers la barrière physique des cellules basales myoépithéliales puis la rupture de la membrane basale. De ce fait, l'intégrité de la couche basale est considérée comme une barrière protectrice contre l'invasion locale des cellules tumorales (Polyak, 2010; Russell *et al.*, 2015).

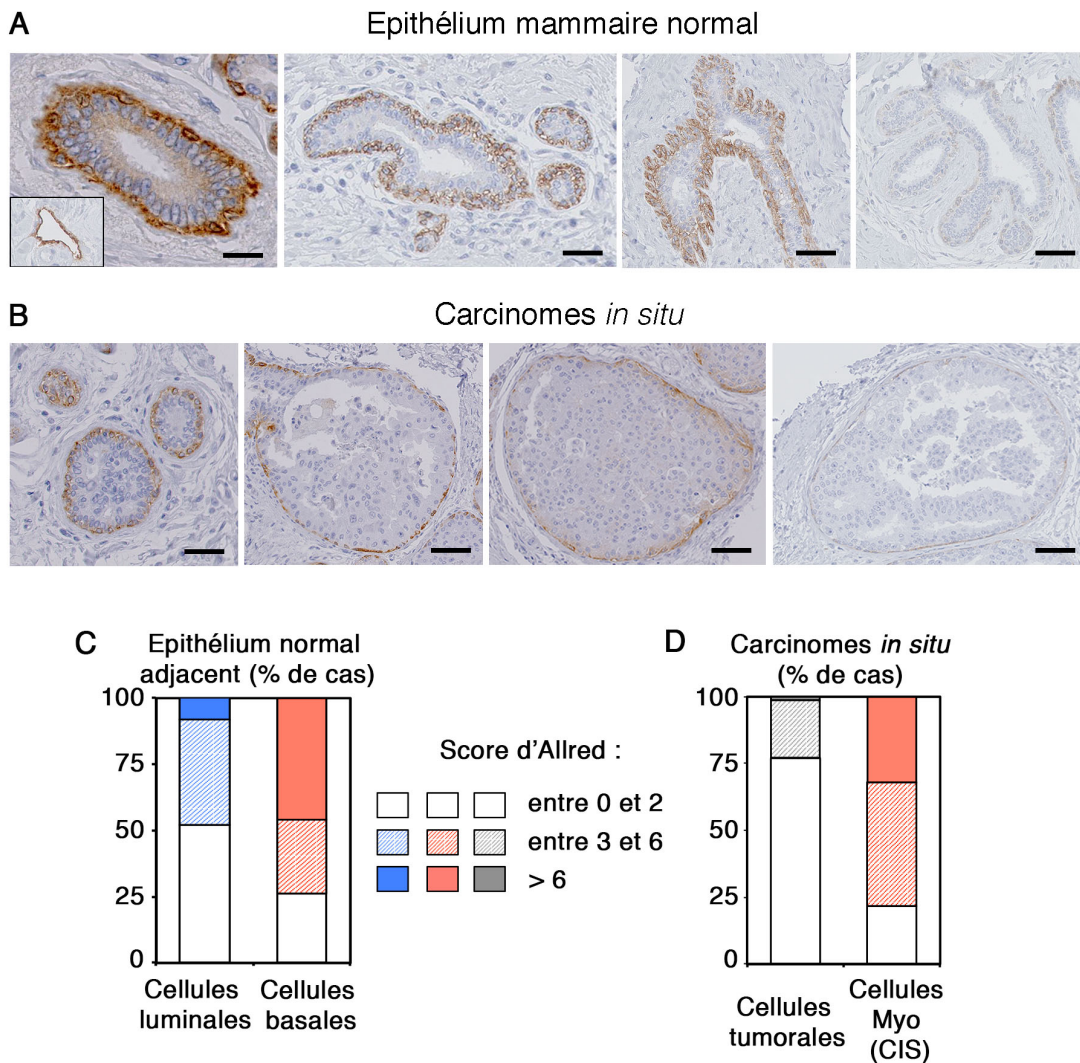


Figure 38 : Expression de la Pdpn dans des cas de carcinomes mammaires *in situ*

(A) Marquage immunohistochimique de Pdpn dans des échantillons de tissus mammaires sains adjacents aux foci tumoraux. Les photographies représentent différentes intensités d'expression de Pdpn. Dans la première image, l'encadré noir est un vaisseau lymphatique fortement marqué par Pdpn, utilisé comme référence interne de marquage. Barres d'échelle de gauche à droite : 60, 110, 110 et 225 μm **(B)** Expression de Pdpn dans des cas de carcinomes *in situ* évaluée par immunohistochimie. Plusieurs cas sont représentés avec différentes intensités de marquage. Barres d'échelle : 90, 100, 100 et 120 μm **(C)** L'histogramme représente l'expression de Pdpn en immunohistochimie dans les cellules luminales et basales des TMA de tissus sains. Les différents cas sont classifiés selon le score d'Allred définissant 3 catégories (entre 0 et 2 : nul ou très faible marquage ; entre 3 et 6 : marquage intermédiaire ; > 6 : marquage fort) et présentés en pourcentage dans chaque catégorie. **(D)** Les intensités de marquage immunohistochimique Pdpn dans les cellules tumorales au sein de la tumeur et les cellules myoépithéliales (Cellules Myo (CIS)) entourant les carcinomes *in situ* ont été quantifiés. L'histogramme représente le pourcentage de cas dans chacune des trois catégories déterminées par le score d'Allred.

L'évaluation de l'implication potentielle de Pdpn dans la transition des DCIS vers les carcinomes invasifs a été réalisée par l'exploration de son expression dans un ensemble de TMA issus de patientes atteintes de cancers du sein diagnostiqués comme DCIS. Pour chaque patiente, nous avons également analysé l'expression de Pdpn dans la biopsie issue de tissu mammaire « sain » adjacent à la tumeur.

Pour réaliser la quantification, nous avons utilisé comme référence interne de marquage les vaisseaux lymphatiques, fortement marqués par Pdpn (Fig. 38A). Son expression dans le tissu mammaire a été comparée à ce contrôle positif afin d'en évaluer l'intensité. De plus, nous avons estimé le pourcentage de cellules positives dans chaque échantillon. Ces deux paramètres (intensité et pourcentage de cellules marquées) nous ont permis de déterminer un score d'Allred pour chaque type cellulaire de l'épithélium normal (luminal et basal) et pour chaque échantillon tumoral.

La Pdpn présente très rarement une expression forte dans les cellules luminales tandis que dans les cellules basales normales, seuls 25% des cas présentent un marquage faible (Fig. 38A et C). Dans l'épithélium normal, l'expression forte de la Pdpn est donc majoritairement restreinte aux cellules basales myoépithéliales de façon concordante avec nos résultats obtenus chez la souris.

Dans les carcinomes *in situ* (CIS), nous avons réalisé le même type de quantification d'expression dans les cellules au sein de la tumeur (cellules tumorales) et dans les cellules basales myoépithéliales entourant le CIS (cellules Myo CIS). Dans la plupart des cas, les cellules tumorales sont négatives ou faiblement marquées par Pdpn (Fig. 38B et D). Par contre, les cellules myoépithéliales entourant le CIS sont majoritairement positives pour Pdpn, avec 30% des cas où elle est exprimée fortement et 42% des cas de façon intermédiaire (Fig. 38B et D).

La comparaison au cas par cas de l'expression de Pdpn dans les cellules basales myoépithéliales de l'échantillon de tissu normal avec celles du carcinome *in situ* révèle que, dans 50% des cas, les cellules basales myoépithéliales entourant le CIS présentent une expression plus faible que les cellules basales normales (données non montrées). Cette perte d'expression n'est pas corrélée à un sous-type de cancer du sein et n'a pas pu être associée à un degré de sévérité particulier de la pathologie pour les 37 cas où nous disposons des informations cliniques.

DISCUSSION

Notre étude, fondée sur l'analyse de souris transgéniques, révèle un rôle pour la Pdpn dans le développement, la fonction des cellules souches et la tumorigenèse mammaires. Nous montrons, en particulier, que la Pdpn est un marqueur spécifique de la couche basale mammaire, qu'elle participe au contrôle de l'activité des cellules souches résidant dans ce compartiment, et qu'elle favorise la tumorigenèse mammaire dans un modèle murin de cancer du sein triple-négatif. Nos données mécanistiques indiquent que la Pdpn potentialise la signalisation Wnt/ β cat dans les cellules souches basales.

Pdpn, un nouveau marqueur de surface du compartiment basal, incluant les cellules souches

La séparation des cellules mammaires par cytométrie de flux requiert l'utilisation de marqueurs de surface robustes dont les épitopes résistent au traitement enzymatique de dissociation cellulaire. A ce titre, les marqueurs les plus utilisés chez la souris sont les chaînes $\alpha 6$ et $\beta 1$ des intégrines qui, combinées à CD24, discriminent les cellules basales, luminales et stromales (Sleeman *et al.*, 2006; Stingl *et al.*, 2006; Shackleton *et al.*, 2006). Nos données révèlent qu'associée à CD24, l'expression de Pdpn sépare ces trois populations, représentant ainsi une alternative aux combinaisons actuelles. L'absence totale d'expression de Pdpn dans les cellules luminales et sa forte expression dans les cellules basales durant la puberté, la maturité et la gestation, permettent de générer des profils de cytométrie particulièrement clairs. A l'inverse, l'expression différentielle des chaînes $\alpha 6$ et $\beta 1$ entre les cellules basales et luminales est peu marquée, surtout durant la gestation où l'expression des intégrines est induite dans la population luminale.

Notre travail démontre que les cellules souches à potentiel régénératif résidant dans le compartiment basal exprime Pdpn à leur surface. Bien que ce marqueur, comme CD24, Itg $\alpha 6$ et Itg $\beta 1$, n'identifie aucune sous-population basale distincte, il serait intéressant de déterminer si le potentiel régénératif est notablement enrichi dans la fraction exprimant fortement Pdpn. La différenciation lactogénique s'accompagne d'une perte de Pdpn dans les cellules myoépithéliales suggérant qu'une forte expression de ce marqueur pourrait constituer un élément de signature des cellules souches basales. A ce titre, l'analyse par cytométrie du tissu lactogénique pourrait permettre d'identifier un réservoir mineur de cellules basales immatures conservant l'expression de Pdpn qui serait réactivé au moment du développement lobulo-alvéolaire lors des gestations successives.

La Pdpn représente donc un marqueur fiable, robuste, et alternatif, permettant de purifier à différents stades du développement mammaire murin la population basale incluant les cellules souches. Il est très certainement utilisable pour l'analyse par cytométrie du tissu mammaire humain puisque son profil d'expression est conservé *in situ*.

La Pdpn n'est pas cruciale pour la fonction contractile des cellules myoépithéliales matures

La lactation est marquée par la différenciation terminale de l'épithélium mammaire. La maturation des cellules basales myoépithéliales, comme celle des cellules luminales sécrétrices, est progressive. Elle comprend l'acquisition de certaines protéines spécifiques du muscle lisse, probablement requises pour un renforcement des propriétés contractiles de ces cellules en réponse à l'ocytocine délivrée au cours de la lactation (Deugnier *et al.*, 1995). La signature moléculaire des cellules myoépithéliales en lactation n'est pas connue, mais à notre connaissance la Pdpn représente à ce jour le seul exemple de perte spécifique d'expression.

Des travaux récents rapportent que la Pdpn est un acteur majeur du contrôle de la contractilité des FRCs dans les ganglions lymphatiques (Acton *et al.*, 2014; Astarita *et al.*, 2015). Son absence dans les cellules myoépithéliales matures indique qu'elle ne joue pas un rôle essentiel dans les capacités de contraction de ces cellules. De plus, la perte précoce de Pdpn dans les cellules basales ne conduit pas à des défauts de lactation, indiquant que leur maturation fonctionnelle n'est pas profondément altérée. D'autres récepteurs sont connus pour réguler la contractilité cellulaire via les RhoGTPases, notamment l'intégrine $\alpha3\beta1$ dont l'absence dans les cellules basales entraîne un défaut de capacité lactogénique (Raymond *et al.*, 2011). L'importance de la Pdpn dans les mécanismes contrôlant la contractilité paraît donc dépendre du contexte cellulaire.

Partenaires moléculaires extracellulaires et cytoplasmiques de Pdpn

Notre travail révèle que dans l'épithélium mammaire, l'expression de Pdpn est concentrée aux contacts intercellulaires, basal-basal et basal-luminal, suggérant une implication dans des interactions cellulaires homotypiques et/ou hétérotypiques au sein de la bicouche. Clec2, le récepteur de Pdpn dans le système immunitaire (pour revue, Suzuki-Inoue *et al.*, 2017), est absent de l'épithélium mammaire. On ne peut pas cependant exclure l'existence d'autres récepteurs non identifiés encore, notamment au sein de la superfamille des Clecs dont plusieurs membres sont exprimés par les cellules basales et luminales mammaires comme l'indique l'analyse de leurs profils transcriptionnels (Kendrick *et al.*, 2008 et données non présentées). Ces récepteurs

pourraient intervenir dans une signalisation bidirectionnelle comme c'est décrit pour les interactions Pdpn/Clec2 dans les cellules immunitaires (Acton *et al.*, 2012; Acton *et al.*, 2014; Astarita *et al.*, 2015).

De façon notable, l'expression de Pdpn *in situ* est corrélée à celle des pERMs aux contacts intercellulaires. En accord avec ces observations, plusieurs travaux rapportent une interaction directe de Pdpn avec des membres de la famille des ERM, notamment ezrine et moésine (Martin-Villar *et al.*, 2006; Acton *et al.*, 2014; Astarita *et al.*, 2015). Nos données de qPCR indiquent que l'ezrine est majoritaire dans les cellules luminales mammaires, tandis que la moésine est fortement exprimée dans les cellules basales. La moésine représenterait donc le partenaire cytoplasmique privilégié de Pdpn, pouvant lui fournir une connexion avec le cytosquelette d'actine et contribuer ainsi à la transmission d'un signal moléculaire dans les cellules basales.

Dans notre modèle transgénique, la perte de Pdpn n'entraîne pas une diminution mesurable de l'expression de la forme phosphorylée active des ERM dans les cellules basales fraîchement isolées, contrairement à ce qui a été rapporté dans les FRCs en culture ou dans des lignées de cellules fibroblastiques et épithéliales (Martin-Villar *et al.*, 2006; Acton *et al.*, 2014; Astarita *et al.*, 2015). De même, nous n'avons pas observé de réorganisation majeure du cytosquelette d'actine dans les cellules basales myoépithéliales déficientes en Pdpn mises en culture sur support Matrigel. Il est possible que des défauts plus discrets soient décelables. Leur analyse pourrait être abordée plus facilement dans la lignée basale mammaire BC44 exprimant de façon forcée la Pdpn.

La perte précoce de Pdpn perturbe la morphogénèse et la fonction des cellules souches mammaires

Notre analyse a révélé que la Pdpn était exprimée dans les cellules souches bipotentes K5+ du bourgeon mammaire embryonnaire. Sa perte précoce dans le modèle *K5Cre;Pdpn^{F/F}* n'entraîne pas de défaut visible de morphogénèse à la puberté, indiquant qu'elle ne compromet pas les processus de migration cellulaire, collective et individuelle, qui sont particulièrement importants à ce stade de développement intense (Ewald *et al.*, 2012). Chez la souris adulte, l'épithélium déficient en Pdpn se développe sans défaut majeur d'organisation mais il est moins ramifié, présentant notamment une réduction des ramifications secondaires et tertiaires au stade nullipare et en début de gestation. Il est établi que ces processus sont contrôlés en aval de la progestérone par des médiateurs locaux appartenant essentiellement à la voie Wnt (pour revues, Brisken et Ataca, 2015; Yu *et al.*, 2016).

L'ablation embryonnaire de Pdpn dans l'épithélium mammaire provoque une perturbation de l'activité des cellules souches basales détectable par des essais fonctionnels dès la puberté. Le compartiment basal des souris *K5Cre;Pdpn^{F/F}* présente notamment une diminution de la fréquence des cellules souches associée à des défauts de croissance et de différenciation *ex vivo* ainsi qu'un potentiel d'autorenouvellement réduit. Le contenu en progéniteurs luminaux dans l'épithélium adulte est également réduit. De façon concordante, les transplantations en série réalisées à partir de fragments épithéliaux contrôles et mutants ont montré que la perte de Pdpn entraînait une réduction du potentiel de développement de l'épithélium mammaire à long-terme. Ces essais menés dans un environnement hormonal contrôlé ont permis de confirmer que les défauts observés dans l'épithélium mammaire déficient en Pdpn sont inhérents à la perte ciblée de Pdpn dans les cellules basales, et non à une perturbation d'origine systémique des souris *K5Cre;Pdpn^{F/F}*.

Le développement post-natal ainsi que les populations souches de la glande mammaire sont régulés localement par des interactions moléculaires réciproques entre les cellules basales et lumineuses, comprenant un ensemble complexe de relations intercellulaires directes et de mécanismes de communication paracrine ([pour revues, Brisken et O'Malley, 2010; Macias et Hinck, 2012; Brisken et Ataca, 2015](#)). Les cellules basales produisent des facteurs de croissance solubles, comme les FGFs, l'HGF et Nrg1, capables de réguler la population lumineuse progénitrice et les processus de ramification ([Macias et al., 2011; Forster et al., 2014; Di-Cicco et al., 2015](#)). Par ailleurs, la stimulation hormonale des cellules lumineuses ER/PR+ induit la libération de facteurs qui influencent l'expansion des cellules lumineuses progénitrices ER/PR- et des cellules souches basales. Les ligands de la voie Wnt/ β cat, tels que Wnt4 et Rspo1, jouent un rôle particulièrement important dans l'expansion du compartiment de cellules souches basales et la ramification latérale ([Cai et al., 2014; Rajaram et al., 2015; Fig. 18](#)).

L'expression de différents gènes cibles de la voie Wnt/ β cat est perturbée dans les cellules basales déficientes en Pdpn

La Pdpn, localisée à l'interface entre les cellules basales et lumineuses mammaires, pourrait contribuer à moduler la réponse des cellules basales aux stimuli délivrés par leur niche, en particulier aux ligands de la voie Wnt/ β cat. En accord avec cette hypothèse, l'expression de plusieurs gènes cibles de la voie Wnt/ β cat, tels que Ccnd1, K15, Vcan et Jag1, est diminuée dans les cellules basales adultes déficientes en Pdpn. Ces molécules n'ont pas toutes de fonction établie

mais leur expression est dans l'ensemble associée au compartiment de cellules souches de divers tissus épithéliaux, dont celui de la glande mammaire.

La *Ccnd1*, un acteur majeur de la transition G1/S du cycle cellulaire, est nécessaire au développement post-natal normal de la glande mammaire, notamment à l'expansion lobulo-alvéolaire (Fantl *et al.*, 1999). La perte de *Ccnd1* dans les cellules épithéliales mammaires limite leur capacité de régénération canalaire et de formation de ramification latérale après transplantation. Elle réduit également leur potentiel d'autorenouveaulement *ex vivo* (Jeselsohn *et al.*, 2010).

La kératine de type II K15 est considérée comme un marqueur des cellules souches des follicules pileux, son expression étant restreinte au bulbe folliculaire, un site d'activation de la voie Wnt/ β cat (pour revue, Yang et Cotsarelis, 2010). Sa fonction n'a pas été explorée dans la glande mammaire, mais elle est décrite comme une cible de la signalisation Wnt/ β cat (Meyer-Abt *et al.*, 2013). Elle pourrait s'associer avec d'autres kératines basales de type I, telles que K5 (pour revue, Bose *et al.*, 2013), dont le niveau d'expression reste inchangé dans les cellules basales déficientes en Pdpn.

Versican est un protéoglycane de la matrice extracellulaire dont le promoteur est directement régulé par les facteurs de transcription Tcf/Lef (Rahmani *et al.*, 2012). Comme K15, l'expression de Versican est associée aux cellules souches du follicule pileux (pour revue, Yang et Cotsarelis, 2010). Son expression ectopique dans des lignées tumorales mammaires favorise leur capacité à former des sphères (Du *et al.*, 2013). Par ailleurs, des données non publiées du laboratoire ont montré que l'expression de Versican est diminuée *in vivo* dans les cellules basales mammaires déficientes en Myc, un gène cible majeur de la voie Wnt/ β cat. La perte de Myc entraîne l'abolition du potentiel régénératif des cellules souches basales (Moumen *et al.*, 2012). Le rôle potentiel de Versican dans la niche des cellules souches mammaires reste toutefois à élucider.

Le promoteur de *Jag1*, un ligand majeur de la voie Notch, possède des sites de liaison aux facteurs de transcription Tcf/Lef (Katoh et Katoh, 2006; Rodilla *et al.*, 2009), indiquant une interaction entre les signalisations Wnt et Notch. La voie Notch spécifie le lignage luminal et contrôle la prolifération des progéniteurs luminaux mammaires (Bouras *et al.*, 2008; Rodilla *et al.*, 2015). La réduction d'expression de *Jag1* dans les cellules basales déficientes en Pdpn pourrait contribuer à la diminution du contenu en progéniteurs clonogéniques observée dans le compartiment luminal.

Nous n'avons pas détecté de modulation de l'*Axin2*, dans les cellules basales déficientes en Pdpn fraîchement isolées des souris adultes nullipares. A ce stade, la population *Axin2*⁺ constitue 5% du

compartiment basal mammaire qui, dans son ensemble, exprime faiblement l'*Axin2* au niveau transcriptionnel (van Amerongen *et al.*, 2012). Il est probable que nos analyses en qPCR ne nous permettent pas d'accéder de manière fiable à l'expression d'*Axin2* dans ce contexte. Par contre, lors d'une stimulation *ex vivo* par le ligand Wnt3a, les cellules basales adultes déficientes en Pdpn présentent une réduction de l'induction d'*Axin2*, indiquant une atténuation de la réponse à la signalisation Wnt/ β cat.

Dans leur ensemble nos résultats indiquent que la perte de Pdpn conduit à une modulation négative de certains gènes cibles de la voie Wnt/ β cat dans les cellules basales mammaires, et à un défaut d'induction de sa cible majeure, *Axin2*, dans des conditions de stimulation *ex vivo*.

La perte de Pdpn affecte la population basale Lgr5+

Les mécanismes de signalisation Wnt, contrôlés par les couples ligands/récepteurs, Wnts/Fzds et Lgrs/Rspos, ne sont que partiellement élucidés dans l'épithélium mammaire (pour revue, Yu *et al.*, 2016). Chez l'adulte, les cellules basales mammaires positives pour *Axin2* et *Lgr5* constituent des petites sous-populations cellulaires distinctes (van Amerongen *et al.*, 2012; Plaks *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2015; Fu *et al.*, 2017 ; Fig. 18). *Lgr4*, un ligand alternatif des Rspos, est largement exprimé dans la couche basale de l'épithélium (Wang *et al.*, 2013). Dans la glande mammaire, la fraction *Axin2*⁺ est définie comme répondant à la signalisation Wnt/ β cat alors que celle positive pour *Lgr5* n'exprime pas de marques d'activation de cette voie, contrairement aux cellules souches intestinales *Lgr5*⁺ (Zeng et Nusse, 2010; Plaks *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2015; Fu *et al.*, 2017). D'après des études récentes, la population basale adulte *Lgr5*⁺ contiendrait un pool de cellules souches bipotentes quiescentes, apparentées à celles du bourgeon mammaire embryonnaire (Trejo *et al.*, 2017; Fu *et al.*, 2017).

Notre travail révèle une surexpression de *Lgr5* dans les cellules basales déficientes en Pdpn. En l'absence d'anticorps anti-*Lgr5* fiable, nous n'avons pas pu tester si cette surexpression était liée à une surreprésentation de la population *Lgr5*⁺. Cette hypothèse serait cependant en accord avec les capacités de croissance restreintes des cellules basales déficientes en Pdpn observées *ex vivo* et leur propension à générer des sphères enrichies en cellules *K5*⁺/*K8*⁺, un phénotype caractéristique des cellules souches mammaires fœtales (Spike *et al.*, 2012).

Pour déterminer si la proportion de cellules *Lgr5*⁺ est modulée à l'âge adulte par la perte embryonnaire de Pdpn, il serait intéressant d'analyser cette fraction dans nos souris mutantes après croisement avec une souris rapportrice *Lgr5*-GFP. Ce modèle permettrait aussi de préciser le niveau d'expression de Pdpn dans la sous-population *Lgr5*⁺.

La Pdpn est un potentiateur de la signalisation Wnt/ β cat

In vivo, les ligands Wnt4 et Rspo1, produits par différentes sous-populations lumineales, agissent en synergie pour ajuster la signalisation Wnt/ β cat dans les cellules basales mammaires (Cai *et al.*, 2014; Rajaram *et al.*, 2015 ; Fig 18). Dans nos mutants *K5Cre;Pdpn^{F/F}*, la population lumineale est affectée et son analyse moléculaire a révélé de faibles niveaux d'expression de Rspo1 qui pourraient expliquer, en partie, une atténuation de la voie Wnt/ β cat dans les cellules basales mammaires.

Afin d'étudier l'implication de la Pdpn dans la signalisation Wnt/ β cat en dehors de la complexité tissulaire, nous avons utilisé la lignée basale mammaire murine BC44, dans laquelle nous avons forcé l'expression de Pdpn, absente des cellules parentales (Deugnier *et al.*, 1999; Deugnier *et al.*, 2002). La réponse moléculaire des cellules BC44, exprimant ou non la Pdpn, a été analysée après stimulation avec Wnt3a et avec Wnt3a/Rspo1, connus pour activer la voie Wnt/ β cat dans les cellules basales mammaires (Zeng et Nusse, 2010; Cai *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015). A l'aide de ce modèle, nous avons montré que la présence de Pdpn potentialise la signalisation Wnt/ β cat. Elle stimule l'expression d'Axin2 ainsi que celle de la β cat activée et favorise sa translocation nucléaire. De plus, l'expression ectopique d'une forme constitutivement activée de la β cat dans les cellules BC44 a révélé que la Pdpn pouvait agir, dans ce contexte, en aval du signalosome membranaire de la voie Wnt/ β cat.

Différents travaux ont mis en évidence l'importance du domaine cytoplasmique dans les mécanismes de signalisation intracellulaire par Pdpn (Wicki *et al.*, 2006; Martin-Villar *et al.*, 2006; Krishnan *et al.*, 2013; Acton *et al.*, 2014; Astarita *et al.*, 2015; Krishnan *et al.*, 2015). L'utilisation d'une construction tronquée dépourvue de la partie cytoplasmique a montré que ce domaine jouait un rôle important dans la potentialisation de la signalisation Wnt/ β cat par Pdpn dans les cellules BC44. La co-localisation de Pdpn avec pERM dans les cellules basales mammaires *in situ* suggère fortement qu'une interaction entre Pdpn et moésine est impliquée dans la réponse observée. Nous testons à l'heure actuelle cette hypothèse à l'aide d'une construction mutée pour les trois acides aminés spécifiques de l'interaction Pdpn/ERM. En lien avec l'activation des ERM, des travaux indiquent que Pdpn module la signalisation par les RhoGTPases dans certaines cellules épithéliales (Wicki *et al.*, 2006; Martin-Villar *et al.*, 2006; Cueni *et al.*, 2010b). Cette voie est

maintenant connue pour interagir avec la signalisation Wnt/ β cat, notamment en régulant l'accumulation nucléaire de la β cat (Schlessinger *et al.*, 2009).

D'autres hypothèses d'action du domaine cytoplasmique sont envisageables. Le rôle potentiel des deux sites de phosphorylation S167 et S171 pourrait être analysé à l'aide des constructions non-phosphorylables et phospho-mimétiques décrites dans la littérature (Krishnan *et al.*, 2013; Acton *et al.*, 2014; Krishnan *et al.*, 2015). Par ailleurs, les domaines transmembranaires et cytoplasmiques de Pdpn participent à sa relocalisation dans les radeaux lipidiques, micro-domaines membranaires potentiellement importants pour l'activation de la signalisation Wnt (Fernandez-Munoz *et al.*, 2011; Ozhan *et al.*, 2013). La perturbation de la formation de ces radeaux par un traitement des cellules BC44 avec un composé solubilisant le cholestérol pourrait permettre d'aborder ce point.

La tetraspanine CD9 et le récepteur CD44 sont des partenaires membranaires potentiels de Pdpn susceptibles de moduler sa fonction (Nakazawa *et al.*, 2008; Martin-Villar *et al.*, 2010). Ils sont fortement exprimés par les cellules basales mammaires (Kendrick *et al.*, 2008; Louderbough *et al.*, 2011; Di-Cicco *et al.*, 2015) et de plus, ont été impliqués dans le contrôle de la signalisation Wnt/ β cat. CD9 est un antagoniste de la voie Wnt/ β cat qui favorise l'export de la β cat via les exosomes (Chairoungdua *et al.*, 2010). CD44 régule de façon positive la signalisation Wnt/ β cat, en contrôlant l'activation de Lrp6 et sa localisation à la membrane (Schmitt *et al.*, 2015). Ces mécanismes requièrent l'interaction cytoplasmique de CD44 avec les protéines ERM et le cytosquelette d'actine. Il serait intéressant de déterminer, dans le modèle BC44, si le rôle de Pdpn dans la potentialisation de la signalisation Wnt/ β cat nécessite son interaction *in cis* avec des partenaires membranaires, comme CD9 ou CD44.

L'ensemble des données obtenues dans nos modèles de perte et gain de fonction indique que dans les cellules basales mammaires, la Pdpn possède un rôle intrinsèque dans la signalisation Wnt/ β cat et peut participer au contrôle paracrine de la fonction des cellules souches (Fig. 39). Les mécanismes par lesquels Pdpn interfère avec la cascade de signalisation Wnt/ β cat, régulée à de multiples niveaux entre la surface cellulaire et le noyau, restent à préciser.

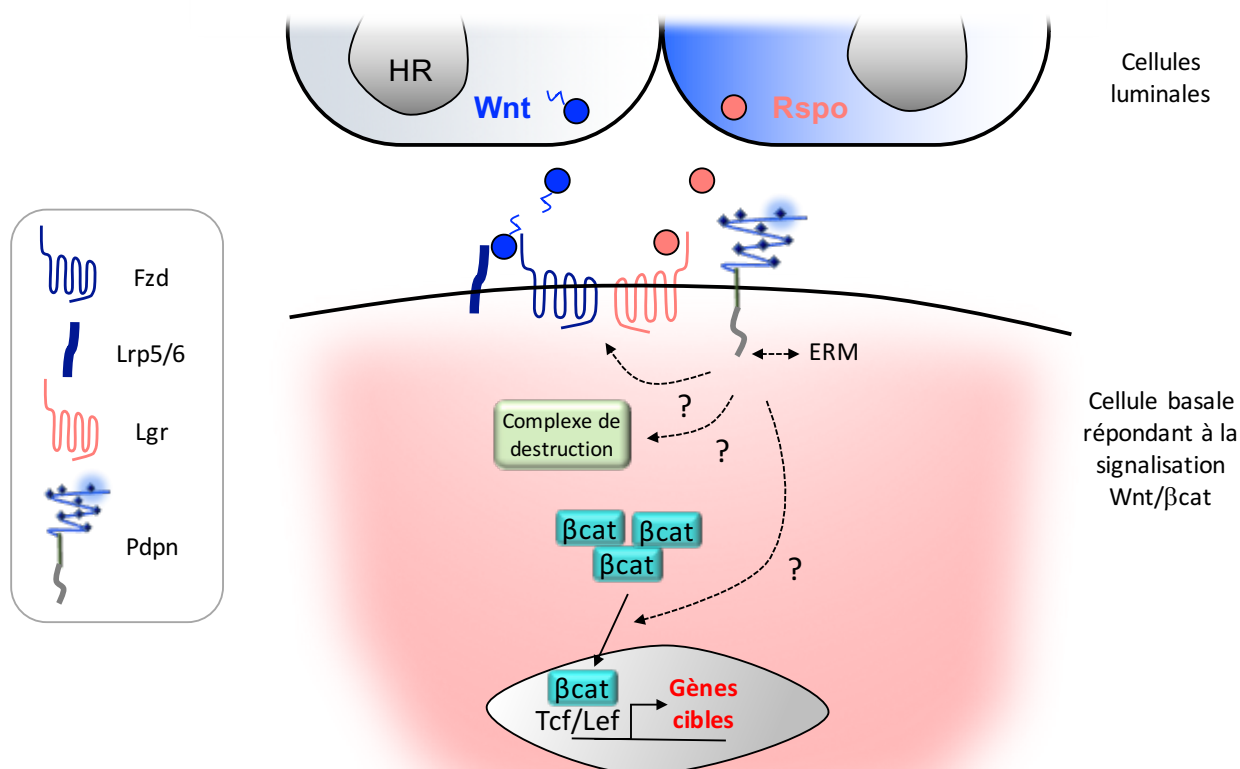


Figure 39 : Modèle de l'implication de la Pdpn dans les interactions luminal-basal contrôlées par la signalisation Wnt/βcat.

Dans la cascade des événements conduisant à l'activation de la voie, la Pdpn pourrait agir au niveau du signalosome membranaire, du complexe de destruction ou du transport nucléaire de la βcat.

