Etude des cellules souches et progénitrices mammaires et de leur contribution à la tumorigenèse : rôle des facteurs de transcription Myc et p53

Aurélie Chiche

▶ **To cite this version:**

Aurélie Chiche. Etude des cellules souches et progénitrices mammaires et de leur contribution à la tumorigenèse : rôle des facteurs de transcription Myc et p53. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT : 2012PA11T091 . tel-00924981

HAL Id: tel-00924981

https://theses.hal.science/tel-00924981

Submitted on 7 Jan 2014

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

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

UNIVERSITE PARIS-SUD

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

***DISCIPLINE** : Médecine*

THÈSE DE DOCTORAT

soutenue le 20 Décembre 2012

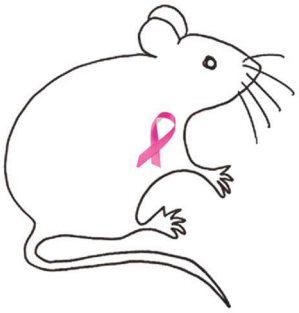
par

Aurélie CHICHE

Etude des cellules souches et progénitrices mammaires et de leur contribution à la tumorigenèse : rôle des facteurs de transcription Myc et p53

Directeur de thèse :	Marina GLUKHOVA	DR1 INSERM (Institut Curie – UMR144)
Composition du jury :		
Président du jury :	Franck TOLEDO	Professeur (Institut Curie – UMR3244)
Rapporteurs :	Véronique MAGUER-SATTA	DR2 CNRS (Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon – U1052/UMR5286)
	Vincent GOFFIN	DR2 INSERM (Centre de Recherche Croissance et Signalisation – U805)
Examinateurs :	Vasily OGRYZKO	DR2 INSERM (Institut Gustave Roussy - UMR8126)
	Marisa MARTIN-FARALDO	CR1 INSERM (Institut Curie – UMR144)

Etude des cellules souches et progénitrices mammaires et de leur contribution à la tumorigenèse : rôle des facteurs de transcription Myc et p53



Je tiens tout d'abord à remercier très sincèrement le Dr Marina Glukhova, ma directrice de thèse qui m'a accueilli dans son équipe il y a déjà cinq ans afin d'y effectuer mon stage de Master, puis ma thèse. Elle m'a fait confiance depuis le premier jour et a toujours su m'apporter de précieux conseils. Elle a su me communiquer sa passion de la science et la ténacité nécessaire à la poursuite de ce métier !

Je remercie vivement le Dr Franck Toledo d'avoir accepté de présider le jury de thèse. J'adresse également toute ma reconnaissance aux Drs Véronique Maguer-Satta, Vincent Goffin, Vasily Ogryzko et Maria-Luisa Martin-Faraldo pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de lire et d'évaluer mon travail.

Je remercie à nouveau tout particulièrement Marisa Faraldo, pour toute son aide, son soutien, ses corrections et ses petits "coup de pression" qui m'ont été nécessaires pour accomplir ce travail. Marisa, encore merci pour ton aide, j'espère pouvoir te donner suffisamment de "trucs et astuces" informatiques pour "payer ma dette".

Marie-Ange, merci à toi aussi pour ces heures de corrections, de discussions et de transmission de résultats et d'expériences qui ont été fort enrichissantes pour moi.

Je souhaite également remercier tous mes collègues présents et passés avec qui j'ai eu la chance de travailler durant ces années : Marisa, Marie-Ange, Valérie, Karine, Amandine, Stéphanie*, Mejdi, Ilaria, Dan, Monique, Guillaume et Nancy. Merci pour tous les moments passés ensemble et pour tous les enseignements que j'ai pu recevoir à votre contact. *Stéphanie, nous nous sommes encouragées mutuellement durant ces années de thèse, tu es la prochaine, alors courage !!

Je souhaite aussi remercier les jeunes stagiaires avec qui j'ai eu la chance de travailler durant ma thèse et qui m'ont apporté beaucoup d'aide à différents moments de mon projet de thèse : Audrey, Clément, Céline, Hervé, Elsa et Basma.

Je remercie l'ensemble de l'équipe animalerie de l'Institut Curie, plus particulièrement Sonia Jannet, Isabelle Grandjean, Céline Billerit, Céline Daviaud, Mickaël Garcia, Olivier Lebhar et André Nennot pour avoir pris soin de nos souris. Un grand merci également aux collègues du Département de Transfert de l'Institut Curie : Charles Decraene, de la plate-forme Affymetrix, ainsi qu'Annick Viguier, Sophie Grondin et Zofia Maciorowski de la plate-forme cytométrie.

Je remercie sincèrement Michèle Colineau, notre chère secrétaire responsable du 1er étage qui s'est toujours montrée très disponible et efficace pour nous éviter les petits tracas administratifs !

Merci également à la dream team avec qui j'ai pu partager des déjeuners, des conseils ou des fous rires : Maud, Isabelle, Olivier, Delphine, ainsi qu'aux autres personnes de l'Institut Curie : Natacha, Christine, Florent, Keltouma, Edwige, Pierre, Daniela, Catalina, Faisal, Yohanes, sans oublier tous ceux que j'oublie, et enfin tout le personnel de l'UMR144. Un merci très spécial à Fatima (et toute l'équipe de la laverie), qui a su, et saura encore faire régner l'ordre au premier étage durant toutes ces années. Ton passage au labo tous les jours a toujours été très apprécié et nous permettait de faire une petite pause supplémentaire ;).

Merci aussi à mes amis qui m'ont soutenue durant cette belle aventure : Maud, Isma, Sophie, Audrey, Chouch, Amal, Isa, Olivier, et Vanessa.

Je n'oublie pas non plus mes oncles et tantes qui ont toujours été présents pour passer un diner en famille ou à d'autres occasions.

Enfin et surtout, merci à mes parents, et à mes soeurs pour leur soutien et leurs encouragements de chaque instant.

ALDH	:	Aldehyde Dehydrogenase
APC	:	Adenomatous Polyposis Coli
ATM	:	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATR	:	Ataxia Telangiectasia and Rad3-related protein
α–SMA	:	α-Smooth Muscle Actin
bHLHZip	:	basic Helix-Loop-Helix leucine Zipper
BLG	:	β-Lactoglobulin
BRCA1/BRCA2	:	Breast Cancer (1/2)
CCL5	:	Chemokine (C-C motif) Ligand 5
CD	:	Cluster of differentiation
CDK	:	Cyclin-Dependent Kinase
C/EBPβ	:	CCAAT/Enhancer Binding Protein β
Dsc-3	:	Desmocolline
Dsg-3	:	Desmogléine
Dsh	:	Dishevelled
EGF	:	Epidermal Growth Factor
EMT	:	Epithelial Mesenchymal Transition
ER	:	Estrogen Receptor
ES	:	Souches Embryonnaires
FCS	:	Fetal Calf Serum
FGF	:	Fibroblast Growth Factor
Fz	:	Frizzled
GSK3β	:	Glycogen Synthase Kinase 3β
HA	:	Hemagglutinine
IGF	:	Insulin-like Growth Factor
JAK	:	Janus Kinase
K	:	Kératine
LEF/TCF	:	Lymphoid Enhancer Factor/T-Cell Factor
LIF	:	Leukemia Inhibitory Factor
LRP	:	Lipoprotein Receptor-related Protein
Ma-CFC	:	Mammary Colony-Forming Cell
Max	:	Myc-associated factor X
MDM	:	Murine Double Minute
MMP	:	Matrix MetalloProteinsase
MMTV	:	Mouse Mammary Tumour Virus
Myc	:	Myelocytomatosis
NF-κB	:	Nuclear Factor-κB
PDGF	:	Platelet-Derived Growth Factor
PI3K	:	Phosphatidylinositol 3-kinase
PTEN	:	Phosphatase and TENsin homolog
PR	:	Progesterone Receptor

PRL	:	Prolactin
PRLR	:	Prolactin Receptor
RANKL	:	Receptor Activator for Nuclear Factor-κB Ligand
SAM	:	Sterile Alpha Motif
Sca-1	:	Stem Cell Antigen-1
SH3	:	Src-Homology domain 3
SIAH	:	Seven In Absentia Homolog
SMA	:	Smooth Muscle Actin
STAT	:	Signal Transducer and Activator of Transcription
TDLU	:	Terminal Duct Lobular Units
TEB	:	Terminal End Buds
TGFβ	:	Transforming Growth Factor β
TP53	:	Transformation Protein 53
Trp53	:	Transformation-related protein 53
WAP	:	Whey Acidic Protein
Wnt	:	Wingless-type MMTV integration site family

REMERCIEMENTS……..2

RESUME……4

LISTE DES ABREVIATIONS……5

TABLE DES MATIERES……...7

INTRODUCTION 9

1. Présentation de la glande mammaire : physiologie et pathologie 10
1.1 Organisation de la glande mammaire.....11
1.1.1 L'épithélium mammaire 12
1.1.2 Le stroma mammaire 15
1.1.3 Ciblage des cellules épithéliales mammaires basales et luminales.....16
1.2 Morphogénèse de la glande mammaire : les étapes clés du développement 16
1.2.1 Développement embryonnaire de la glande mammaire 17
1.2.2 Puberté : croissance canalaire de la glande mammaire.....19
1.2.3 Gestation – Lactation : morphogenèse lobulo-alvéoalaire 21
1.2.4 Involution : apoptose et remodelage de la glande mammaire 25
1.3 Les cellules souches dans la glande mammaire 26
1.3.1 Mise en évidence des propriétés régénératives des cellules basales.....27
1.3.2 Propriétés clonogéniques des cellules épithéliales mammaires.....29
1.3.3 Modèle de ségrégation des lignages mammaires.....30
1.3.4 Mécanismes de contrôle de la fonction des cellules souches et progénitrices mammaires.. 32
1.3.5 Rôle de la transition épithélium-mésenchyme dans l'acquisition des propriétés des cellules souches mammaires 33
1.4 La tumorigenèse mammaire.....34
1.4.1 Les cancers du sein 34
1.4.2 Classification moléculaire des cancers du sein.....36
1.4.3 Les tumeurs du sein de type basal 38
1.4.4 Les différentes théories menant à l'hétérogénéité tumorale 39
1.5 Rôle de la voie Wnt/β-caténine dans la tumorigenèse mammaire.....41

2. Le proto-oncogène *Myc* 45
2.1 Structure de la protéine Myc 45
2.2 Activation et fonctions de Myc 48
2.3 Rôle de Myc dans le maintien des cellules souches et progénitrices.....50
2.4 Rôle de Myc dans la tumorigenèse 51

3. Le gène suppresseur de tumeur *Trp53* 53
3.1 Structure de la protéine p53 53
3.2 Régulation de p53 55
3.3 Activation et fonction de p53.....56
3.4 Rôle de p53 dans le développement et dans les cellules souches 59
3.4.1 p53 et développement.....59
3.4.2 p53 et cellules souches embryonnaires.....59
3.4.3 p53 et cellules souches adultes 60
3.4.4 Mécanismes possibles d'action de p53 sur la régulation du compartiment cellulaire souche......61
3.5 Rôle de p53 dans la tumorigenèse.....62
3.5.1 Les mutations du gène *Trp53* ont fréquentes dans les cancers 62
3.5.2 p53 et cellules souches cancéreuses.....63