La perte de Pdpn induit une atténuation de la tumorigénèse mammaire dirigée par l'activation de la voie Wnt/βcat

La surexpression de Pdpn a été documentée dans de nombreux types de carcinomes où elle est souvent concentrée au front invasif (pour revues, Wicki et Christofori, 2007; Suzuki-Inoue *et al.*, 2017). Elle est de plus associée à une progression tumorale plus rapide dans des modèles murins de tumeurs de peau et de pancréas (Wicki *et al.*, 2006; Renart *et al.*, 2015). Nous avons trouvé que les tumeurs mammaires triple-négatives induites par l'expression d'une forme activée de βcat, expriment fortement Pdpn, notamment au front invasif. Dans les souris *K5ΔNβcat*, les tumeurs mammaires sont le résultat de l'amplification aberrante des cellules souches de type basal (Moumen *et al.*, 2013). Nos données montrent que l'inactivation de Pdpn dans ce modèle entraîne : i) une diminution de la population de souche basale dans l'épithélium mammaire pré-

néoplasique ; ii) un retard dans l'apparition de tumeurs et une diminution de leur nombre ; et iii) une inhibition de formation de tumorsphères en culture. L'ensemble de ces résultats suggère que l'atténuation de la tumorigenèse en absence de Pdpn pourrait être due, au moins en partie, à la réduction du compartiment de cellules souches basales, cibles de la transformation oncogénique par la β cat.

L'expression ectopique de la Pdpn dans un contexte cellulaire épithélial favorise l'acquisition de caractéristiques mésenchymateuses, mais l'activation d'un programme EMT « complet » reste discutée (pour revues, Wicki et Christofori, 2007; Renart *et al.*, 2015). L'identité basale des tumeurs formées par les souris $K5\Delta N\beta cat$ en absence de Pdpn est conservée. Toutefois, elles surexpriment la cadhérine E et présentent une répression des gènes *Snai1*, *Vim* et *Twist1*, suggérant une transition vers un phénotype plus épithélial avec un renforcement des jonctions intercellulaires. L'EMT est considérée comme un processus dynamique et réversible qui comprend un large spectre d'états transitionnels entre les phénotypes épithéliaux et mésenchymateux (Tan *et al.*, 2014; pour revues, Savagner, 2015; Nieto *et al.*, 2016).

La voie de signalisation Wnt/ β cat est étroitement connectée à l'activation des processus d'EMT, caractérisés par une régulation négative de l'expression de la cadhérine E via l'induction des membres des familles Snails et Twists (pour revue, Heuberger et Birchmeier, 2010). A leur front invasif, certains carcinomes présentent des marques d'activation de la voie Wnt/ β cat, ainsi que des caractéristiques mésenchymateuses typiques d'un programme d'EMT (pour revue, Fodde et Brabletz, 2007; Suzuki *et al.*, 2008a). Il est donc probable que la Pdpn, en potentialisant la signalisation Wnt/ β cat, favorise l'expression de caractéristiques mésenchymateuses dans notre modèle de tumorigenèse mammaire. Il est intéressant de noter qu'en accord avec nos données, l'expression de *Snail1*, et non de son paralogue *Snail2*, est associée à l'activation de l'EMT dans des modèles de tumeurs mammaires (Ye *et al.*, 2015).

Valeur diagnostique et pronostique de la Pdpn dans les cancers du sein

La couche myoépithéliale constitue une barrière naturelle protectrice contre la progression des CIS en carcinomes invasifs. Son intégrité est déterminante pour contenir les processus d'invasion locale (pour revue Moumen *et al.*, 2011). Il a été rapporté que plusieurs protéines spécifiques du lignage basal, notamment p63, calponine et α -SMA, sont perdues dans les cellules myoépithéliales entourant les CIS, et ce avant l'apparition de défaut structurel de la couche (Russell *et al.*, 2015). En accord avec ces données, notre analyse des TMA indique que l'expression de Pdpn dans les cellules basales myoépithéliales est atténuée dans 50% des cas de CIS par rapport à l'épithélium

normal adjacent. Ces données suggèrent que la Pdpn pourrait représenter un élément de signature de la progression des CIS et avoir une valeur pronostique de l'évolution de la maladie. A ce titre, il serait intéressant de déterminer si la perte de Pdpn est précoce ou tardive, en la comparant à celle des autres marqueurs myoépithéliaux altérés.

Notre analyse *in silico* sur une large cohorte de patientes atteintes de cancer du sein a révélé qu'une forte expression transcriptionnelle de Pdpn semble corrélérer avec un mauvais pronostic dans le sous-type basal/triple-négatif uniquement. Ces données reposent sur l'expression globale de Pdpn dans la biopsie des patientes de cette cohorte, comprenant cellules stromales et tumorales. Notre screening préliminaire des carcinomes triple-négatifs par immunohistologie montre que la Pdpn est fréquemment exprimée dans les CAFs alors qu'elle l'est rarement dans les cellules tumorales, confirmant des données de la littérature ([Schoppmann et al., 2012](#); [Pula et al., 2013](#)). Le groupe des TNBC étant très hétérogène, il serait intéressant de déterminer si les rares cas d'expression tumorale correspondent à un sous-type particulier, et s'il existe une corrélation entre l'expression de Pdpn, des signes d'hyper-activation de la voie Wnt/ β cat, et un haut score d'EMT. De façon intéressante, des données préliminaires, obtenues en collaboration avec J. P. Thiery, indiquent une corrélation significative entre l'expression de Pdpn et le sous-type « claudin-low » associé à un haut score EMT ([Tan et al., 2014](#); données non publiées).

La présence de Pdpn dans les CAFs corrèle avec un mauvais pronostic pour les patientes atteintes de cancers du sein triple-négatifs mais sa fonction reste à préciser ([Schoppmann et al., 2012](#); [Pula et al., 2013](#)). On peut postuler que la forte expression de cette molécule dans ces cellules fibroblastiques pourrait affecter leurs propriétés mécaniques et physiologiques, et impacter la croissance tumorale.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Malgré de nombreux travaux impliquant la Pdpn dans le développement tissulaire et la tumorigenèse, sa distribution précise et sa fonction potentielle dans l'épithélium mammaire en développement n'avaient pas été étudiées. Notre travail a révélé que l'expression de Pdpn est régulée de façon spatio-temporelle dans l'épithélium mammaire murin. Présente dès l'embryogenèse, cette protéine transmembranaire est restreinte à la couche basale mammaire après la naissance mais absente des cellules myoépithéliales durant la lactation. Elle n'est pas essentielle aux mécanismes de migration des cellules basales de la coiffe gouvernant la morphogenèse canalaire durant la puberté, ni aux compétences contractiles des cellules myoépithéliales matures. En revanche, notre travail révèle qu'au cours du développement post-natal mammaire, la Pdpn participe au contrôle de la signalisation Wnt/ β cat qui régule de façon paracrine la fonction des cellules souches résidant dans le compartiment basal, mettant ainsi en évidence un rôle nouveau pour cette molécule et un nouveau partenaire de cette voie de signalisation clef pour le développement et la tumorigenèse mammaires.

Les mécanismes moléculaires reliant Pdpn à l'activation de la signalisation Wnt/ β cat restent à définir précisément. Une de nos hypothèses impliquerait une modulation de l'activation des RhoGTPases via le site de liaison aux ERM5 du domaine cytoplasmique de la Pdpn. Nous la testons à l'heure actuelle dans le modèle de la lignée basale mammaire BC44.

L'expression conservée de Pdpn dans l'épithélium mammaire humain suggère une fonction moléculaire similaire. Elle représente un marqueur additionnel des cellules basales mammaires, potentiellement intéressant pour évaluer la transition des CIS vers les carcinomes invasifs. Enfin, sa fonction dans les CAFs des cancers du sein triple-négatifs qui la surexpriment fortement mérite sans doute d'être explorée.

MATERIELS ET METHODES

1) Modèles de souris transgéniques

Les souris *K5Cre*, exprimant la recombinaise Cre sous le contrôle du promoteur de la kératine 5 (actif dans les cellules basales des épithélia stratifiés, dont la glande mammaire), ont été fournies par le Dr. J.L. Jorcano ([Ramirez et al., 2004](#)). Les souris *K5ΔNβcat* ont été générées par le laboratoire et décrites précédemment ([Teuliere et al., 2005](#)).

Les souris *Pdpr^{F/F}* ont été générées par le prestataire Ozgene (Bentley DC, Australie). Des séquences LoxP, entourant l'exon 1 du gène de la *Pdpr* qui comprend le codon d'initiation, ont été introduites par recombinaison homologue dans des cellules souches embryonnaires murines C57BL6. Les clones hétérozygotes obtenus ont été ensuite implantés dans des souris pseudo-gestantes (fond génétique 129SV) pour produire des souris chimériques hétérozygotes. Ces dernières ont été croisées avec des souris *Rosa26;Flp1* (exprimant la recombinaise flippase) afin d'éliminer la cassette Neo^R. Après l'obtention des souris homozygotes *Pdpr^{F/F}* nous les avons croisé avec les souris *K5Cre* et *K5ΔNβcat*. Nous avons également croisé ces souris avec les souris *Rosa26^{LacZ}* possédant une cassette loxP-stop-loxP-LacZ ([Soriano, 1999](#)). Pour l'ensemble des expériences *in vivo* sauf indication contraire, nous avons choisi comme contrôles des souris *Pdpr^{F/F}* ou *Pdpr^{F/F};K5ΔNβcat* de la même portée ou d'âge similaire, au même stade de développement que les mutantes analysées. Les souris du modèle tumoral *K5ΔNβcat* ont été suivies régulièrement afin de détecter l'apparition de tumeurs et sacrifiées quand l'une des tumeurs palpables avait atteint 1cm³.

L'utilisation de ces animaux a été effectuée en accord avec les règles européennes et nationales de la protection des animaux vertébrés utilisés à des fins expérimentales (Numéro de licence #C75-05-18). Ces expériences sont conformes aux principes de remplacement, réduction et raffinement décrits dans le guide pour la protection et l'utilisation des animaux de laboratoire (NRC, 2011).

2) Génotypage des souris transgéniques

Les extractions d'ADN génomique (ADNg) sont réalisées à partir de fragments d'oreilles. Ils sont soit digérés à 55°C sur la nuit par une solution de lyse à la protéinase K (Tris 100 mM, pH 7,5 ; EDTA 50 mM, pH 8 et SDS 0,5% ; protéinase K 0,3 mg/ml Roche), soit au moyen d'un kit d'extraction KAPA (« KAPA Express Extract Kit », KAPA Biosystems). Après centrifugation et précipitation, l'ADNg est récupéré et resuspendu dans du Tris-EDTA (Tris 10mM, pH 7,5 et EDTA 0,1 mM).

La présence du transgène Cre, des sites LoxP dans le gène de la Pdpn ou du transgène K5 Δ N β cat (appelé Δ N β cat), a été détectée par PCR. Les séquences des amorces et les conditions de chaque PCR sont indiquées dans le tableau ci-dessous :

Gènes	Séquence des amorces	Conditions PCR	Taille amplicon
Cre	5'- ATTTGCCTGCATTACCGGTC -3' 5'- ATCAACGTTTTGTTTTCGGA -3'	1 min 94°C 1 min 55°C 1 min 72°C	28 cycles 350 pb
Pdpn-F	5'- GGGCTAAGTCTCCTGTAACA -3' 5'- TTCCATCCATTTCCAGTGTAG -3'	15 sec 95°C 15 sec 50°C 30 sec 72°C	34 cycles 400 pb (sauvage) 550 pb (flox)
Δ N β cat	5' ATCCCATCCACGCAGTTTGAC 3' 5' GATGCCACCAGACTTAAAGATG 3'	1 min 94°C 1 min 50°C 1 min 72°C	35 cycles 500 pb (sauvage) 400 pb (Tg)

Tableau 6 : Présentation des amorces utilisées pour le génotypage des souris par PCR

Les séquences des amorces sont indiquées ainsi que la taille des amplicons produits en paires de bases (pb)

L'ensemble des cycles de PCR est précédé d'une étape de dénaturation de 5 min à 95°C et terminé par une étape d'élongation de 7 min à 72°C. Les produits de la réaction PCR sont ensuite déposés sur un gel d'agarose contenant du SYBR[®] Safe (0,004% ; ThermoFisher Scientific) pour une migration électrophorétique afin de visualiser les différents amplicons.

3) Dissociation des glandes ou tumeurs mammaires murines

Afin d'analyser les populations épithéliales mammaires par cytométrie de flux, les glandes mammaires murines ont été prélevées, dissociées mécaniquement à l'aide de ciseaux et scalpels, puis soumises à une série de digestions enzymatiques et protéolytiques à base de collagénase A (3 mg/mL, Sigma Aldrich), de hyaluronidase (100 U/mL, Sigma), de trypsine-EDTA (0,25% trypsine, 0,1% EDTA, Invitrogen), de dispase II (5 mg/mL, Roche) et de DNase I (0,1 mg/mL; Sigma), selon les protocoles décrits précédemment (Stingl *et al.*, 2006; Shackleton *et al.*, 2006; Sleeman *et al.*, 2007). Pour les tissus tumoraux, le temps de digestion enzymatique à 37°C dans la solution de collagénase A et hyaluronidase a été allongé à 2h au lieu 1h30-45. Les érythrocytes sont éliminés à l'aide d'un tampon de lyse à base de chlorure d'ammonium (STEMCELL technologies), puis la solution est passée sur un filtre de 40 μ m (Fisher brand) afin d'éliminer les fragments tissulaires non dissociés.

4) Culture de la lignée cellulaire BC44

La lignée cellulaire épithéliale de type basal BC44 a été clonée à partir des cellules mammaires murines HC11, elles-mêmes dérivant de la lignée CommaD β (Deugnier *et al.*, 1999; Deugnier *et al.*,

2002). Ces cellules sont cultivées dans un milieu composé de RPMI 1640 medium (Gibco Life Technologies), FBS 10% (Gibco Life Technologies), 2 mM L-Glutamine, 5 µg/mL insuline (Sigma-Aldrich), et pénicilline + streptomycine (Gibco Life Technologies), comme décrit précédemment (Deugnier *et al.*, 1999).

5) Tri cellulaire et analyse en cytométrie de flux

Les cellules primaires mammaires dissociées ainsi que les cellules de la lignée BC44 sont marquées pendant 20 min à 4°C avec les anticorps référencés dans le tableau page 181. Après lavage, les cellules marquées sont analysées grâce au cytomètre LSRII (BD Biosciences) ou triées à l'aide du cytomètre de flux/trieur MoFlo Astrios (Beckman Coulter). Toutes les données obtenues sont analysées avec le logiciel FlowJo. La pureté des populations triées est vérifiée pour chaque tri, elle est d'environ 95%.

6) Essai de formation de colonies

Des fibroblastes irradiés (NIH-3T3L1 irradiés à 20 Gy) sontensemencés dans une plaque 24 puits à la densité de 5000 cellules par puits. Ce tapis de fibroblastes crée une assise de cellules productrices de matrice extracellulaire permettant aux cellules épithéliales d'adhérer au support. Le lendemain, les cellules épithéliales fraîchement isolées sont mises en culture à faible densité (500 cellules luminales ou 2000 cellules basales par puits) comme décrit précédemment (Stingl *et al.*, 2006; Shackleton *et al.*, 2006) dans le milieu suivant :

-pour les cellules luminales : DMEM/F12 (Gibco Life technologie), FCS (10%, Life technologie), Insuline (5 µg/mL, Sigma- Aldrich), EGF (10 ng/mL, Invitrogen Life Technologie), Choléra Toxine (100 ng/mL, ICN Biochemicals), Pénicilline + Streptomycine (10 mM, Gibco) et Glutamine (10 mM, Gibco)

-pour les cellules basales : DMEM/F12 (Gibco Life technologie), FCS (1%, Life technologie), complément B27 (1% Gibco), Insuline (5 µg/mL, Sigma-Aldrich), EGF (10 ng/mL, Invitrogen Life Technologie), Pénicilline + Streptomycine (10 mM, Gibco) et Glutamine (10 mM, Gibco).

Après 7 jours de culture, les colonies cellulaires formées sont fixées en paraformaldéhyde 4% (ou PFA) pendant 15 min à température ambiante, puis colorées à l'hématoxyline-éosine et photographiées sous loupe binoculaire (MZ8, Leica Microsystems GmbH, Allemagne). Le nombre et la taille des colonies sont quantifiés avec le logiciel ImageJ (NIH, USA).

7) Essai de formation de mammosphères et tumorsphères

Selon le protocole décrit par Dontu et Coll. et modifié par Spike et Coll., les populations cellulaires fraîchement isolées par cytométrie de flux ont été mises en culture en plaques 24 puits à faible adhérence (Corning) à une densité de 5000 cellules/puits pour les cellules épithéliales normales et 20000 cellules/puits pour les cellules tumorales (Dontu *et al.*, 2003; Spike *et al.*, 2012). Le milieu de culture est composé de DMEM/F12 (Gibco Life technologie), B27 (1%, Gibco), EGF (20 ng/mL, Invitrogen), bFGF (20 ng/mL, Gibco Life technologie), 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). Après 12 à 14 jours de culture, les puits sont photographiés à la loupe binoculaire. Pour quantifier les mammosphères et estimer leur taille, le logiciel ImageJ a été utilisé. Les tailles des structures ont été évaluées en quantité de pixels occupé sur la photographie et classées en trois catégories : agrégats cellulaires (inférieure à 90 pixels), microsphères (entre 90 et 150 pixels) et mammosphères (supérieure à 150 pixels). Pour estimer le pourcentage de cellules clonogéniques, c'est-à-dire aptes à générer des mammosphères d'origine clonale, le nombre de mammosphères et microsphères a été rapporté au nombre de cellulesensemencées initialement.

Tous les 12 à 14 jours, afin d'évaluer et comparer le potentiel clonogénique de chaque population sur le long terme, les mammosphères sont dissociées avec de la trypsine 0,05% (Gibco) pendant 10 min puis après rinçage, filtration et comptage, les cellules ainsi dissociées sont réensemencées dans le milieu décrit ci-dessus.

Lors de cette étape, il est possible de réaliser des cytopots de cellules dissociées issues des mammosphères. Pour cela, les cellules sont projetées sur une lame histologique par une centrifugation dans un cytospin (Thermo Scientific Cytospin® 4 Cytocentrifuge) pendant 5 minutes à 1500 rpm, puis fixées en méthanol froid pendant 10 min.

Pour évaluer la capacité de réponse à la stimulation de la voie Wnt/ β cat des cellules mammaires primaires, les cellules basales fraîchement isolées sont mises en culture sur la nuit à une densité de 40000 cellules par puits en condition mammosphère puis traitées avec Wnt3a (10ng/mL, R&D system) pendant 7h, en présence ou absence de Rspo1 (50ng/mL, R&D system).

Pour mesurer la quantité de cellules primaires métaboliquement actives en culture 3D, 20000 cellules basales fraîchement isolées sontensemencées par puits en condition mammosphère. Après 6 jours de culture, les cellules sont centrifugées et analysées au moyen du kit Cell titer Glo® 3D (Promega) comme préconisé par le fabricant.

8) Isolement d'organoïdes et culture *ex vivo* en 2D/3D

a) Isolement des organoïdes à partir de tissu mammaire

Selon le protocole d'Ewald et Coll., les glandes mammaires murines, après élimination des ganglions lymphatiques, sont collectées et dissociées mécaniquement par une cinquantaine d'incisions croisées au scalpel (Ewald, 2013). Les fragments obtenus sont incubés pendant 1h à 37°C sous agitation (140rpm) dans une solution de digestion enzymatique contenant : du DMEM/F12 (Gibco Life technologie), FCS (5%, Life technologie), trypsine (2mg/mL, Gibco), insuline (5µg/mL, Sigma-Aldrich), Collagenase A (2mg/mL, Sigma-Aldrich), Pénicilline + Streptomycine (10 mM, Gibco) et Glutamine (10 mM, Gibco). Après centrifugation à 1800 rpm pendant 10 min à température ambiante, le culot obtenu est traité à la DNase (4000U/mL, Sigma) pendant 5 min à température ambiante. Afin d'obtenir des fragments d'épithélium mammaire dépourvus de contamination par des adipocytes ou fibroblastes, 4 à 5 centrifugations différentielles sont réalisées, ce qui consiste à atteindre la vitesse de 1800 rpm sans maintenir cette vitesse plus de quelques secondes. Le culot de fragments d'épithélium est alors remis en suspension et la densité des organoïdes (c'est à dire des structures contenant plus de 50 cellules épithéliales) est estimée par comptage au microscope.

b) Etalement et analyses d'explants *ex vivo* en culture 2D

Les organoïdes isolées sontensemencés à une densité de 500 à 1500 organoïdes/puits en plaques de 24 puits contenant des lamelles de verre. Les lamelles peuvent être recouvertes d'une fine couche (dit « coating ») de Matrigel (10%, BD Pharmingen) ou de collagène I bovin (0.3 mg/mL, Advanced Biomatrix) pendant 1h à 37°C avant la mise en culture. Après 24 à 48h de culture dans un milieu contenant DMEM/F12 (Gibco Life technologie), FCS (5%, Life technologie), complément B27 (1% Gibco), Insuline (5 µg/mL, Sigma-Aldrich), EGF (10 ng/mL, Invitrogen Molecular Probes), Pénicilline + Streptomycine (10 mM, Gibco) et Glutamine (10 mM, Gibco), les organoïdes étalés (appelés explants) sont fixées en PFA 4% pendant 10 min à température ambiante ou en Méthanol pendant 10 min à -20°C.

c) Essai de formation d'organoïdes *ex vivo* en culture 3D

Pour les essais de formation d'organoïdes en 3D, des gouttes de 30 µL de Matrigel (Growth factor reduced, BD Pharmingen) contenant les fragments épithéliaux, sont étalées dans des chambres de

culture à 8 compartiments (Ibidi). Après 30 min de polymérisation à 37°C, la goutte de Matrigel solidifiée est recouverte avec 200 µL d'un milieu de culture contenant : DMEM/F12 (Gibco Life technologie), ITS (Insuline + Transferrine + Sodium sélénite, 1%, Sigma), Pénicilline + Streptomycine (10 mM, Gibco). Quand c'est spécifié, les organoïdes sont traitées avec du bFGF de souris (5nM ; Life technologie) en présence ou non de Rspo1 (500ng/mL ; R&S systems). Le milieu de culture est changé tous les jours. Après 7 à 9 jours, les organoïdes sont préparés pour réaliser des marquages immuno-fluorescents. Pour cela, chaque puits est incubé sous agitation légère avec 100 µL de sucrose à 18% puis à 30% (Sigma) pendant 15-30 min. Le Matrigel contenant les structures épithéliales est ensuite homogénéisé par pipetages dans le sucrose 30% puis étalé sur une lame de verre. Lorsque le mélange Matrigel/sucrose est sec (environ 30 min à température ambiante), les organoïdes sont fixés en PFA 4% ou Méthanol froid pendant 10 min à température ambiante. Le protocole de marquage immuno-fluorescent utilisé est le même que celui décrit pour les coupes histologiques à la page 179. Les organoïdes marqués sont analysés au microscope confocal A1R (Objectif 20X, APO VC/NA 0,75/WD 1 DIC Dry, Nikon).

9) Implantation de dispositifs hormonaux

Les implants hormonaux sont préparés dans des tubes en silicone creux et fins de 1,5 cm environ de longueur (Dow-Corning) contenant chacun : 50 µg d'estrogènes (Sigma) et 20 mg de progestérone (Sigma). La veille de l'expérience, les implants sont réhydratés à 37°C dans du PBS. Les souris sont anesthésiées puis rasées entre les deux omoplates. Une incision de 3 mm permet d'insérer les implants sous la peau. L'incision est refermée à l'aide de quelques points de suture. L'analyse des glandes mammaires de ces souris est faite après un mois d'exposition aux hormones (Rajkumar *et al.*, 2007; Moumen *et al.*, 2012).

10) Transplantation de cellules isolées et de fragments d'épithélium mammaire

Le potentiel de régénération des populations cellulaires isolées à partir de l'épithélium mammaire, ou des fragments de celui-ci, est étudié grâce à des essais de transplantation. Les cellules épithéliales fraîchement isolées et diluées dans du milieu CO2 indépendant (Gibco Life Technologie) contenant 50% de matrigel (BD Pharmingen), ou les fragments épithéliaux d'environ 1 mm³, sont greffés dans des coussins adipeux mammaires de femelles « hôtes » immunodéficientes âgées de 3 semaines (« nudes Balb/c » ; Charles River) dont le rudiment épithélial mammaire endogène est préalablement excisé par microchirurgie (Deome *et al.*, 1959;

Taddei *et al.*, 2008). Les glandes #4 bilatérales de la souris hôte reçoivent l'injection de deux populations cellulaires différentes, permettant de comparer rigoureusement leurs capacités morphogénétiques dans un contexte hormonal identique. Les greffons sont analysés 8 à 12 semaines après transplantation. Dans certains cas, les souris greffées peuvent être accouplées afin d'étudier le développement lobulo-alvéolaire des transplants mammaires.

Les cellules basales fraîchement isolées ou les fragments issus des greffons primaires peuvent être transplantés de nouveau en suivant le même protocole, on appelle cela les transplantations secondaires et tertiaires. Cela permet d'étudier les capacités cellulaires d'auto-renouvellement à long terme.

Les expériences de transplantation en dilution limite permettent d'évaluer la fréquence de cellules présentant une capacité de régénération (cellules souches). Pour se faire, on peut calculer la fréquence au moyen d'un logiciel créé en 2009 et mis à disposition sur internet (<http://bioinf.wehi.edu.au/software/elda/>) par les auteurs (Hu et Smyth, 2009).

11) Etude morphologique et histologique des tissus mammaires

a) Prélèvement, fixation et coupes histologiques

Les glandes ou tumeurs mammaires sont prélevées, étalées sur une lame histologique, puis fixées sur la nuit. Deux types de fixation peuvent être utilisés selon l'analyse des échantillons : Methacarn ou paraformaldéhyde (PFA). Pour l'analyse morphologique *in toto*, après fixation au Methacarn (60% méthanol ; 30% chloroforme ; 10% acide acétique), les glandes sont rincées deux fois en éthanol 70% pendant 1h puis en eau distillée pendant 5 minutes. Après leur incubation en rouge carmin (Sigma, 0,2%) sur la nuit, les glandes sont déshydratées dans des bains d'éthanol de concentration croissante (de 50% à 100%) puis dans 2 bains successifs de xylène, et enfin photographiées sous loupe binoculaire (MZ8, Leica Microsystems GmbH, Allemagne). Pour l'inclusion en paraffine, les glandes sont passées dans un mélange de xylène/paraffine (50/50) pendant une heure à 60°C puis dans un bain de paraffine pure pendant encore une heure. Après un deuxième bain de paraffine sur la nuit, les échantillons sont refroidis à température ambiante jusqu'à ce que la solidification de la paraffine.

Pour les immuno-marquages avec certains anticorps, les glandes ont été fixées en PFA 4% à 4°C sur la nuit, rincées exhaustivement en PBS à 4°C, puis incubées en série de 40 minutes à température ambiante dans des solutions d'éthanol de concentrations croissantes (de 50% à

100%). Les échantillons ont ensuite été placés dans deux bains successifs de xylène et inclus en paraffine comme décrit dans le paragraphe précédent.

Pour l'analyse histologique des mammosphères, après 2 semaines de culture, une partie des mammosphères de chaque génération a été collectée par centrifugation. Le culot de mammosphères est resuspendu dans une goutte de 50 μ L de Matrigel (BD Biosciences), disposé dans une plaque de culture 6 puits puis laissé à 37°C pendant 1h pour permettre la polymérisation de la goutte de Matrigel. Les échantillons sont fixés en Methacarn pendant 15 minutes, incubés en méthanol 100% sur la nuit, passés dans 2 bains successifs de xylène de 15 minutes, puis placés dans un mélange de xylène/paraffine (50/50) pendant une heure à 60°C et enfin inclus comme décrit ci-dessus.

Les blocs de paraffine obtenus ont été conservés au froid avant d'être coupés au microtome (Leica RM 2035). Des coupes sériées de 6-7 μ m d'épaisseur sont étalées sur des lames histologiques facilitant l'adhérence.

b) Marquage au Xgal

Dans les souris *Rosa26^{LacZ}*, l'expression de la β -galactosidase indique que la recombinase Cre a excisé le codon stop de la cassette loxP-stop-loxP-LacZ. Afin de détecter l'expression de la β -galactosidase, un test enzymatique en présence de son substrat, le X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside) est réalisé. Le X-gal hydrolysé donne une coloration bleue caractéristique. Pour cela, les glandes mammaires sont prélevées, préfixées en PFA 2,5% diluée dans du PBS pendant 1 heure et incubées *in toto* avec le X-gal à 1,5 mg/mL 1h à 37°C puis sur la nuit à 30°C. Le lendemain, les tissus sont post fixés en PFA 4% durant 1 heure, déshydratés puis inclus en paraffine comme décrit précédemment.

c) Colorations histologiques

La coloration Hématoxyline/Eosine est réalisée sur les coupes de tissu à intervalle régulier (une coupe sur 8), ce qui permet d'étudier la morphologie des structures et de sélectionner les lames qui seront ensuite utilisées pour un marquage par immunofluorescence. Après déparaffinage des coupes dans deux bains successifs de xylène, de 5 minutes chacun, les coupes sont réhydratées à l'aide de bains d'alcool de concentrations décroissantes (100% à 50%) et ensuite lavées pendant 5 minutes à l'eau osmosée. La coloration débute par un bain de 1 à 2 minutes dans l'hématoxyline (RAL diagnostics), suivi d'un lavage à l'eau du robinet. Les coupes sont ensuite plongées dans un

bain d'éosine à 0,5% (Sigma) pendant 1 à 2 minutes, suivi par un lavage à l'eau osmosée. Les coupes sont finalement déshydratées et montées avec du milieu EUKITT, (Sigma-Aldrich) avant visualisation au microscope optique (Leica DM RBE, Leica Microsystems GmbH, Allemagne).

Dans le cas où les glandes ont été marquées au X-gal, une coloration unique au Fast Red (Vector laboratories) pendant 2 minutes a été utilisée afin de visualiser les structures provenant de cellules négatives pour le marquage X-gal.

12) Immunohistologie et immunocytologie

Le marquage des échantillons inclus en paraffine débute par un déparaffinage et une réhydratation des coupes comme décrits précédemment pour les colorations histologiques. Les coupes sont ensuite lavées dans un bain de PBS pendant 5 minutes. Pour certains anticorps, une étape de "démasquage antigénique" acide est nécessaire. Pour cela, les lames sont placées dans une solution de citrate de sodium 10mM pH 6, préchauffée à 95°C, et incubées à une température proche de l'ébullition pendant 10 minutes, puis refroidies 20 minutes à température ambiante. Les lames sont ensuite recouvertes d'une solution de blocage composée de PBS et de sérum de veau fœtal (FCS) à 5% afin de saturer tous les sites de fixation non spécifiques potentiels. Les coupes sont alors incubées avec les anticorps primaires (tableau page 181) dilués dans la solution de blocage et placées en chambre humide à 4°C sur la nuit. Après 3 rinçages en PBS pendant 10 minutes, les coupes sont incubées avec les anticorps secondaires : anticorps anti-IgG, produits chez la chèvre, de la gamme Alexa Fluor, (Alexa 488 et Alexa 594, Molecular probes) dilués au 1/500^{ème} et incubés avec les lames pendant 2 heures à température ambiante à l'abri de la lumière. Les lames sont de nouveau lavées dans du PBS (3 fois 10 min), puis montées dans une solution aqueuse Dapi-Mount (Molecular probes Life technologies), permettant de marquer les noyaux au Dapi, et enfin observées en microscopie à épifluorescence (DM 600B, Leica Allemagne). Le logiciel Metamorph (MDS Analytical Technologies Inc., USA) est utilisé pour l'acquisition des images et Adobe Photoshop (Adobe Systems Incorporated, USA) pour le traitement de celles-ci.

Les cellules BC44, les explants 2D et les cytopspots de cellules épithéliales mammaires sont fixés sur lames ou lamelles de verre, incubés avec les anticorps primaires (tableau page 181) dilués dans du PBS pendant 1-2h à 37°C, puis rincés en PBS et incubés avec les anticorps secondaires couplés aux fluorochromes pendant 45 min à 1h à 37°C. Pour finir, les lames ou lamelles de verre sont montées dans une solution aqueuse Dapi-Mount (Molecular probes Life technologies) comme indiqué ci-dessus.

13) Constructions plasmidiques et transfections de la lignée BC44

Afin d'étudier la fonction de Pdpn *in vitro*, nous avons surexprimé la Pdpn de façon ectopique dans la lignée cellulaire de type basal BC44, une lignée qui ne l'exprime pas. Pour cela, les cellules sont transfectées au moyen du réactif Lipofectamine 3000 (Thermofisher Scientific) avec les plasmides suivants : pcDNA3.1-Pdpn (pour la Pdpn complète) et pcDNA3.1-Pdpn Δ C (pour la Pdpn dont la queue cytoplasmique est tronquée) qui ont été fournis par le laboratoire du Dr. S. Acton (Acton *et al.*, 2014). Le plasmide pcDNA3.1 vide est utilisé comme contrôle (donné par Dr. C. Blouin, équipe Dr. L. Johannes Institut Curie). Après une sélection à la généticine (G418 600 μ g/mL, Sigma Aldrich), les cellules exprimant la Pdpn à leur surface ont été triées à l'aide du FACS Aria Fusion (BD Biosciences ; Fig. 40) et mises en culture dans les conditions décrites à la page 172, en conservant la pression de sélection à la généticine. La stabilité des populations cellulaires triées a été vérifiée après plusieurs passages en culture (80-90% de cellules restent positives pour Pdpn).