4. Objectifs et approches expérimentales 65

MATERIELS & METHODES 66

1. Souris transgéniques 67

2. Génotypage 67

3. Isolement des cellules mammaires par cytométrie en flux 68

4. Essai de formation des colonies 69

5. Essai de formation des mammosphères 70

6. Transplantation de cellules isolées et de fragments de tissu mammaire dans le coussin adipeux 71

7. Etude morphologique et histologique des échantillons 72
7.1 Prélèvement, fixation et coupes histologiques 72
7.2 Marquage au X-gal 73
7.3 Colorations histologiques 74

8. Immunohistologie - Immunocytologie 74

9. Anticorps 75

10. RT-PCR en temps réel 76

11. Analyse statistique des résultats 78

RESULTATS 79

1. Le proto-oncogène *Myc* est essentiel à la fonction des cellules souches mammaires (Article 1) 80
1.1 La perte de Myc dans les cellules basales mammaires diminue la prolifération cellulaire dans les deux couches de l'épithélium mammaire conduisant à une hypoplasie de la glande 80
1.2 La perte de Myc dans les cellules basales mammaires affecte les cellules souches/progénitrices mammaires 81
1.3 La perte de Myc dans la couche basale mammaire perturbe fortement la fonction des cellules souches mammaires 81
1.4 La stimulation par des hormones ovariennes ne suffit pas à restaurer la fonction des cellules souches/progénitrices déficientes en Myc 82

2. La perte de p53 entraine l'amplification des cellules souches/progénitrices dans les compartiments basal et luminal mammaires (Manuscrit) 96
2.1 L'expression de la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur de la Kératine 5 entraine une suppression du gène Trp53 et une augmentation des populations cellulaires dans la couche basale et luminale de l'épithélium mammaire 96
2.2 La perte de p53 induit une expansion des cellules progénitrices luminales ainsi qu'une augmentation de leur potentiel d'autorenouvellement 97
2.3 La perte de p53 induit l'expansion des cellules progénitrices basales ainsi qu'une augmentation de leur potentiel d'autorenouvellement 97
2.4 L'activation de la signalisation de Notch est nécessaire à la formation des mammosphères basales et luminales 97
2.5 L'absence de p53 induit une augmentation de la fréquence des cellules souches ainsi qu'une augmentation de leur autorenouvellement in vivo 98
2.6 Analyse du potentiel de régénération des cellules luminales déficientes pour p53 (données préliminaires) 119

3. Myc est indispensable pour l'amplification des cellules souches et progénitrices mammaires et le développement de tumeurs de type basal induite par l'activation de la signalisation Wnt/β-caténine 121

3.1 L'activation de la voie Wnt/β-caténine dans les cellules basales mammaires induit le développement de tumeurs de type basal 121

3.2 Myc est nécessaire à la formation des tumeurs K5ΔNβcat 123

3.3 Myc est nécessaire à l'amplification des cellules souches et progénitrices mammaires induite par l'activation de la voie Wnt/β-caténine 124

3.4 L'activation de la voie Wnt/β-caténine dans les cellules basales mammaires induit un développement épithélial mammaire chez les mâles 128

4. La perte de p53 dans la couche basale mammaire dans le contexte d'une activation de la voie Wnt/β-caténine induit une augmentation de la fréquence des cellules souches cancéreuses 129

4.1 La perte de p53 dans la couche basale mammaire accélère la tumorigenèse induite par la β-caténine 129

4.2 La perte de p53 dans la couche basale mammaire augmente la fréquence des cellules souches cancéreuses 132

4.3 La transplantation de cellules tumorales issues des souris K5Cre; *Trp53*$^{F/F}$; K5ΔNβcat induit un développement lobulo-alvéolaire dans les glandes mammaires des souris hôtes 133

5. La perte de p53 dans la couche basale mammaire dans le contexte d'une activation de la voie Wnt/β-caténine induit un développement lobulo-alvéolaire chez les mâles .. 135

DISCUSSION & PERSPECTIVES 138

ANNEXES 153

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 163

INTRODUCTION

1. Présentation de la glande mammaire : physiologie et pathologie

L'apparition de la glande mammaire est un événement tardif à l'échelle de l'évolution, et constitue la caractéristique principale de la classe des Mammifères. La glande mammaire est une glande exocrine d'origine ectodermique. Le nombre de glandes mammaires est variable selon l'espèce : une paire pectorale chez l'espèce humaine contre cinq paires, par exemple, chez la souris. D'un point de vue morphologique, cet organe est constitué d'un réseau épithélial d'alvéoles sécrétrices (acini ou unités sécrétrices) et de canaux ramifiés connectant ces dernières, inséré au sein du tissu conjonctif mammaire, également appelé coussin adipeux. Les glandes mammaires humaines et murines présentent quelques différences morpho-anatomiques (Fig. 1).

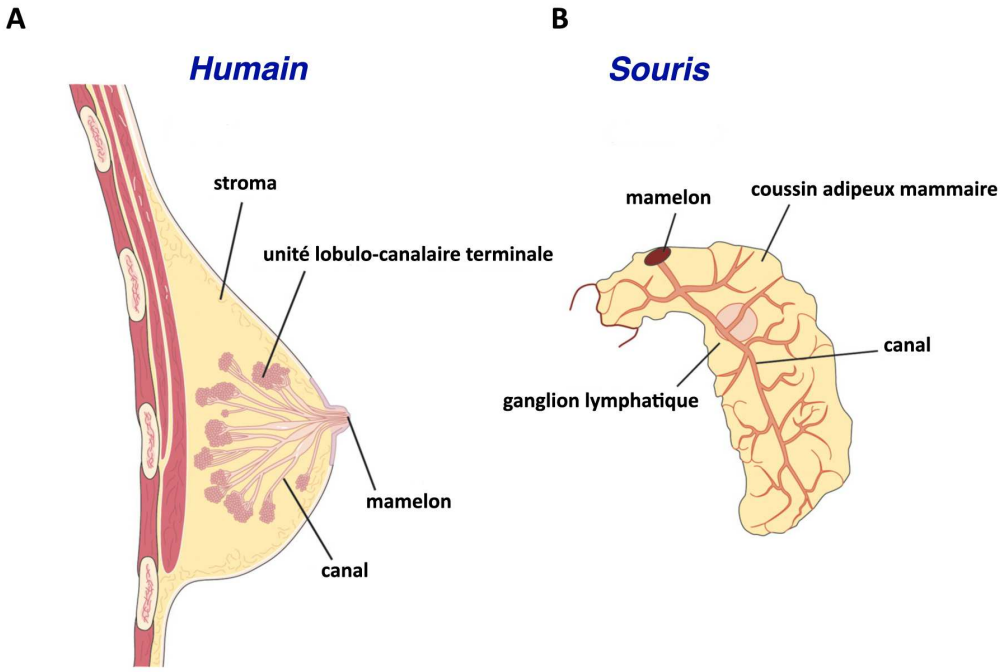


Figure 1 : Représentations schématiques de glandes mammaires humaine et murine en vue parasagittale

(A) Glande mammaire humaine. Les unités lobulo-canalaires terminales sont drainées par un réseau de canalicules, ainsi que par des canaux lobulaires, lobaires et mammaires (par ordre croissant de taille et de direction vers le mamelon).
(B) Glande mammaire murine. Les canaux ramifiés sont constitués d'un canal primaire traversant la glande jusqu'au mamelon et sur lequel débouchent de courtes branches latérales secondaires et tertiaires, ces dernières donnant naissance aux alvéoles lors de chaque gestation.
(Modifié d'après Visvader, 2009)

Chez l'espèce humaine, un petit nombre d'alvéoles apparaît dès la puberté et reste présent durant toute la vie adulte. Ces alvéoles sont agencées en grappes (unités lobulo-canalaires terminales ou TDLUs = Terminal Duct Lobular Units) et groupées en lobules, eux-mêmes rassemblés en lobes (Fig. 1A). Chez la souris, la glande mammaire adulte quiescente ne présente qu'une structure majoritairement canalaire (Fig. 1B), comprenant peu de bourgeons alvéolaires rudimentaires qui sont formés à chaque cycle œstral. La morphogenèse lobulo-alvéolaire a lieu essentiellement au cours de chaque période de gestation. Par ailleurs, le stroma mammaire murin est majoritairement adipeux tandis que chez la femme il est principalement fibreux. En dépit de ces disparités, l'organisation et la hiérarchie cellulaires de l'épithélium mammaire ainsi que les mécanismes moléculaires et cellulaires qui régissent le développement et le fonctionnement de la glande mammaire sont très conservés entre ces deux espèces (pour revue, voir Visvader, 2009). La fonction essentielle de la glande mammaire est de permettre aux femelles de produire et de sécréter les protéines et les lipides du lait, afin de nourrir les nouveau-nés au cours de la lactation. Outre l'apport de nourriture, la lactation permet également de fournir aux nourrissons une protection immunitaire efficace contre les pathogènes grâce aux facteurs immunitaires présents dans le lait.

Nous exposerons tout d'abord l'organisation cellulaire et le développement de la glande mammaire de la souris, qui a servi de modèle d'étude pour ce travail de thèse. Nous analyserons également les mécanismes moléculaires conduisant à la tumorigenèse mammaire.

1.1 Organisation de la glande mammaire

Chez la souris, il existe cinq paires de glandes mammaires, situées sous la peau en position ventrale. Selon l'axe crânio-caudal, on distingue trois paires de glandes thoraciques (glandes #1, #2 et #3), une paire de glandes abdominales (#4) et une paire de glandes inguinales (#5) (Fig. 2). Chaque glande est constituée d'un stroma mammaire, au sein duquel se développe un épithélium canalaire ramifié, connecté au mamelon par un canal primaire unique.

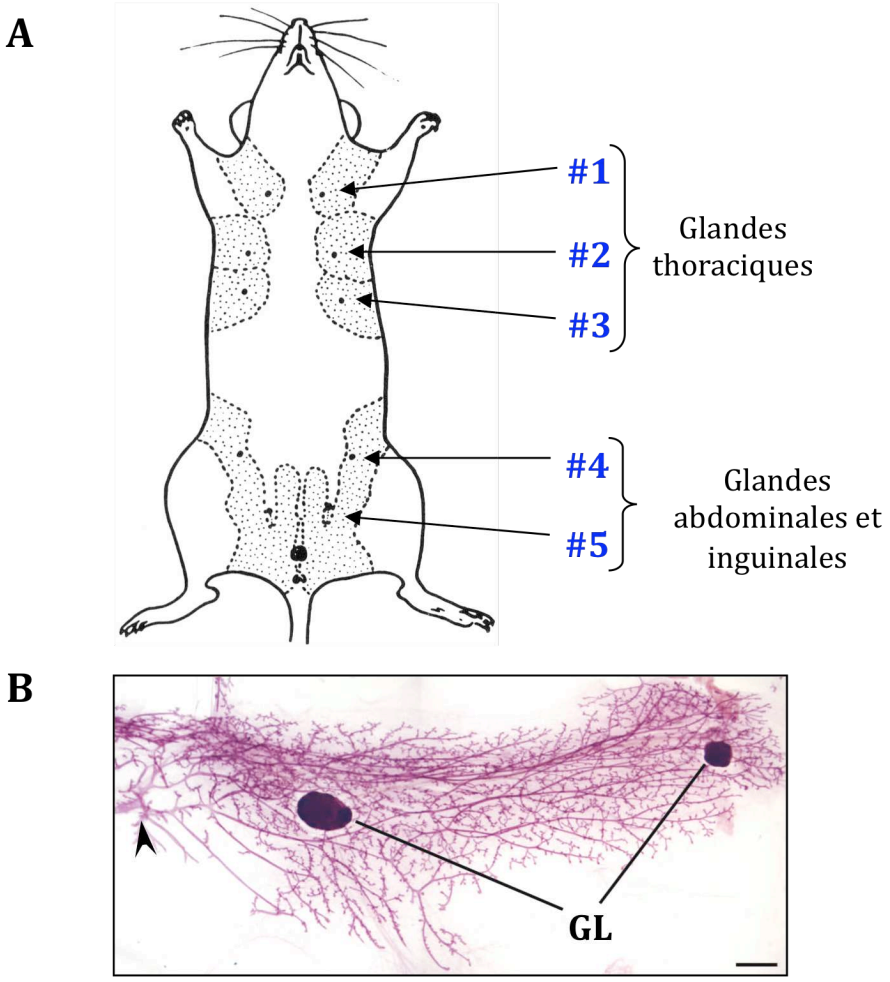


Figure 2 : Présentation de la glande mammaire murine adulte

(A) Localisations anatomiques des cinq paires de glandes mammaires chez la souris.
(B) Coloration *in toto* en rouge carmin d'une glande mammaire #4. La pointe de flèche indique la partie proximale de la glande, connectée au mamelon. GL : ganglions lymphatiques. Barre d'échelle : 1 mm.
(Modifié d'après Sternlicht, 2006)

1.1.1 L'épithélium mammaire

L'épithélium de la glande mammaire possède deux entités structurales distinctes. D'une part, les alvéoles, structures spécialisées dans la production du lait, apparaissant pendant la gestation et présentes tout au long de la lactation (Fig. 3, bas). D'autre part, les canaux qui vont acheminer le lait jusqu'au mamelon pendant la lactation (Fig. 3, haut).

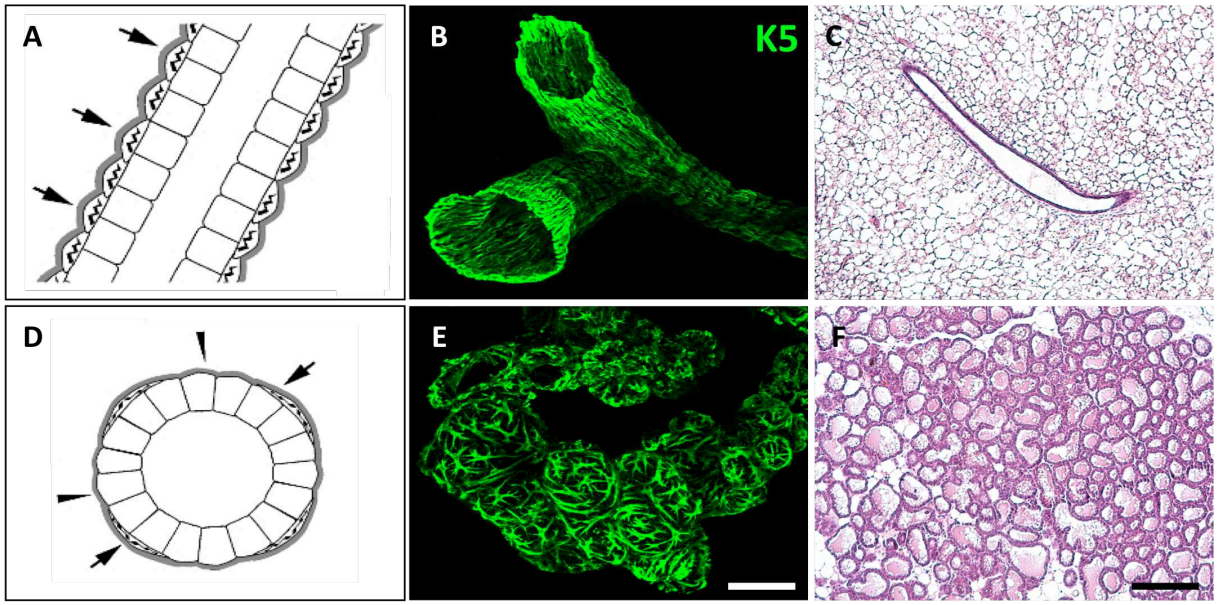


Figure 3 : Organisation de l'épithélium mammaires canalaire et alvéolaire

(A et D) Schéma de l'épithélium canalaire (A) et alvéolaire (D). Les flèches indiquent l'interaction des cellules myoépithéliales avec la lame basale (en gris). Les pointes de flèches indiquent l'interaction des cellules luminales alvéolaires avec la lame basale.
(B et E) Immunomarquage de canaux (B) et d'alvéoles (E) de glande mammaire sur coupe épaisse par un anticorps anti-K5 (observation par microscopie confocale). Barre d'échelle : 150 µm.
(C et F) Coupe histologique de l'épithélium canalaire (C) et alvéolaire (F) mammaire d'une souris adulte vierge ou à 3 jours de lactation, après coloration à l'hématoxilline & éosine. Barre d'échelle : 100 µm.

L'épithélium mammaire est pseudo stratifié et organisé en bicouche : une couche de cellules luminales sécrétrices de forme cuboïdale, formant la lumière des tubules mammaires (ou lumen), et une assise de cellules basales myoépithéliales de forme aplatie, directement au contact des cellules luminales, et reposant sur une lame basale (Fig. 4). Ces deux types cellulaires sont identifiables par l'expression de marqueurs spécifiques.

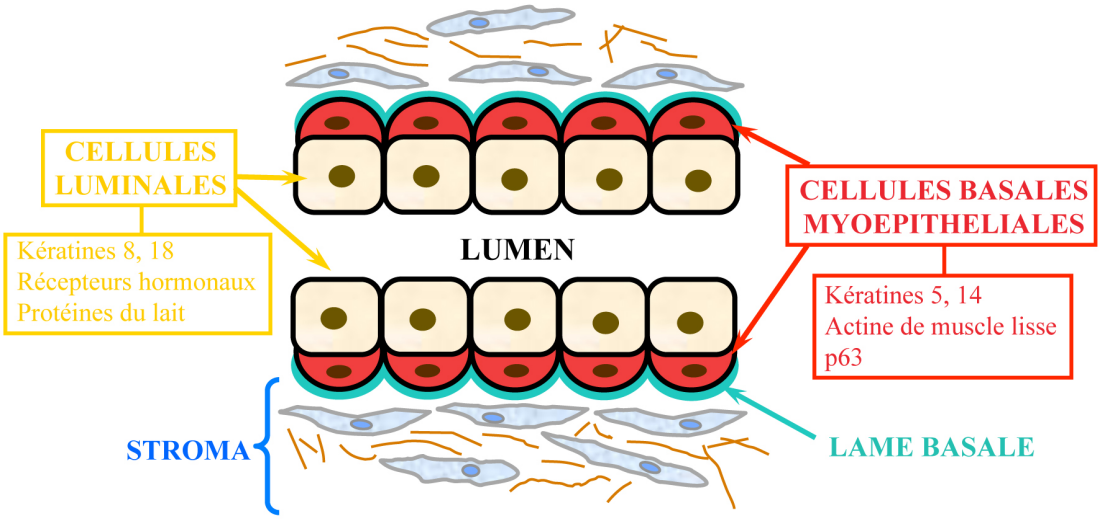


Figure 4 : Représentation schématique de l'épithélium mammaire murin

La bicouche épithéliale mammaire est constituée de cellules luminales (jaune) et de cellules basales myoépithéliales (rouge), chaque type de cellules exprimant des marqueurs spécifiques. La lame basale, formée de protéines et de protéoglycanes, entoure complètement l'épithélium mammaire, le séparant du stroma environnant (Modifié d'après Faraldo *et al.*, 2005).

Les cellules luminales expriment les kératines (K) 8 et 18 et une partie d'entre elles possède les récepteurs hormonaux aux œstrogènes (ER), à la progestérone (PR) et à la prolactine (PrlR). Pendant la gestation et la lactation, les cellules luminales dans les alvéoles synthétisent les protéines du lait (comme la β-caséine, WAP – de l'anglais « Whey Acidic Protein » - et β-lactoglobuline), et présentent des gouttelettes lipidiques dans leur cytoplasme (ce qui leur donne une taille plus importante à l'état différencié).

Les cellules myoépithéliales ont la particularité d'être contractiles, afin de permettre l'expulsion du lait vers les canaux. Ces cellules expriment spécifiquement les kératines 5 et 14, la molécule d'adhérence P-cadhérine, les cadhérines desmosomiques desmocolline-3 (Dsc-3) et desmogléine-3 (Dsg-3) et le facteur de transcription p63, marqueurs caractéristiques des couches basales des épithélia stratifiés. Les cellules myoépithéliales sont enrichies en intégrines, les récepteurs majeurs de la matrice extracellulaire, et notamment en intégrines comprenant la sous-unité β1 (pour revue, voir Raymond *et al.*, 2012). Par ailleurs, elles expriment les marqueurs de muscle lisse comme l'α-actine de muscle lisse (α-SMA), la myosine de muscle lisse et la calponine (pour revue, voir Deugnier *et al.*, 2002 ; Moumen *et al.*, 2011).

Au sein des alvéoles, les cellules myoépithéliales sont de forme étoilée permettant le contact des cellules sécrétrices avec la membrane basale sous-jacente, tandis que les cellules myoépithéliales canalaires sont allongées dans l'axe des canaux et organisées en une couche relativement continue (Fig. 5). De ce fait, dans les canaux, les cellules luminales ont un contact limité avec la membrane basale tandis que les cellules basales myoépithéliales, en permanence exposées aux signaux issus de la matrice extracellulaire sous-jacente et du stroma mammaire pourraient participer activement à la morphogenèse mammaire et être les médiateurs de la signalisation du stroma vers les cellules luminales.

Pendant la lactation, les cellules luminales alvéolaires sécrètent le lait qui est collecté dans les alvéoles et la lumière des canaux, tandis que les cellules basales myoépithéliales assurent les contractions synchronisées autour des alvéoles et le long des canaux qui sont nécessaires au transport du lait jusqu'au mamelon (Moumen *et al*., 2011). Ces contractions sont induites par la libération d'ocytocine, elle-même stimulée par un réflexe neural lors de l'allaitement de la progéniture.