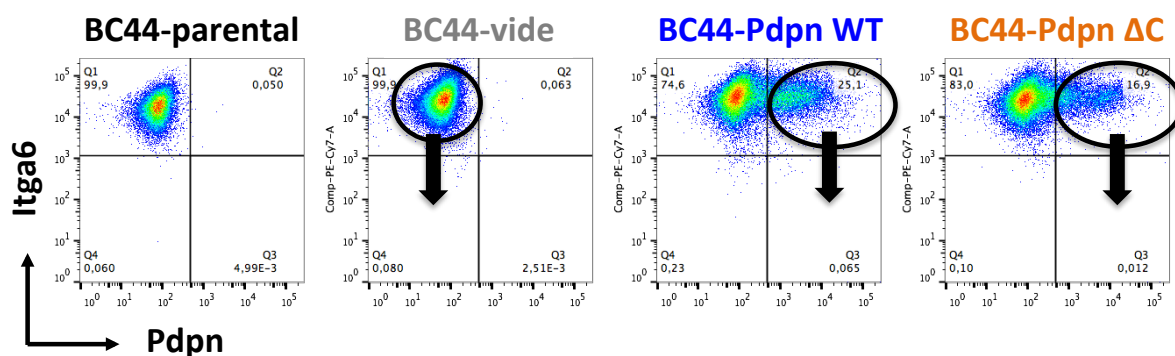


Figure 40 : Analyse par cytométrie de flux de l'expression de Pdpn dans les cellules BC44 transfectées.

Expression de l'intégrine $\alpha 6$ (CD49f, Itg $\alpha 6$) et de Pdpn dans les cellules BC44 : parentales (cellules d'origine, non transfectées), vide (transfectées avec le vecteur vide), Pdpn-WT (transfectées avec le vecteur exprimant la Pdpn complète) et Pdpn- Δ C (transfectées avec le vecteur exprimant la protéine Pdpn dont la partie cytoplasmique est tronquée). Les cercles noirs représentent les populations triées par cytométrie de flux qui ont ensuite été mises en culture en présence de généticine afin d'établir des lignées stables. L'anticorps anti-Pdpn utilisé ici reconnaît sa partie extracellulaire.

Concernant le système rapporteur de l'activité Wnt/ β cat, les plasmides TOPFlash et Renilla permettant l'expression des luciférase « firefly » et « renilla » respectivement, ont été transfectés transitoirement à l'aide du réactif GeneJuice[®] (EMD Millipore), selon les conditions décrites par le fabricant. Brièvement, un mélange de 3 μ L de réactif de transfection par μ g d'ADN plasmidique est utilisé. Les cellules sontensemencées en plaque 12 puits à la densité de 1.2×10^5 cellules/puits. Après 24h, les cellules sont transfectées avec 500 ng/puits de plasmide rapporteur TOPFlash et 250 ng/puits de plasmide pCGN- Δ N β cat (donné par le Dr. A. Ben-Ze'ev ; Teuliere *et al.*, 2005). Le plasmide TK-Renilla est utilisé comme contrôle de l'efficacité de transfection (125 ng/puits, Promega). Le kit Dual-Glo[®] luciférase (Promega) est utilisé afin de mesurer les taux de luciférase

« firefly » et « renilla » dans chaque condition expérimentale 48h après transfection. Les valeurs sont obtenues au moyen d'un lecteur de plaque FluoStar OPTIMA (BMG Labtech) puis les valeurs de la luciférase « firefly » sont toutes normalisées sur celles de la luciférase « renilla ».

14) Western Blot

Les extractions protéiques à partir de cellules tumorales fraîchement isolées murines ou de cellules BC44 en culture sont préparées dans les tampons d'extraction Laemmli ou RIPA. Après migration sur gel de polyacrylamide et transfert sur membrane de PVDF (Polyfluorure de vinylidène), ces dernières sont saturées pendant 1h à température ambiante puis incubées sur la nuit à 4°C avec les anticorps primaires selon les conditions présentées dans le tableau page 181. Les membranes sont ensuite incubées 2h à température ambiante dans une solution d'anticorps secondaire couplé à la HRP (de l'anglais « Horseradish peroxidase ») puis révélées grâce au kit Pico ou Pico Plus SuperSignal™ (ThermoFisher Scientific).

15) Anticorps

Une synthèse de l'ensemble des anticorps primaires utilisés dans cette étude, classés par application, est donnée ci-dessous :

Nom de l'anticorps	Espèce	Clone	Fabricant	Usage dans cette étude et dilution
CD49f-PeCy7 (Itga6)	rat	GoH3	Biologend	FACS (1/50 ^e)
CD24- BV421	rat	M1/69	Biologend	FACS (1/50 ^e)
CD45-APC	rat	30-F11	Biologend	FACS (1/100 ^e)
CD31-APC	rat	MEC13.3	Biologend	FACS (1/100 ^e)
CD54-PE (ICAM-1)	rat	YN1/1.7.4	Biologend	FACS (1/50 ^e)
Pdnp-PE	rat	clone 8.1.1	Biologend	FACS (1/50 ^e)
Clec2-PE	rat	17D9	Biologend	FACS (1/30 ^e)
CD44-BV605	rat	IM7	Biologend	FACS (1/50 ^e)
K5	Lapin	polyclonal	Covance	IF (1/1000 ^e)
K8	Souris	1E8	Biologend	IF (1/100 ^e)
p63	Souris	4A4	Abcam	IF (1/50 ^e)
Sma-Cy3	Souris	1A4	Sigma-Aldrich	IF (1/250 ^e)
Pan-keratin	Lapin	AE1/AE3	Dako	IF (1/100 ^e)
PR	Lapin	polyclonal	Santa Cruz	IF (1/200 ^e)
p-ERM	Lapin	polyclonal	Cell signaling technologies	IF (1/100 ^e)
Pdnp (Pa2.26)	Rat	Pa2.26	Dr. M. Quintanilla Gandarillas et al., 1997	IF (1/200 ^e)
Pdnp (D2-40)	Souris	M2A	Abcam	IF (1/100 ^e)
Phalloïdine	None	None	Molecular probes	IF déjà couplé (1/200 ^e)
Vinculin	Souris	VIIIF9	Dr. M. Glukhova Glukhova et al., 1990	IF (surnagent ½)
β-catenine totale	Lapin	Polyclonal	Cell signaling technologies	IF (1/250 ^e)

Cdh1	Rat	ECCD-2	Thermofisher scientific	WB 1/1000 ^e
Vimentine	Souris	V13.2	Sigma Aldrich	WB 1/1000 ^e
β-actine	Souris	AC-74	Sigma Aldrich	WB 1/20000 ^e
β-catenine forme activée	Lapin	D13A1	Cell Signaling Technologies	WB 1/1000 ^e
β-catenine totale	Souris	14/beta-catenin	BD Biosciences	WB 1/10000 ^e
p-ERM	Lapin	polyclonal	Cell Signaling Technologies	WB 1/1000 ^e
ERM	Lapin	polyclonal	Cell Signaling Technologies	WB 1/1000 ^e

Tableau 7 : Liste des anticorps primaires utilisés dans cette étude classés par type d'application

16) RT-PCR en temps réel

Les ARN totaux des cellules fraîchement isolées à partir des glandes mammaires sont extraits à l'aide du kit Micro RNeasy (Qiagen) en suivant les instructions décrites par le fabricant. Les ARN purifiés sont rétro-transcrits avec la transcriptase inverse M-MLV (Promega), en utilisant la méthode d'amorçage au hasard (amorces hexamériques; 1 µg, Roche) pour obtenir des ADN complémentaires (ADNc). Pour chaque échantillon, une réaction témoin a été effectuée au cours de laquelle les ARN totaux ne sont pas mis en présence de l'enzyme de rétro-transcription. Des expériences de PCR en temps réel sont ensuite réalisées à l'aide d'un appareil Light Cycler 480[®] (Roche) permettant de mesurer en temps réel l'augmentation de la fluorescence du colorant et intercalant de l'ADN (SYBR Green QuantiNova ; Qiagen), intégré aux nucléotides utilisés.

Les amorces oligonucléotidiques spécifiques des gènes d'intérêt, ont été « dessinés » à l'aide du logiciel Oligo 6.8 (Molecular Biology Insights) et fournies par Eurogentec. Elles sont présentées dans le tableau en annexe 2. Dans certains cas, des amorces commerciales ont également été utilisées (Qiagen). Les conditions expérimentales de PCR en temps réel comportent une étape de dénaturation de 15 min à 95°C ; puis 45 cycles de : 10 secondes à 95°C, 30 secondes à 60°C et 30 secondes à 72°C ; puis une étape de dissociation des amorces de 5 secondes à 95°C et 1 min à 65°C. Les niveaux de transcription des gènes d'intérêts sont rapportés à ceux du gène de référence glyceraldéhyde phosphate deshydrogénase (*Gapdh*), suivant la formule $2^{(Ct_{GAPDH} - Ct_{\text{gène cible}})}$, où le Ct correspond au nombre de cycles de PCR permettant l'obtention de 50% de la totalité des produits d'amplification. Des duplicats ont été réalisés pour chaque échantillon.

17) Analyses *in silico*

L'étude *in silico* de la valeur pronostique et du niveau d'expression de Pdpr dans les différents sous-types de cancers du sein humains a été réalisée au moyen de banques de données transcriptionnelles (analyse par puce à ADN des échantillons de tumeurs mammaires des patients)

disponibles publiquement sur les sites internet de Genexminer (<http://bcgenex.centregauducheau.fr/> ; Jezequel *et al.*, 2013) et de KMplotter (<http://kmplot.com/analysis/> ; Szasz *et al.*, 2016). Sur ces deux banques de données, la sonde 221898_at a été sélectionnée pour évaluer l'expression de *Pdpn* puisqu'elle correspond à l'unique sonde optimale validée pour sa spécificité, sa détection des isoformes d'épissage et sa robustesse face à la dégradation des transcrits. Les valeurs statistiques sont directement calculées par les algorithmes utilisés par ces banques de données.

18) Analyse de micromatrices tissulaires sur des échantillons humains

L'analyse de l'expression de la *Pdpn* sur des micro-matrices tissulaires (dites TMAs, de l'anglais « tissue micro-arrays ») de biopsies tumorales de patientes a été réalisée via une collaboration avec le programme Pic-Bim de l'Institut Curie. Les patientes incluses dans la cohorte répondent aux critères suivants : un cancer du sein primaire diagnostiqué à l'Institut Curie entre 2005 et 2006, une tumeur traitée uniquement par chirurgie (pas de chimio-, radio-, ou hormonothérapies), des pièces tumorales provenant de l'hôpital de l'Institut Curie d'une épaisseur suffisante (>1 mm). Les pièces tumorales sélectionnées ont été caractérisées par les anatomo-pathologistes Maya Nourieh, Lionel Aherfi et Anne Vincent Salomon. Ils ont notamment déterminés pour toutes les tumeurs : le type histologique, l'index mitotique, le score d'Elston et Ellis (différenciation, pléomorphisme nucléaire et index mitotique), le statut des récepteurs hormonaux aux estrogènes (ER) et à la progestérone (PR), le statut du récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain (HER2 pour human epidermal growth factor receptor 2) et le pourcentage de cellules positives pour Ki67. Pour les cancers du sein triple-négatifs, les anatomo-pathologistes ont également réalisé une quantification de l'expression des marqueurs spécifiques du lignage basal (CK5/6, CK14), et vérifié le statut du récepteur à l'EGF (EGFR) ainsi que l'absence des marqueurs spécifiques du lignage luminal (CK8/18). Cette banque de TMAs inclut 100 cas de cancer canalaire *in situ* et 649 échantillons de cancer du sein invasif canalaire dont 187 TNBC, 212 luminal A, 148 luminal B, 21 luminal B/Her2+, 81 Her2+. Les 35 lames de TMAs ainsi constituées comprennent, pour chaque patiente, des biopsies de deux localisations différentes au sein de la tumeur ainsi qu'une biopsie du tissu sain adjacent. Un marquage immuno-histochimique avec l'anticorps anti-*Pdpn* (D2-40, Abcam) a été réalisé sur l'ensemble de ces lames. Les lames sont ensuite photographiées et enregistrées par un scanner de lame (Philips digital pathology) afin de faciliter la lecture et la quantification du marquage. Une double lecture a été effectuée permettant

d'attribuer un score d'Allred, basé sur l'intensité d'expression et le pourcentage de cellules positives moyen des deux biopsies tumorales de chaque patiente.

19) Analyse statistique des résultats

Pour la plupart des expériences quantifiées, les résultats sont présentés sous forme d'une moyenne faite à partir d'au moins 3 expériences +/- l'écart-type moyen. La p-value est déterminée par un test de Student à deux colonnes de distribution et une correction de Welch qui assume que les deux populations ont une variance non-équivalente. Pour la courbe de survie présentée en [Fig. 6](#) de l'article soumis Bresson et al., un test Log Rank (ou dit également de Mantel Cox) a été réalisé. Les résultats sont considérés significativement différents quand la p-value est inférieure à 0,05. Toutes les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 7.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- A, D.A.C.P., and Lopes, C. (2017). Implications of Different Cancer Stem Cell Phenotypes in Breast Cancer. *Anticancer Res* 37, 2173-2183.
- Acton, S.E., Astarita, J.L., Malhotra, D., Lukacs-Kornek, V., Franz, B., Hess, P.R., Jakus, Z., Kuligowski, M., Fletcher, A.L., Elpek, K.G., *et al.* (2012). Podoplanin-rich stromal networks induce dendritic cell motility via activation of the C-type lectin receptor CLEC-2. *Immunity* 37, 276-289.
- Acton, S.E., Farrugia, A.J., Astarita, J.L., Mourao-Sa, D., Jenkins, R.P., Nye, E., Hooper, S., van Blijswijk, J., Rogers, N.C., Snelgrove, K.J., *et al.* (2014). Dendritic cells control fibroblastic reticular network tension and lymph node expansion. *Nature* 514, 498-502.
- 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.
- Allred, D.C., and Medina, D. (2008). The relevance of mouse models to understanding the development and progression of human breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 13, 279-288.
- Arpin, M., Chirivino, D., Naba, A., and Zwaenepoel, I. (2011). Emerging role for ERM proteins in cell adhesion and migration. *Cell Adh Migr* 5, 199-206.
- Asai, J., Hirakawa, S., Sakabe, J., Kishida, T., Wada, M., Nakamura, N., Takenaka, H., Mazda, O., Urano, T., Suzuki-Inoue, K., *et al.* (2016). Platelets Regulate the Migration of Keratinocytes via Podoplanin/CLEC-2 Signaling during Cutaneous Wound Healing in Mice. *Am J Pathol* 186, 101-108.
- 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, 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., *et al.* (2010). Control of mammary stem cell function by steroid hormone signalling. *Nature* 465, 798-802.
- Astarita, J.L., Acton, S.E., and Turley, S.J. (2012). Podoplanin: emerging functions in development, the immune system, and cancer. *Front Immunol* 3, 283.
- Astarita, J.L., Cremasco, V., Fu, J., Darnell, M.C., Peck, J.R., Nieves-Bonilla, J.M., Song, K., Kondo, Y., Woodruff, M.C., Gogineni, A., *et al.* (2015). The CLEC-2-podoplanin axis controls the contractility of fibroblastic reticular cells and lymph node microarchitecture. *Nat Immunol* 16, 75-84.
- Atsumi, N., Ishii, G., Kojima, M., Sanada, M., Fujii, S., and Ochiai, A. (2008). Podoplanin, a novel marker of tumor-initiating cells in human squamous cell carcinoma A431. *Biochem Biophys Res Commun* 373, 36-41.
- Aure, M.R., Vitelli, V., Jernstrom, S., Kumar, S., Krohn, M., Due, E.U., Haukaas, T.H., Leivonen, S.K., Vollan, H.K., Luders, T., *et al.* (2017). Integrative clustering reveals a novel split in the luminal A subtype of breast cancer with impact on outcome. *Breast Cancer Res* 19, 44.

- 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.
- Barbareschi, M., Pecciarini, L., Cangi, M.G., Macri, E., Rizzo, A., Viale, G., and Doglioni, C. (2001). p63, a p53 homologue, is a selective nuclear marker of myoepithelial cells of the human breast. *Am J Surg Pathol* 25, 1054-1060.
- Beleut, M., Rajaram, R.D., Caikovski, M., Ayyanan, A., Germano, D., Choi, Y., Schneider, P., and Brisken, C. (2010). Two distinct mechanisms underlie progesterone-induced proliferation in the mammary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 2989-2994.
- Bernardo, G.M., Lozada, K.L., Miedler, J.D., Harburg, G., Hewitt, S.C., Mosley, J.D., Godwin, A.K., Korach, K.S., Visvader, J.E., Kaestner, K.H., *et al.* (2010). FOXA1 is an essential determinant of ERalpha expression and mammary ductal morphogenesis. *Development* 137, 2045-2054.
- Bertucci, F., Finetti, P., and Birnbaum, D. (2012). Basal breast cancer: a complex and deadly molecular subtype. *Curr Mol Med* 12, 96-110.
- Bianchini, G., Balko, J.M., Mayer, I.A., Sanders, M.E., and Gianni, L. (2016). Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nat Rev Clin Oncol* 13, 674-690.
- Blaas, L., Pucci, F., Messal, H.A., Andersson, A.B., Josue Ruiz, E., Gerling, M., Douagi, I., Spencer-Dene, B., Musch, A., Mitter, R., *et al.* (2016). Lgr6 labels a rare population of mammary gland progenitor cells that are able to originate luminal mammary tumours. *Nat Cell Biol* 18, 1346-1356.
- Booth, B.W., Mack, D.L., Androutsellis-Theotokis, A., McKay, R.D., Boulanger, C.A., and Smith, G.H. (2008). The mammary microenvironment alters the differentiation repertoire of neural stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 14891-14896.
- Boulanger, C.A., Mack, D.L., Booth, B.W., and Smith, G.H. (2007). Interaction with the mammary microenvironment redirects spermatogenic cell fate in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 3871-3876.
- 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.
- Breiteneder-Geleff, S., Matsui, K., Soleiman, A., Meraner, P., Poczewski, H., Kalt, R., Schaffner, G., and Kerjaschki, D. (1997). Podoplanin, novel 43-kd membrane protein of glomerular epithelial cells, is down-regulated in puromycin nephrosis. *Am J Pathol* 151, 1141-1152.
- Breiteneder-Geleff, S., Soleiman, A., Horvat, R., Amann, G., Kowalski, H., and Kerjaschki, D. (1999). [Podoplanin--a specific marker for lymphatic endothelium expressed in angiosarcoma]. *Verh Dtsch Ges Pathol* 83, 270-275.

- Briskin, C. (2013). Progesterone signalling in breast cancer: a neglected hormone coming into the limelight. *Nat Rev Cancer* 13, 385-396.
- Briskin, C., and Ataca, D. (2015). Endocrine hormones and local signals during the development of the mouse mammary gland. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 4, 181-195.
- Briskin, 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.
- Briskin, C., and O'Malley, B. (2010). Hormone action in the mammary gland. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a003178.
- Briskin, 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.
- Cai, C., Yu, Q.C., Jiang, W., Liu, W., Song, W., Yu, H., Zhang, L., Yang, Y., and Zeng, Y.A. (2014). R-spondin1 is a novel hormone mediator for mammary stem cell self-renewal. *Genes Dev* 28, 2205-2218.
- Canal, F., Charawi, S., Grimber, G., Houbron, C., Drouet, V., Colnot, S., Terris, B., Cavard, C., and Perret, C. (2016). Generation of Mice with Hepatocyte-Specific Conditional Deletion of Notum. *PLoS One* 11, e0150997.
- Cancer Genome Atlas, N. (2012). Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 490, 61-70.
- Carrasco-Ramirez, P., Greening, D.W., Andres, G., Gopal, S.K., Martin-Villar, E., Renart, J., Simpson, R.J., and Quintanilla, M. (2016). Podoplanin is a component of extracellular vesicles that reprograms cell-derived exosomal proteins and modulates lymphatic vessel formation. *Oncotarget* 7, 16070-16089.
- Chadi, S., Buscara, L., Pechoux, C., Costa, J., Laubier, J., Chaboissier, M.C., Pailhoux, E., Vilotte, J.L., Chanat, E., and Le Provost, F. (2009). R-spondin1 is required for normal epithelial morphogenesis during mammary gland development. *Biochem Biophys Res Commun* 390, 1040-1043.
- Chairoungdua, A., Smith, D.L., Pochard, P., Hull, M., and Caplan, M.J. (2010). Exosome release of beta-catenin: a novel mechanism that antagonizes Wnt signaling. *J Cell Biol* 190, 1079-1091.
- Chakrabarti, R., Wei, Y., Hwang, J., Hang, X., Andres Blanco, M., Choudhury, A., Tiede, B., Romano, R.A., DeCoste, C., Mercatali, L., *et al.* (2014). DeltaNp63 promotes stem cell activity in mammary gland development and basal-like breast cancer by enhancing Fzd7 expression and Wnt signalling. *Nat Cell Biol* 16, 1004-1015, 1001-1013.
- Chen, W.S., Cao, Z., Sugaya, S., Lopez, M.J., Sendra, V.G., Laver, N., Leffler, H., Nilsson, U.J., Fu, J., Song, J., *et al.* (2016). Pathological lymphangiogenesis is modulated by galectin-8-dependent crosstalk between podoplanin and integrin-associated VEGFR-3. *Nat Commun* 7, 11302.

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* 31, 1857-1867.

Chiche, A., Moumen, M., Romagnoli, M., Petit, V., Lasla, H., Jezequel, P., de la Grange, P., Jonkers, J., Deugnier, M.A., Glukhova, M.A., *et al.* (2017). p53 deficiency induces cancer stem cell pool expansion in a mouse model of triple-negative breast tumors. *Oncogene* 36, 2355-2365.

Ciarloni, L., Mallepell, S., and Briskin, 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., Briskin, 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.

Clarke, R.B., Howell, A., Potten, C.S., and Anderson, E. (1997). Dissociation between steroid receptor expression and cell proliferation in the human breast. *Cancer Res* 57, 4987-4991.

Clevers, H. (2011). The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nat Med* 17, 313-319.

Clevers, H., Loh, K.M., and Nusse, R. (2014). Stem cell signaling. An integral program for tissue renewal and regeneration: Wnt signaling and stem cell control. *Science* 346, 1248012.

Clucas, J., and Valderrama, F. (2015). ERM proteins in cancer progression. *J Cell Sci* 128, 1253.

Cortez, M.A., Nicoloso, M.S., Shimizu, M., Rossi, S., Gopisetty, G., Molina, J.R., Carlotti, C., Jr., Tirapelli, D., Neder, L., Brassesco, M.S., *et al.* (2010). miR-29b and miR-125a regulate podoplanin and suppress invasion in glioblastoma. *Genes Chromosomes Cancer* 49, 981-990.

Coussy, F., Lallemand, F., Vacher, S., Schnitzler, A., Chemlali, W., Caly, M., Nicolas, A., Richon, S., Meseure, D., El Botty, R., *et al.* (2017). Clinical value of R-spondins in triple-negative and metaplastic breast cancers. *Br J Cancer* 116, 1595-1603.

Cruciat, C.M., and Niehrs, C. (2013). Secreted and transmembrane wnt inhibitors and activators. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5, a015081.

Cueni, L.N., Chen, L., Zhang, H., Marino, D., Huggenberger, R., Alitalo, A., Bianchi, R., and Detmar, M. (2010a). Podoplanin-Fc reduces lymphatic vessel formation in vitro and in vivo and causes disseminated intravascular coagulation when transgenically expressed in the skin. *Blood* 116, 4376-4384.

Cueni, L.N., and Detmar, M. (2009). Galectin-8 interacts with podoplanin and modulates lymphatic endothelial cell functions. *Exp Cell Res* 315, 1715-1723.

Cueni, L.N., Hegyi, I., Shin, J.W., Albinger-Hegy, A., Gruber, S., Kunstfeld, R., Moch, H., and Detmar, M. (2010b). Tumor lymphangiogenesis and metastasis to lymph nodes induced by cancer cell expression of podoplanin. *Am J Pathol* 177, 1004-1016.

Dang, Q., Liu, J., Li, J., and Sun, Y. (2014). Podoplanin: a novel regulator of tumor invasion and metastasis. *Med Oncol* 31, 24.

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.

de Lau, W., Peng, W.C., Gros, P., and Clevers, H. (2014). The R-spondin/Lgr5/Rnf43 module: regulator of Wnt signal strength. *Genes Dev* 28, 305-316.

de Visser, K.E., Ciampricotti, M., Michalak, E.M., Tan, D.W., Speksnijder, E.N., Hau, C.S., Clevers, H., Barker, N., and Jonkers, J. (2012). Developmental stage-specific contribution of LGR5(+) cells to basal and luminal epithelial lineages in the postnatal mammary gland. *J Pathol* 228, 300-309.

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.

Deugnier, M.A., Faraldo, M.M., Janji, B., Rousselle, P., Thiery, J.P., and Glukhova, M.A. (2002). EGF controls the in vivo developmental potential of a mammary epithelial cell line possessing progenitor properties. *J Cell Biol* 159, 453-463.

Deugnier, M.A., Faraldo, M.M., Rousselle, P., Thiery, J.P., and Glukhova, M.A. (1999). Cell-extracellular matrix interactions and EGF are important regulators of the basal mammary epithelial cell phenotype. *J Cell Sci* 112 (Pt 7), 1035-1044.

Deugnier, M.A., Moiseyeva, E.P., Thiery, J.P., and Glukhova, M. (1995). Myoepithelial cell differentiation in the developing mammary gland: progressive acquisition of smooth muscle phenotype. *Dev Dyn* 204, 107-117.

Di-Cicco, A., Petit, V., Chiche, A., Bresson, L., Romagnoli, M., Orian-Rousseau, V., Vivanco, M., Medina, D., Faraldo, M.M., Glukhova, M.A., *et al.* (2015). Paracrine Met signaling triggers epithelial-mesenchymal transition in mammary luminal progenitors, affecting their fate. *Elife* 4.

Dolled-Filhart, M., McCabe, A., Giltneane, J., Cregger, M., Camp, R.L., and Rimm, D.L. (2006). Quantitative in situ analysis of beta-catenin expression in breast cancer shows decreased expression is associated with poor outcome. *Cancer Res* 66, 5487-5494.

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.

dos Santos, C.O., Rebbeck, C., Rozhkova, E., Valentine, A., Samuels, A., Kadiri, L.R., Osten, P., Harris, E.Y., Uren, P.J., Smith, A.D., *et al.* (2013). Molecular hierarchy of mammary differentiation yields refined markers of mammary stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 7123-7130.

Dossus, L., and Benusiglio, P.R. (2015). Lobular breast cancer: incidence and genetic and non-genetic risk factors. *Breast Cancer Res* 17, 37.

Driehuis, E., and Clevers, H. (2017). WNT signalling events near the cell membrane and their pharmacological targeting for the treatment of cancer. *Br J Pharmacol*.

- Du, W.W., Fang, L., Yang, X., Sheng, W., Yang, B.L., Seth, A., Zhang, Y., Yang, B.B., and Yee, A.J. (2013). The role of versican in modulating breast cancer cell self-renewal. *Mol Cancer Res* *11*, 443-455.
- Elsarraj, H.S., Hong, Y., Valdez, K.E., Michaels, W., Hook, M., Smith, W.P., Chien, J., Herschkowitz, J.I., Troester, M.A., Beck, M., *et al.* (2015). Expression profiling of in vivo ductal carcinoma in situ progression models identified B cell lymphoma-9 as a molecular driver of breast cancer invasion. *Breast Cancer Res* *17*, 128.
- Ewald, A.J. (2013). Isolation of mouse mammary organoids for long-term time-lapse imaging. *Cold Spring Harb Protoc* *2013*, 130-133.
- Ewald, A.J., Huebner, R.J., Palsdottir, H., Lee, J.K., Perez, M.J., Jorgens, D.M., Tauscher, A.N., Cheung, K.J., Werb, Z., and Auer, M. (2012). Mammary collective cell migration involves transient loss of epithelial features and individual cell migration within the epithelium. *J Cell Sci* *125*, 2638-2654.
- Fantl, V., Edwards, P.A., Steel, J.H., Vonderhaar, B.K., and Dickson, C. (1999). Impaired mammary gland development in Cyl-1(-/-) mice during pregnancy and lactation is epithelial cell autonomous. *Dev Biol* *212*, 1-11.
- Faraldo, M.M., Teuliere, J., Deugnier, M.A., Taddei-De La Hosserye, I., Thierry, 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., *et al.* (2005). Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. *Oncogene* *24*, 4660-4671.
- Farr, A.G., Berry, M.L., Kim, A., Nelson, A.J., Welch, M.P., and Aruffo, A. (1992). Characterization and cloning of a novel glycoprotein expressed by stromal cells in T-dependent areas of peripheral lymphoid tissues. *J Exp Med* *176*, 1477-1482.
- 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., *et al.* (2000). The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development. *Cell* *103*, 41-50.
- Fernandez-Munoz, B., Yurrita, M.M., Martin-Villar, E., Carrasco-Ramirez, P., Megias, D., Renart, J., and Quintanilla, M. (2011). The transmembrane domain of podoplanin is required for its association with lipid rafts and the induction of epithelial-mesenchymal transition. *Int J Biochem Cell Biol* *43*, 886-896.
- Fodde, R., and Brabletz, T. (2007). Wnt/beta-catenin signaling in cancer stemness and malignant behavior. *Curr Opin Cell Biol* *19*, 150-158.
- Forster, N., Saladi, S.V., van Bragt, M., Sfondouris, M.E., Jones, F.E., Li, Z., and Ellisen, L.W. (2014). Basal cell signaling by p63 controls luminal progenitor function and lactation via NRG1. *Dev Cell* *28*, 147-160.
- Fu, J., Gerhardt, H., McDaniel, J.M., Xia, B., Liu, X., Ivanciu, L., Ny, A., Hermans, K., Silasi-Mansat, R., McGee, S., *et al.* (2008). Endothelial cell O-glycan deficiency causes blood/lymphatic misconnections and consequent fatty liver disease in mice. *J Clin Invest* *118*, 3725-3737.

Fu, N.Y., Rios, A.C., Pal, B., Law, C.W., Jamieson, P., Liu, R., Vaillant, F., Jackling, F., Liu, K.H., Smyth, G.K., *et al.* (2017). Identification of quiescent and spatially restricted mammary stem cells that are hormone responsive. *Nat Cell Biol* 19, 164-176.

Fuchs, E., and Chen, T. (2013). A matter of life and death: self-renewal in stem cells. *EMBO Rep* 14, 39-48.

Gandarillas, A., Scholl, F.G., Benito, N., Gamallo, C., and Quintanilla, M. (1997). Induction of PA2.26, a cell-surface antigen expressed by active fibroblasts, in mouse epidermal keratinocytes during carcinogenesis. *Mol Carcinog* 20, 10-18.

Garner, O.B., Bush, K.T., Nigam, K.B., Yamaguchi, Y., Xu, D., Esko, J.D., and Nigam, S.K. (2011). Stage-dependent regulation of mammary ductal branching by heparan sulfate and HGF-cMet signaling. *Dev Biol* 355, 394-403.

Gastaldi, S., Sassi, F., Accornero, P., Torti, D., Galimi, F., Migliardi, G., Molyneux, G., Perera, T., Comoglio, P.M., Boccaccio, C., *et al.* (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.

Ginestier, C., Hur, M.H., Charafe-Jauffret, E., Monville, F., Dutcher, J., Brown, M., Jacquemier, J., Viens, P., Kleer, C.G., Liu, S., *et al.* (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., Frid, M.G., Shekhonin, B.V., Balabanov, Y.V., and Koteliansky, V.E. (1990). Expression of fibronectin variants in vascular and visceral smooth muscle cells in development. *Dev Biol* 141, 193-202.

Glukhova, M.A., and Streuli, C.H. (2013). How integrins control breast biology. *Curr Opin Cell Biol* 25, 633-641.

Gomez-Orte, E., Saenz-Narciso, B., Moreno, S., and Cabello, J. (2013). Multiple functions of the noncanonical Wnt pathway. *Trends Genet* 29, 545-553.

Gonzalez, D.M., and Medici, D. (2014). Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Sci Signal* 7, re8.

Gonzalez-Suarez, E., Jacob, A.P., Jones, J., Miller, R., Roudier-Meyer, M.P., Erwert, R., Pinkas, J., Branstetter, D., and Dougall, W.C. (2010). RANK ligand mediates progesterin-induced mammary epithelial proliferation and carcinogenesis. *Nature* 468, 103-107.

Gouon-Evans, V., Rothenberg, M.E., and Pollard, J.W. (2000). Postnatal mammary gland development requires macrophages and eosinophils. *Development* 127, 2269-2282.

Green, J., Nusse, R., and van Amerongen, R. (2014). The role of Ryk and Ror receptor tyrosine kinases in Wnt signal transduction. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6.

Groger, M., Loewe, R., Holnthoner, W., Embacher, R., Pillinger, M., Herron, G.S., Wolff, K., and Petzelbauer, P. (2004). IL-3 induces expression of lymphatic markers Prox-1 and podoplanin in human endothelial cells. *J Immunol* 173, 7161-7169.

- Gu, B., Sun, P., Yuan, Y., Moraes, R.C., Li, A., Teng, A., Agrawal, A., Rheume, C., Bilanchone, V., Veltmaat, J.M., *et al.* (2009). Pygo2 expands mammary progenitor cells by facilitating histone H3 K4 methylation. *J Cell Biol* 185, 811-826.
- Guo, W., Keckesova, Z., Donaher, J.L., Shibue, T., Tischler, V., Reinhardt, F., Itzkovitz, S., Noske, A., Zurrer-Hardi, U., Bell, G., *et al.* (2012). Slug and Sox9 cooperatively determine the mammary stem cell state. *Cell* 148, 1015-1028.
- Haegbarth, A., and Clevers, H. (2009). Wnt signaling, lgr5, and stem cells in the intestine and skin. *Am J Pathol* 174, 715-721.
- Hantusch, B., Kalt, R., Krieger, S., Puri, C., and Kerjaschki, D. (2007). Sp1/Sp3 and DNA-methylation contribute to basal transcriptional activation of human podoplanin in MG63 versus Saos-2 osteoblastic cells. *BMC Mol Biol* 8, 20.
- Hao, H.X., Jiang, X., and Cong, F. (2016). Control of Wnt Receptor Turnover by R-spondin-ZNRF3/RNF43 Signaling Module and Its Dysregulation in Cancer. *Cancers (Basel)* 8.
- Harburg, G., Compton, J., Liu, W., Iwai, N., Zada, S., Marlow, R., Strickland, P., Zeng, Y.A., and Hinck, L. (2014). SLIT/ROBO2 signaling promotes mammary stem cell senescence by inhibiting Wnt signaling. *Stem Cell Reports* 3, 385-393.
- Hasenauer, S., Malinge, D., Koschut, D., Pace, G., Matzke, A., von Au, A., and Orian-Rousseau, V. (2013). Internalization of Met requires the co-receptor CD44v6 and its link to ERM proteins. *PLoS One* 8, e62357.
- Haynes, B., Sarma, A., Nangia-Makker, P., and Shekhar, M.P. (2017). Breast cancer complexity: implications of intratumoral heterogeneity in clinical management. *Cancer Metastasis Rev.*
- Hennighausen, L., and Robinson, G.W. (2008). Interpretation of cytokine signaling through the transcription factors STAT5A and STAT5B. *Genes Dev* 22, 711-721.
- Herzog, B.H., Fu, J., Wilson, S.J., Hess, P.R., Sen, A., McDaniel, J.M., Pan, Y., Sheng, M., Yago, T., Silasi-Mansat, R., *et al.* (2013). Podoplanin maintains high endothelial venule integrity by interacting with platelet CLEC-2. *Nature* 502, 105-109.
- Heuberger, J., and Birchmeier, W. (2010). Interplay of cadherin-mediated cell adhesion and canonical Wnt signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a002915.
- Honma, M., Minami-Hori, M., Takahashi, H., and Iizuka, H. (2012). Podoplanin expression in wound and hyperproliferative psoriatic epidermis: regulation by TGF-beta and STAT-3 activating cytokines, IFN-gamma, IL-6, and IL-22. *J Dermatol Sci* 65, 134-140.
- Hori, K., Sen, A., and Artavanis-Tsakonas, S. (2013). Notch signaling at a glance. *J Cell Sci* 126, 2135-2140.
- Howard, B.A., and Lu, P. (2014). Stromal regulation of embryonic and postnatal mammary epithelial development and differentiation. *Semin Cell Dev Biol* 25-26, 43-51.
- Hu, Y., and Smyth, 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.

- Huang, Y.L., Anvarian, Z., Doderlein, G., Acebron, S.P., and Niehrs, C. (2015). Maternal Wnt/STOP signaling promotes cell division during early *Xenopus* embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *112*, 5732-5737.
- Huo, Y., and Macara, I.G. (2014). The Par3-like polarity protein Par3L is essential for mammary stem cell maintenance. *Nat Cell Biol* *16*, 529-537.
- Hwang, Y.S., Xianglan, Z., Park, K.K., and Chung, W.Y. (2012). Functional invadopodia formation through stabilization of the PDPN transcript by IMP-3 and cancer-stromal crosstalk for PDPN expression. *Carcinogenesis* *33*, 2135-2146.
- 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.
- Inman, J.L., Robertson, C., Mott, J.D., and Bissell, M.J. (2015). Mammary gland development: cell fate specification, stem cells and the microenvironment. *Development* *142*, 1028-1042.
- Jamieson, C., Sharma, M., and Henderson, B.R. (2014). Targeting the beta-catenin nuclear transport pathway in cancer. *Semin Cancer Biol* *27*, 20-29.
- Jansen, K.A., Atherton, P., and Ballestrem, C. (2017). Mechanotransduction at the cell-matrix interface. *Semin Cell Dev Biol*.
- Jarde, T., Lloyd-Lewis, B., Thomas, M., Kendrick, H., Melchor, L., Bougaret, L., Watson, P.D., Ewan, K., Smalley, M.J., and Dale, T.C. (2016). Wnt and Neuregulin1/ErbB signalling extends 3D culture of hormone responsive mammary organoids. *Nat Commun* *7*, 13207.
- Jeselsohn, R., Brown, N.E., Arendt, L., Klebba, I., Hu, M.G., Kuperwasser, C., and Hinds, P.W. (2010). Cyclin D1 kinase activity is required for the self-renewal of mammary stem and progenitor cells that are targets of MMTV-ErbB2 tumorigenesis. *Cancer Cell* *17*, 65-76.
- Jezequel, P., Frenel, J.S., Campion, L., Guerin-Charbonnel, C., Gouraud, W., Ricolleau, G., and Campone, M. (2013). bc-GenExMiner 3.0: new mining module computes breast cancer gene expression correlation analyses. *Database (Oxford)* *2013*, bas060.
- Joshi, P.A., Di Grappa, M.A., and Khokha, R. (2012). Active allies: hormones, stem cells and the niche in adult mammopoiesis. *Trends Endocrinol Metab* *23*, 299-309.
- Joshi, P.A., Waterhouse, P.D., Kannan, N., Narala, S., Fang, H., Di Grappa, M.A., Jackson, H.W., Penninger, J.M., Eaves, C., and Khokha, R. (2015). RANK Signaling Amplifies WNT-Responsive Mammary Progenitors through R-SPONDIN1. *Stem Cell Reports* *5*, 31-44.
- Kakugawa, S., Langton, P.F., Zebisch, M., Howell, S., Chang, T.H., Liu, Y., Feizi, T., Bineva, G., O'Reilly, N., Snijders, A.P., *et al.* (2015). Notum deacylates Wnt proteins to suppress signalling activity. *Nature* *519*, 187-192.

- Kalita-de Croft, P., Al-Ejeh, F., McCart Reed, A.E., Saunus, J.M., and Lakhani, S.R. (2016). 'Omics Approaches in Breast Cancer Research and Clinical Practice. *Adv Anat Pathol* 23, 356-367.
- Katoh, M., and Katoh, M. (2006). Notch ligand, JAG1, is evolutionarily conserved target of canonical WNT signaling pathway in progenitor cells. *Int J Mol Med* 17, 681-685.
- Kazanskaya, O., Glinka, A., del Barco Barrantes, I., Stannek, P., Niehrs, C., and Wu, W. (2004). R-Spondin2 is a secreted activator of Wnt/beta-catenin signaling and is required for Xenopus myogenesis. *Dev Cell* 7, 525-534.
- Keller, P.J., Arendt, L.M., Skibinski, A., Logvinenko, T., Klebba, I., Dong, S., Smith, A.E., Prat, A., Perou, C.M., Gilmore, H., *et al.* (2012). Defining the cellular precursors to human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 2772-2777.
- 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.
- Kerjaschki, D., Regele, H.M., Moosberger, I., Nagy-Bojarski, K., Watschinger, B., Soleiman, A., Birner, P., Krieger, S., Hovorka, A., Silberhumer, G., *et al.* (2004). Lymphatic neoangiogenesis in human kidney transplants is associated with immunologically active lymphocytic infiltrates. *J Am Soc Nephrol* 15, 603-612.
- Kersten, K., de Visser, K.E., van Miltenburg, M.H., and Jonkers, J. (2017). Genetically engineered mouse models in oncology research and cancer medicine. *EMBO Mol Med* 9, 137-153.
- Kessenbrock, K., Dijkgraaf, G.J., Lawson, D.A., Littlepage, L.E., Shahi, P., Pieper, U., and Werb, Z. (2013). A role for matrix metalloproteinases in regulating mammary stem cell function via the Wnt signaling pathway. *Cell Stem Cell* 13, 300-313.
- Khaled, W.T., Choon Lee, S., Stingl, J., Chen, X., Raza Ali, H., Rueda, O.M., Hadi, F., Wang, J., Yu, Y., Chin, S.F., *et al.* (2015). BCL11A is a triple-negative breast cancer gene with critical functions in stem and progenitor cells. *Nat Commun* 6, 5987.
- Kim, W., Kim, M., and Jho, E.H. (2013). Wnt/beta-catenin signalling: from plasma membrane to nucleus. *Biochem J* 450, 9-21.
- Kim, Y.C., Clark, R.J., Pelegri, F., and Alexander, C.M. (2009). Wnt4 is not sufficient to induce lobuloalveolar mammary development. *BMC Dev Biol* 9, 55.
- Kordon, E.C., and Smith, G.H. (1998). An entire functional mammary gland may comprise the progeny from a single cell. *Development* 125, 1921-1930.
- 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.
- Krishnan, H., Ochoa-Alvarez, J.A., Shen, Y., Nevel, E., Lakshminarayanan, M., Williams, M.C., Ramirez, M.I., Miller, W.T., and Goldberg, G.S. (2013). Serines in the intracellular tail of podoplanin (PDPN) regulate cell motility. *J Biol Chem* 288, 12215-12221.

- Krishnan, H., Retzbach, E.P., Ramirez, M.I., Liu, T., Li, H., Miller, W.T., and Goldberg, G.S. (2015). PKA and CDK5 can phosphorylate specific serines on the intracellular domain of podoplanin (PDPN) to inhibit cell motility. *Exp Cell Res* 335, 115-122.
- 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.
- LaMarca, H.L., Visbal, A.P., Creighton, C.J., Liu, H., Zhang, Y., Behbod, F., and Rosen, J.M. (2010). CCAAT/enhancer binding protein beta regulates stem cell activity and specifies luminal cell fate in the mammary gland. *Stem Cells* 28, 535-544.
- Lane, S.W., Williams, D.A., and Watt, F.M. (2014). Modulating the stem cell niche for tissue regeneration. *Nat Biotechnol* 32, 795-803.
- Lee, H.J., and Ormandy, C.J. (2012). Etf5, hormones and cell fate. *Trends Endocrinol Metab* 23, 292-298.
- Lehmann, B.D., Bauer, J.A., Chen, X., Sanders, M.E., Chakravarthy, A.B., Shyr, Y., and Pietenpol, J.A. (2011). Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest* 121, 2750-2767.
- Li, N., Long, B., Han, W., Yuan, S., and Wang, K. (2017). microRNAs: important regulators of stem cells. *Stem Cell Res Ther* 8, 110.
- 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., *et al.* (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, M.L., Vaillant, F., Yagita, H., Lindeman, G.J., Smyth, G.K., and Visvader, J.E. (2010). Transcriptome analyses of mouse and human mammary cell subpopulations reveal multiple conserved genes and pathways. *Breast Cancer Res* 12, R21.
- Lin, T.P., Guzman, R.C., Osborn, R.C., Thordarson, G., and Nandi, S. (1992). Role of endocrine, autocrine, and paracrine interactions in the development of mammary hyperplasia in Wnt-1 transgenic mice. *Cancer Res* 52, 4413-4419.
- Lindley, L.E., Curtis, K.M., Sanchez-Mejias, A., Rieger, M.E., Robbins, D.J., and Briegel, K.J. (2015). The WNT-controlled transcriptional regulator LBH is required for mammary stem cell expansion and maintenance of the basal lineage. *Development* 142, 893-904.
- Lindvall, C., Zylstra, C.R., Evans, N., West, R.A., Dykema, K., Furge, K.A., and Williams, B.O. (2009). The Wnt co-receptor Lrp6 is required for normal mouse mammary gland development. *PLoS One* 4, e5813.
- Linnemann, J.R., Miura, H., Meixner, L.K., Irmeler, M., Kloos, U.J., Hirschi, B., Bartsch, H.S., Sass, S., Beckers, J., Theis, F.J., *et al.* (2015). Quantification of regenerative potential in primary human mammary epithelial cells. *Development* 142, 3239-3251.
- Liu, W., Wu, T., Dong, X., and Zeng, Y.A. (2017). Neuropilin-1 is upregulated by Wnt/beta-catenin signaling and is important for mammary stem cells. *Sci Rep* 7, 10941.

- Lloyd-Lewis, B., Harris, O.B., Watson, C.J., and Davis, F.M. (2017). Mammary Stem Cells: Premise, Properties, and Perspectives. *Trends Cell Biol.*
- 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.
- Louderbough, J.M., Brown, J.A., Nagle, R.B., and Schroeder, J.A. (2011). CD44 Promotes Epithelial Mammary Gland Development and Exhibits Altered Localization during Cancer Progression. *Genes Cancer* *2*, 771-781.
- Luo, J., Chen, J., Deng, Z.L., Luo, X., Song, W.X., Sharff, K.A., Tang, N., Haydon, R.C., Luu, H.H., and He, T.C. (2007). Wnt signaling and human diseases: what are the therapeutic implications? *Lab Invest* *87*, 97-103.
- MacDonald, B.T., Tamai, K., and He, X. (2009). Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell* *17*, 9-26.
- Macias, H., and Hinck, L. (2012). Mammary gland development. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* *1*, 533-557.
- Macias, H., Moran, A., Samara, Y., Moreno, M., Compton, J.E., Harburg, G., Strickland, P., and Hinck, L. (2011). SLIT/ROBO1 signaling suppresses mammary branching morphogenesis by limiting basal cell number. *Dev Cell* *20*, 827-840.
- Mahtab, E.A., Wijffels, M.C., Van Den Akker, N.M., Hahurij, N.D., Lie-Venema, H., Wisse, L.J., Deruiter, M.C., Uhrin, P., Zaujec, J., Binder, B.R., *et al.* (2008). Cardiac malformations and myocardial abnormalities in podoplanin knockout mouse embryos: Correlation with abnormal epicardial development. *Dev Dyn* *237*, 847-857.
- 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.
- Martin-Villar, E., Borda-d'Agua, B., Carrasco-Ramirez, P., Renart, J., Parsons, M., Quintanilla, M., and Jones, G.E. (2015). Podoplanin mediates ECM degradation by squamous carcinoma cells through control of invadopodia stability. *Oncogene* *34*, 4531-4544.
- Martin-Villar, E., Fernandez-Munoz, B., Parsons, M., Yurrita, M.M., Megias, D., Perez-Gomez, E., Jones, G.E., and Quintanilla, M. (2010). Podoplanin associates with CD44 to promote directional cell migration. *Mol Biol Cell* *21*, 4387-4399.
- Martin-Villar, E., Megias, D., Castel, S., Yurrita, M.M., Vilaro, S., and Quintanilla, M. (2006). Podoplanin binds ERM proteins to activate RhoA and promote epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Sci* *119*, 4541-4553.
- Martin-Villar, E., Scholl, F.G., Gamallo, C., Yurrita, M.M., Munoz-Guerra, M., Cruces, J., and Quintanilla, M. (2005). Characterization of human PA2.26 antigen (T1alpha-2, podoplanin), a small membrane mucin induced in oral squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* *113*, 899-910.

- Martin-Villar, E., Yurrita, M.M., Fernandez-Munoz, B., Quintanilla, M., and Renart, J. (2009). Regulation of podoplanin/PA2.26 antigen expression in tumour cells. Involvement of calpain-mediated proteolysis. *Int J Biochem Cell Biol* *41*, 1421-1429.
- Melchor, L., Molyneux, G., Mackay, A., Magnay, F.A., Atienza, M., Kendrick, H., Nava-Rodrigues, D., Lopez-Garcia, M.A., Milanezi, F., Greenow, K., *et al.* (2014). Identification of cellular and genetic drivers of breast cancer heterogeneity in genetically engineered mouse tumour models. *J Pathol* *233*, 124-137.
- Mikaelian, I., Hovick, M., Silva, K.A., Burzenski, L.M., Shultz, L.D., Ackert-Bicknell, C.L., Cox, G.A., and Sundberg, J.P. (2006). Expression of terminal differentiation proteins defines stages of mouse mammary gland development. *Vet Pathol* *43*, 36-49.
- Miyashita, T., Higuchi, Y., Kojima, M., Ochiai, A., and Ishii, G. (2017). Single cell time-lapse analysis reveals that podoplanin enhances cell survival and colony formation capacity of squamous cell carcinoma cells. *Sci Rep* *7*, 39971.
- Molyneux, G., Geyer, F.C., Magnay, F.A., McCarthy, A., Kendrick, H., Natrajan, R., Mackay, A., Grigoriadis, A., Tutt, A., Ashworth, A., *et al.* (2010). BRCA1 basal-like breast cancers originate from luminal epithelial progenitors and not from basal stem cells. *Cell Stem Cell* *7*, 403-417.
- 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., 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. *Mol Cancer* *12*, 132.
- 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*, 1246-1254.
- 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.
- Muschler, J., and Streuli, C.H. (2010). Cell-matrix interactions in mammary gland development and breast cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *2*, a003202.
- Nakamura-Ishizu, A., Takubo, K., Kobayashi, H., Suzuki-Inoue, K., and Suda, T. (2015). CLEC-2 in megakaryocytes is critical for maintenance of hematopoietic stem cells in the bone marrow. *J Exp Med* *212*, 2133-2146.
- Nakazawa, Y., Sato, S., Naito, M., Kato, Y., Mishima, K., Arai, H., Tsuruo, T., and Fujita, N. (2008). Tetraspanin family member CD9 inhibits Aggrus/podoplanin-induced platelet aggregation and suppresses pulmonary metastasis. *Blood* *112*, 1730-1739.
- 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.

- Nguyen-Ngoc, K.V., Shamir, E.R., Huebner, R.J., Beck, J.N., Cheung, K.J., and Ewald, A.J. (2015). 3D culture assays of murine mammary branching morphogenesis and epithelial invasion. *Methods Mol Biol* 1189, 135-162.
- Nieto, M.A., Huang, R.Y., Jackson, R.A., and Thiery, J.P. (2016). Emt: 2016. *Cell* 166, 21-45.
- Nose, K., Saito, H., and Kuroki, T. (1990). Isolation of a gene sequence induced later by tumor-promoting 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in mouse osteoblastic cells (MC3T3-E1) and expressed constitutively in ras-transformed cells. *Cell Growth Differ* 1, 511-518.
- Nusse, R. (2012). Wnt signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4.
- Nusse, R., and Clevers, H. (2017). Wnt/beta-Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell* 169, 985-999.
- Nusse, R., and Varmus, H. (2012). Three decades of Wnts: a personal perspective on how a scientific field developed. *EMBO J* 31, 2670-2684.
- 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., *et al.* (2008). The Ets transcription factor Elf5 specifies mammary alveolar cell fate. *Genes Dev* 22, 581-586.
- Ohizumi, I., Harada, N., Taniguchi, K., Tsutsumi, Y., Nakagawa, S., Kaiho, S., and Mayumi, T. (2000). Association of CD44 with OTS-8 in tumor vascular endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1497, 197-203.
- Olaku, V., Matzke, A., Mitchell, C., Hasenauer, S., Sakkaravarthi, A., Pace, G., Ponta, H., and Orian-Rousseau, V. (2011). c-Met recruits ICAM-1 as a coreceptor to compensate for the loss of CD44 in Cd44 null mice. *Mol Biol Cell* 22, 2777-2786.
- Oliver, C.H., Khaled, W.T., Frend, H., Nichols, J., and Watson, C.J. (2012). The Stat6-regulated KRAB domain zinc finger protein Zfp157 regulates the balance of lineages in mammary glands and compensates for loss of Gata-3. *Genes Dev* 26, 1086-1097.
- Orian-Rousseau, V., and Ponta, H. (2015). Perspectives of CD44 targeting therapies. *Arch Toxicol* 89, 3-14.
- Ozhan, G., Sezgin, E., Wehner, D., Pfister, A.S., Kuhl, S.J., Kagermeier-Schenk, B., Kuhl, M., Schwille, P., and Weidinger, G. (2013). Lypd6 enhances Wnt/beta-catenin signaling by promoting Lrp6 phosphorylation in raft plasma membrane domains. *Dev Cell* 26, 331-345.
- Pan, Y., Wang, W.D., and Yago, T. (2014). Transcriptional regulation of podoplanin expression by Prox1 in lymphatic endothelial cells. *Microvasc Res* 94, 96-102.
- Parker, J.S., Mullins, M., Cheang, M.C., Leung, S., Voduc, D., Vickery, T., Davies, S., Fauron, C., He, X., Hu, Z., *et al.* (2009). Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol* 27, 1160-1167.
- 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., Akslén, L.A., *et al.* (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**, 747-752.
- Phillips, S., Prat, A., Sedic, M., Proia, T., Wronski, A., Mazumdar, S., Skibinski, A., Shirley, S.H., Perou, C.M., Gill, G., *et al.* (2014). Cell-state transitions regulated by SLUG are critical for tissue regeneration and tumor initiation. *Stem Cell Reports* **2**, 633-647.
- 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.
- 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.
- Plaszczycza, A., Nilsson, J., Magnusson, L., Brosjo, O., Larsson, O., Vult von Steyern, F., Domanski, H.A., Lilljebjorn, H., Fioretos, T., Tayebwa, J., *et al.* (2014). Fusions involving protein kinase C and membrane-associated proteins in benign fibrous histiocytoma. *Int J Biochem Cell Biol* **53**, 475-481.
- Pohl, S.G., Brook, N., Agostino, M., Arfuso, F., Kumar, A.P., and Dharmarajan, A. (2017). Wnt signaling in triple-negative breast cancer. *Oncogenesis* **6**, e310.
- Poincloux, R., Lizarraga, F., and Chavrier, P. (2009). Matrix invasion by tumour cells: a focus on MT1-MMP trafficking to invadopodia. *J Cell Sci* **122**, 3015-3024.
- Polyak, K. (2010). Molecular markers for the diagnosis and management of ductal carcinoma in situ. *J Natl Cancer Inst Monogr* **2010**, 210-213.
- Polyak, K. (2011). Heterogeneity in breast cancer. *J Clin Invest* **121**, 3786-3788.
- 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.
- Prater, M.D., Petit, V., Alasdair Russell, I., Giraddi, R.R., Shehata, M., Menon, S., Schulte, R., Kalajzic, I., Rath, N., Olson, M.F., *et al.* (2014). Mammary stem cells have myoepithelial cell properties. *Nat Cell Biol* **16**, 942-950, 941-947.
- Pula, B., Witkiewicz, W., Dziegiel, P., and Podhorska-Okolow, M. (2013). Significance of podoplanin expression in cancer-associated fibroblasts: a comprehensive review. *Int J Oncol* **42**, 1849-1857.
- Raafat, A., Goldhar, A.S., Klauzinska, M., Xu, K., Amirjazi, I., McCurdy, D., Lashin, K., Salomon, D., Vonderhaar, B.K., Egan, S., *et al.* (2011). Expression of Notch receptors, ligands, and target genes during development of the mouse mammary gland. *J Cell Physiol* **226**, 1940-1952.
- Rahadiani, N., Ikeda, J., Makino, T., Tian, T., Qiu, Y., Mamat, S., Wang, Y., Doki, Y., Aozasa, K., and Morii, E. (2010). Tumorigenic role of podoplanin in esophageal squamous-cell carcinoma. *Ann Surg Oncol* **17**, 1311-1323.

- Rahmani, M., Carthy, J.M., and McManus, B.M. (2012). Mapping of the Wnt/beta-catenin/TCF response elements in the human versican promoter. *Methods Mol Biol* 836, 35-52.
- Rajaram, R.D., Buric, D., Caikovski, M., Ayyanan, A., Rougemont, J., Shan, J., Vainio, S.J., Yalcin-Ozuysal, O., and Brisken, C. (2015). Progesterone and Wnt4 control mammary stem cells via myoepithelial crosstalk. *EMBO J* 34, 641-652.
- Rajkumar, L., Kittrell, F.S., Guzman, R.C., Brown, P.H., Nandi, S., and Medina, D. (2007). Hormone-induced protection of mammary tumorigenesis in genetically engineered mouse models. *Breast Cancer Res* 9, R12.
- 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.
- Ramirez, M.I., Millien, G., Hinds, A., Cao, Y., Seldin, D.C., and Williams, M.C. (2003). T1alpha, a lung type I cell differentiation gene, is required for normal lung cell proliferation and alveolus formation at birth. *Dev Biol* 256, 61-72.
- Ran, S., Volk, L., Hall, K., and Flister, M.J. (2010). Lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in breast cancer. *Pathophysiology* 17, 229-251.
- 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.
- 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.
- Regan, J.L., Sourisseau, T., Soady, K., Kendrick, H., McCarthy, A., Tang, C., Brennan, K., Linardopoulos, S., White, D.E., and Smalley, M.J. (2013). Aurora A kinase regulates mammary epithelial cell fate by determining mitotic spindle orientation in a Notch-dependent manner. *Cell Rep* 4, 110-123.
- Reis-Filho, J.S., and Pusztai, L. (2011). Gene expression profiling in breast cancer: classification, prognostication, and prediction. *Lancet* 378, 1812-1823.
- Renart, J., Carrasco-Ramirez, P., Fernandez-Munoz, B., Martin-Villar, E., Montero, L., Yurrita, M.M., and Quintanilla, M. (2015). New insights into the role of podoplanin in epithelial-mesenchymal transition. *Int Rev Cell Mol Biol* 317, 185-239.
- Ring, B.Z., Hout, D.R., Morris, S.W., Lawrence, K., Schweitzer, B.L., Bailey, D.B., Lehmann, B.D., Pietenpol, J.A., and Seitz, R.S. (2016). Generation of an algorithm based on minimal gene sets to clinically subtype triple negative breast cancer patients. *BMC Cancer* 16, 143.
- Rios, A.C., Fu, N.Y., Cursons, J., Lindeman, G.J., and Visvader, J.E. (2016a). The complexities and caveats of lineage tracing in the mammary gland. *Breast Cancer Res* 18, 116.
- Rios, A.C., Fu, N.Y., Jamieson, P.R., Pal, B., Whitehead, L., Nicholas, K.R., Lindeman, G.J., and Visvader, J.E. (2016b). Essential role for a novel population of binucleated mammary epithelial cells in lactation. *Nat Commun* 7, 11400.

- Rios, A.C., Fu, N.Y., Lindeman, G.J., and Visvader, J.E. (2014). In situ identification of bipotent stem cells in the mammary gland. *Nature* *506*, 322-327.
- Rishi, A.K., Joyce-Brady, M., Fisher, J., Dobbs, L.G., Floros, J., VanderSpek, J., Brody, J.S., and Williams, M.C. (1995). Cloning, characterization, and development expression of a rat lung alveolar type I cell gene in embryonic endodermal and neural derivatives. *Dev Biol* *167*, 294-306.
- Roarty, K., and Rosen, J.M. (2010). Wnt and mammary stem cells: hormones cannot fly wingless. *Curr Opin Pharmacol* *10*, 643-649.
- Roarty, K., and Serra, R. (2007). Wnt5a is required for proper mammary gland development and TGF-beta-mediated inhibition of ductal growth. *Development* *134*, 3929-3939.
- Roarty, K., Shore, A.N., Creighton, C.J., and Rosen, J.M. (2015). Ror2 regulates branching, differentiation, and actin-cytoskeletal dynamics within the mammary epithelium. *J Cell Biol* *208*, 351-366.
- Robinson, G.W. (2007). Cooperation of signalling pathways in embryonic mammary gland development. *Nat Rev Genet* *8*, 963-972.
- Rodilla, V., Dasti, A., Huyghe, M., Lafkas, D., Laurent, C., Reyat, F., and Fre, S. (2015). Luminal progenitors restrict their lineage potential during mammary gland development. *PLoS Biol* *13*, e1002069.
- Rodilla, V., Villanueva, A., Obrador-Hevia, A., Robert-Moreno, A., Fernandez-Majada, V., Grilli, A., Lopez-Bigas, N., Bellora, N., Alba, M.M., Torres, F., *et al.* (2009). Jagged1 is the pathological link between Wnt and Notch pathways in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 6315-6320.
- Ruan, W., and Kleinberg, D.L. (1999). Insulin-like growth factor I is essential for terminal end bud formation and ductal morphogenesis during mammary development. *Endocrinology* *140*, 5075-5081.
- Rubin, H. (2006). What keeps cells in tissues behaving normally in the face of myriad mutations? *Bioessays* *28*, 515-524.
- Russell, T.D., Jindal, S., Agunbiade, S., Gao, D., Troxell, M., Borges, V.F., and Schedin, P. (2015). Myoepithelial cell differentiation markers in ductal carcinoma in situ progression. *Am J Pathol* *185*, 3076-3089.
- Russnes, H.G., Lingjaerde, O.C., Borresen-Dale, A.L., and Caldas, C. (2017). Breast Cancer Molecular Stratification: From Intrinsic Subtypes to Integrative Clusters. *Am J Pathol* *187*, 2152-2162.
- Savagner, P. (2015). Epithelial-mesenchymal transitions: from cell plasticity to concept elasticity. *Curr Top Dev Biol* *112*, 273-300.
- Schacht, V., Dadras, S.S., Johnson, L.A., Jackson, D.G., Hong, Y.K., and Detmar, M. (2005). Up-regulation of the lymphatic marker podoplanin, a mucin-type transmembrane glycoprotein, in human squamous cell carcinomas and germ cell tumors. *Am J Pathol* *166*, 913-921.
- Schacht, V., Ramirez, M.I., Hong, Y.K., Hirakawa, S., Feng, D., Harvey, N., Williams, M., Dvorak, A.M., Dvorak, H.F., Oliver, G., *et al.* (2003). T1alpha/podoplanin deficiency disrupts normal lymphatic vasculature formation and causes lymphedema. *EMBO J* *22*, 3546-3556.

- Scheele, C.L., Hannezo, E., Muraro, M.J., Zomer, A., Langedijk, N.S., van Oudenaarden, A., Simons, B.D., and van Rheenen, J. (2017). Identity and dynamics of mammary stem cells during branching morphogenesis. *Nature* 542, 313-317.
- Schlessinger, K., Hall, A., and Tolwinski, N. (2009). Wnt signaling pathways meet Rho GTPases. *Genes Dev* 23, 265-277.
- Schmitt, M., Metzger, M., Gradl, D., Davidson, G., and Orian-Rousseau, V. (2015). CD44 functions in Wnt signaling by regulating LRP6 localization and activation. *Cell Death Differ* 22, 677-689.
- Scholl, F.G., Gamallo, C., and Quintanilla, M. (2000). Ectopic expression of PA2.26 antigen in epidermal keratinocytes leads to destabilization of adherens junctions and malignant progression. *Lab Invest* 80, 1749-1759.
- Scholl, F.G., Gamallo, C., Vilaro, S., and Quintanilla, M. (1999). Identification of PA2.26 antigen as a novel cell-surface mucin-type glycoprotein that induces plasma membrane extensions and increased motility in keratinocytes. *J Cell Sci* 112 (Pt 24), 4601-4613.
- Schoppmann, S.F., Berghoff, A., Dinhof, C., Jakesz, R., Gnant, M., Dubsky, P., Jesch, B., Heinzl, H., and Birner, P. (2012). Podoplanin-expressing cancer-associated fibroblasts are associated with poor prognosis in invasive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 134, 237-244.
- Schuijers, J., and Clevers, H. (2012). Adult mammalian stem cells: the role of Wnt, Lgr5 and R-spondins. *EMBO J* 31, 2685-2696.
- Sekiguchi, T., Takemoto, A., Takagi, S., Takatori, K., Sato, S., Takami, M., and Fujita, N. (2016). Targeting a novel domain in podoplanin for inhibiting platelet-mediated tumor metastasis. *Oncotarget* 7, 3934-3946.
- 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.
- Shen, Y., Chen, C.S., Ichikawa, H., and Goldberg, G.S. (2010). SRC induces podoplanin expression to promote cell migration. *J Biol Chem* 285, 9649-9656.
- Skibinski, A., and Kuperwasser, C. (2015). The origin of breast tumor heterogeneity. *Oncogene* 34, 5309-5316.
- 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.