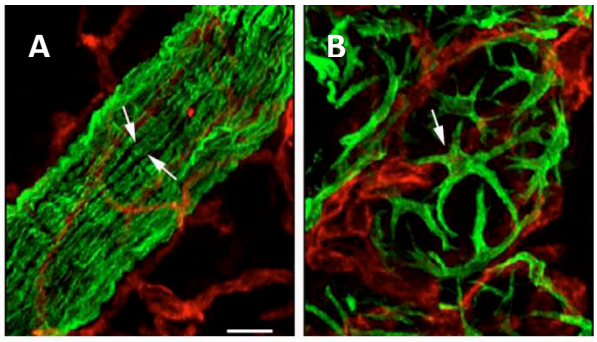


Figure 5 : Morphologie des cellules myoépithéliales canalaires et alvéolaires

Double immuno-marquage avec un anticorps anti-K5 (en vert, révélant les cellules myoépithéliales), et anti-CD31 (en rouge, révélant les vaisseaux), sur des coupes de glandes mammaires de souris. Les flèches indiquent les cellules myoépithéliales allongées (A) et étoilées (B).
(A) Souris vierge adulte âgées de 10 semaines.
(B) Souris à jour 2 de lactation.
Barre d'échelle : 30 µm (A) et 10 µm (B).
(Modifié d'après Moumen *et al.,* 2011)

1.1.2 Le stroma mammaire

L'ensemble de la structure épithéliale est entouré d'une membrane (ou lame) basale, constituée essentiellement de laminines, nidogène, collagènes et protéoglycanes (pour revue, voir Maller *et al*., 2010). La membrane basale sépare l'épithélium du tissu conjonctif adjacent

appelé stroma mammaire et composé d'adipocytes, de fibroblastes, de cellules immunitaires, de vaisseaux sanguins et lymphatiques, de fibres nerveuses ainsi que des constituants de la matrice extracellulaire (Richert *et al*., 2000). Les adipocytes sont les cellules majoritaires du stroma mammaire et sont à l'origine du nom de coussin adipeux. Les différents signaux systémiques et paracrines délivrés par l'ensemble des cellules stromales sont essentiels à la croissance canalaire de la glande mammaire pendant la puberté, ainsi que lors du développement lobulo-alvéolaire au cours de la gestation (pour revue, voir Tanos & Brisken, 2008).

1.1.3 Ciblage des cellules épithéliales mammaires basales et luminales

Des nombreuses études du développement et de la tumorigenèse mammaires reposent sur l'utilisation de modèles transgéniques comportant soit une invalidation génique totale (en anglais « knock-out ») soit une déficience ou une surexpression ciblées spécifiquement dans l'épithélium mammaire (pour revue, voir Faraldo *et al*., 2005 ; Allred & Medina, 2008). Parmi les promoteurs spécifiques de l'épithélium mammaire couramment utilisés on distingue notamment le promoteur MMTV-LTR (plus communément appelé MMTV, de l'anglais « Mouse Mammary Tumour Virus ») ou encore les promoteurs des gènes codant pour les protéines WAP (de l'anglais « Whey Acidic Protein ») et BLG (pour β-lactoglobulin). Dans l'ensemble, ces promoteurs sont spécifiquement activés dans les cellules luminales, chez l'animal vierge (pour MMTV) ou au cours de la gestation (MMTV, WAP) et de la lactation (MMTV, WAP et BLG). D'autres promoteurs sont également utilisés afin de cibler les cellules basales épithéliales mammaires, comme les promoteurs des gènes codant pour les cytokératines K5 et K14, actifs dans les premières étapes du développement.

1.2 Morphogénèse de la glande mammaire : les étapes clés du développement

Chez la souris, comme chez les autres mammifères, la morphogenèse de la glande mammaire est très limitée durant la vie embryonnaire et a lieu principalement après la naissance, sous l'influence du système hormonal. On distingue trois étapes successives dans le développement post-natal de la glande mammaire : la croissance et la ramification

canalaires chez la souris pubère, le développement lobulo-alvéolaire et la différenciation lactogénique pendant la gestation, et l'involution de la glande à la fin de la lactation (Fig. 6). Chacune de ces étapes est contrôlée par des régulateurs hormonaux et des interactions paracrines distinctes (pour revue, voir Sternlicht, 2006 ; Brisken & Rajaram, 2006).

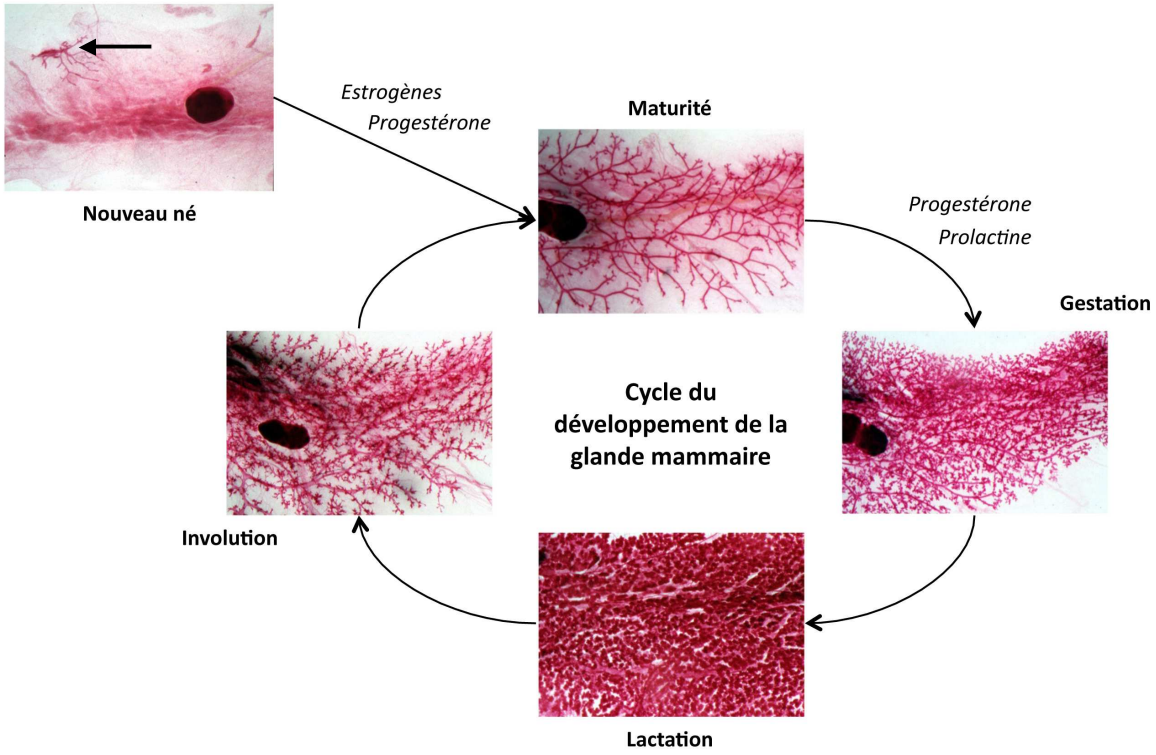


Figure 6 : Développement post-natal de la glande mammaire murine

Photographies de montage de glandes mammaires *in toto* colorées au rouge carmin, à différentes étapes du développement post-natal. A la naissance, l'épithélium mammaire est rudimentaire (flèche) puis, sous l'influence des hormones, il se développe à travers tout le coussin adipeux au cours de la puberté, pour donner une glande mammaire mature. Pendant la gestation et la lactation, la glande mammaire se différencie afin de produire du lait. A la fin de la lactation, le tissu sécrétoire est éliminé par apoptose au cours de l'involution, et la glande mammaire retrouve un état quiescent jusqu'à une nouvelle gestation.

1.2.1 Développement embryonnaire de la glande mammaire

Le développement embryonnaire mammaire est limité principalement à la formation d'ébauches mammaires. Chez la souris, il débute au cours de la seconde moitié de la gestation (E11,5), lorsque les lignes mammaires apparaissent le long de l'axe crânio-caudal et forment cinq placodes localisées aux sites des futurs mamelons (Fig. 7). On assiste alors au niveau de chaque placode à une invagination de l'épithélium afin de former un rudiment mammaire primaire qui commence à pénétrer le mésenchyme sous-jacent (E14,5), ébauche du futur coussin adipeux mammaire (pour revue, voir Veltmaat *et al.*, 2003 ; Robinson, 2007).

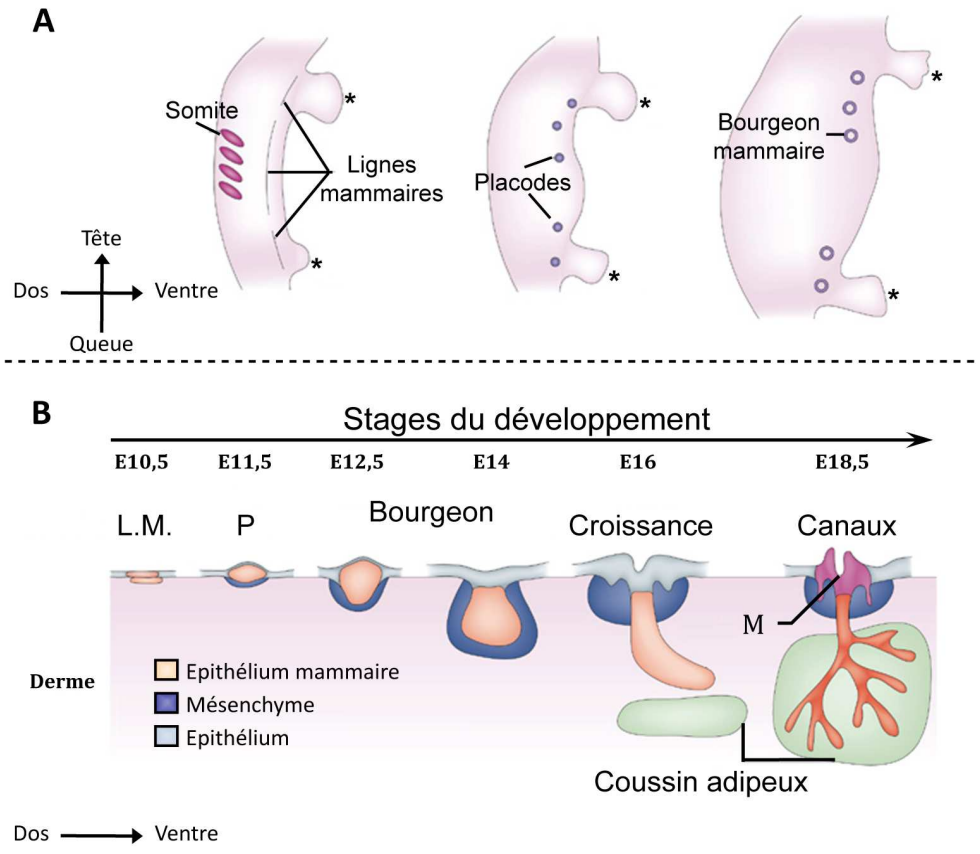


Figure 7 : Développement embryonnaire de la glande mammaire murine

(A) Représentation schématique de la position des lignes mammaires chez l'embryon de souris au 10^{e} jour embryonnaire (E10), qui vont former des placodes à E11,5 puis des bourgeons mammaires à partir de E12,5. Les * indiquent les ébauches des futurs membres supérieurs et inférieurs.
(B) Etapes du développement des lignes mammaires (L.M.) en placodes (P) puis en bourgeons. A E18,5, le mamelon (M) se forme et des canaux épithéliaux rudimentaires apparaissent au sein du coussin adipeux.
(Modifié d'après Robinson, 2007)

L'épithélium se développe ensuite en un nombre limité de branches et, à la naissance, seule une arborescence canalaire rudimentaire est présente dans le stroma mammaire. Parmi les signaux intervenant dans le développement mammaire embryonnaire, on notera notamment les rôles importants des protéines solubles des familles Wnt et FGF (Mailleux *et al*., 2002 ; Veltmaat *et al*., 2004). Il a été montré également que le développement de la glande mammaire au cours de la période embryonnaire est indépendant des œstrogènes et de la progestérone (Hovey *et al*., 2002 ; Hens & Wysolmerski, 2005).