- Smith, G.H., and Medina, D. (1988). A morphologically distinct candidate for an epithelial stem cell in mouse mammary gland. *J Cell Sci* 90 (Pt 1), 173-183.
- Soady, K.J., Kendrick, H., Gao, Q., Tutt, A., Zvelebil, M., Ordonez, L.D., Quist, J., Tan, D.W., Isacke, C.M., Grigoriadis, A., *et al.* (2015). Mouse mammary stem cells express prognostic markers for triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res* 17, 31.
- Soriano, P. (1999). Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet* 21, 70-71.
- 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., *et al.* (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10869-10874.
- 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.
- Spike, B.T., and Wahl, G.M. (2011). p53, Stem Cells, and Reprogramming: Tumor Suppression beyond Guarding the Genome. *Genes Cancer* 2, 404-419.
- Stanganello, E., and Scholpp, S. (2016). Role of cytonemes in Wnt transport. *J Cell Sci* 129, 665-672.
- 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.
- Sternlicht, M.D. (2006). Key stages in mammary gland development: the cues that regulate ductal branching morphogenesis. *Breast Cancer Res* 8, 201.
- 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.
- Su, Y., Fu, C., Ishikawa, S., Stella, A., Kojima, M., Shitoh, K., Schreiber, E.M., Day, B.W., and Liu, B. (2008). APC is essential for targeting phosphorylated beta-catenin to the SCFbeta-TrCP ubiquitin ligase. *Mol Cell* 32, 652-661.
- Sun, Q., Zhang, J., Cao, W., Wang, X., Xu, Q., Yan, M., Wu, X., and Chen, W. (2013). Dysregulated miR-363 affects head and neck cancer invasion and metastasis by targeting podoplanin. *Int J Biochem Cell Biol* 45, 513-520.
- Suzuki, H., Masuda, N., Shimura, T., Araki, K., Kobayashi, T., Tsutsumi, S., Asao, T., and Kuwano, H. (2008a). Nuclear beta-catenin expression at the invasive front and in the vessels predicts liver metastasis in colorectal carcinoma. *Anticancer Res* 28, 1821-1830.
- Suzuki, H., Toyota, M., Carraway, H., Gabrielson, E., Ohmura, T., Fujikane, T., Nishikawa, N., Sogabe, Y., Nojima, M., Sonoda, T., *et al.* (2008b). Frequent epigenetic inactivation of Wnt antagonist genes in breast cancer. *Br J Cancer* 98, 1147-1156.

Suzuki-Inoue, K., Inoue, O., Ding, G., Nishimura, S., Hokamura, K., Eto, K., Kashiwagi, H., Tomiyama, Y., Yatomi, Y., Umemura, K., *et al.* (2010). Essential in vivo roles of the C-type lectin receptor CLEC-2: embryonic/neonatal lethality of CLEC-2-deficient mice by blood/lymphatic misconnections and impaired thrombus formation of CLEC-2-deficient platelets. *J Biol Chem* 285, 24494-24507.

Suzuki-Inoue, K., Kato, Y., Inoue, O., Kaneko, M.K., Mishima, K., Yatomi, Y., Yamazaki, Y., Narimatsu, H., and Ozaki, Y. (2007). Involvement of the snake toxin receptor CLEC-2, in podoplanin-mediated platelet activation, by cancer cells. *J Biol Chem* 282, 25993-26001.

Suzuki-Inoue, K., Osada, M., and Ozaki, Y. (2017). Physiologic and pathophysiologic roles of interaction between C-type lectin-like receptor 2 and podoplanin: partners from in utero to adulthood. *J Thromb Haemost* 15, 219-229.

Szasz, A.M., Lanczky, A., Nagy, A., Forster, S., Hark, K., Green, J.E., Boussioutas, A., Busuttill, R., Szabo, A., and Gyorffy, B. (2016). Cross-validation of survival associated biomarkers in gastric cancer using transcriptomic data of 1,065 patients. *Oncotarget* 7, 49322-49333.

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.

Taelman, V.F., Dobrowolski, R., Plouhinec, J.L., Fuentealba, L.C., Vorwald, P.P., Gumper, I., Sabatini, D.D., and De Robertis, E.M. (2010). Wnt signaling requires sequestration of glycogen synthase kinase 3 inside multivesicular endosomes. *Cell* 143, 1136-1148.

Takemoto, A., Miyata, K., and Fujita, N. (2017). Platelet-activating factor podoplanin: from discovery to drug development. *Cancer Metastasis Rev.*

Tamura, S., Suzuki-Inoue, K., Tsukiji, N., Shirai, T., Sasaki, T., Osada, M., Satoh, K., and Ozaki, Y. (2016). Podoplanin-positive periaarteriolar stromal cells promote megakaryocyte growth and proplatelet formation in mice by CLEC-2. *Blood* 127, 1701-1710.

Tan, T.Z., Miow, Q.H., Miki, Y., Noda, T., Mori, S., Huang, R.Y., and Thiery, J.P. (2014). Epithelial-mesenchymal transition spectrum quantification and its efficacy in deciphering survival and drug responses of cancer patients. *EMBO Mol Med* 6, 1279-1293.

Tao, L., Roberts, A.L., Dunphy, K.A., Bigelow, C., Yan, H., and Jerry, D.J. (2011). Repression of mammary stem/progenitor cells by p53 is mediated by Notch and separable from apoptotic activity. *Stem Cells* 29, 119-127.

Tejchman, A., Lamerant-Fayel, N., Jacquinet, J.C., Bielawska-Pohl, A., Mleczko-Sanecka, K., Grillon, C., Chouaib, S., Ugorski, M., and Kieda, C. (2017). Tumor hypoxia modulates podoplanin/CCL21 interactions in CCR7+ NK cell recruitment and CCR7+ tumor cell mobilization. *Oncotarget* 8, 31876-31887.

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.

Trejo, C.L., Luna, G., Dravis, C., Spike, B.T., and Wahl, G.M. (2017). Lgr5 is a marker for fetal mammary stem cells, but is not essential for stem cell activity or tumorigenesis. *NPJ Breast Cancer* 3, 16.

- Trusolino, L., Bertotti, A., and Comoglio, P.M. (2010). MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* *11*, 834-848.
- Tsukamoto, A.S., Grosschedl, R., Guzman, R.C., Parslow, T., and Varmus, H.E. (1988). Expression of the int-1 gene in transgenic mice is associated with mammary gland hyperplasia and adenocarcinomas in male and female mice. *Cell* *55*, 619-625.
- Tsuneki, M., Maruyama, S., Yamazaki, M., Xu, B., Essa, A., Abe, T., Babkair, H., Cheng, J., Yamamoto, T., and Saku, T. (2013). Extracellular heat shock protein A9 is a novel interaction partner of podoplanin in oral squamous cell carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* *434*, 124-130.
- Ugorski, M., Dziegiel, P., and Suchanski, J. (2016). Podoplanin - a small glycoprotein with many faces. *Am J Cancer Res* *6*, 370-386.
- Uhrin, P., Zaujec, J., Breuss, J.M., Olcaydu, D., Chrenek, P., Stockinger, H., Fuerbauer, E., Moser, M., Haiko, P., Fassler, R., *et al.* (2010). Novel function for blood platelets and podoplanin in developmental separation of blood and lymphatic circulation. *Blood* *115*, 3997-4005.
- Vaillant, F., Lindeman, G.J., and Visvader, J.E. (2011). Jekyll or Hyde: does Matrigel provide a more or less physiological environment in mammary repopulating assays? *Breast Cancer Res* *13*, 108.
- 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, L.G., Haegebarth, A., Stange, D.E., van de Wetering, M., and Clevers, H. (2009). OLFM4 is a robust marker for stem cells in human intestine and marks a subset of colorectal cancer cells. *Gastroenterology* *137*, 15-17.
- Van Keymeulen, A., Fioramonti, M., Centonze, A., Bouvencourt, G., Achouri, Y., and Blanpain, C. (2017). Lineage-Restricted Mammary Stem Cells Sustain the Development, Homeostasis, and Regeneration of the Estrogen Receptor Positive Lineage. *Cell Rep* *20*, 1525-1532.
- 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.
- 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.
- 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.
- Visvader, J.E., and Clevers, H. (2016). Tissue-specific designs of stem cell hierarchies. *Nat Cell Biol* *18*, 349-355.
- Visvader, J.E., and Smith, G.H. (2011). Murine mammary epithelial stem cells: discovery, function, and current status. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *3*.

- Visvader, J.E., and Stingl, J. (2014). Mammary stem cells and the differentiation hierarchy: current status and perspectives. *Genes Dev* 28, 1143-1158.
- Wallden, B., Storhoff, J., Nielsen, T., Dowidar, N., Schaper, C., Ferree, S., Liu, S., Leung, S., Geiss, G., Snider, J., *et al.* (2015). Development and verification of the PAM50-based Prosigna breast cancer gene signature assay. *BMC Med Genomics* 8, 54.
- Wang, D., Cai, C., Dong, X., Yu, Q.C., Zhang, X.O., Yang, L., and Zeng, Y.A. (2015). Identification of multipotent mammary stem cells by protein C receptor expression. *Nature* 517, 81-84.
- Wang, Y., Dong, J., Li, D., Lai, L., Siwko, S., Li, Y., and Liu, M. (2013). Lgr4 regulates mammary gland development and stem cell activity through the pluripotency transcription factor Sox2. *Stem Cells* 31, 1921-1931.
- Watanabe, K., Villarreal-Ponce, A., Sun, P., Salmans, M.L., Fallahi, M., Andersen, B., and Dai, X. (2014). Mammary morphogenesis and regeneration require the inhibition of EMT at terminal end buds by *Ovol2* transcriptional repressor. *Dev Cell* 29, 59-74.
- Watson, C.J., and Khaled, W.T. (2008). Mammary development in the embryo and adult: a journey of morphogenesis and commitment. *Development* 135, 995-1003.
- Watson, C.J., and Kreuzaler, P.A. (2011). Remodeling mechanisms of the mammary gland during involution. *Int J Dev Biol* 55, 757-762.
- Wetterwald, A., Hoffstetter, W., Cecchini, M.G., Lanske, B., Wagner, C., Fleisch, H., and Atkinson, M. (1996). Characterization and cloning of the E11 antigen, a marker expressed by rat osteoblasts and osteocytes. *Bone* 18, 125-132.
- Wicki, A., and Christofori, G. (2007). The potential role of podoplanin in tumour invasion. *Br J Cancer* 96, 1-5.
- Wicki, A., Lehembre, F., Wick, N., Hantusch, B., Kerjaschki, D., and Christofori, G. (2006). Tumor invasion in the absence of epithelial-mesenchymal transition: podoplanin-mediated remodeling of the actin cytoskeleton. *Cancer Cell* 9, 261-272.
- Williams, J.M., and Daniel, C.W. (1983). Mammary ductal elongation: differentiation of myoepithelium and basal lamina during branching morphogenesis. *Dev Biol* 97, 274-290.
- Wu, X., Tu, X., Joeng, K.S., Hilton, M.J., Williams, D.A., and Long, F. (2008). Rac1 activation controls nuclear localization of beta-catenin during canonical Wnt signaling. *Cell* 133, 340-353.
- Wuidart, A., Ousset, M., Rulands, S., Simons, B.D., Van Keymeulen, A., and Blanpain, C. (2016). Quantitative lineage tracing strategies to resolve multipotency in tissue-specific stem cells. *Genes Dev* 30, 1261-1277.
- Xiao, Q., Chen, Z., Jin, X., Mao, R., and Chen, Z. (2017). The many postures of noncanonical Wnt signaling in development and diseases. *Biomed Pharmacother* 93, 359-369.
- Xie, H.Y., Shao, Z.M., and Li, D.Q. (2017). Tumor microenvironment: driving forces and potential therapeutic targets for breast cancer metastasis. *Chin J Cancer* 36, 36.

- Xu, Y., Pang, W., Lu, J., Shan, A., and Zhang, Y. (2016). Polypeptide N-Acetylgalactosaminyltransferase 13 Contributes to Neurogenesis via Stabilizing the Mucin-type O-Glycoprotein Podoplanin. *J Biol Chem* 291, 23477-23488.
- Yalcin-Ozuysal, O., Fiche, M., Guitierrez, M., Wagner, K.U., Raffoul, W., and Brisken, C. (2010). Antagonistic roles of Notch and p63 in controlling mammary epithelial cell fates. *Cell Death Differ* 17, 1600-1612.
- 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, C.C., and Cotsarelis, G. (2010). Review of hair follicle dermal cells. *J Dermatol Sci* 57, 2-11.
- Yang, L., Wu, X., Wang, Y., Zhang, K., Wu, J., Yuan, Y.C., Deng, X., Chen, L., Kim, C.C., Lau, S., *et al.* (2011). FZD7 has a critical role in cell proliferation in triple negative breast cancer. *Oncogene* 30, 4437-4446.
- Ye, X., Tam, W.L., Shibue, T., Kaygusuz, Y., Reinhardt, F., Ng Eaton, E., and Weinberg, R.A. (2015). Distinct EMT programs control normal mammary stem cells and tumour-initiating cells. *Nature* 525, 256-260.
- Ye, X., and Weinberg, R.A. (2015). Epithelial-Mesenchymal Plasticity: A Central Regulator of Cancer Progression. *Trends Cell Biol* 25, 675-686.
- Yu, Q.C., Verheyen, E.M., and Zeng, Y.A. (2016). Mammary Development and Breast Cancer: A Wnt Perspective. *Cancers (Basel)* 8.
- Yurrita, M.M., Fernandez-Munoz, B., Del Castillo, G., Martin-Villar, E., Renart, J., and Quintanilla, M. (2014). Podoplanin is a substrate of presenilin-1/gamma-secretase. *Int J Biochem Cell Biol* 46, 68-75.
- Zeng, L., Cai, C., Li, S., Wang, W., Li, Y., Chen, J., Zhu, X., and Zeng, Y.A. (2016). Essential Roles of Cyclin Y-Like 1 and Cyclin Y in Dividing Wnt-Responsive Mammary Stem/Progenitor Cells. *PLoS Genet* 12, e1006055.
- Zeng, X., Huang, H., Tamai, K., Zhang, X., Harada, Y., Yokota, C., Almeida, K., Wang, J., Doble, B., Woodgett, J., *et al.* (2008). Initiation of Wnt signaling: control of Wnt coreceptor Lrp6 phosphorylation/activation via frizzled, dishevelled and axin functions. *Development* 135, 367-375.
- 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.
- Zhang, M., Atkinson, R.L., and Rosen, J.M. (2010). Selective targeting of radiation-resistant tumor-initiating cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 3522-3527.
- Zimmer, G., Lottspeich, F., Maisner, A., Klenk, H.D., and Herrler, G. (1997). Molecular characterization of gp40, a mucin-type glycoprotein from the apical plasma membrane of Madin-Darby canine kidney cells (type I). *Biochem J* 326 (Pt 1), 99-108.

ANNEXES

Annexe 1 : Paracrine Met signaling triggers epithelial-mesenchymal transition in mammary luminal progenitors, affecting their fate.



RESEARCH ARTICLE



Paracrine Met signaling triggers epithelial–mesenchymal transition in mammary luminal progenitors, affecting their fate

Amandine Di-Cicco^{1,2,3}, Valérie Petit^{1,2}, Aurélie Chiche^{1,2,3}, Laura Bresson^{1,2,3}, Mathilde Romagnoli^{1,2,3}, Véronique Orian-Rousseau⁴, Maria dM Vivanco⁵, Daniel Medina⁶, Marisa M Faraldo^{1,2,3,7}, Marina A Glukhova^{1,2,3,7}, Marie-Ange Deugnier^{1,2,3,7*}

¹Institut Curie, Paris Sciences et Lettres Research University, Paris, France; ²CNRS UMR144, Subcellular Structure and Cellular Dynamics - Institut Curie, Paris, France; ³Equipe Labellisée par La Ligue contre le Cancer, Paris, France; ⁴Karlsruhe Institute of Technology, Karlsruhe, Germany; ⁵Cell Biology and Stem Cells Unit, CIC bioGUNE, Derio, Spain; ⁶Baylor College of Medicine, Houston, United States; ⁷Institut national de la santé et de la recherche médicale, Paris, France

Abstract HGF/Met signaling has recently been associated with basal-type breast cancers, which are thought to originate from progenitor cells residing in the luminal compartment of the mammary epithelium. We found that ICAM-1 efficiently marks mammary luminal progenitors comprising hormone receptor-positive and receptor-negative cells, presumably ductal and alveolar progenitors. Both cell populations strongly express Met, while HGF is produced by stromal and basal myoepithelial cells. We show that persistent HGF treatment stimulates the clonogenic activity of ICAM1-positive luminal progenitors, controlling their survival and proliferation, and leads to the expression of basal cell characteristics, including stem cell potential. This is accompanied by the induction of *Snai1* and *Snai2*, two major transcription factors triggering epithelial–mesenchymal transition, the repression of the luminal-regulatory genes *Elf5* and *Hey1*, and claudin down-regulation. Our data strongly indicate that paracrine Met signaling can control the function of luminal progenitors and modulate their fate during mammary development and tumorigenesis.

DOI: [10.7554/eLife.06104.001](https://doi.org/10.7554/eLife.06104.001)

*For correspondence: marie-ange.deugnier@curie.fr

Competing interests: The authors declare that no competing interests exist.

Funding: See page 21

Received: 16 December 2014

Accepted: 11 June 2015

Published: 13 July 2015

Reviewing editor: Johanna Ivaska, University of Turku, Finland

© Copyright Di-Cicco et al. This article is distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use and redistribution provided that the original author and source are credited.

Introduction

The postnatal development of the mammary gland comprises two distinct morphogenetic events: the growth and branching of epithelial ducts during puberty and the lobulo–alveolar development during pregnancy. The mammary epithelium is embedded in a fatty connective tissue and organized as a bilayer, with a basal layer of myoepithelial cells and a luminal epithelial layer. During lactation, the luminal cells produce milk, whereas myoepithelial cells serve for milk expulsion.

The luminal cell layer is characterized by the expression of keratins 8/18/19 and comprises a subset of hormone-sensing cells that express estrogen, progesterone, and prolactin receptors (ER, PR, and PrlR, respectively) (Briskin, 2013). Basal myoepithelial cells express keratins 5 and 14, P-cadherin, the transcription factor p63, and smooth muscle-specific contractile proteins (Moumen et al., 2011). This compartment specifically displays Slug/Snai2 (Guo et al., 2012; Nassour et al., 2012), a key transcription factor coordinating the epithelial–mesenchymal (EMT) transition program (Thiery et al., 2009; Nieto and Cano, 2012; Gonzalez and Medici, 2014).

eLife digest Throughout the life of a female mammal, the mammary glands undergo different phases of development to prepare for, and adapt to, feeding offspring. Luminal cells line the inside of branch-like structures throughout the mammary gland and are responsible for producing milk. When the mammary gland grows, new luminal cells develop from a kind of cell called luminal progenitor cells. However, these progenitor cells are also thought to be the source of certain types of breast cancer.

Recently, it has been suggested that luminal progenitor cells display a receptor protein called Met on their surface. When Met and 'co-receptor' proteins bind to a molecule called HGF, this triggers a cascade of signals that can cause certain cells to change their properties. This is known as the epithelial–mesenchymal transition. Although this transition is important for new tissues to develop, it can also result in cancerous tumors forming if it is not correctly controlled. Luminal cells do not produce HGF themselves, which suggests that Met signaling in these cells is triggered by the HGF released from neighboring cells. However, neither the mechanisms behind this signaling nor the effects of signaling on the luminal progenitor cells are well understood.

Di-Cicco et al. set out to identify where Met, its co-receptors and HGF are located in the mouse mammary gland during different phases of development. This revealed that one of the co-receptors—called ICAM-1—can be used as a marker to identify certain types of luminal progenitor cell. Di-Cicco et al. found that these progenitor cells display Met on their surface, and other types of mammary cell—called stromal cells and myoepithelial cells—produce HGF.

When exposed to HGF, luminal progenitor cells grown in culture in the laboratory proliferated and went through the epithelial–mesenchymal transition. These findings suggest that myoepithelial and stromal cells regulate luminal progenitor cells by producing HGF to activate Met signaling in these cells. Such interactions could be of great importance during mammary development and tumorigenesis. The next big challenge will be to determine the circumstances under which luminal progenitor cells stimulated by HGF can give rise to breast cancers. This work will allow us to better define the cell population that should be targeted by anti-cancer drugs.

DOI: [10.7554/eLife.06104.002](https://doi.org/10.7554/eLife.06104.002)

The adult mammary basal compartment harbors multipotent stem cells able to fully regenerate the gland upon transplantation (*Shackleton et al., 2006; Stingl et al., 2006*). The luminal cell layer contains clonogenic cells, the luminal progenitors (*Asselin-Labat et al., 2007; Sleeman et al., 2007*). This population is heterogeneous, consisting of hormone receptor-positive and hormone receptor-negative clonogenic cells that are considered to be functionally distinct ductal and alveolar progenitors (*Beleut et al., 2010; Regan et al., 2012; Shehata et al., 2012; Fu et al., 2014*). Considerable interest has recently focused on luminal progenitors. According to lineage-tracing studies, these cells are able to drive the expansion of the luminal cell population in mammary ducts and alveoli during postnatal development (*Van Keymeulen et al., 2011; Fu et al., 2014; Rios et al., 2014*). Moreover, luminal progenitors are thought to be at the origin of the triple-negative, basal-like, Brca1-associated breast cancers, indicating that they display phenotypic plasticity and an ability to upregulate basal markers (*Lim et al., 2009; Molyneux et al., 2010; Proia et al., 2011*). Of note, ectopic expression of Snail2 endows luminal progenitors with basal cell features (*Guo et al., 2012*), supporting an important role of EMT in the regulation of luminal progenitor plasticity.

The Met tyrosine kinase receptor and its major ligand, HGF, are known to control numerous epithelial cell functions and trigger EMT (*Trusolino et al., 2010; Gherardi et al., 2012*). Met signaling has been implicated in mammary development and tumorigenesis. Although not investigated in detail yet, Met-deficient mammary glands of adult MMTV-Cre:Met^{fl/fl} mice showed defects in branching morphogenesis (*Garner et al., 2011*). Aberrant Met activation occurs in breast cancers, in particular in the triple-negative, basal-like subtype (*Gastaldi et al., 2010; Ponzo and Park, 2010*). Expression of activated Met or over-expression of HGF in mouse mammary gland induce tumors, including those of the basal-like subtype (*Graveel et al., 2009; Ponzo et al., 2009; Holland et al., 2013; Knight et al., 2013*). Several in vitro studies performed with mammary organoids or immortalized cell lines have implicated HGF/Met signaling in the regulation of mammary epithelial cell growth, morphogenesis, and differentiation (*Soriano et al., 1995; Yang et al., 1995; Haslam et al., 2008; Lee et al., 2011*).

One recent work indicated that luminal progenitors express Met and that, when forced to express HGF, display an enhanced *in vivo* regenerative potential, a property attributed to basal-type stem cells (Gastaldi et al., 2013). However, *in situ*, mammary luminal cells do not express HGF, suggesting that Met signaling in mammary epithelial cells is activated in a paracrine manner. HGF-mediated paracrine and autocrine Met stimulation can trigger distinct biological responses in epithelial cells (Mai et al., 2014). How Met-expressing luminal progenitors respond to the physiological paracrine action of HGF has not yet been investigated at the cellular and molecular levels.

Met activation requires adhesion molecules as co-receptors. Two co-receptors for Met have been identified in hepatocytes: CD44v6, the CD44 isoform containing the exon v6 and ICAM-1 (CD54), a member of the immunoglobulin superfamily of cell adhesion molecules (Orian-Rousseau et al., 2002; Olaku et al., 2011). In this study, we investigated the expression of ICAM-1, CD44v6, HGF, and Met in the mouse mammary epithelium. We found that ICAM-1 is a useful marker for obtaining highly enriched preparations of clonogenic luminal progenitors that express Met, and that HGF is produced by both stromal and myoepithelial cells. Using ICAM-1 as a surface marker, we further characterized Met-expressing luminal progenitors and analyzed their cellular and molecular responses to HGF. Our data suggest that HGF can act as a paracrine regulator of luminal progenitor function and fate during mammary development and tumorigenesis.

Results

ICAM-1 expression discriminates the basal/myoepithelial cell compartment and two distinct populations of luminal cells

We examined ICAM-1 expression at representative stages of mammary gland development, including puberty, maturity, early, and late gestation. Freshly isolated mammary cells, double-stained for CD24 and ICAM-1, were analyzed by flow cytometry (Figure 1A, Figure 1—figure supplement 1A). From puberty to late gestation, ICAM-1 was differentially expressed in the mammary epithelium. Staining for this marker identified three epithelial populations, negative (ICAM1-neg) or displaying low (ICAM1-low) or high (ICAM1-hi) levels of expression (Figure 1A, Figure 1—figure supplement 1B). Gene expression analysis by qPCR showed that, at all stages of development, K5-expressing basal myoepithelial cells were located in the ICAM1-hi population, while K8-positive luminal cells were distributed in ICAM1-neg and ICAM1-low-cell subsets (Figure 1B). Thus, ICAM-1 can be used to identify the basal cell compartment, and separate two populations of luminal cells, referred to hereafter as Lu-pos and Lu-neg cells.

Throughout development, the basal myoepithelial cell population constitutively expressed ICAM-1 at high level (Figure 1A). By contrast, the luminal cells displayed temporal changes in ICAM-1 expression (Figure 1A, Figure 1—figure supplement 1C). In virgin mice, most of the luminal cells were negative for ICAM-1 at puberty, whereas 25–30% of the luminal cells expressed ICAM-1 in the mature gland of 11 to 14-week-old cycling females. Notably, the Lu-pos cell subset was amplified early in gestation (P-8d), during the expansion of the alveolar buds. Later, at P-16d, when the alveoli were well developed, almost the entire luminal compartment was positive for ICAM-1. Thus, in the luminal cell population, ICAM-1 expression is developmentally regulated and correlates temporally with changes in hormone signaling.

ICAM-1 expression delineates a luminal cell population highly enriched in clonogenic progenitors

We investigated the functional properties of the luminal cell populations separated on the basis of ICAM-1 expression, by plating purified Lu-pos and Lu-neg cells at low density and assessing their ability to form colonies in two-dimensional cultures. In adult virgin mice, almost all the colony-forming activity was associated with the Lu-pos cell subset, demonstrating that ICAM-1 expression delineates a luminal population highly enriched in clonogenic progenitors (Figure 1C). Notably, ICAM-1 efficiently marked mammary luminal progenitors from adult virgin Balb/c (Figure 1C), C57Bl/6J (Figure 1—figure supplement 2A) and Blg-Cre; R26 mice (Figure 1—figure supplement 2B–E). As expected from previous findings (Selbert et al., 1998; Molyneux et al., 2010), LacZ activity, as assessed by X-gal staining, was undetectable in basal myoepithelial cells and present in a subset of luminal cells in the mammary gland of adult virgin Blg-Cre; R26 females (Figure 1—figure supplement 2C). An analysis of Cre expression by qPCR indicated that Blg (β -Lactoglobulin) drove recombination

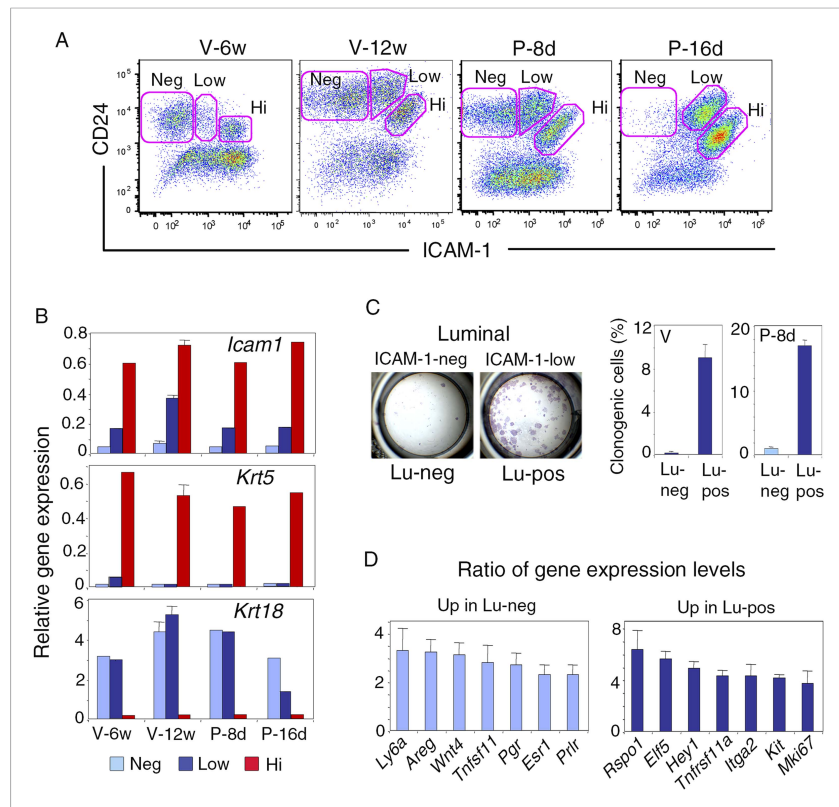


Figure 1. ICAM-1 expression discriminates basal and luminal cell compartments and defines a luminal population highly enriched in clonogenic progenitors. **(A)** Flow cytometry dot plots showing CD24 and ICAM-1 expression in cells isolated from mouse mammary glands taken at representative stages of development: V-6w, 6-week-old virgin; V-12w, 12-week-old virgin; P-8d, 8-day pregnant mice; P-16d, 16-day pregnant mice. Within the CD24-positive epithelial cell population, ICAM-1 discriminated three distinct fractions, negative (Neg), low-expressing (Low), and high-expressing (Hi) cells. **(B)** Levels of *Icam1* and lineage-specific gene expression in ICAM1-neg, ICAM1-low, and ICAM1-hi epithelial cells as determined by q-PCR analysis. Cells were isolated from mammary glands at different stages of development, as shown in panel **A**. The values were normalized to *Gapdh* expression and represent mean values from at least two distinct cell preparations. Data obtained with adult virgin mice (V-12w) are from four independent groups of cell samples and presented as mean \pm S.E.M. **(C)** Colony formation by ICAM1-neg (Lu-neg) and ICAM1-low (Lu-pos) mammary luminal cells. Left panel: hematoxylin and eosin (H&E) staining of clonal colonies after 8 days in culture. Right panel: percentages of clonogenic cells. Cells were isolated from mature virgin mice (V) and early pregnant females (P-8d). The results are from two (P-8d) or three (V) independent cell preparations (each of which with three separate wells), and presented as mean values \pm S.E.M. **(D)** q-PCR analysis of relative gene expression levels in Lu-neg and Lu-pos cells isolated from mammary glands of mature virgin females. Mean ratios (\pm S.E.M.) of values normalized to *Gapdh* expression are shown. Lu-neg/Lu-pos and Lu-pos/Lu-neg ratios are presented in left and right panels, respectively. Results are from three independent cell preparations. DOI: 10.7554/eLife.06104.003

The following source data and figure supplements are available for figure 1:

Source data 1.

DOI: 10.7554/eLife.06104.004

Figure supplement 1. Gating procedure for flow cytometry analysis.

DOI: 10.7554/eLife.06104.005

Figure 1. continued on next page

Figure 1. Continued

Figure supplement 2. Isolation of mammary luminal progenitors from adult virgin C57Bl/6J and Blg-Cre; R26 females using ICAM-1.

DOI: [10.7554/eLife.06104.006](https://doi.org/10.7554/eLife.06104.006)

primarily in the luminal progenitor population identified by ICAM-1 (**Figure 1—figure supplement 2D**). Accordingly, 98% of the colonies formed by ICAM1-expressing Blg-Cre; R26 luminal cells were LacZ-positive (**Figure 1—figure supplement 2E**).

We next compared the molecular characteristics of the luminal cell populations defined by ICAM-1 by analyzing the expression of a panel of genes by qPCR (**Figure 1D**, **Figure 1—figure supplement 2F**). The non-clonogenic Lu-neg population had high level of transcripts for the hormone receptors, ER α , PR, and PrlR, and for genes encoding secreted hormonal mediators implicated in the control of mammary development such as amphiregulin (encoded by *Areg*), RankL (encoded by *Tnfsf11*) and Wnt4. These genes, along with *Ly6a* (encoding Sca-1), are characteristic of mature mammary luminal cells (*Mulac-Jericevic et al., 2003; Kendrick et al., 2008; Cai et al., 2014*). The clonogenic Lu-pos population expressed *Mki67*, a marker of cell proliferation, more strongly than the Lu-neg fraction. It exhibited high levels of expression for genes encoding essential regulators of mammary development including *Elf5*, the Notch effector, *Hey1*, RANK (encoded by *Tnfrsf11a*), and the local mediator R-spondin1 (encoded by *Rspo1*) (*Fata et al., 2000; Bouras et al., 2008; Oakes et al., 2008; Cai et al., 2014*). Lu-pos cells also over-expressed *Kit* and *Itga2*, two markers previously used to obtain mammary cell populations enriched in luminal progenitors (*Regan et al., 2012; Shehata et al., 2012*).

The Lu-neg and Lu-pos cell populations isolated from the mammary glands of females in early pregnancy had functional properties and gene expression patterns similar to those purified from adult virgin glands (**Figure 1D**, **Figure 2—figure supplement 1A**). ICAM-1 thus appeared to be a robust surface marker for the enrichment in mammary luminal progenitors from adult virgin and early pregnant females.

The luminal progenitors identified by ICAM-1 express Met whereas myoepithelial and stromal cells produce HGF

We then used q-PCR to examine the expression of Met and its major cytoplasmic effector, *Gab1*, in the mammary cell populations separated by ICAM-1. In adult virgin mice, Met transcript levels were five and ten times higher in the Lu-pos population than in the Lu-neg and myoepithelial cells, respectively; *Gab1*, like *Met*, was strongly expressed only in the Lu-pos fraction (**Figure 2A**). Similarly, the clonogenic Lu-pos population isolated from the mammary glands of early pregnant females was greatly enriched in Met-expressing cells (**Figure 3—figure supplement 1B**). Thus, in adult virgin females and during early pregnancy, the target cells for Met signaling mostly belonged to the luminal progenitor-enriched population defined by ICAM-1 expression.

As expected (*Niranjan et al., 1995; Yang et al., 1995*), HGF, the major Met ligand, was strongly expressed in the CD24-negative Pdgfr-expressing stromal cell population (**Figure 2B**). In addition, HGF was expressed at high level in the mammary basal cell population of mature virgin and early pregnant mice (**Figure 2A,B**, **Figure 2—figure supplement 1B**), suggesting paracrine interactions between basal myoepithelial cells and luminal progenitors.

As both ICAM-1 and CD44v6 may serve as co-receptors for Met (*Olaku et al., 2011*), we analyzed the expression of CD44v6 in freshly isolated Lu-pos and Lu-neg cells. Most cells of both populations were stained with the anti-CD44v6 antibody (**Figure 2—figure supplement 1C**). Thus, CD44v6 is broadly expressed in the luminal compartment and cannot, therefore, be used for the enrichment in Met-expressing progenitors.

HGF stimulates the clonogenic activity of luminal progenitors and promotes acquisition of basal-specific traits

We used ICAM-1 to isolate Met-expressing luminal progenitors and investigated their response to the paracrine action of HGF. Purified Lu-pos cells were cultured in suspension in the presence of 2% Matrigel as previously described (*Spike et al., 2012; Chiche et al., 2013*). We found that HGF-treated

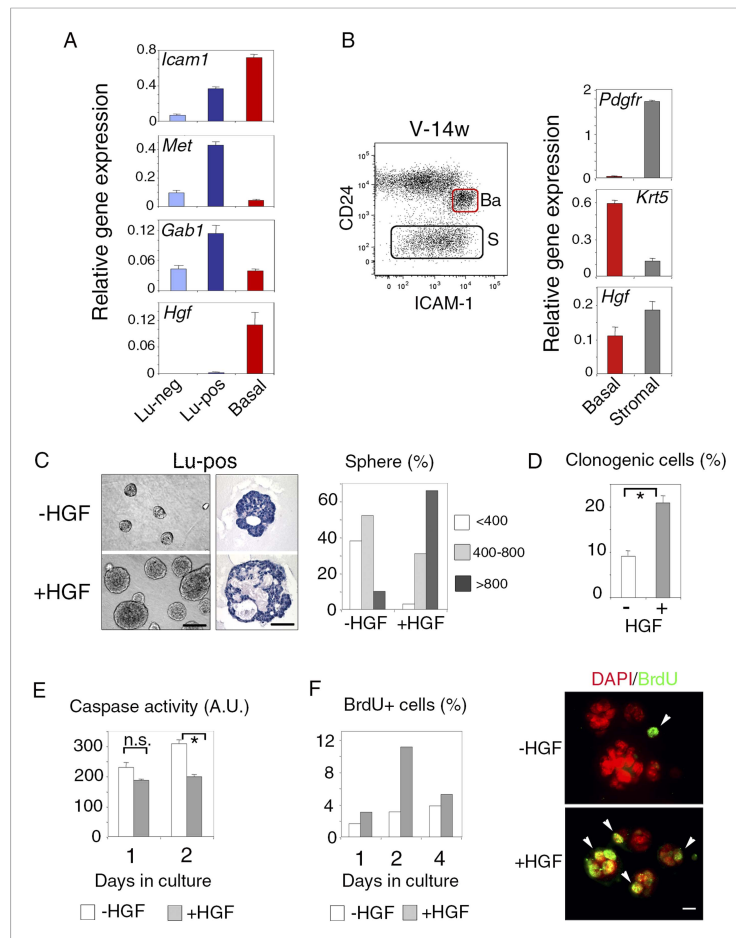


Figure 2. ICAM-1 identifies Met-expressing clonogenic luminal progenitors. **(A)** *Icam1*, *Met*, *Gab1*, and *Hgf* expression in Lu-neg, Lu-pos, and basal/myoepithelial cells isolated from mammary glands of mature virgin mice by flow cytometry. The q-PCR values were normalized to *Gapdh* expression and represent mean values \pm S.E.M from three independent preparations. **(B)** Levels of *Hgf* expression in stromal and basal/myoepithelial cells. Left panel: flow cytometry dot plot showing mammary basal (Ba) and stromal (S) cell compartments isolated from a 14-week-old virgin mice. Right panel: q-PCR analysis of *Hgf* expression in basal and stromal cells. The values were normalized to *Gapdh* expression and represent mean values \pm S.E.M from three independent preparations. **(C)** Characteristics of HGF-treated and untreated spheres derived from purified Lu-pos cells cultured in the absence or presence of HGF for 10 days. Left panels: Representative phase contrast images of HGF-treated and untreated spheres (bar, 400 μ m) and H&E staining of sections through HGF-treated and untreated spheres (bar, 150 μ m). Right panel: Sphere size distribution (in arbitrary units) in HGF-treated and untreated cultures. At least 250 spheres were analyzed per condition. **(D)** Average percentages (\pm S.E.M) of clonogenic cells in non-stimulated and HGF-stimulated cultures of Lu-pos cells. Data from two independent cell preparations (each of which with three separate wells analyzed at day 10) are shown. * $p < 0.0004$. **(E)** Caspase-3 and caspase-7 activity in non-stimulated and HGF-stimulated Lu-pos cells after 1 and 2 days in culture as measured by a luminescent assay. Data are the mean (\pm S.E.M) of three measurements from separate wells. * $p < 0.003$ at day 2, not significant (n.s) at day 1. A.U., arbitrary unit. **(F)** BrdU incorporation in Lu-pos cells grown in the absence or presence of HGF for 1, 2, and 4 days. Left panel: percentage of BrdU-positive cells. Mean values from two distinct cell preparations are shown. Right panel: representative images of cells

Figure 2. continued on next page

Figure 2. Continued

cytocentrifuged and immunostained with anti-BrdU antibody after 2 days in culture. Nuclei were counterstained with DAPI. Arrowheads indicate proliferating BrdU-positive cells. Bar, 20 μ m.

DOI: [10.7554/eLife.06104.007](https://doi.org/10.7554/eLife.06104.007)

The following source data and figure supplement are available for figure 2:

Source data 1.

DOI: [10.7554/eLife.06104.008](https://doi.org/10.7554/eLife.06104.008)

Figure supplement 1. Molecular and phenotypic characteristics of luminal progenitors isolated from virgin and early pregnant females.

DOI: [10.7554/eLife.06104.009](https://doi.org/10.7554/eLife.06104.009)

Lu-pos cells formed enlarged spheres after 10 days in culture (**Figure 2C**). These spheres had multiple lumens, with an overall lumen space larger than that of the untreated spheres (**Figure 2C**).

Quantitative analysis revealed that HGF-treated cultures of purified Lu-pos cells contained twice as many spheres as non-stimulated cultures (**Figure 2D**), suggesting a role for HGF in favoring cell survival and/or proliferation. Measurements of caspase activity showed that HGF-treated cells had lower levels of activated caspase-3 and caspase-7 than untreated cells after 2 days in culture (**Figure 2E**). BrdU-incorporation assays performed after 1, 2, and 4 days in culture indicated that HGF treatment increased cell proliferation, particularly on day 2 (**Figure 2F**). Thus, in 3D cultures, HGF stimulated the clonogenic activity of ICAM1-expressing luminal progenitors, by promoting cell survival and proliferation early in culture.

We then investigated the long-term effects of HGF on purified luminal progenitors. Using q-PCR, we analyzed proliferation and lineage-specific gene expression in Lu-pos cells cultured in the presence or absence of HGF for 9–10 days (**Figure 3A**). *Mki67* was down-regulated in HGF-stimulated cultures whereas *Cdkn1a*, which encodes p21, a negative regulator of the cell cycle (**Abbas and Dutta, 2009**), was upregulated by a factor of 2.5. The basal-specific keratin, Krt5, undetectable in untreated spheres, was clearly expressed in HGF-stimulated spheres, whereas no significant decrease was observed in expression of the luminal-specific keratin, Krt18. Thus, in the long-term, HGF/Met signaling biased luminal progenitors toward a basal cell fate while attenuating cell cycle progression.

Consistent with the q-PCR data, immunofluorescence labeling showed that the percentages of K5-positive cells in spheres stimulated with HGF for 9–10 days were six times higher than that of untreated cultures (**Figure 3B**). Numerous K5-expressing cells stained positive for K8 (**Figure 3B**), and none contained the myoepithelial-specific protein α -SMA (**Figure 3—figure supplement 1**). Interestingly, BrdU incorporation assays showed that, unlike K5-negative luminal cells, K5-expressing cells did not cycle following HGF stimulation (**Figure 3C**).

Thus, paracrine Met activation controls the survival and proliferation of ICAM1-expressing luminal progenitors and favors the acquisition of basal-specific keratin.

Luminal progenitors activate EMT program and repress luminal-specific regulatory genes upon stimulation by HGF

To prove that K5-expressing cells in HGF-treated spheres originated from luminal progenitors, we isolated Lu-pos cells from Blg-Cre; R26 mouse mammary glands and stimulated them with HGF for 9–10 days. As in Balb/c mice, Met was strongly expressed in the Blg-Cre; R26 luminal progenitor population purified with ICAM-1 (**Figure 4—figure supplement 1A**). Notably, in HGF-stimulated cultures, 85% of the K5-positive cells expressed LacZ and were therefore of luminal origin (**Figure 4A**, **Figure 4—figure supplement 1B**). Control HGF-treated basal cells did not stain positive for X-gal.

We investigated the molecular events induced by the paracrine action of HGF in luminal progenitors, by analyzing the expression of basal-specific and luminal-specific regulatory genes in untreated and HGF-treated spheres derived from purified Lu-pos cells (**Figure 4B**). Upon stimulation with HGF, the expression of essential regulators of the luminal cell fate such as *Elf5*, *Hey1*, and *Gata3* was repressed, whereas that of several basal-specific genes increased markedly. These genes included *Cdh3* (encoding P-cadherin), *Trp63*, and the EMT inducer *Snai2*. Other genes associated with EMT program—*Snai1*, *Sox9*, and *Cdh2* (encoding N-cadherin)—were also upregulated. In agreement with gene expression data, immunodetection studies revealed that HGF-treated spheres contained

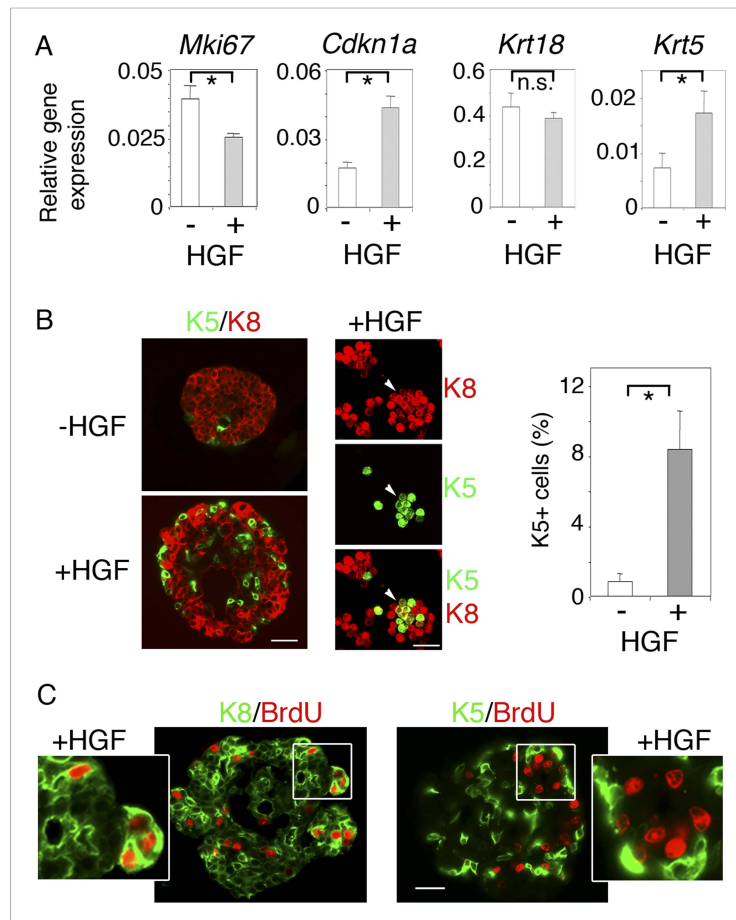


Figure 3. HGF promotes acquisition of basal-specific keratins in luminal progenitors identified by ICAM-1. **(A)** Analysis of *Mki67*, *Cdkn1a*, *Krt18* and *Krt5* expression in spheres derived from untreated and HGF-treated Lu-pos cells, as determined by q-PCR. Lu-pos cells were isolated from mammary glands of mature virgin mice. The values, normalized to *Gapdh* expression, represent mean values \pm S.E.M. from at least three independent sphere preparations harvested after 10 days in culture. * $p < 0.05$, $p < 0.001$, $p < 0.007$ for *Mki67*, *Cdkn1a*, and *Krt5*, respectively. n.s., not significant (*Krt18*). **(B)** Double immunofluorescence labeling of non-stimulated and HGF-stimulated Lu-pos cells grown for 10 days. Left panel: K8 and K5 staining of spheres sections. Bar, 60 μ m. Middle panel: K8 and K5 staining of cytocentrifuged cells derived from HGF-stimulated cultures. Arrowheads indicate a group of double-positive K5/K8 cells. Bar, 45 μ m. Right panel: Average percentages (\pm S.E.M.) of K5-expressing cells in 10- to 12-day-old spheres derived from untreated and HGF-treated Lu-pos cells. 1000 cells at least were counted per sample. Percentages of K5-positive cells in untreated and HGF-treated cultures were $0.8\% \pm 0.4$ and $8.4\% \pm 2.2$, respectively. Data are from four independent cell preparations. * $p < 0.002$. **(C)** BrdU incorporation in 10-day-old HGF-treated spheres. Sections were stained with anti-BrdU antibody combined either to anti-K8 (left panels) or anti-K5 (right panels) antibodies. Pictures at low magnification and enlarged views of defined areas are shown. Bar, 45 μ m. DOI: 10.7554/eLife.06104.010

The following source data and figure supplement are available for figure 3:

Source data 1.

DOI: 10.7554/eLife.06104.011

Figure supplement 1. α -SMA expression in untreated and HGF-treated spheres.

DOI: 10.7554/eLife.06104.012

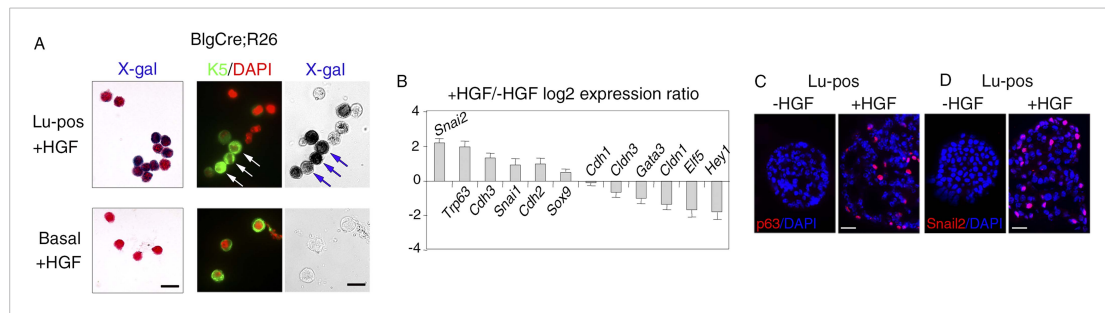


Figure 4. HGF triggers activation of EMT program in ICAM1-expressing luminal progenitors. **(A)** K5 and β -galactosidase expression in cells isolated from HGF-treated spheres. Lu-pos (upper panels) and basal cells (lower panels) were purified from mammary glands of mature virgin Blg-Cre; R26 mice and stimulated with HGF for 13 days. Left panels: X-gal staining with fast red counterstaining. Bar, 15 μ m. Middle and right panels: correlated images of K5 immunostaining and X-gal staining. Arrows indicate LacZ-positive cells expressing K5. Quantitative data are shown in **Figure 4—figure supplement 1B**. Bar, 10 μ m. **(B)** Comparative expression levels of basal-specific, epithelial–mesenchymal transition (EMT)-associated and luminal-specific genes in spheres derived from untreated and HGF-treated Lu-pos cells as determined by q-PCR. Lu-pos cells isolated from mammary glands of mature virgin Balb/c mice were cultured in the absence or presence of HGF for 10 days. Results are expressed as Log₂ ratios of values normalized to *Gapdh* and represent mean values \pm S.E.M. from at least three independent sphere preparations. The comparator values were those obtained with untreated spheres. **(C–D)** Immunodetection of p63 **(C)** and Snail2 **(D)** in sections through untreated and HGF-stimulated spheres. Nuclei were counterstained with DAPI. Bar, 25 μ m.

DOI: [10.7554/eLife.06104.013](https://doi.org/10.7554/eLife.06104.013)

The following source data and figure supplement are available for figure 4:

Source data 1.

DOI: [10.7554/eLife.06104.014](https://doi.org/10.7554/eLife.06104.014)

Figure supplement 1. Met expression in luminal progenitors isolated from Blg-Cre; R26 mice.

DOI: [10.7554/eLife.06104.015](https://doi.org/10.7554/eLife.06104.015)

numerous p63- and Snail2-positive cells, whereas untreated cells were negative for these basal-specific markers (**Figure 4C,D**).

Snai2 and *Snai1* can directly repress the transcription of *Cdh1* (encoding E-cadherin) and claudins (reviewed in *Thiery et al., 2009; Gonzalez and Medici, 2014*). Noticeably, *Cdh1* expression was not significantly reduced upon HGF treatment, whereas claudin-1 and claudin-3 transcript levels decreased strongly (**Figure 4B**). Consistent with the q-PCR data, immunofluorescence staining revealed E-cadherin in the vast majority of cell–cell contacts in untreated and HGF-treated spheres (**Figure 5A**). Notably, numerous Snail2-positive cells present in the HGF-stimulated spheres displayed E-cadherin at their surface (**Figure 5B**). Claudin-1 distribution was more heterogeneous than that of E-cadherin, but it was clearly altered following HGF treatment. Untreated spheres contained a majority of cells with claudin-1 at their junctions, whereas HGF-treated spheres displayed large cell areas lacking claudin-1 expression (**Figure 5C**).

Thus, the persistent stimulation of Met signaling by exogenous HGF in luminal progenitors repressed luminal-regulatory gene expression, upregulated basal-specific markers, and triggered an EMT program, including *Snai2* and *Snai1* expression and decrease in claudin levels.

Persistent stimulation by HGF is required to sustain effects on luminal progenitors

To examine whether the HGF/Met signaling effects on luminal progenitors persist after HGF withdrawal, primary HGF-treated spheres obtained from purified Lu-pos cells were dissociated and then cultured either with or without HGF for 10 additional days. Both clonogenic activity and level of expression of the basal-specific keratin Krt5 were much lower in secondary mammospheres deprived of HGF (**Figure 6A,B**). Consistently, immunofluorescence stainings revealed that, like untreated control cultures, secondary mammospheres deprived of HGF contained less than 1% K5-positive cells (**Figure 6C,D**). HGF-treated secondary mammospheres contained twice more K5-positive cells than HGF-treated primary spheres. Many K5-positive cells co-expressed K8, as in primary spheres,

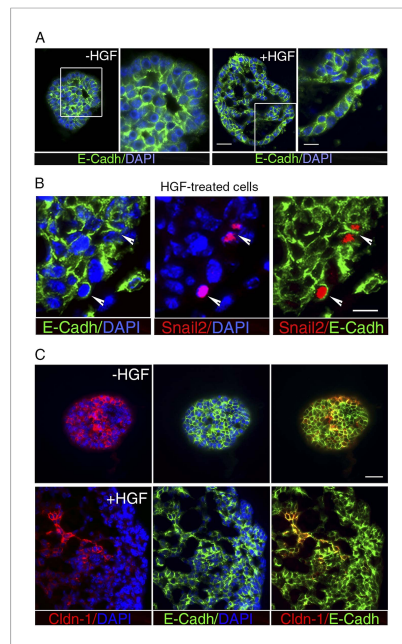


Figure 5. HGF treatment perturbs cell–cell adhesion in ICAM1-expressing luminal progenitors. **(A)** Immunofluorescence labeling of sphere sections with anti-E-cadherin antibody. Low- and high-magnification views of untreated (left panels) and HGF-treated (right panels) spheres. Nuclei were stained with DAPI. Bars, 60 μ m and 30 μ m. **(B)** Double immunodetection of Snail2 and E-cadherin in a HGF-treated sphere. Arrowheads indicate Snail2-positive cells expressing E-cadherin at their surface. Nuclei were stained with DAPI. Bar, 20 μ m. **(C)** Double immunofluorescence labeling of sphere sections with anti-claudin-1 and anti-E-cadherin antibodies. Nuclei were stained with DAPI. Bar, 75 μ m. DOI: [10.7554/eLife.06104.016](https://doi.org/10.7554/eLife.06104.016)

These data demonstrate that paracrine Met activation induced multipotent stem cell properties in luminal progenitors.

Met-expressing luminal progenitors comprise hormone receptor-positive and hormone receptor-negative cells

Differential Sca-1 expression in the luminal compartment has been reported to delineate populations enriched in hormone receptor-positive and hormone receptor-negative cells, both containing clonogenic progenitors (Sleeman et al., 2007; Regan et al., 2012). We characterized Met-expressing luminal progenitors further, by analyzing ICAM-1 and Sca-1 distribution in the luminal compartment at different developmental stages by flow cytometry (Figure 8A, Figure 8—figure supplement 1A).

In adult virgin mammary gland, ICAM-1 separated both Sca-1-positive and Sca-1-negative cell populations, revealing four cell subsets, Lu1 (ICAM1-neg/Sca-1-pos), Lu2 (ICAM1-pos/Sca-1-pos), Lu3 (ICAM1-neg/Sca-1-neg), and Lu4 (ICAM1-pos/Sca-1-neg) accounting for $39.8 \pm 4.6\%$, $9.1 \pm 1.4\%$, $15.0 \pm 2.5\%$, and $25.4 \pm 6.1\%$ of the luminal compartment, respectively (Figure 8A). We assessed the

(Figure 6C). Experiments performed with mammary luminal progenitors purified from BlgCre; R26 mice confirmed that, in HGF-treated secondary mammospheres, K5-expressing cells were derived from LacZ-positive luminal cells (Figure 6E). Gene expression analysis showed that *Trp63*, *Snai2*, and *Cdkn1a* were upregulated whereas *Hey1*, *Elf5*, and *Mki67* were downregulated only in HGF-treated secondary mammospheres (Figure 6F).

Thus, the continuous activation of HGF/Met signaling is required to sustain the response of luminal progenitors in vitro and leads to the accumulation of cells with basal characteristics.

HGF stimulation confers regenerative potential on luminal progenitors

To compare the stem cell activity of untreated and HGF-treated luminal progenitors, we transplanted either single-cell suspensions or intact spheres into cleared mammary fat pads of recipient mice (Figure 7). Untreated cells isolated from primary spheres failed to repopulate the fat pad or gave rise to very limited outgrowths. In contrast, HGF-treated cultures formed ductal-type outgrowths in seven of the eight transplanted fat pads (Figure 7A, Supplementary file 1). Serial passages of luminal progenitor-derived mammospheres stimulated by HGF led to an important enrichment in K5-positive cells (Figure 6C); we therefore compared the regenerative potential of secondary spheres from untreated and HGF-stimulated cultures. Strikingly, these transplantation assays showed that only HGF-treated spheres were able to form outgrowths (Figure 7B). 6-week-old outgrowths were composed of well-organized ducts and growing buds comprising K8-positive luminal cells and basally located α -SMA-expressing myoepithelial cells (Figure 7C,D).

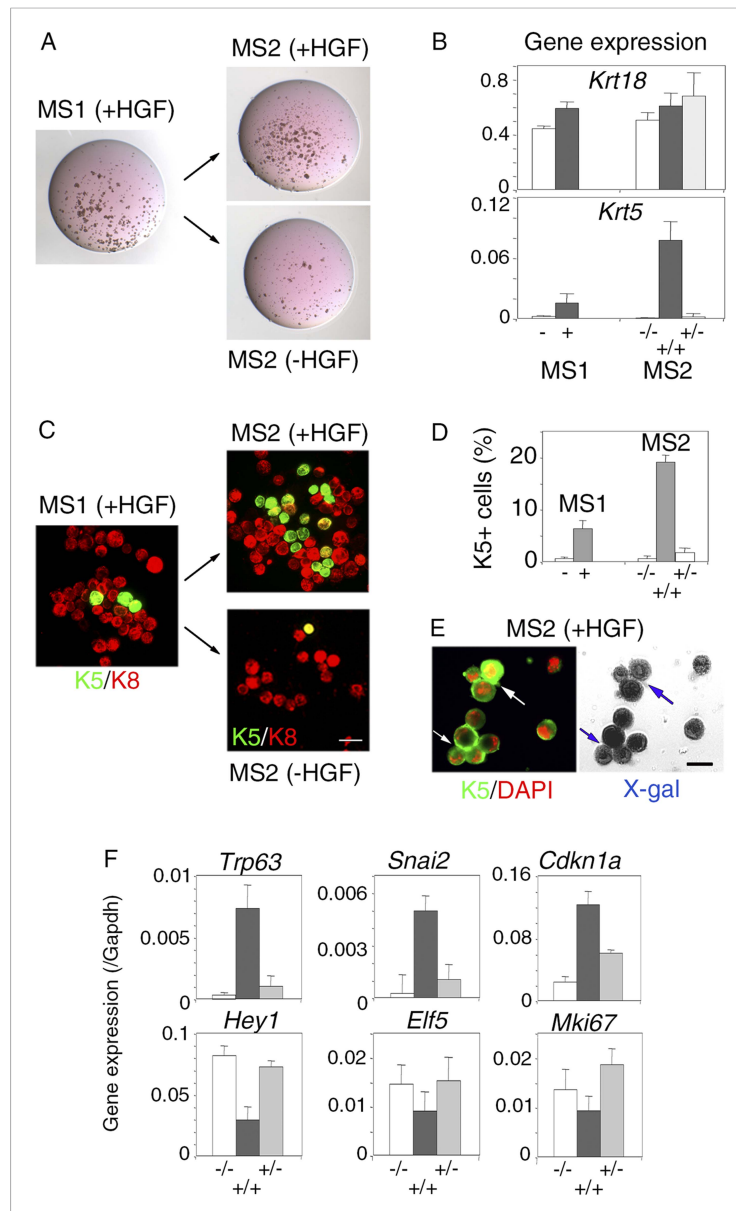


Figure 6. Persistent stimulation with HGF is required to sustain effects on luminal progenitors. **(A)** Microphotographs of primary (MS1) and secondary (MS2) mammospheres derived from purified Lu-pos cells. Primary spheres obtained after 11 days of culture in the presence of HGF were dissociated and 5000 cells were replated and grown either in the presence or absence of HGF for an additional period of 10 days. **(B)** *Krt18* and *Krt5* expression levels in MS1 and MS2 cultures derived from Lu-pos cells as determined by q-PCR. HGF-treated MS2 cultures (+) grown either in the presence or absence of HGF are labeled +/+ and +/-, respectively. Untreated primary (-) and secondary (-/-) spheres of Lu-pos cells served as controls. The values were normalized to *Gapdh* expression. Data are presented as mean values \pm S.E.M. of three *Figure 6. continued on next page*

Figure 6. Continued

independent experiments. (C) K5-expressing cells in MS1 and MS2 cultures derived from Lu-pos cells. Immunodetection of K5 and K8 in cytocentrifuged cells isolated from MS1 and MS2. Bar, 30 μ m. (D) Percentages of K5-expressing cells in MS1 and MS2 cultures according to their treatment with HGF. 2000 cells were counted per analyzed cytopots. Data from two independent experiments (three separate cytopots) are presented as mean values \pm S.E.M. (E) Correlated images of K5 immunostaining and X-gal staining in cells isolated from HGF-treated secondary spheres. Lu-pos cells were purified from mammary glands of mature virgin Blg-Cre; R26 mice and continuously stimulated with HGF. Arrows indicate two groups of LacZ-positive cells expressing K5. Bar, 15 μ m. (F) Modulation of *Trp63*, *Snai2*, *Hey1*, *Elf5*, *Cdkn1a*, and *Mki67* expression levels in MS2 cultures derived from Lu-pos cells as determined by q-PCR. The q-PCR values were normalized to *Gapdh* expression. Results are shown as mean values \pm S.E.M. of three independent experiments.

DOI: [10.7554/eLife.06104.017](https://doi.org/10.7554/eLife.06104.017)

The following source data is available for figure 6:

Source data 1.

DOI: [10.7554/eLife.06104.018](https://doi.org/10.7554/eLife.06104.018)

colony-forming potential of these cell subsets. Lu1 was considered as non-clonogenic (<0.5% colony-forming cells), Lu3 cells, negative for ICAM-1, were poorly clonogenic whereas both Lu2 and Lu4 cells, positive for ICAM-1, were highly clonogenic (Figure 8B).

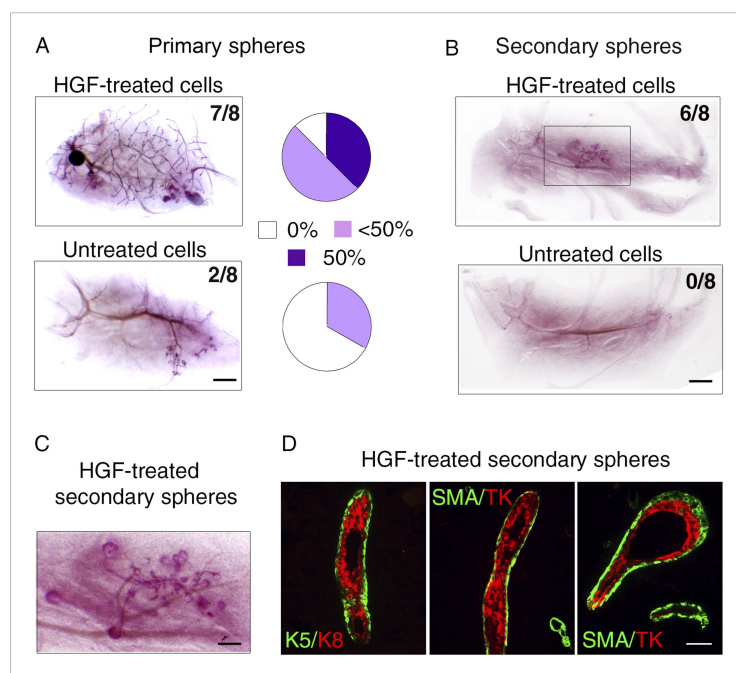


Figure 7. HGF-treated luminal progenitors display regenerative potential. (A) Regenerative properties of cells isolated from untreated and HGF-treated cultures of luminal progenitors. Primary spheres were dissociated and single cell suspensions were transplanted at 2000, 1000, and 500 cells/fat pad. Left panels: Representative images of carmine-stained outgrowths obtained 12 weeks after transplantation of 2000 cells and take rates. Bar, 0.2 mm. Right panels: Diagrams showing take rate and fat pad filling. (B) Representative images of carmine-stained outgrowths obtained 5 weeks after transplantation of intact secondary spheres harvested from untreated and HGF-treated cultures of luminal progenitors. Take rates are indicated. Bar, 2 mm. (C) Enlarged view of the outgrowth shown in B. Bar, 0.8 mm. (D) Double immunofluorescence stainings of sections through the outgrowth shown in C. Immunodetection of K5/K8 in a duct (left panel) and α -SMA/TK in a duct and a growing bud (middle and right panels, respectively). Bar, 45 μ m. The following supplementary file is available for Figure 7: **Supplementary file 1.**

DOI: [10.7554/eLife.06104.019](https://doi.org/10.7554/eLife.06104.019)

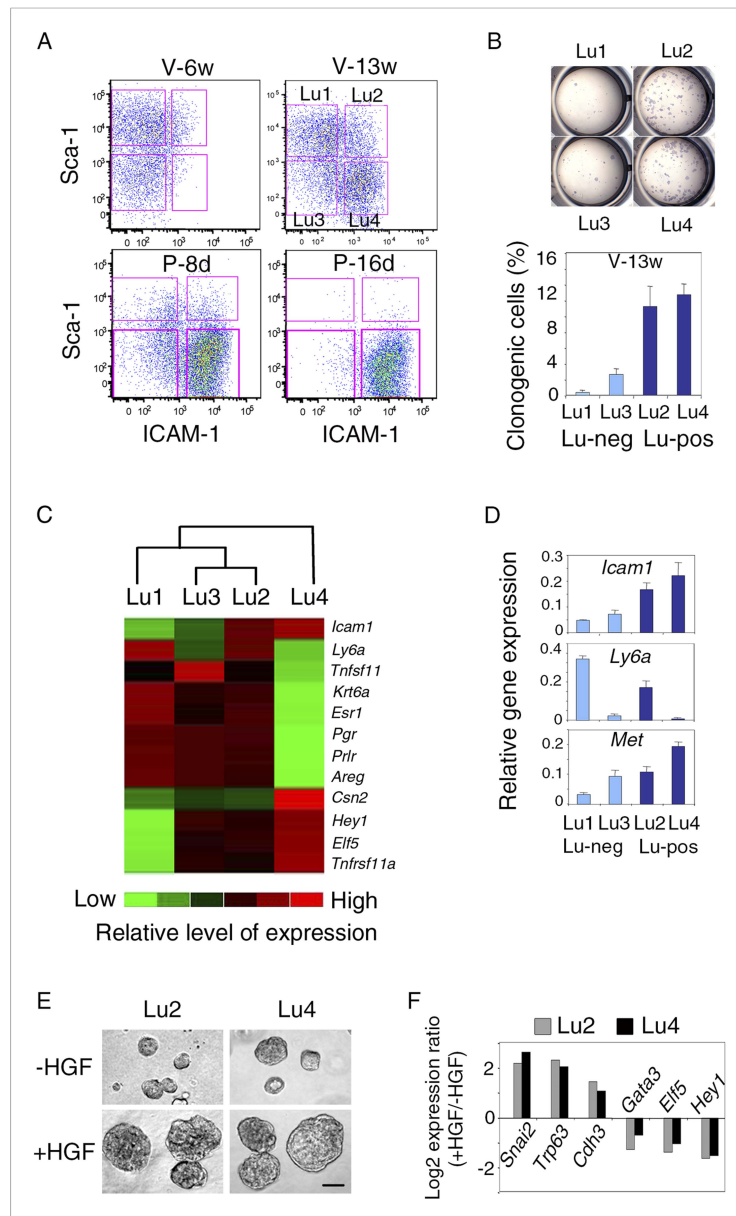


Figure 8. Met-expressing clonogenic cells are distributed in hormone-receptor-positive and negative luminal cell populations. **(A)** Representative flow cytometry dot-plots showing Sca-1 and ICAM-1 expression in the mammary luminal cell population isolated from mice at different stages of development: V-6w, 6-week-old virgin; V-13w, 13-week-old virgin; P-8d, 8-day pregnant; P-16d, 16-day pregnant mice. Combined with Sca-1, ICAM-1 discriminated four cell populations referred to as Lu1, Lu2, Lu3, and Lu4. **(B)** Colony formation by Lu1, Lu2, Lu3, and Lu4 cell subsets isolated from mammary glands of mature virgin mice. Upper panel: H&E staining of colonies after 8 days in Figure 8. continued on next page

Figure 8. Continued

culture. Lower panel: percentages of clonogenic cells. The results from two independent cell samples (each of which with three separate wells) are presented as mean values \pm S.E.M. (C) Heat map of qPCR gene expression analysis performed on Lu1, Lu2, Lu3, and Lu4 cells freshly isolated from mammary glands of mature virgin mice. The qPCR values were normalized to *Gapdh* expression. Mean values from three independent cell preparations were used to establish the map and determine relationships between the luminal subsets by unsupervised hierarchical clustering. (D) q-PCR analysis of *Icam1*, *Ly6a*, and *Met* expression in Lu1, Lu2, Lu3, and Lu4 cell populations freshly isolated from mammary glands of mature virgin mice. The values were normalized to *Gapdh* expression and represent mean values \pm S.E.M from three independent preparations. (E) Representative phase contrast images of spheres derived from Lu2 and Lu4 cell populations grown in the absence or presence of HGF for 10 days. Bar, 150 μ m. (F) Comparative expression levels of basal-specific, EMT-associated and luminal-specific genes in spheres derived from Lu2 and Lu4 cells, as determined by q-PCR. Cells were grown as described above in (E). Results are expressed as Log₂ ratios of values normalized to *Gapdh*. The comparator values were those obtained with cell preparations grown in the absence of HGF.