1.2.2 Puberté : croissance canalaire de la glande mammaire

La majeure partie de la mammogenèse se déroule lors de la vie postnatale. Les étapes essentielles de la morphogenèse mammaire sont résumées en Figure 6.

De la naissance à la puberté, le réseau canalaire mammaire est très rudimentaire et ne comprend que des ramifications secondaires peu nombreuses reliées à un canal primaire directement connecté au mamelon. Jusqu'à ce stade et en dépit du fait que le canal primaire soit déconnecté du mamelon chez le mâle, la taille de l'épithélium mammaire diffère peu entre le mâle et la femelle. Il faut attendre le début de la puberté, lorsque de larges structures bulbaires – nommées bourgeons terminaux (TEBs, de l'anglais « Terminal End Buds ») prennent naissance aux extrémités distales des canaux chez la femelle, pour voir s'établir un dimorphisme sexuel marqué de la glande mammaire. Avec la puberté, à partir d'environ quatre semaines, sous l'influence des hormones sexuelles, et particulièrement des œstrogènes, les TEBs sont le siège d'une prolifération cellulaire intense afin de permettre aux canaux de progresser rapidement par élongation dans le stroma jusqu'à atteindre les limites du coussin adipeux mammaire. Ils contribuent de cette façon à la mise en place d'un réseau de canaux ramifiés ayant entièrement envahi le stroma, caractéristique des femelles vierges adultes. Les TEBs sont constitués de deux types cellulaires morphologiquement distincts : une couche cellulaire externe, constituée de cellules apicales de type basal, précurseurs des cellules myoépithéliales, et une multicouche de cellules internes, ou cellules du corps du bourgeon, dont sont issues les cellules luminales (Fig. 8) (Hinck & Silberstein, 2005 ; Sternlicht, 2006 ; Visvader, 2009).

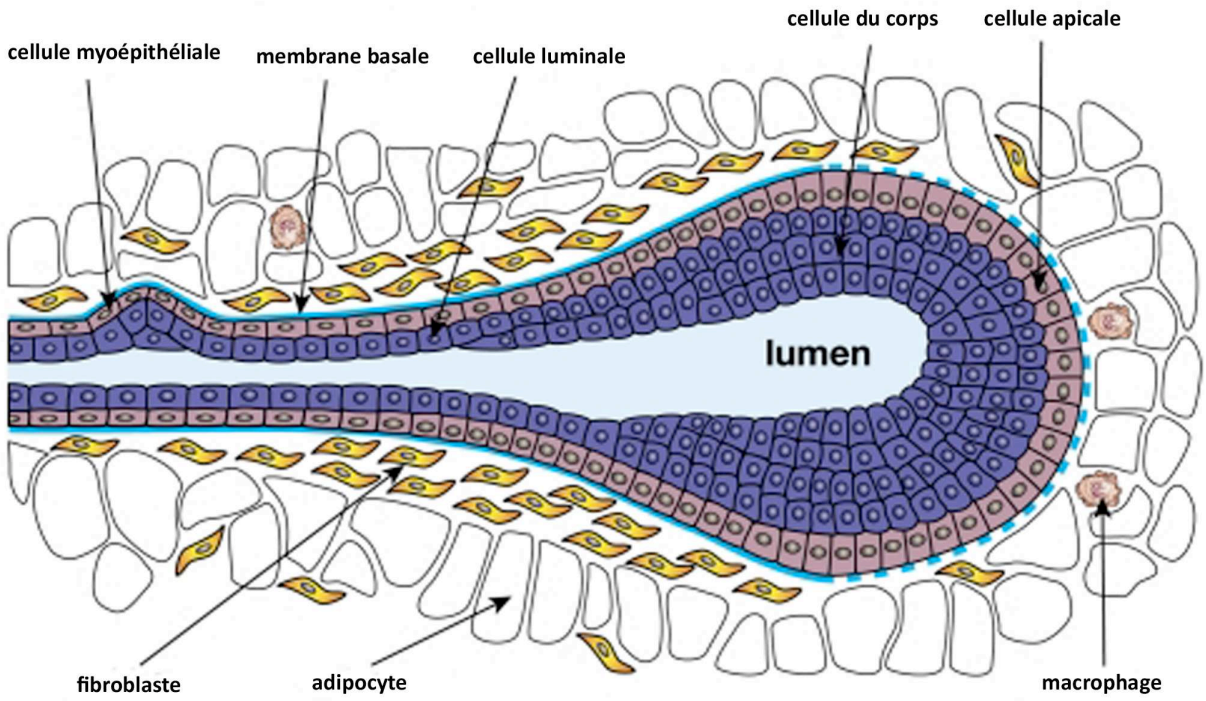


Figure 8 : Représentation schématique de l'organisation d'un bourgeon terminal (TEB)

Au cours de la puberté, les TEBs croissent à travers le stroma jusqu'à atteindre les extrémités du coussin adipeux. Les cellules apicales, de type basal, expriment notamment le marqueur p63 et constituent les précurseurs des cellules basales myoépithéliales. Les cellules du corps du TEBs sont organisées en plusieurs couches et expriment les marqueurs de type luminal K8/K18. Ils sont l'origine des cellules luminales.
(Modifié d'après Visvader, 2009)

Dans les TEBs, les cellules du corps expriment majoritairement les kératines luminales, alors que les cellules apicales sont positives pour l'actine de muscle lisse et p63. La lumière des canaux est formée par apoptose des cellules du corps lors de la croissance des TEBs. En effet, l'inactivation du gène *Bim* a montré l'importance de ce facteur pro-apoptotique dans la formation de la lumière des canaux mammaires (Mailleux *et al*., 2007).

Les principaux régulateurs de la croissance canalaire et de la prolifération des TEBs pendant la puberté sont les œstrogènes et l'hormone de croissance (Daniel *et al*., 1987 ; Silberstein *et al*., 1994 ; Brisken & O'Malley, 2010). Les œstrogènes possèdent deux récepteurs distincts, les récepteurs aux œstrogènes de type α (ERα) et de type β (ERβ), le premier étant le plus important au cours du développement mammaire (Mueller *et al*., 2002 ; Forster *et al*., 2002). L'inactivation du gène codant pour ERα chez la souris entraine une absence de TEBs dans les glandes mammaires, empêchant ainsi la croissance canalaire (Bocchinfuso *et al*., 2000 ; Mallepell *et al*., 2006 ; Feng *et al*., 2007). La sécrétion de l'hormone de croissance par la glande pituitaire est également nécessaire au cours de la

puberté. En effet, cette hormone active son récepteur dans le stroma mammaire, entrainant la production d'IGF1, qui stimule localement la prolifération des cellules épithéliales mammaires (Ruan *et al*., 1992 ; Kleinberg *et al*., 2000). Par ailleurs, l'épithélium mammaire sécrète le facteur de croissance TGFβ, qui a une action inhibitrice locale sur la croissance et les ramifications canalaires (Ewan *et al*., 2002 ; pour revue, voir Hinck & Silberstein, 2005). La progestérone participe également, dans une moindre mesure, à la morphogenèse canalaire à la fin de la puberté, en induisant la formation de branches latérales lorsque l'épithélium mammaire est complètement développé (Atwood *et al*., 2000). Nous présenterons plus tard de façon détaillée le mécanisme d'action de la progestérone, qui joue un rôle essentiel dans le développement mammaire au cours de la gestation.

Plusieurs modèles de souris transgéniques ont montré les rôles importants d'autres molécules, d'origine épithéliale ou stromale, dans la croissance et la ramification de l'épithélium mammaire au cours de la puberté. On notera notamment l'importance de l'amphiréguline, appartenant à la famille EGF (Ciarloni *et al*., 2007 ; Luetteke *et al*., 1999), le facteur de transcription C/EBPβ (Seagroves *et al*., 1998), les protéases qui dégradent la matrice extracellulaire MMP-2 et MMP-3 (Wiseman *et al*., 2003), ou encore, le facteur de transcription Gata-3 (Kouros-Mehr *et al*., 2006 ; Asselin-Labat *et al*., 2007). À la fin de la puberté, vers l'âge de 8-9 semaines, lorsque les extrémités du stroma mammaire sont atteintes, les TEBs cessent de croître puis régressent et le coussin adipeux mammaire est alors occupé par un système canalaire ramifié mature (Sternlicht, 2006). La glande mammaire entre dans la phase adulte et se trouve alors dans un état quiescent, jusqu'à la gestation.

1.2.3 Gestation – Lactation : morphogenèse lobulo-alvéoalaire

Le développement lobulo-alvéolaire est déclenché lors de chaque gestation (cycle reproductif). Au cours de cette étape, la glande mammaire subit une morphogénèse globale initiée avec la formation de branches épithéliales latérales supplémentaires ainsi que de bourgeons alvéolaires latéraux, et les cellules luminales prolifèrent rapidement. C'est à partir de la seconde moitié de la gestation, que débute la phase de différenciation alvéolaire, au cours de laquelle les cellules luminales se différencient en cellules alvéolaires sécrétrices de lait. Parallèlement à cette expansion du tissu épithélial, des modifications importantes s'opèrent également dans le stroma mammaire. Les adipocytes perdent leur contenu lipidique

(Neville *et al*., 1998) et le réseau vasculaire se développe de manière importante afin d'apporter l'énergie et les nutriments nécessaires à la production de lait (Djonov *et al*., 2001).

La régulation de la morphogénèse alvéolaire est principalement assurée par l'action de deux hormones : la progestérone, qui permet l'expansion du compartiment épithélial, et la prolactine, qui induit la différenciation des cellules luminales (Brisken & O'Malley, 2010).

Comme mentionné précédemment, la progestérone participe à la formation de branches épithéliales latérales durant la puberté, et cette activité reprend de façon intensive au cours de la gestation par le développement des alvéoles. En effet, il a été montré que l'inactivation des deux récepteurs à la progestérone, PR-A et PR-B, perturbe le développement alvéolaire (Lydon *et al*., 1995 ; Brisken *et al*., 1998). Cependant, seul PR-B est nécessaire à l'action proliférative de la progestérone sur les cellules épithéliales mammaires, car l'inactivation du gène codant pour PR-A n'a pas d'effet sur le développement mammaire (Mulac-Jericevic *et al*., 2000 ; Mulac-Jericevic *et al*., 2003). Les cellules épithéliales mammaires n'expriment pas toutes le récepteur à la progestérone. Des expériences de formation de glandes mammaires chimériques à partir de cellules épithéliales mammaires positives (PR+) et négatives (PR-) pour le récepteur à la progestérone ont montré que les cellules épithéliales PR- prolifèrent en réponse à la progestérone, indiquant ainsi la production de facteurs paracrines par les cellules PR+ induisant la prolifération des cellules PR- (Brisken *et al*., 1998). Parmi les cibles de la voie de signalisation de la progestérone, les protéines Wnt-4 et RANKL ont été identifiées comme les principaux facteurs responsables de la prolifération des cellules épithéliales mammaires négatives pour PR, en agissant de façon paracrine (Brisken *et al*., 2000 ; Fata *et al*., 2000). Ainsi, la production de Wnt-4 en début de gestation participe à la stimulation de la croissance de branches latérales. La cytokine RANKL va quant à elle permettre l'activation du facteur de transcription NF-κB, afin d'induire l'expression de la protéine Cycline D1 qui joue un rôle essentiel dans la formation et le maintien des structures alvéolaires (Cao *et al*., 2001 ; Conneely *et al*., 2003). De plus, comme nous le décriront plus tard, RANKL joue un rôle essentiel dans la régulation des cellules souches mammaires par les hormones ovariennes (Asselin-Labat *et al*., 2010 ; Joshi *et al*., 2010).

La prolactine (Prl) est une hormone pituitaire qui possède deux rôles essentiels au cours de la reproduction : le maintien du corps jaune dans l'ovaire en début de gestation, assurant la production d'œstrogènes et de progestérone, et le développement de la glande

mammaire, en agissant directement sur les cellules épithéliales mammaires. Il a été mis en évidence que le récepteur à la prolactine (PrlR) joue un rôle crucial au cours de la deuxième moitié de la gestation, en stimulant la différenciation alvéolaire (Ormandy *et al*., 1997).

De façon intéressante, la progestérone induit l'expression de PrlR alors que la prolactine induit celle de PR, suggérant que ces hormones interagissent de manière synergique afin de contrôler le développement alvéolaire. En outre, l'étude des souris déficientes pour PR et PrlR a révélé des phénotypes similaires, principalement l'absence d'un compartiment alvéolaire fonctionnel, indiquant une coopération entre les voies de signalisation Prl et progestérone (Ormandy *et al*., 1997 ; Lydon *et al*., 1995). La liaison de la Prl sur son récepteur active la voie de signalisation JAK/STAT, permettant au facteur de transcription STAT5 d'induire l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la prolifération et la différenciation alvéolaires. Parmi ces gènes, on retrouve le gène codant pour RANKL (Srivastava *et al*., 2003), ainsi que le gène codant pour l'IGF-2 (Brisken *et al*., 2002). La Prl induit par ailleurs l'expression de protéines du lait, comme WAP ou la β-caséine (Miyoshi *et al*., 2001). L'expression du facteur de transcription Elf5 est également sous le contrôle de la voie de signalisation de la Prl, et il a été montré récemment qu'Elf5 joue un rôle crucial dans la différenciation des cellules luminales au cours de la gestation (Oakes *et al*., 2008).

Outre la progestérone et la prolactine, d'autres facteurs importants interviennent dans la morphogénèse alvéolaire. Il s'agit principalement des récepteurs à tyrosine kinase de la famille EGF (ERBB), et de leurs ligands (Luetteke *et al*., 1999). En effet, l'inactivation du gène *ErbB4* dans l'épithélium mammaire entraine une altération du développement alvéolaire (Jones *et al*., 1999 ; Long *et al*., 2003). Le facteur de transcription Gata-3 est également un acteur important de la morphogénèse alvéolaire, grâce à son rôle dans la régulation de la différenciation des cellules luminales (Kouros-Mehr *et al*., 2006 ; Asselin-Labat *et al*., 2007).

Ainsi, à la fin de la gestation, la glande mammaire a atteint une différenciation complète et est prête à sécréter du lait. Au moment de la naissance, la production de protéines du lait augmente davantage, les jonctions serrées des cellules alvéolaires se ferment et le lait est sécrété dans la lumière alvéolaire (Neville *et al*., 2002). Ce processus requiert l'arrêt de production de progestérone. Puis l'allaitement se met en place et la succion des mamelons par les nouveaux-nés commence. Le niveau élevé de prolactine permet alors le maintien de l'expression des gènes codant pour les protéines du lait. Une autre hormone, l'ocytocine, est impliquée au cours de cette étape en induisant la contraction des cellules basales

myoépithéliales afin d'expulser le lait produit par les alvéoles vers les canaux, et ensuite l'éjecter à travers le mamelon.

L'ensemble des régulateurs du développement postnatal de la glande mammaire est résumé dans la Figure 9.

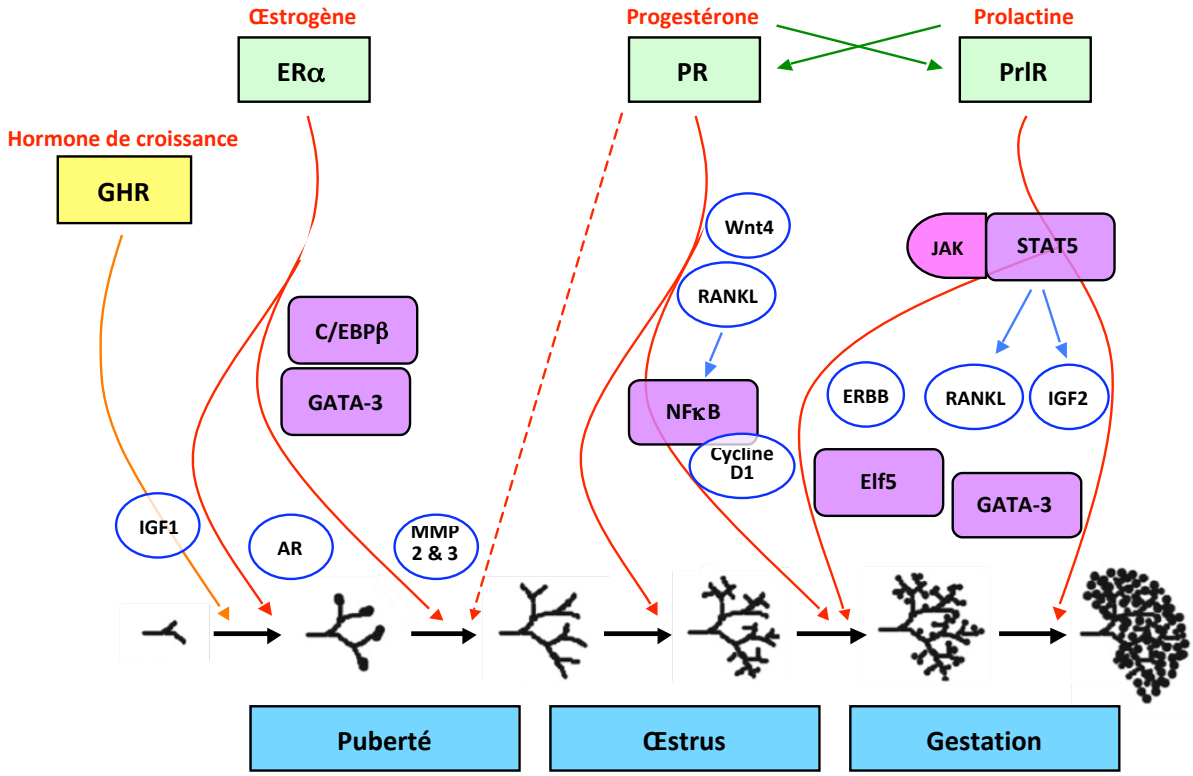


Figure 9 : Principaux facteurs impliqués dans le développement de la glande mammaire

Les principaux régulateurs de la croissance canalaire pendant la puberté sont les œstrogènes et l'hormone de croissance. L'IGF1 stimule localement la prolifération des cellules épithéliales. Au début de la gestation, la progestérone induit la production de Wnt-4 qui est responsable de la croissance des branches latérales, et de RANKL qui permet la formation et le maintien des structures alvéolaires. La progestérone induit l'expression du récepteur à la prolactine (PrlR) et la prolactine induit celle du récepteur à la progestérone (PgR) (flèches vertes). La fixation de la prolactine sur son récepteur active la voie de signalisation JAK/STAT5 induisant l'expression de RANKL, IGF2, Elf5 et GATA3 permettant la morphogenèse alvéolaire et la différenciation des cellules luminales.
(Modifié d'après Brisken & O'Malley, 2010)

1.2.4 Involution : apoptose et remodelage de la glande mammaire

La période de lactation dure environ 3 à 4 semaines et sa fin est signalée mécaniquement, par le sevrage des petits et l'arrêt progressif du stimulus de succion sur le mamelon. L'accumulation du lait induit alors l'involution, une étape cruciale de remodelage de la glande mammaire, qui conduit à la régression du tissu alvéolaire par apoptose. Au cours de l'involution, environ 80% de l'épithélium mammaire est éliminé en l'espace d'une semaine (Watson, 2006).

La période d'involution est caractérisée par deux phases. Durant la première étape, l'accumulation du lait dans les canaux induit l'apoptose des cellules alvéolaires (Quarrie *et al*., 1996). Cette étape, réversible en cas de reprise de succion par les nourrissons dans les deux jours après son commencement, est caractérisée d'un point de vue morphologique par le détachement des cellules luminales dans la lumière des alvéoles. Parmi les molécules impliquées dans cette première étape, le facteur de transcription STAT3 et les cytokines LIF et TGFβ3 jouent un rôle essentiel (Kritikou *et al*., 2003 ; Schere-Levy *et al*., 2003 ; Nguyen & Pollard, 2000 ; Sutherland *et al*., 2006). La protéine p53 est également un régulateur physiologique important durant cette étape de l'involution. Activée suite à l'arrêt de succion des petits, p53 va induire rapidement l'expression de gènes pro-apoptotiques, permettant l'élimination des cellules sécrétrices (Jerry *et al*., 1998).