DOI: [10.7554/eLife.06104.020](https://doi.org/10.7554/eLife.06104.020)

The following source data and figure supplement are available for figure 8:

Source data 1.

DOI: [10.7554/eLife.06104.021](https://doi.org/10.7554/eLife.06104.021)

Figure supplement 1. Characterization of luminal cell populations isolated from virgin and pregnant mice using ICAM-1 and Sca-1 expression.

DOI: [10.7554/eLife.06104.022](https://doi.org/10.7554/eLife.06104.022)

All four luminal cell subsets expressed K8 and displayed similar high levels of *Krt18* and very low levels of the basal-specific gene *Krt14* (Figure 8A, Figure 8—figure supplement 1B). We characterized the four cell subsets further by carrying out qPCR-based gene expression analyses on a panel of luminal-specific genes. Unsupervised hierarchical clustering divided the populations into two main branches (Figure 8C). Lu1, Lu2, and Lu3 clustered together, sharing strong expression of hormone receptors, ER α , PR, and PrlR. The second branch contained only Lu4, which displayed very low levels of hormone receptor transcripts.

Only Lu4, the major clonogenic subset devoid of HR-positive cells, expressed the milk protein β -casein (Figure 8C). It also strongly expressed *Elf5* and *Tnfrsf11a*, two crucial regulators of alveologenesis (Fata et al., 2000; Oakes et al., 2008). Interestingly, flow cytometry analysis on mammary epithelial cells isolated at different stages of development showed that Lu4 was absent at puberty; this subset appeared in the glands of sexually mature cycling females and displayed massive expansion early in pregnancy (Figure 8A). By contrast, Lu2 and Lu3 were detected at all stages of development. As in mature virgin glands, Lu2 and Lu4 were highly clonogenic during early pregnancy, whereas Lu3 was not (Figure 8—figure supplement 1C). The gene expression patterns of Lu1, Lu2, Lu3, and Lu4 cells isolated from mature virgin and early pregnant mice were similar (Figure 8—figure supplement 1D,E).

The q-PCR analysis showed that *Met* was strongly expressed in the clonogenic populations, Lu2 and Lu4 (Figure 8D). These populations responded similarly to HGF treatment in 3D cultures. On stimulation, both produced larger spheres, displaying an upregulation of basal-specific genes (*Snai2*, *Trp63*, and *Cdh3*) and a down-regulation of luminal-specific regulatory genes (*Gata3*, *Elf5*, and *Hey1*) (Figure 8E,F).

These data show that luminal progenitors defined by ICAM-1 expression include hormone receptor-positive and hormone receptor-negative cells, all of which are potential targets of HGF/Met signaling.

ICAM-1 can serve to localize luminal progenitors in the mammary epithelium

To complement the flow cytometry data, we analyzed ICAM-1 localization on histological sections of mammary gland. Immunohistochemical studies confirmed that in the pubertal gland, basal myoepithelial rather than luminal cells expressed ICAM-1 while at late pregnancy, the whole epithelium was positive (Figure 9A). At the onset of lactation, ICAM-1 was down-regulated both in ducts and alveoli (Figure 9A).

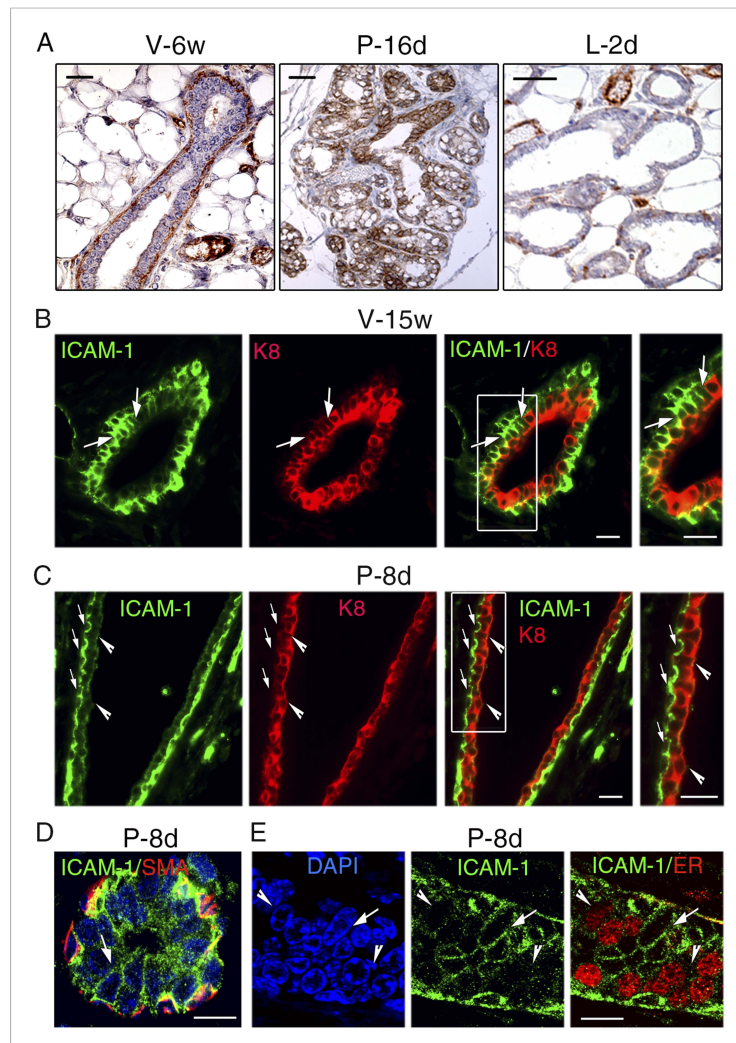


Figure 9. ICAM-1 localization in the developing and adult mammary gland. **(A)** Immunohistochemical detection of ICAM-1 in sections through mammary glands from mice at puberty (V-6w; left panel), late pregnancy (P-16d; middle panel), and onset of lactation (L-2d; right panel). Left panel: bar, 60 μ m. Middle and right panels: bar, 100 μ m. **(B)** Double immunofluorescence labeling of ICAM-1 and K8 in a mammary duct of a 15-week-old virgin female (V-15w). The right panel shows an enlarged view of the area defined on the left. The arrows indicate a cluster of ICAM1-positive luminal cells. Bars, 40 μ m. **(C)** Double immunofluorescence staining of ICAM-1 and K8 in a large mammary duct at early gestation (P-8d). The right panel shows enlarged view of the area defined on the left. The arrows point to myoepithelial cells expressing ICAM-1 at their apical and lateral surfaces. The arrowheads indicate luminal layer negative for ICAM-1. Bars, 40 μ m. **(D and E)** Sections through an alveolus and a small duct from a mammary gland of 8-day-pregnant mouse (P-8d). **(D)** Double immunofluorescence labeling of ICAM-1 and α -SMA (SMA); **(E)** ICAM-1 and ER. DAPI served to stain the nuclei. The arrows point to clusters of ICAM1-positive cells. The arrowheads indicate clusters of ER-positive cells negative for ICAM-1. Bars, 10 μ m.

DOI: [10.7554/eLife.06104.023](https://doi.org/10.7554/eLife.06104.023)

Figure 9. continued on next page

Figure 9. Continued

The following figure supplement is available for figure 9:

Figure supplement 1. Response of luminal progenitors isolated from *Icam1*-deficient mammary epithelium to HGF stimulation.

DOI: [10.7554/eLife.06104.024](https://doi.org/10.7554/eLife.06104.024)

ICAM-1 localization in the adult mammary epithelium was further investigated using double immunofluorescence labeling with anti-ICAM-1 and anti-K8 antibodies. In agreement with the flow cytometry data, mammary basal cells in adult virgin mice displayed high levels of ICAM-1, whereas the luminal compartment comprised ICAM1-negative and ICAM1-positive cells (Figure 9B). ICAM1-positive luminal cells, enriched in clonogenic cells, often formed cell clusters within the ducts.

At early pregnancy, myoepithelial cells lining large ducts strongly expressed ICAM-1, whereas luminal cells were devoid of ICAM-1 (Figure 9C). In contrast, in the developing alveoli and small ducts, the luminal layer, presumably enriched in alveolar progenitors, contained clusters of cells positive for ICAM-1 (Figure 9D). Consistently with qPCR data, ER-positive cells were mostly ICAM1-negative (Figure 9E). Notably, in adult virgin and early pregnant mice, ICAM-1 expression was restricted to cell-cell contacts, basal-to-basal, basal-to-luminal, and luminal-to-luminal (Figure 9B–E).

Loss of ICAM-1 does not impede the response of luminal progenitors to HGF

To analyze a possible contribution of ICAM-1 in mammary development and HGF/Met signaling, we investigated the mammary phenotype of *Icam1*-deficient (*Icam1*-KO) mice. The *Icam1*-KO females are viable, fertile, and able to feed their pups (Xu et al., 1994). Whole-mount analysis of mammary glands from wild-type and *Icam1*-KO adult virgin and pregnant mice indicated that lack of ICAM-1 did not induce visible defects in mammary morphogenesis (Figure 9—figure supplement 1A). Flow cytometry analysis showed that the percentages of basal and luminal cells were not significantly affected in the *Icam1*-KO epithelium of adult virgin mice (Figure 9—figure supplement 1B).

For HGF stimulation assays, we isolated *Icam1*-KO mammary epithelial cells and used the Sca-1-negative luminal cell population enriched in clonogenic progenitors (Figure 9—figure supplement 1C). We found that *Icam1*-KO Sca-1-negative luminal cells responded to HGF by increased clonogenicity and production of large spheres (Figure 9—figure supplement 1D,E). In addition, as previously observed in the presence of ICAM-1, HGF treatment led to the induction of the basal-specific genes *Krt5*, *Trp63*, and *Snai2*, with a concomitant decrease in the regulators of the luminal lineage, *Elf5*, *Gata3*, and *Hey1* (Figure 9—figure supplement 1F,G). Thus, ICAM-1 is not mandatory for mammary development and HGF/Met signaling in luminal progenitors.

Discussion

We report here that ICAM-1 is a new surface marker for the enrichment of mouse mammary luminal progenitors. Luminal progenitor population identified by ICAM-1 labeling is heterogeneous, comprising HR-positive and HR-negative cells, potentially ductal and alveolar progenitors, both strongly expressing Met. We show that paracrine Met activation stimulates the clonogenic activity of ICAM1-expressing luminal progenitors, controlling their survival and proliferation, and promotes a luminal-to-basal switch while triggering EMT program (Figure 10). EMT was accompanied by acquisition of regenerative potential, a property restricted to multipotent stem cells. Our data suggest that paracrine HGF signaling can affect the fate of luminal progenitors during mammary development and tumorigenesis.

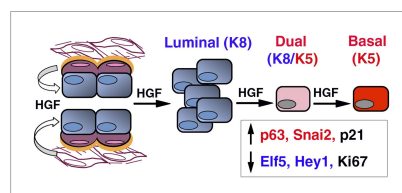


Figure 10. HGF/Met signaling in the mammary tissue. Luminal progenitors express Met, whereas stromal and basal myoepithelial cells produce HGF. Paracrine HGF/Met signaling can control the survival and proliferation of luminal progenitors and affects their fate by modulating antagonistic regulators of basal- (p63, Snai2) and luminal-specific (Elf5, Hey1) regulators.

DOI: [10.7554/eLife.06104.025](https://doi.org/10.7554/eLife.06104.025)

ICAM-1 is a new marker for the enrichment of clonogenic luminal progenitors

Our study provides the first evidence showing that ICAM-1 is differentially distributed, both spatially and temporally, in the mouse mammary epithelium. In mature virgin mice and early in pregnancy, the luminal cell population comprises ICAM1-negative and ICAM1-positive cell fractions, highly enriched in hormone-sensing cells and clonogenic progenitors, respectively. The luminal progenitors identified by ICAM-1 staining strongly express *Elf5*, *Hey1*, *Tnfrsf11a*, and *Rspo1* genes encoding critical regulators of mammary development (Fata et al., 2000; Bouras et al., 2008; Lee et al., 2011; Cai et al., 2014).

Several recent studies have indicated that the luminal progenitor population includes cells with different phenotypes (Oliver et al., 2012; Regan et al., 2012; Shehata et al., 2012; Lafkas et al., 2013; Sale et al., 2013; Rodilla et al., 2015). The differential expression of Sca-1 and CD61 was first used to obtain partial enrichment in luminal progenitor cells (Asselin-Labat et al., 2007; Sleeman et al., 2007; Rios et al., 2014). Subsequently, the combined use of Sca-1 and c-kit or CD49b revealed that the luminal progenitors in the mature virgin gland belong to two distinct populations, one consisting essentially of HR-positive cells and the other mostly of HR-negative cells (Regan et al., 2012; Shehata et al., 2012). We found that in virgin glands and during early pregnancy, combined ICAM-1 and Sca-1 expression discriminated these two major luminal clonogenic cell subsets. ICAM-1 clearly appeared more efficient than Sca-1 for separating non-clonogenic and clonogenic luminal populations. Importantly, ICAM-1 marked the luminal progenitor population in different mouse strains, including C57Bl6/J, and in mixed backgrounds, such as that of BlgCre; R26 mice, whereas neither CD61 nor c-kit can be used for luminal progenitor enrichment from C57Bl6/J mouse mammary glands (Visvader and Stingl, 2014). Furthermore, differential ICAM-1 expression within the Sca-1-negative luminal cell population separated a poorly clonogenic ICAM1-negative subset enriched in HR-positive cells (Lu3) from a major clonogenic cell fraction positive for ICAM-1 and lacking HR expression (Lu4). Such separation was not possible with CD49b, the most recently described marker for characterizing luminal cell subsets (Shehata et al., 2012; De Silva et al., 2015).

The clonogenic luminal cell population is thought to comprise distinct ductal- and alveolar-restricted progenitors, as yet not fully characterized (Regan et al., 2012; Shehata et al., 2012). Cells committed to the alveolar fate are expected to expand in adult females particularly at the onset of pregnancy, to express *Tnfrsf11a* and *Elf5* strongly, and most probably, to lack ER and PR (Fata et al., 2000; Lee et al., 2011; Fu et al., 2014; Rodilla et al., 2015). Interestingly, the Sca-1-negative ICAM1-positive clonogenic cell population (Lu4) absent from prepubertal mammary epithelium fulfills these criteria. In addition, these cells have high levels of transcript for the milk protein β -casein. By contrast, the Sca-1- and ICAM1-positive clonogenic subset containing HR-expressing cells (Lu2) present throughout mammary development may preferentially contain ductal-restricted progenitors.

Thus, ICAM-1 is a new robust marker for separating basal and luminal cells and analyzing the heterogeneity of the luminal cell compartment in the adult mammary gland using flow cytometry. In addition, ICAM-1 can be used to localize and further characterize luminal progenitors in situ.

HR-negative and HR-positive luminal progenitors are potential targets of HGF/Met signaling

The target cells for Met signaling in the mammary epithelium remain poorly characterized. A recent work reported the expression of Met predominantly in the Sca-1-negative luminal progenitor-enriched population (Gastaldi et al., 2013). In agreement with these data, we found high-Met transcript levels in the Sca-1-negative ICAM1-positive clonogenic cell population (Lu4). Additionally, we observed strong Met expression in the Sca-1-positive ICAM1-positive luminal progenitors (Lu2). Thus, the two major clonogenic populations of luminal progenitors, enriched in HR-negative and HR-positive cells, are potential targets of HGF/Met signaling. Met was also expressed in the Sca-1-negative ICAM1-negative cell subset (Lu3), which was weakly clonogenic and enriched in HR-positive cells. Our data thus highlight the phenotypic diversity of Met-expressing cells in the luminal population. Consistently, a knockin mouse model with a mutationally activated Met has been reported to develop various types of mammary tumors, including ER-positive and ER-negative tumors (Graveel et al., 2009).

We found that ICAM1-expressing luminal progenitors responded to HGF stimulation by basal marker upregulation. Importantly, using the Blg-Cre; R26 reporter mouse, we demonstrated that these basal marker-expressing cells were of luminal origin. Triple-negative basal-like breast cancers are thought to originate from luminal progenitors aberrantly expressing basal-specific markers (Lim et al., 2009; Molyneux et al., 2010; Proia et al., 2011). The highest levels of Met have been associated with the basal subtype of breast cancers (Garcia et al., 2007; Graveel et al., 2009; Ponzo et al., 2009; Gastaldi et al., 2010; Knight et al., 2013). Moreover, amplifications of the Met locus and Met overexpression occur in Brca1/p53-deficient mouse tumors, a model of basal-like breast cancers (Smolen et al., 2006; Gastaldi et al., 2013). Thus, consistent with these reports, our results strongly indicate that Met signaling may contribute to the phenotypic characteristics of certain basal-like breast carcinomas.

ICAM-1 is not mandatory for HGF/Met signaling in luminal progenitors

We found that in the mouse mammary epithelium, Met-expressing luminal progenitors displayed both ICAM-1 and CD44v6 at their surface. In mouse hepatocytes, CD44v6 acts as main co-receptor for Met, however, ICAM-1 can trigger Met activation in the absence of CD44 (Orian-Rousseau et al., 2002; Olaku et al., 2011). Our data showed that loss of ICAM-1 did not severely affect mammary development, HGF/Met signaling, and basal cell differentiation process in luminal progenitors. This suggests that CD44v6 rather than ICAM-1 serve as main co-receptor for Met in the mouse mammary epithelium and that identical compensation mechanisms may be involved in Met activation in liver and mammary gland. Distribution of Met and its co-receptors in the human mammary gland remains poorly defined; however, strong expression of Met, ICAM-1, and CD44v6 has been associated with triple-negative breast cancers and correlated with poor prognosis (Charpin et al., 2009; Gastaldi et al., 2010; Ponzo and Park, 2010; Schroder et al., 2011). Moreover, ICAM-1 has recently been identified as a molecular target for triple-negative breast cancers (Guo et al., 2014).

Myoepithelial and stromal cells may both control luminal progenitor function in a paracrine manner

Stromal cells are usually considered to be the only source of HGF in the mammary gland (Niranjan et al., 1995; Yang et al., 1995; Gastaldi et al., 2013). However, we show here that mammary myoepithelial cells also produce HGF. It is worth mentioning that in the postnatal mammary epithelium, ductal luminal cells are in direct contact with myoepithelial rather than stromal cells. In alveoli, the myoepithelial cell layer is discontinuous, so luminal cells may also come into contact with the basement membrane (Moumen et al., 2011). HGF produced by both myoepithelial and stromal cells may therefore contribute to the control of the luminal progenitor activity, favoring either their normal expansion during development or aberrant amplification in cancers. Paracrine basal-to-luminal signaling mediated by the Nrg1-ErbB4 ligand-receptor pair has recently been implicated in the regulation of luminal cell maturation during lobulo-alveolar development (Forster et al., 2014).

We found that HGF had multiple effects on Met-expressing luminal progenitors. Early in culture, HGF promoted cell survival and proliferation. Consistent with its role in tubulogenesis (Rosario and Birchmeier, 2003), HGF then favored lumen formation. Finally, HGF treatment affected the fate of luminal progenitors, leading to the accumulation of a cell population expressing basal markers, including cells co-expressing basal and luminal keratins. Such dual luminal/basal cells are seldom in the adult mammary epithelium but are abundant in fetal mammary rudiments (Spike et al., 2012). The accumulation of cells co-expressing basal and luminal keratins has been observed in the mammary epithelium of Elf5-null mice, which have high-Snai2 levels and display EMT-like phenotypic changes (Chakrabarti et al., 2012a, 2012b).

HGF triggers EMT in luminal progenitors and modulates the expression of antagonistic regulators of luminal and basal fates

Several regulators of the balance between mammary luminal and basal phenotypes have recently been identified. Notch signaling specifies a luminal cell fate, whereas Δ Np63 is required for the maintenance of basal cell characteristics (Bouras et al., 2008; Yalcin-Ozuysal et al., 2010). Forced expression of Snai2 endows mammary luminal progenitor cells with molecular characteristics and functional properties of basal-type stem cells, whereas Elf5, through the direct repression of Snai2, promotes luminal cell differentiation (Guo et al., 2012; Chakrabarti et al., 2012a, 2012b). Consistent with these data, we found that HGF induced the expression of Trp63 whilst repressing that of Hey1,

a major Notch effector, in luminal progenitors. Concomitantly, we observed important hallmarks of EMT, including an increase in *Snai1* and *Snai2* levels, *Elf5* repression and claudin down-regulation. The transcription of P-cadherin and N-cadherin was induced upon HGF treatment, but E-cadherin expression was not repressed, suggesting a partial, reversible EMT process (Nieto and Cano, 2012; Gonzalez and Medici, 2014). Consistently, alterations of the luminal progenitor phenotype did not persist in vitro after HGF withdrawal. Altogether, these data suggest that microenvironmental signals, such as HGF, may modulate the phenotype of luminal progenitors, by affecting the expression of antagonistic regulators of the basal and luminal fates.

In addition to their role in triggering EMT, transcription factors of the Snail family have been reported to attenuate cell cycle progression by increasing p21 expression (Vega et al., 2004). At late time points, *Cdkn1a*, *Snai1*, and *Snai2* were upregulated in HGF-treated cultures of luminal progenitors, whereas *Mki67* was down-regulated. These changes were accompanied by the accumulation of K5-expressing quiescent cells. How p21 and its major upstream regulator p53 are involved in the response of luminal progenitors to HGF remains to be unraveled. A recent analysis of transgenic mouse models showed that Met can synergize with p53 loss to promote the formation of triple-negative mammary tumors with a claudin-low, EMT-type molecular signature (Knight et al., 2013). Furthermore, the loss of p53 from the mammary epithelium leads to the expansion of clonogenic mammary luminal progenitors (Chiche et al., 2013).

In brief, our data provide new insights into the cellular and molecular mechanisms underlying the phenotypic plasticity of luminal progenitors. They also suggest that mammary basal and stromal cells may both be involved in controlling luminal progenitor function via the paracrine activation of Met during mammary development and tumorigenesis.

Materials and methods

Mouse strains and transgenic mice

BALB/cByJ JAX, C57BL/6, and BALB/c-Nude JAX females were purchased from Charles Rivers (L'Arbresle, France). Transgenic mice expressing the Cre recombinase under the control of the β -Lactoglobulin promoter (Blg-Cre) were from the Jackson Laboratories (Sacramento, CA, USA) and purchased from Charles Rivers. Rosa26-LacZ reporter strain was provided by Soriano (1999). *Icam1*-deficient mice (B6.129S4-*Icam1*^{tm1Jcgr/J}) were from the Jackson Laboratories. The mature virgin females used in the experiments were 11–25 weeks old. The care and use of animals used here was strictly applying European and National Regulation for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes in force (facility licence #C75-05-18). It complies also with internationally established principles of replacement, reduction, and refinement in accordance with Guide for the Care and Use of Laboratory animals (NRC, 2011). All experimental procedures were ethically approved (Ethical approval 02265.01/CEEA-IC 118).

Preparation of mammary epithelial cells

Single cells were prepared from 2 to 8 inguinal mammary glands. Glands taken from virgin or pregnant females were minced, first with scissors and then with scalpels. Minced tissues were transferred to a digestion solution containing 3 mg/ml collagenase (Roche Diagnostics, Meylan, France), 100 units/ml hyaluronidase (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) in CO₂-independent medium (Gibco, Life Technologies, St Aubin, France) completed with 5% fetal bovine serum (FBS, Lonza, Basel, Switzerland) and 2 mM L-glutamine (Sigma-Aldrich), and incubated for 90 min at 37°C with shaking (150 rpm). Digested samples were centrifuged at 450×g for 5 min and the supernatant eliminated. Pellets were washed once with CO₂-independent medium, treated with a prewarmed 0.25% trypsin/0.1% versen (Life Technologies; Biochrom, Berlin, Germany) solution in Phosphate Buffered Saline (PBS) for 1 min and rinsed with CO₂-independent medium containing 5% FBS. Pellets were then resuspended in a solution of 5 mg/ml dispase II (Roche) in CO₂-independent medium containing 5% FBS and DNaseI (Sigma-Aldrich) was added to a final concentration of 0.1 mg/ml. After 5 min incubation at 37°C, cells were rinsed once in CO₂-independent medium containing 5% FBS and the pellets were treated with a cold ammonium chloride solution (Stem Cell Technologies, Grenoble, France). Cell suspensions were centrifuged, resuspended in CO₂-independent medium, and filtered through a nylon mesh cell strainer with 40- μ m pores (Fisher Scientific, Illkirch, France) before immunolabeling.

Flow cytometry

Freshly isolated cells were incubated at 4°C for 20 min with the following conjugated antibodies: anti-CD24-FITC (clone M1/69) and anti-CD49f-PE (clone GoH3) from BD Biosciences (BD France, Le Pont-de-Claix, France), anti-CD54-PE (clone YN1/1.7.4), anti-CD45-APC (clone 30-F11), and anti-CD31-APC (clone MEC13.3) from Biolegend (San Diego, CA, USA), anti-Ly6A/E-PE-Cy5 (clone D7) from eBiosciences (San Diego, CA, USA). Labeled cells were sorted on a FACSVantage flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), and data analyzed using FlowJo software. Sorted cell populations were routinely re-analyzed and found to be 96–98% pure. As estimated by trypan blue exclusion, cell viability after sorting was between 83% and 92%.

Cell culture assays

For two-dimensional clonogenic assays, sorted luminal cells were plated on irradiated 3T3 cell feeders on 24-well plates at a density of 250–500 cells per well and cultured in DMEM/F12 medium supplemented with 10% FBS, 5 µg/ml insulin (Sigma–Aldrich), 10 ng/ml EGF (Invitrogen, Life Technologies), and 100 ng/ml cholera toxin (ICN Biochemicals, Irvine, CA, USA) for 7 days as described elsewhere (Sleeman *et al.*, 2007). For mammosphere cultures, freshly isolated luminal cells were seeded on ultra-low adherence 24-well plates (Corning, NY, USA) at the density of 2000–5000 cells/well, in mammosphere media: DMEM/F12 medium supplemented with 2% B27, 20 ng/ml EGF, 20 ng/ml bFGF (Gibco, Life Technologies), 4 µg/ml heparin (Sigma–Aldrich), 10 µg/ml insulin, and 2% growth-factor-reduced Matrigel (BD Biosciences) as described elsewhere (Spike *et al.*, 2012; Chiche *et al.*, 2013). When specified, mammospheres were treated with 25–50 ng/ml recombinant mouse HGF (R&D Systems Europe, Lille, France) every 2 days. ImageJ software was used to count the colonies and the mammospheres and evaluate their size in pixels. Single cell suspensions were obtained from mammospheres by treatment with 0.05% trypsin (Gibco, Life Technologies).

Caspase-3/7 activity was assessed in cells harvested 1 and 2 days after plating them in mammosphere medium, using the Caspase-Glo 3/7 Assay System (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's protocol.

Immunofluorescence and immunohistochemical stainings

Freshly isolated cells were cytocentrifuged onto slides and fixed in cold methanol for 10 min. Cells were incubated with primary antibodies at 37°C for 1 hr, with secondary antibodies at room temperature for 1 hr and mounted in Prolong Gold antifade reagent with DAPI (Invitrogen, Life Technologies). Mammospheres were resuspended in 50 µl Matrigel and incubated at 37°C for 2 hr prior to embedding either in OCT (Tissue-Tek, Sakura Finetek Europe, Leiden, Netherlands) for cryosections or in paraffin. Cryosections were post-fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min and treated with 0.5% triton X-100 for 5 min before immunostaining. Spheres were fixed in Methacarn (1:3:6 mixture of acetic acid:chloroform:methanol) before embedding in paraffin. Sections were dewaxed, processed for acidic antigen retrieval, and immunolabeled, as described elsewhere (Chiche *et al.*, 2013). For cell proliferation assays, mammospheres were incubated with BrdU (5 µg/ml; Sigma–Aldrich) for 1 hr before being fixed and processed.

The following primary antibodies were used: anti-K5 and anti-K8 (Covance, Princeton, NJ, USA), anti-BrdU, anti-CD44v6 (AbD Serotec, Oxford, UK), anti-E-cadherin (ECCD2; Life Technologies), anti-p63 and anti-claudin-1 (Abcam, Cambridge, UK), anti-snail2/sluc (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), anti-ICAM-1 (Proteintech, Chicago, IL, USA), anti-ER (Dako France, Les Ulis, France), and Cy3-conjugated anti- α -SMA (Sigma–Aldrich). Alexafluor-conjugated secondary antibodies (Molecular Probes, Life Technologies) were used. For the immunohistochemical detection of ICAM-1, we used the EnVision System from Dako. Image acquisition was performed using a Leica DM 6000B microscope (Wetzlar, Germany) and MetaMorph software. Confocal images were acquired with a Nikon Confocal A1r microscope using a 60x CFI Plan oil objective (Apo VC/NA 1.4/WD 0.13).

X-gal staining

Mammospheres established from Blg-Cre; R26 mammary cells were dissociated and isolated cells were pre-fixed with 2.5% paraformaldehyde for 5 min at 4°C and X-gal stained in suspension at 37°C

overnight. Cells were cytocentrifuged, post-fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min at room temperature, and processed either for Fast Red staining or immunostaining.

For whole-mount X-gal staining, mammary glands from Blg-Cre; R26 females were fixed in 2.5% paraformaldehyde for 1 hr at 4°C and stained overnight at 30°C. Glands were embedded in paraffin and sections counterstained with Fast Red.

Transplantation assays and whole-mount analysis

Isolated cells derived from primary spheres or intact secondary spheres were transplanted into the inguinal fat pads of 3-week-old BALB/c-Nude JAX females cleared of endogenous epithelium as described elsewhere (Deome *et al.*, 1959; Moumen *et al.*, 2012; Chiche *et al.*, 2013). Untreated and HGF-treated cells or spheres were resuspended in 10 µl of 25% growth factor-reduced Matrigel before being grafted in the contralateral fat pads of host mice. For secondary sphere transplantations, 5000 ICAM1-positive luminal progenitors per well were plated, grown with or without HGF for 14 days, then, dissociated and replated at 5000 cells per well as for primary spheres. After 15 days in culture, the content of each culture well was grafted in a separate mammary fat pad. To analyze the outgrowths, dissected mammary fat pads were spread onto glass slides, fixed in Methacarn, and stained with carmine alum (Stem Cell Technologies), as described elsewhere (Moumen *et al.*, 2012; Chiche *et al.*, 2013).