A partir du troisième jour, la deuxième étape de l'involution débute de manière irréversible. L'apoptose de l'épithélium mammaire se poursuit, accompagnée d'un remodelage important du tissu mammaire. Pendant cette étape, les MMP (protéases de la matrice extracellulaire) sont fortement exprimées et participent à la dégradation de la matrice (Green & Lund, 2005). Les adipocytes du stroma se développent et envahissent l'espace occupé préalablement par le tissu épithélial sécrétoire (Watson, 2006).

Ainsi, à la fin de l'involution, la glande mammaire retrouve une morphologie post-pubertaire et retourne à un état quiescent, jusqu'à l'avènement d'une nouvelle gestation.

1.3 Les cellules souches dans la glande mammaire

Les cellules souches tissulaires adultes sont caractérisées par leur aptitude à régénérer à long terme et à l'état isolé leur tissu d'origine dans sa structure et sa fonction. Elles présentent une propriété fonctionnelle essentielle, l'autorenouvellement, défini par la capacité à engendrer au moins une cellule fille équivalente à la cellule mère, en longévité et aptitude à la différenciation. Les cellules souches sont dites multipotentes lorqu'elles donnent naissance aux différents lignages de leur tissu d'origine, unipotentes si leur destin est restreint à un seul lignage. Les capacités de développement et de régénération de la glande mammaire suggèrent que l'épithélium mammaire abrite des cellules souches. DeOme et ses collaborateurs furent les premiers à émettre cette hypothèse, en observant que des fragments d'épithélium isolés de différentes régions de la glande mammaire étaient capables de reconstituer une arborescence canalaire complète après transplantation orthotopique (Deome *et al*., 1959).

Le principe de cette technique consiste à greffer des fragments de glandes mammaires, ou des cellules épithéliales mammaires isolées, dans les coussins adipeux dépourvus d'épithélium mammaire endogène, chez des souris prépubères âgées de 3 semaines (Fig. 10). Plusieurs semaines après transplantation, les souris hôtes sont analysées et le développement des transplants mammaires est évalué. La transplantation au niveau de glandes mammaires controlatérales permet de comparer le potentiel de développement de deux fragments mammaires ou deux populations cellulaires mammaires dans le même animal et donc dans le même contexte hormonal. Par ailleurs, en effectuant des expériences de transplantations sériées, il est possible de tester les capacités régénératives à long terme de l'épithélium mammaire (Daniel *et al*., 1968). D'autres études ont également montré par la suite que les cellules ayant un potentiel régénératif important étaient présentes à tous les stades du développement et dans toutes les régions de la glande mammaire chez la souris (Smith & Medina, 1988 ; Young *et al*., 1971).

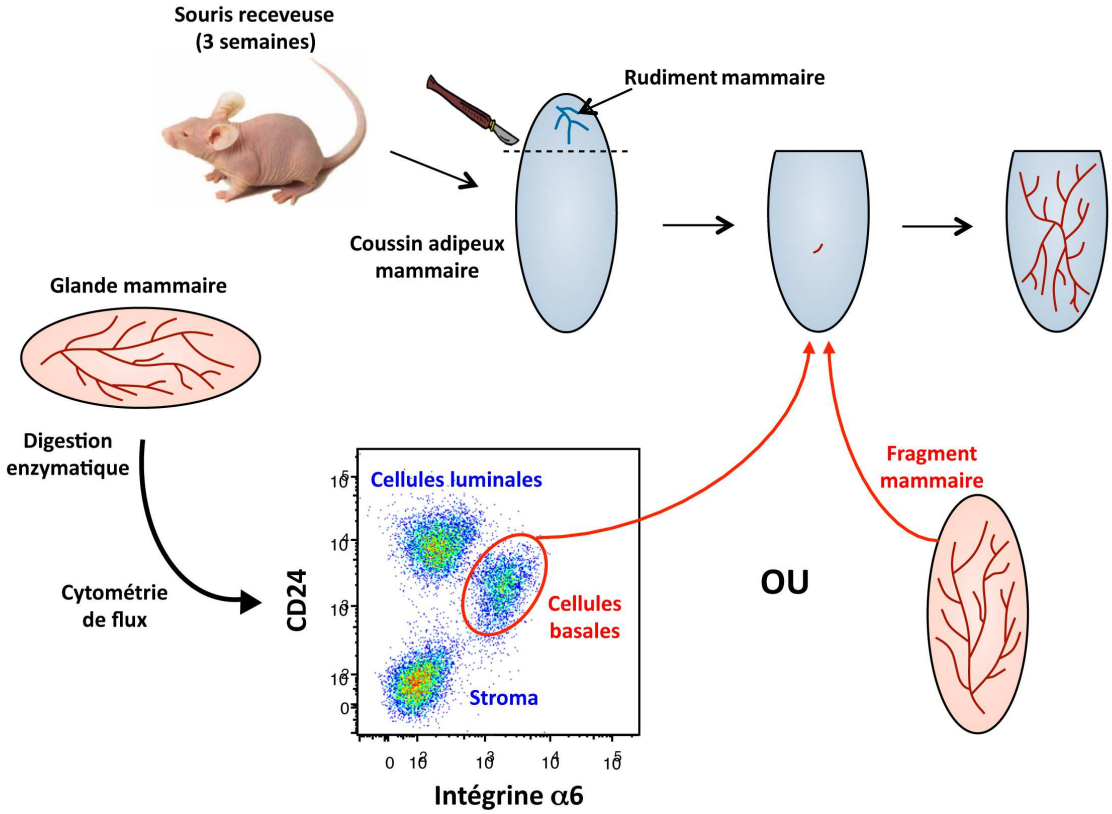


Figure 10 : Principe de la technique de transplantation mammaire

Les glandes mammaires #4 d'une souris hôte immunodéficiente prépubère (âgée d'environ 3 semaines) sont préparées préalablement à la transplantation afin de retirer par microchirurgie l'épithélium mammaire endogène. Puis un fragment d'épithélium (ou des cellules épithéliales isolées) d'une glande mammaire de souris donneuse est greffé dans la glande #4 de la souris hôte. 10-12 semaines après transplantation, les glandes mammaires greffées sont analysées afin d'évaluer la croissance épithéliale des transplants mammaires.

1.3.1 Mise en évidence des propriétés régénératives des cellules basales

En 2006, les différentes populations épithéliales de la glande mammaire adulte ont pu être purifiées grâce à l'utilisation de la cytométrie en flux et caractérisées par leur expression de marqueurs spécifiques de lignage (Shackleton *et al.*, 2006 ; Sleeman *et al.*, 2006 ; Stingl *et al.*, 2006).

En cytométrie en flux, les cellules basales myoépithéliales ont été localisées dans une population exprimant modérément la protéine de surface CD24, et fortement les sous-unités α6 et β1 des intégrines (population $CD24^{faible}$ $\alpha6^{fort}$ $\beta1^{fort}$) (Fig. 10). Les cellules luminales au contraire, présentent une forte expression CD24, ainsi qu'une faible expression des intégrines α6 et β1 (population $CD24^{fort}$ $\alpha6^{faible}$ $\beta1^{faible}$). Les cellules stromales sont quant à elles négatives pour l'expression de CD24. De plus, on distingue deux populations

fonctionnellement distinctes dans le compartiment luminal définies par l'expression différentielle du marqueur de surface Sca-1 (Sleeman *et al*., 2006 ; Sleeman *et al*., 2007). Les cellules luminales exprimant Sca-1 constituent une sous-population luminale enrichie en cellules ER+, exprimant le récepteur ERα, ainsi que les récepteurs PR et PrlR. En revanche, les cellules luminales négatives pour Sca-1 représentent une sous-population luminale majoritairement négatives pour ER.

Les essais de transplantation des populations cellulaires mammaires purifiées ont montré que seules les cellules basales à l'état isolé ont la capacité à régénérer une glande entière comprenant des canaux et des alvéoles organisés en bicouche (Shackleton *et al*., 2006 ; Stingl *et al*., 2006). Le potentiel régénératif des cellules basales est maintenu à long terme ainsi que le montrent les expériences de transplantations en série (Fig. 11). Ces travaux ont mené à la conclusion que des cellules souches mammaires multipotentes étaient localisées dans le compartiment épithélial basal et que celles-ci n'exprimaient pas les récepteurs hormonaux.

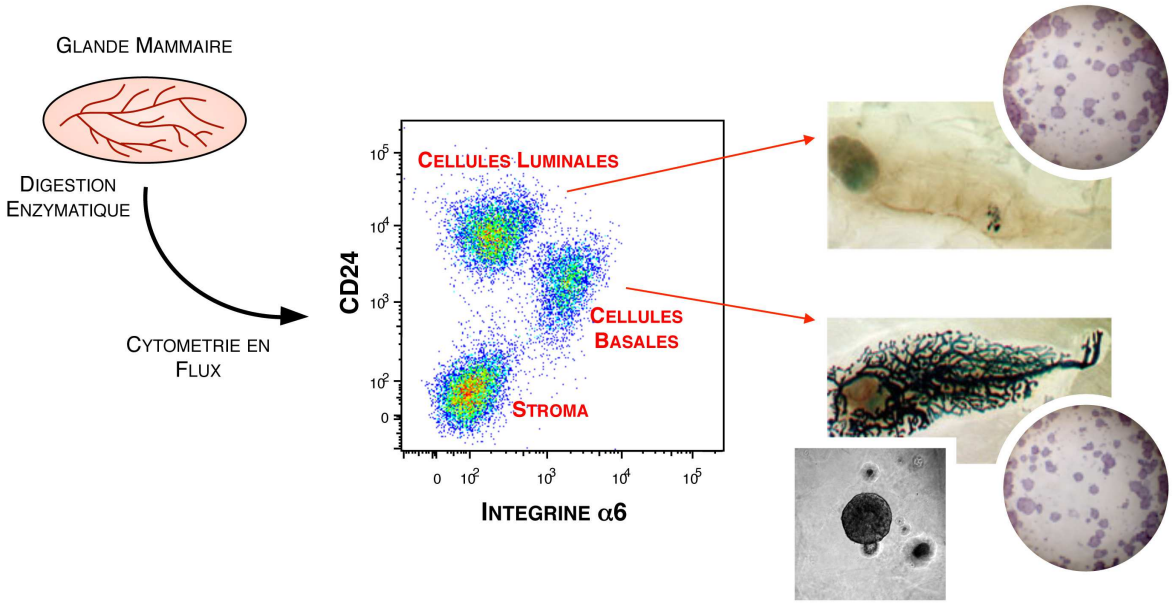


Figure 11 : Propriétés fonctionnelles des populations basales et luminales mammaires isolées par cytométrie en flux

Seules les cellules basales sont capables de régénérer un épithélium mammaire après transplantation *in vivo*. Elles forment également des colonies en culture bi- et tri- dimensionnelle (dites mammosphères). Les cellules luminales produisent des colonies clonales *in vitro*.

1.3.2 Propriétés clonogéniques des cellules épithéliales mammaires

De façon analogue au système hématopoïétique où l'existence d'une hiérarchie cellulaire est bien établie (Akashi *et al*., 2000), l'épithélium mammaire contiendrait des cellules progénitrices en amplification transitoire, issues des cellules souches par division asymétrique, donnant naissance aux cellules luminales et myoépithéliales des canaux et des alvéoles. Des tests de formation de colonies en deux et trois dimensions ont été utilisées afin d'identifier des progéniteurs mammaires possédant des capacités de développement plus limitées que les cellules souches (Fig. 11).

Les cellules basales ont la capacité de former des colonies en culture bidimensionnelle sur support de fibroblastes nourriciers (Stingl *et al*., 2006 ; Asselin-Labat *et al*., 2007). L'identité des cellules basales clonogéniques n'est pas fermement établie mais on considère que ces cellules ont des caractéristiques de cellules progénitrices.

Par le même type d'essai, des cellules clonogéniques ont été aussi identifiées dans le compartiment luminal de la glande mammaire murine. Elles ont été partiellement enrichies soit sur la base de leur expression en intégrine β3 (CD61), soit sur l'absence d'expression de Sca-1 (Asselin-Labat *et al*., 2007 ; Sleeman *et al*., 2007). Sleeman et ses collègues ont montré que la population de cellules luminales négative pour Sca-1 est enrichie en cellules clonogéniques (Ma-CFC, de l'anglais « Mammary Colony-Forming Cells ») et exprime peu les récepteurs hormonaux, alors que les cellules luminales positives pour Sca-1 sont majoritairement ER+ et sont caractérisées par une faible capacité à former des colonies *in vitro* (Sleeman *et al*., 2007 ; Regan *et al*., 2012).

Des essais de culture tridimensionnelle sur support non adhérent sont également utilisés pour analyser les propriétés fonctionnelles des cellules épithéliales mammaires. Ce test, initialement mis au point pour l'étude des cellules mammaires humaines, a été récemment adapté au modèle murin (Dontu *et al*., 2003 ; Spike *et al*., 2012). En présence de 2% de matrigel, on obtient des structures sphéroides d'origine clonale, nommées mammosphères, qui peuvent être repiquées plusieurs fois permettant ainsi de quantifier le potentiel clonogénique et d'autorenouvellement des cellules épithéliales mammaires, basales et luminales.

1.3.3 Modèle de ségrégation des lignages mammaires

L'ensemble des résultats obtenus dans les expériences de transplantation et de clonogénicité a conduit à proposer un modèle hypothétique de ségrégation des lignages épithéliaux mammaires chez la souris (Fig. 12A). Dans ce modèle les deux lignages mammaires dériveraient de rares cellules souches multipotentes de type basal donnant naissance à des cellules progénitrices à capacité de différenciation plus restreinte.

Des études récentes utilisant des stratégies de traçage cellulaire ont montré que les deux lignages mammaires ont pour origine des cellules embryonnaires précurseurs qui expriment les cytokératines basales K5 et K14 (Van Keymeulen *et al*., 2011 ; Moumen *et al*., 2012). Toutefois, durant la période postnatale, les cellules du compartiment basal ne contribuent pas de façon significative à la formation de la couche luminale indiquant que l'homéostasie de la glande mammaire adulte serait maintenue par deux types distincts de cellules souches ou progénitrices aux potentialités restreintes à chaque lignage (Fig. 12B) (Taddei *et al*., 2008 ; Van Keymeulen *et al*., 2011 ; van Amerongen *et al*., 2012). La participation possible de rares cellules souches/progénitrices bipotentes à l'homéostasie de l'épithélium mammaire adulte n'est pas exclue (van Amerongen *et al*., 2012).

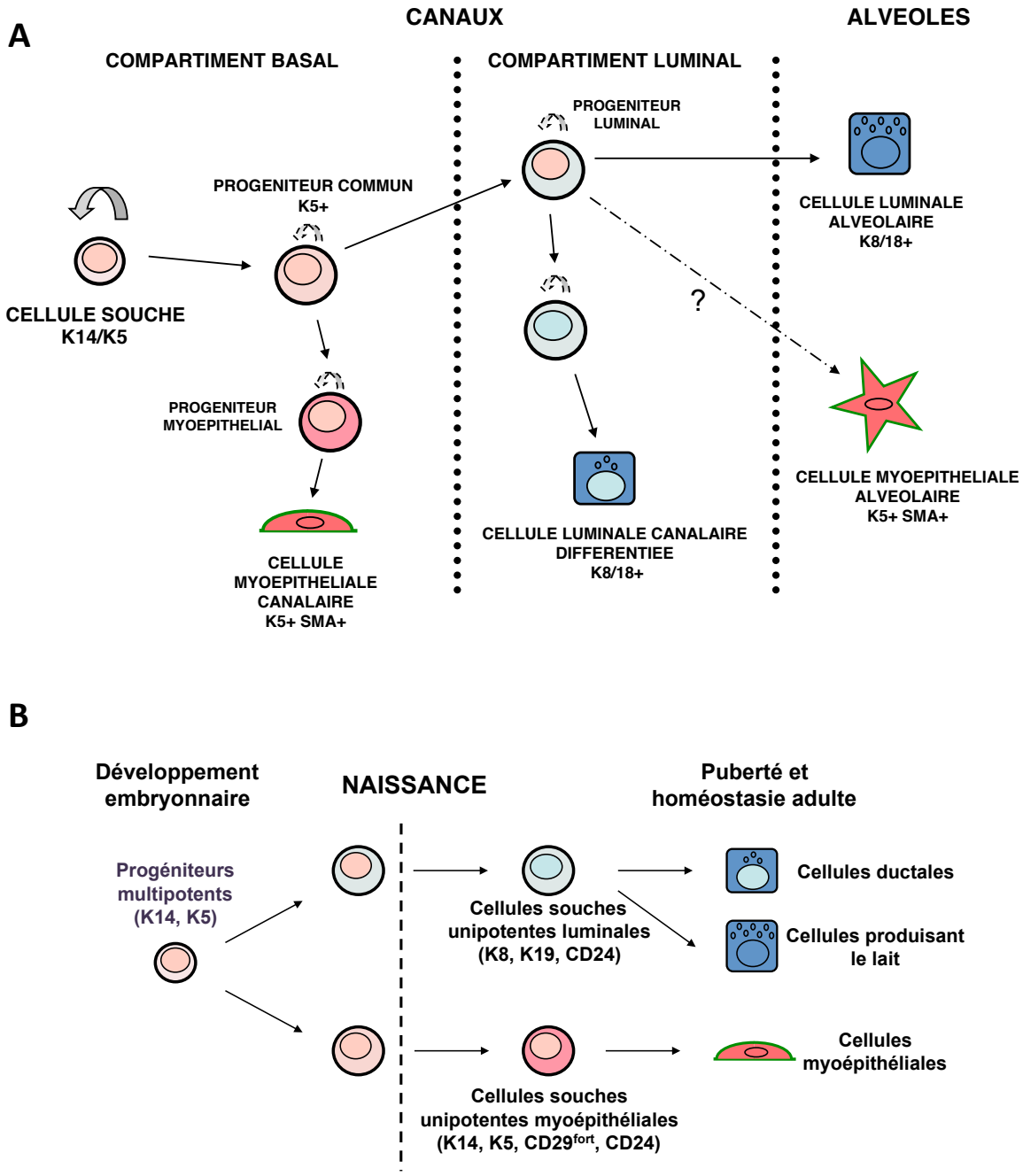


Figure 12 : Schéma hypothétique de la hiérarchie et de la mise en place des lignages épithéliaux mammaires

(A) Des cellules souches bipotentes ont été localisées dans le compartiment basal permettant la régénération d'une glande mammaire entière. De telles cellules souches donneraient un progéniteur commun, capable de générer deux types de progéniteurs : des progéniteurs myoépithéliaux conservant une localisation basale et des progéniteurs luminaux dans le compartiment luminal. Le premier type de progéniteurs pourrait se différencier en cellules myoépithéliales canalaires. Le second, en revanche, aurait la capacité de se différencier en cellules luminales canalaires, et lors de chaque gestation donneraient lieu à la formation des deux types de cellules composant les alvéoles : les cellules luminales alvéolaires et les cellules myoépithéliales alvéolaires.
(B) Les progéniteurs mammaires embryonnaires multipotents (K14+) engendreraient dès la naissance des cellules souches unipotentes distinctes, de type basal et luminal, qui assureraient l'expansion de la glande mammaire pendant la puberté et la grossesse (Modifié d'après Van Keymeulen *et al*., 2011).

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

Au cours des dernières années différents travaux utilisant notamment de modèles transgéniques ont commencé à élucider les signaux intervenant dans la régulation des fonctions des cellules souches et progénitrices mammaires.

Deux travaux récents ont rapporté le rôle crucial des hormones stéroidiennes, œstrogènes et progésterone dans le contrôle des fonctions des cellules souches mammaires (Asselin-Labat *et al*., 2010 ; Joshi *et al*., 2010). En effet, malgré l'absence d'expression des récepteurs ER et PR, les cellules souches du compartiment basal répondent à la stimulation hormonale pendant la gestation grâce à différents signaux paracrines provenant des cellules luminales ER+/PR+. Parmi ces signaux, le facteur RANKL jouerait un rôle essentiel (Asselin-Labat *et al*., 2010 ; Joshi *et al*., 2010).

Notre équipe a montré que l'invalidation du gène codant pour l'intégrine β1 dans les cellules exprimant K5 entraine une perte du potentiel régénératif de l'épithélium mammaire (Taddei *et al*., 2008). L'absence d'intégrine β1 altère l'orientation de l'axe de division des cellules basales de sorte que leur progénie identifiée par un marqueur génétique se trouve dans le compartiment luminal conduisant à l'épuisement de leur potentiel d'autorenouvellement. Par ailleurs, l'activité de la métalloprotéinase CD10, marqueur des cellules progénitrices, et l'adhésion à la matrice par les intégrines β1 sont nécessaires pour prévenir la différenciation des progéniteurs mammaires (Bachelard-Cascales *et al*., 2010). Ces travaux mettent en évidence l'importance des interactions entre les cellules basales et la matrice extracellulaire ainsi que le relargage de molécules de signalisation par l'action des protéases, dans le maintien d'une population de cellules souches mammaires fonctionnelles.

Une autre étude a montré l'importance du rôle du facteur Bmi1 dans la régulation des cellules souches mammaires (Pietersen *et al*., 2008). Bmi1 est une protéine du groupe Polycomb impliquée dans la répression d'inhibiteurs du cycle cellulaire (p16 et p19) et elle est nécessaire à l'autorenouvellement des cellules souches hématopoietiques et neurales (Molofsky *et al*., 2003 ; Park *et al*., 2003). Pietersen *et al*. ont montré que l'inactivation de *Bmi1* entraine des défauts sévères de croissance épithéliale mammaire *in vivo* au cours de la puberté, indiquant que le développement et le maintien des cellules souches mammaires dépendent en partie du facteur