Reverse transcription-polymerase chain reaction

RNA was reverse-transcribed with MMLV H(-) Point reverse transcriptase (Promega, Madison, WI, USA), and quantitative PCR (qPCR) was performed by monitoring, in real time, the increase in fluorescence of the SYBR Green dye on an LightCycler 480 Real-Time PCR System (Roche Applied Science, Basel, Switzerland). The primers used for qPCR analysis were purchased from SABiosciences/Qiagen (Hilden, Germany) or designed using Oligo 6.8 software and synthesized by Eurogentec (Seraing, Belgium) (Supplementary file 2).

Statistical analysis of the data

p values were determined using Student's test with two-tailed distribution and unequal variance.

Acknowledgements

We are particularly grateful to the personnel of the Animal facility (Sonia Jannet, Isabelle Grandjean) and the Flow Cytometry Core facility (Annick Viguiet, Sophie Grondin and Zosia Maciorowski). We greatly thank the staff of the PICT-IBiSA Lhomond Imaging facility and the Nikon Imaging Center at Institut Curie–Centre National de la Recherche Scientifique for help with image acquisition, in particular Lucie Sengmanivong. We also thank Veronica Rodilla (Institut Curie, Paris, France) for sharing reagents and protocols. Laura Bresson received funding from the « *Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur* ».

Additional information

Funding

Funder	Grant reference	Author
Ligue Contre le Cancer	Equipe Labelisee 2013	Marina A Glukhova
Agence Nationale de la Recherche	ANR-13-BSV2-0001	Marina A Glukhova
Canceropole Ile de France	2014-1-SEIN-01-ICR-1	Marina A Glukhova
Agence Nationale de la Recherche	ANR-08-BLAN-0078-01	Marina A Glukhova

The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

Author contributions

AD-C, VP, AC, LB, MR, DM, Acquisition of data, Analysis and interpretation of data; VO-R, MMV, Analysis and interpretation of data, Contributed unpublished essential data or reagents; MMF, Conception and design, Analysis and interpretation of data; MAG, Analysis and interpretation of

data, Drafting or revising the article; M-AD, Conception and design, Acquisition of data, Analysis and interpretation of data, Drafting or revising the article

Ethics

Animal experimentation: The care and use of animals used here was strictly applying European and National Regulation for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes in force (facility licence #C75-05-18). It complies also with internationally established principles of replacement, reduction and refinement in accordance with Guide for the Care and Use of Laboratory animals (NRC 2011). All experimental procedures were ethically approved (Ethical approval 02265.01/CEEA-IC 118).

Additional files

Supplementary files

- Supplementary file 1. Regenerative capacity of cells isolated from untreated and HGF-treated primary spheres.
DOI: [10.7554/eLife.06104.026](https://doi.org/10.7554/eLife.06104.026)
- Supplementary file 2. List of primers for q-PCR.
DOI: [10.7554/eLife.06104.027](https://doi.org/10.7554/eLife.06104.027)

References

- Abbas T, Dutta A. 2009. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nature Reviews. Cancer* **9**: 400–414. doi: [10.1038/nrc2657](https://doi.org/10.1038/nrc2657).
- Asselin-Labat ML, Sutherland KD, Barker H, Thomas R, Shackleton M, Forrest NC, Hartley L, Robb L, Grosveld FG, van der Wees J, Lindeman GJ, Visvader JE. 2007. Gata-3 is an essential regulator of mammary-gland morphogenesis and luminal-cell differentiation. *Nature Cell Biology* **9**:201–209. doi: [10.1038/ncb1530](https://doi.org/10.1038/ncb1530).
- Beleut M, Rajaram RD, Caikovski M, Ayyanan A, Germano D, Choi Y, Schneider P, Briskin C. 2010. Two distinct mechanisms underlie progesterone-induced proliferation in the mammary gland. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **107**:2989–2994. doi: [10.1073/pnas.0915148107](https://doi.org/10.1073/pnas.0915148107).
- Bouras T, Pal B, Vaillant F, Harburg G, Asselin-Labat ML, Oakes SR, Lindeman GJ, Visvader JE. 2008. Notch signaling regulates mammary stem cell function and luminal cell-fate commitment. *Cell Stem Cell* **3**:429–441. doi: [10.1016/j.stem.2008.08.001](https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.08.001).
- Briskin C. 2013. Progesterone signalling in breast cancer: a neglected hormone coming into the limelight. *Nature Reviews. Cancer* **13**:385–396. doi: [10.1038/nrc3518](https://doi.org/10.1038/nrc3518).
- Cai C, Yu QC, Jiang W, Liu W, Song W, Yu H, Zhang L, Yang Y, Zeng YA. 2014. R-spondin1 is a novel hormone mediator for mammary stem cell self-renewal. *Genes & Development* **28**:2205–2218. doi: [10.1101/gad.245142.114](https://doi.org/10.1101/gad.245142.114).
- Chakrabarti R, Hwang J, Andres Blanco M, Wei Y, Lukacisin M, Romano RA, Smalley K, Liu S, Yang Q, Ibrahim T, Mercatali L, Amadori D, Haffty BG, Sinha S, Kang Y. 2012a. E1f5 inhibits the epithelial-mesenchymal transition in mammary gland development and breast cancer metastasis by transcriptionally repressing Snail2. *Nature Cell Biology* **14**:1212–1222. doi: [10.1038/ncb2607](https://doi.org/10.1038/ncb2607).
- Chakrabarti R, Wei Y, Romano RA, DeCoste C, Kang Y, Sinha S. 2012b. E1f5 regulates mammary gland stem/progenitor cell fate by influencing notch signaling. *Stem Cells* **30**:1496–1508. doi: [10.1002/stem.1112](https://doi.org/10.1002/stem.1112).
- Charpin C, Giusiano S, Secq V, Carpentier S, Andrac L, Lavaut MN, Allasia C, Bonnier P, Garcia S. 2009. Quantitative immunocytochemical profile to predict early outcome of disease in triple-negative breast carcinomas. *International Journal of Oncology* **34**:983–993. doi: [10.3892/ijo_00000224](https://doi.org/10.3892/ijo_00000224).
- Chiche A, Moumen M, Petit V, Jonkers J, Medina D, Deugnier MA, Faraldo MM, Glukhova MA. 2013. Somatic loss of P53 leads to Stem/Progenitor cell amplification in both mammary epithelial compartments, basal and luminal. *Stem Cells* **31**:1857–1867. doi: [10.1002/stem.1429](https://doi.org/10.1002/stem.1429).
- De Silva D, Kunasegaran K, Ghosh S, Pietersen AM. 2015. Transcriptome analysis of the hormone-sensing cells in mammary epithelial reveals dynamic changes in early pregnancy. *BMC Developmental Biology* **15**:7. doi: [10.1186/s12861-015-0058-9](https://doi.org/10.1186/s12861-015-0058-9).
- Deome KB, Faulkin LJ Jr, Bern HA, Blair PB. 1959. Development of mammary tumors from hyperplastic alveolar nodules transplanted into gland-free mammary fat pads of female C3H mice. *Cancer Research* **19**:515–520.
- Fata JE, Kong YY, Li J, Sasaki T, Irie-Sasaki J, Moorehead RA, Elliott R, Scully S, Voura EB, Lacey DL, Boyle WJ, Khokha R, Penninger JM. 2000. The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development. *Cell* **103**:41–50. doi: [10.1016/S0092-8674\(00\)00103-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00103-3).
- Forster N, Saladi SV, van Bragt M, Sfondouris ME, Jones FE, Li Z, Ellisen LW. 2014. Basal cell signaling by p63 controls luminal progenitor function and lactation via NRG1. *Developmental Cell* **28**:147–160. doi: [10.1016/j.devcel.2013.11.019](https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.11.019).
- Fu N, Lindeman GJ, Visvader JE. 2014. The mammary stem cell hierarchy. *Current Topics in Developmental Biology* **107**:133–160. doi: [10.1016/B978-0-12-416022-4.00005-6](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416022-4.00005-6).

- Garcia S, Dales JP, Charafe-Jauffret E, Carpentier-Meunier S, Andrac-Meyer L, Jacquemier J, Andonian C, Lavaut MN, Allasia C, Bonnier P, Charpin C. 2007. Poor prognosis in breast carcinomas correlates with increased expression of targetable CD146 and c-Met and with proteomic basal-like phenotype. *Human Pathology* **38**: 830–841. doi: [10.1016/j.humpath.2006.11.015](https://doi.org/10.1016/j.humpath.2006.11.015).
- Garner OB, Bush KT, Nigam KB, Yamaguchi Y, Xu D, Esko JD, Nigam SK. 2011. Stage-dependent regulation of mammary ductal branching by heparan sulfate and HGF-cMet signaling. *Developmental Biology* **355**:394–403. doi: [10.1016/j.ydbio.2011.04.035](https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.04.035).
- Gastaldi S, Comoglio PM, Trusolino L. 2010. The Met oncogene and basal-like breast cancer: another culprit to watch out for? *Breast Cancer Research* **12**:208. doi: [10.1186/bcr2617](https://doi.org/10.1186/bcr2617).
- Gastaldi S, Sassi F, Accornero P, Torti D, Galimi F, Migliardi G, Molyneux G, Perera T, Comoglio PM, Boccaccio C, Smalley MJ, Bertotti A, 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. doi: [10.1038/ncr.2012.154](https://doi.org/10.1038/ncr.2012.154).
- Gherardi E, Birchmeier W, Birchmeier C, Vande Woude G. 2012. Targeting MET in cancer: rationale and progress. *Nature Reviews. Cancer* **12**:89–103. doi: [10.1038/nrc3205](https://doi.org/10.1038/nrc3205).
- Gonzalez DM, Medici D. 2014. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Science Signaling* **7**:re8. doi: [10.1126/scisignal.2005189](https://doi.org/10.1126/scisignal.2005189).
- Graveel CR, DeGroot JD, Su Y, Koeman J, Dykema K, Leung S, Snider J, Davies SR, Swiatek PJ, Cottingham S, Watson MA, Ellis MJ, Sigler RE, Furge KA, Vande Woude GF. 2009. Met induces diverse mammary carcinomas in mice and is associated with human basal breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **106**:12909–12914. doi: [10.1073/pnas.0810403106](https://doi.org/10.1073/pnas.0810403106).
- Guo P, Huang J, Wang L, Jia D, Yang J, Dillon DA, Zurakowski D, Mao H, Moses MA, Auguste DT. 2014. ICAM-1 as a molecular target for triple negative breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **111**:14710–14715. doi: [10.1073/pnas.1408556111](https://doi.org/10.1073/pnas.1408556111).
- Guo W, Keckesova Z, Donaher JL, Shibue T, Tischler V, Reinhardt F, Itzkovitz S, Noske A, Zurrer-Hardi U, Bell G, Tam WL, Mani SA, van Oudenaarden A, Weinberg RA. 2012. Slug and Sox9 cooperatively determine the mammary stem cell state. *Cell* **148**:1015–1028. doi: [10.1016/j.cell.2012.02.008](https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.008).
- Haslam SZ, Drolet A, Smith K, Tan M, Upperclee M. 2008. Progesterin-regulated luminal cell and myoepithelial cell-specific responses in mammary organoid culture. *Endocrinology* **149**:2098–2107. doi: [10.1210/en.2007-1398](https://doi.org/10.1210/en.2007-1398).
- Holland JD, Gyorffy B, Vogel R, Eckert K, Valenti G, Fang L, Lohneis P, Elezskurtaj S, Ziebold U, Birchmeier W. 2013. Combined Wnt/beta-catenin, Met, and CXCL12/CXCR4 signals characterize basal breast cancer and predict disease outcome. *Cell Reports* **5**:1214–1227. doi: [10.1016/j.celrep.2013.11.001](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.11.001).
- Kendrick H, Regan JL, Magnay FA, Grigoriadis A, Mitsopoulos C, Zvelebil M, Smalley MJ. 2008. Transcriptome analysis of mammary epithelial subpopulations identifies novel determinants of lineage commitment and cell fate. *BMC Genomics* **9**:591. doi: [10.1186/1471-2164-9-591](https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-591).
- Knight JF, Lesurf R, Zhao H, Pinnaduwaage D, Davis RR, Saleh SM, Zuo D, Naujokas MA, Chughtai N, Herschkowitz JI, Prat A, Mulligan AM, Muller WJ, Cardiff RD, Gregg JP, Andrusis IL, Hallett MT, Park M. 2013. Met synergizes with p53 loss to induce mammary tumors that possess features of claudin-low breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **110**:E1301–E1310. doi: [10.1073/pnas.1210353110](https://doi.org/10.1073/pnas.1210353110).
- Lafkas D, Rodilla V, Huyghe M, Mourao L, Kiaris H, Fre S. 2013. Notch3 marks clonogenic mammary luminal progenitor cells in vivo. *The Journal of Cell Biology* **203**:47–56. doi: [10.1083/jcb.201307046](https://doi.org/10.1083/jcb.201307046).
- Lee K, Gjorevski N, Boghaert E, Radisky DC, Nelson CM. 2011. Snail1, Snail2, and E47 promote mammary epithelial branching morphogenesis. *The EMBO Journal* **30**:2662–2674. doi: [10.1038/emboj.2011.159](https://doi.org/10.1038/emboj.2011.159).
- Lim E, Vaillant F, Wu D, Forrest NC, Pal B, Hart AH, Asselin-Labat ML, Gyorki DE, Ward T, Partanen A, Feleppa F, Huschtscha LI, Thorne HJ, Fox SB, Yan M, French JD, Brown MA, Smyth GK, Visvader JE, Lindeman GJ. 2009. Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers. *Nature Medicine* **15**:907–913. doi: [10.1038/nm.2000](https://doi.org/10.1038/nm.2000).
- Mai A, Muharram G, Barrow-McGee R, Baghirov H, Rantala J, Kermorgant S, Ivaska J. 2014. Distinct c-Met activation mechanisms induce cell rounding or invasion through pathways involving integrins, RhoA and HIP1. *Journal of Cell Science* **127**:1938–1952. doi: [10.1242/jcs.140657](https://doi.org/10.1242/jcs.140657).
- Molyneux G, Geyer FC, Magnay FA, McCarthy A, Kendrick H, Natrajan R, Mackay A, Grigoriadis A, Tutt A, Ashworth A, Reis-Filho JS, 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. doi: [10.1016/j.stem.2010.07.010](https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.07.010).
- Moumen M, Chiche A, Cagnet S, Petit V, Raymond K, Faraldo MM, Deugnier MA, Glukhova MA. 2011. The mammary myoepithelial cell. *The International Journal of Developmental Biology* **55**:763–771. doi: [10.1387/ijdb.113385mm](https://doi.org/10.1387/ijdb.113385mm).
- Moumen M, Chiche A, Deugnier MA, Petit V, Gandarillas A, Glukhova MA, Faraldo MM. 2012. The proto-oncogene Myc is essential for mammary stem cell function. *Stem Cells* **30**:1246–1254. doi: [10.1002/stem.1090](https://doi.org/10.1002/stem.1090).
- Mulac-Jericevic B, Lydon JP, DeMayo FJ, Conneely OM. 2003. Defective mammary gland morphogenesis in mice lacking the progesterone receptor B isoform. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **100**: 9744–9749. doi: [10.1073/pnas.1732707100](https://doi.org/10.1073/pnas.1732707100).
- Nassour M, Idoux-Gillet Y, Selmi A, Come C, Faraldo ML, Deugnier MA, Savagner P. 2012. Slug controls stem/progenitor cell growth dynamics during mammary gland morphogenesis. *PLOS ONE* **7**:e53498. doi: [10.1371/journal.pone.0053498](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053498).
- Nieto MA, Cano A. 2012. The epithelial-mesenchymal transition under control: global programs to regulate epithelial plasticity. *Seminars in Cancer Biology* **22**:361–368. doi: [10.1016/j.semcancer.2012.05.003](https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2012.05.003).

- Niranjan B, Buluwela L, Yant J, Perusinghe N, Atherton A, Phippard D, Dale T, Gusterson B, Kamalati T. 1995. HGF/SF: a potent cytokine for mammary growth, morphogenesis and development. *Development* **121**: 2897–2908.
- Oakes SR, Naylor MJ, Asselin-Labat ML, Blazek KD, Gardiner-Garden M, Hilton HN, Kazlauskas M, Pritchard MA, Chodosh LA, Pfeffer PL, Lindeman GJ, Visvader JE, Ormandy CJ. 2008. The Ets transcription factor Elf5 specifies mammary alveolar cell fate. *Genes & Development* **22**:581–586. doi: [10.1101/gad.1614608](https://doi.org/10.1101/gad.1614608).
- Olaku V, Matzke A, Mitchell C, Hasenauer S, Sakkaravarthi A, Pace G, Ponta H, Orian-Rousseau V. 2011. c-Met recruits ICAM-1 as a coreceptor to compensate for the loss of CD44 in Cd44 null mice. *Molecular Biology of the Cell* **22**:2777–2786. doi: [10.1091/mbc.E11-02-0134](https://doi.org/10.1091/mbc.E11-02-0134).
- Oliver CH, Khaled WT, Friend H, Nichols J, Watson CJ. 2012. The Stat6-regulated KRAB domain zinc finger protein Zfp157 regulates the balance of lineages in mammary glands and compensates for loss of Gata-3. *Genes & Development* **26**:1086–1097. doi: [10.1101/gad.184051.111](https://doi.org/10.1101/gad.184051.111).
- Orian-Rousseau V, Chen L, Sleeman JP, Herrlich P, Ponta H. 2002. CD44 is required for two consecutive steps in HGF/c-Met signaling. *Genes & Development* **16**:3074–3086. doi: [10.1101/gad.242602](https://doi.org/10.1101/gad.242602).
- Ponzo MG, Lesurf R, Petkiewicz S, O'Malley FP, Pinnaduwa D, Andrusis IL, Bull SB, Chughtai N, Zuo D, Souleimanova M, Germain D, Omeroglu A, Cardiff RD, Hallett M, Park M. 2009. Met induces mammary tumors with diverse histologies and is associated with poor outcome and human basal breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **106**:12903–12908. doi: [10.1073/pnas.0810402106](https://doi.org/10.1073/pnas.0810402106).
- Ponzo MG, Park M. 2010. The Met receptor tyrosine kinase and basal breast cancer. *Cell Cycle* **9**:1043–1050. doi: [10.4161/cc.9.6.11033](https://doi.org/10.4161/cc.9.6.11033).
- Proia TA, Keller PJ, Gupta PB, Klebba I, Jones AD, Sedic M, Gilmore H, Tung N, Naber SP, Schnitt S, Lander ES, Kuperwasser C. 2011. Genetic predisposition directs breast cancer phenotype by dictating progenitor cell fate. *Cell Stem Cell* **8**:149–163. doi: [10.1016/j.stem.2010.12.007](https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.12.007).
- Regan JL, Kendrick H, Magnay FA, Vafaizadeh V, Groner B, Smalley MJ. 2012. c-Kit is required for growth and survival of the cells of origin of Brca1-mutation-associated breast cancer. *Oncogene* **31**:869–883. doi: [10.1038/onc.2011.289](https://doi.org/10.1038/onc.2011.289).
- Rios AC, Fu NY, Lindeman GJ, Visvader JE. 2014. In situ identification of bipotent stem cells in the mammary gland. *Nature* **506**:322–327. doi: [10.1038/nature12948](https://doi.org/10.1038/nature12948).
- Rodilla V, Dasti A, Huyghe M, Lafkas D, Laurent C, Reyat F, Fre S. 2015. Luminal progenitors restrict their lineage potential during mammary gland development. *PLoS Biology* **13**:e1002069. doi: [10.1371/journal.pbio.1002069](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002069).
- Rosario M, Birchmeier W. 2003. How to make tubes: signaling by the Met receptor tyrosine kinase. *Trends in Cell Biology* **13**:328–335. doi: [10.1016/S0962-8924\(03\)00104-1](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(03)00104-1).
- Sale S, Lafkas D, Artavanis-Tsakonas S. 2013. Notch2 genetic fate mapping reveals two previously unrecognized mammary epithelial lineages. *Nature Cell Biology* **15**:451–460. doi: [10.1038/ncb2725](https://doi.org/10.1038/ncb2725).
- Schroder C, Witzel I, Muller V, Krenkel S, Wirtz RM, Janicke F, Schumacher U, Milde-Langosch K. 2011. Prognostic value of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 expression in breast cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* **137**:1193–1201. doi: [10.1007/s00432-011-0984-2](https://doi.org/10.1007/s00432-011-0984-2).
- Selbert S, Bentley DJ, Melton DW, Rannie D, Lourenco P, Watson CJ, Clarke AR. 1998. Efficient BLG-Cre mediated gene deletion in the mammary gland. *Transgenic Research* **7**:387–396. doi: [10.1023/A:1008848304391](https://doi.org/10.1023/A:1008848304391).
- Shackleton M, Vaillant F, Simpson KJ, Stingl J, Smyth GK, Asselin-Labat ML, Wu L, Lindeman GJ, Visvader JE. 2006. Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature* **439**:84–88. doi: [10.1038/nature04372](https://doi.org/10.1038/nature04372).
- Shehata M, Teschendorff A, Sharp G, Novic N, Russell A, Avril S, Prater M, Eirew P, Caldas C, Watson CJ, Stingl J. 2012. Phenotypic and functional characterization of the luminal cell hierarchy of the mammary gland. *Breast Cancer Research* **14**:R134. doi: [10.1186/bcr3334](https://doi.org/10.1186/bcr3334).
- Sleeman KE, Kendrick H, Robertson D, Isacke CM, Ashworth A, Smalley MJ. 2007. Dissociation of estrogen receptor expression and in vivo stem cell activity in the mammary gland. *The Journal of Cell Biology* **176**:19–26. doi: [10.1083/jcb.200604065](https://doi.org/10.1083/jcb.200604065).
- Smolen GA, Muir B, Mohapatra G, Barmettler A, Kim WJ, Rivera MN, Haserlat SM, Okimoto RA, Kwak E, Dahiya S, Garber JE, Bell DW, Sgroi DC, Chin L, Deng CX, Haber DA. 2006. Frequent met oncogene amplification in a Brca1/Trp53 mouse model of mammary tumorigenesis. *Cancer Research* **66**:3452–3455. doi: [10.1158/0008-5472.CAN-05-4181](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-4181).
- Soriano JV, Pepper MS, Nakamura T, Orci L, Montesano R. 1995. Hepatocyte growth factor stimulates extensive development of branching duct-like structures by cloned mammary gland epithelial cells. *Journal of Cell Science* **108**:413–430.
- Soriano P. 1999. Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nature Genetics* **21**:70–71. doi: [10.1038/5007](https://doi.org/10.1038/5007).
- Spike BT, Engle DD, Lin JC, Cheung SK, La J, Wahl GM. 2012. A mammary stem cell population identified and characterized in late embryogenesis reveals similarities to human breast cancer. *Cell Stem Cell* **10**:183–197. doi: [10.1016/j.stem.2011.12.018](https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.12.018).
- Stingl J, Eirew P, Ricketson I, Shackleton M, Vaillant F, Choi D, Li H, Eaves CJ. 2006. Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells. *Nature* **439**:993–997. doi: [10.1038/nature04496](https://doi.org/10.1038/nature04496).
- Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. 2009. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* **139**:871–890. doi: [10.1016/j.cell.2009.11.007](https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.007).
- Trusolino L, Bertotti A, Comoglio PM. 2010. MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **11**:834–848. doi: [10.1038/nrm3012](https://doi.org/10.1038/nrm3012).

- Van Keymeulen A, Rocha AS, Ousset M, Beck B, Bouvencourt G, Rock J, Sharma N, Dekoninck S, Blanpain C. 2011. Distinct stem cells contribute to mammary gland development and maintenance. *Nature* **479**:189–193. doi: [10.1038/nature10573](https://doi.org/10.1038/nature10573).
- Vega S, Morales AV, Ocana OH, Valdes F, Fabregat I, Nieto MA. 2004. Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death. *Genes & Development* **18**:1131–1143. doi: [10.1101/gad.294104](https://doi.org/10.1101/gad.294104).
- Visvader JE, Stingl J. 2014. Mammary stem cells and the differentiation hierarchy: current status and perspectives. *Genes & Development* **28**:1143–1158. doi: [10.1101/gad.242511.114](https://doi.org/10.1101/gad.242511.114).
- Xu H, Gonzalo JA, St Pierre Y, Williams IR, Kupper TS, Cotran RS, Springer TA, Gutierrez-Ramos JC. 1994. Leukocytosis and resistance to septic shock in intercellular adhesion molecule 1-deficient mice. *The Journal of Experimental Medicine* **180**:95–109. doi: [10.1084/jem.180.1.95](https://doi.org/10.1084/jem.180.1.95).
- Yalcin-Ozuysal O, Fiche M, Guitierrez M, Wagner KU, Raffoul W, Brisken C. 2010. Antagonistic roles of Notch and p63 in controlling mammary epithelial cell fates. *Cell Death and Differentiation* **17**:1600–1612. doi: [10.1038/cdd.2010.37](https://doi.org/10.1038/cdd.2010.37).
- Yang Y, Spitzer E, Meyer D, Sachs M, Niemann C, Hartmann G, Weidner KM, Birchmeier C, Birchmeier W. 1995. Sequential requirement of hepatocyte growth factor and neuregulin in the morphogenesis and differentiation of the mammary gland. *The Journal of Cell Biology* **131**:215–226. doi: [10.1083/jcb.131.1.215](https://doi.org/10.1083/jcb.131.1.215).

Annexe 2 : Liste des amorces utilisées dans cette étude pour les RT-qPCR

Acta2-as	5'- GTCCAGCACAATACCAGTTG -3'
Acta2-s	5'- GACCCAGATTATGTTTGAGAC -3'
Axin2-as	5'- ACTGCCAGACATCCTGTGA -3'
Axin2-s	5'- GTACCTTGCCAAAACGGAAT -3'
Cdh1-as	5'- ACCACCGTTCTCCTCCGTA -3'
Cdh1-s	5'- ATCCTCGCCCTGCTGATTC -3'
Cdh3-as	5'- GTCCTGTGCGGTATAGATGC -3'
Cdh3-s	5'- ACGAAGCCCCTGTGTTTGTGTT -3'
Cnn1-as	5'- AGTACTGCCTGAACCCGGAGT -3'
Cnn1-s	5'- GTTGTGCGGGTGGTGATTG -3'
Esr1-as	5'- GAGGCACACAAACTCTTCTC -3'
Esr1-s	5'- CTGGACAGGAATCAAGGTAAT -3'
Elf5-as	5'- AGGCAGGGTAGTAGTCTTCA -3'
Elf5-s	5'- CCAACGCATCCTTCTGTGAC -3'
Fn1-as	5'- GTGCCTCCACTATGATGTTG -3'
Fn1-s	5'- GAAGAGCCCTTACAGTTCCA -3'
Gapdh -as	5'- GTTGAAGTCGCAGGAGACAAC -3'
Gapdh-s	5'- CCAATGTGTCCGTCGTGGATC -3'
Gata3-as	5'- TTCGCTTGGGCTTGATAAGG -3'
Gata3-s	5'- AGGCAGGGAGTGTGTGAAC -3'
HA-DNBcat-as	5'- GCCCGTCAATATCAGCTACT -3'
HA-DNBcat-s	5'- ATCCTTATGACGTGCCTGAC -3'
Krt14-as	5'- TCCAGCAGGATTTTGTACTG -3'
Krt14-s	5'- CGGCAAGAGTGAGATTTCTG -3'
Krt15-as	5'- CAGGGTCCGTCTCAGGTCT -3'
Krt15-s	5'- GAGGTGGCGTCTAACACAG -3'
Krt18-as	5'- CAGCCTTGTGATGTTGGTGT -3'
Krt18-s	5'- CCTTGCCGCCGATGACTTTA -3'
Krt5-as	5'- TGCCAACACCAATGCTGCTG -3'
Krt5-s	5'- GACCAGTCAACATCTCTGTC -3'
Lgr5-as	5'- AGGTCCCGCTCATCTTGAAC -3'
Lgr5-s	5'- ATGCCATCTGCTTACCAGTGT -3'
Myc-as	5'- CCCGACTCCGACCTCTTG -3'
Myc-s	5'- CACCAGCAGCGACTCTGAA -3'
Myh11-as	5'- CATGGACCCGCTAAATGACA -3'
Myh11-s	5'- CAATGCGGTCCACATCCTTC -3'
Pdpn-as	5'- GCCTTGCCAGTAGATTCATTA -3'
Pdpn-s	5'- ACCGTGCCAGTGTTGTTCTG -3'
Pgr-as	5'- CAACTGGGCAGCAATAACTTC -3'
Pgr-s	5'- CCACCTGTACTGCTTGAATAC -3'
Prlr-as	5'- GTCATCCACTTCCAAGAACTC -3'
Prlr-s	5'-ATAAAAAGGATTTGATACTCATCTG-3'
Procr-as	5'- GAACTCCACACAAGTGTCCCT -3'

Procr-s	5'- CCAAAGCAGCCAACTTCACC -3'
Rspo1-as	5'- ACGGGGACCACTCGCTCAT -3'
Rspo1-s	5'- GCCTGCTTCAGCCACA ACTT -3'
Snai1-as	5'- TAGTTCTGGGAGACACATTG -3'
Snai1-s	5'- ACACCTGTTTCACAGCAGTT -3'
Snai2-as	5'- CCCAGTGTGAGTTCTAATGT -3'
Snai2-s	5'- GATGCCCAGTCTAGGAAATC -3'
Tnfsf11-as	5'- ATGCTGGTTTTAACGACATAC -3'
Tnfsf11-s	5'- CAAGATGGCTTCTATTACCTG -3'
Trp63-as	5'- GAGGAGCCGTTCTGAATCTG -3'
Trp63-s	5'- TGCCCAGACTCAATTTAGTGA -3'
Vcan-as	5'- GAAGGTGTCGCTGAATGAAAC -3
Vcan-s	5'- ACCACGCTATGAAATCAACTC -3
Vim-as	5'- TAAGGGCATCCACTTCACAG -3'
Vim-s	5'- CCAAGCAGGAGTCAAACGA -3'
Wnt4-as	5'- GCCACACCTGCTGAAGAGAT -3'
Wnt4-s	5'- CGAGGAGTGCCAATACCAGT -3'

Titre : Rôle de la Podoplanine dans le développement et la tumorigénèse mammaires

Mots clés : Glande mammaire, cellules souches, Podoplanine, signalisation Wnt, cancer du sein

Résumé : L'épithélium mammaire est composé de cellules luminales et basales myoépithéliales. Il comprend des cellules souches et progénitrices qui gouvernent le développement de la glande. Leur dérégulation est probablement à l'origine de certains cancers du sein très agressifs, dits « triple-négatifs » (négatifs pour les récepteurs hormonaux et HER2), pour lesquels il n'existe pas de thérapie ciblée. L'équipe a identifié un nouveau marqueur spécifique du compartiment basal comprenant les cellules souches, la Podoplanine (Pdpn), dont l'expression est concentrée aux contacts intercellulaires basal-luminal. La Pdpn est une glycoprotéine transmembranaire connectée au cytosquelette, impliquée dans le développement de nombreux tissus et la tumorigénèse. Son rôle dans la glande mammaire n'a jamais été étudié. À l'aide d'une délétion génique conditionnelle, nous avons trouvé que l'absence de Pdpn dans l'épithélium mammaire perturbe la fonction des cellules souches/progénitrices basales ainsi que l'expression de plusieurs composants du signalosome de la voie Wnt/b-caténine. De plus, la perte de Pdpn dans un modèle murin de tumorigénèse mammaire induite par l'activation de la signalisation Wnt/b-caténine réduit la fréquence des tumeurs mammaires triple-négatives, limite l'expansion des cellules initiatrices de tumeurs et favorise l'expression de marqueurs moléculaires associés à un programme de transition mésenchymo-épithéliale. Au moyen d'expériences de gain de fonction dans une lignée de cellules basales mammaires, nous avons montré que les phénotypes décrits précédemment reposent sur des mécanismes moléculaires impliquant la Pdpn dans le contrôle positif de l'activation de la voie Wnt/b-caténine. Notre étude révèle un rôle pour la Pdpn dans le contrôle des cellules souches et de leur réponse à la signalisation Wnt/b-caténine au cours du développement et de la tumorigénèse mammaire.

Title : Role of Podoplanin in mammary development and tumorigenesis

Keywords : mammary gland, stem cells, Podoplanin, Wnt signaling, breast cancer

Abstract : Stem cells (SC) drive mammary development, giving rise postnatally to an epithelial bilayer composed of luminal and basal myoepithelial cells. The molecular identity of SCs and the factors regulating their function remain poorly defined. We identified the transmembrane protein, Podoplanin (Pdpn), as a specific marker of the basal compartment, including multipotent SCs, and found Pdpn concentrated at the basal-luminal interface. Embryonic deletion of Pdpn targeted to basal cells diminished basal and luminal SC activity and affected expression of several Wnt/b-catenin (Wnt/b-cat) signaling components. Moreover, Pdpn deletion attenuated mammary tumor formation in a mouse model of b-cat-induced breast cancer, limiting tumor-initiating cell expansion and promoting molecular features associated with mesenchymal-to-epithelial cell transition. In line with the loss-of-function data, we demonstrated that mechanistically, Pdpn enhanced Wnt/b-cat signaling in mammary basal cells. Overall, our study reveals a role for Pdpn in mammary development and tumorigenesis through the control of Wnt/b-cat-responsive SCs.

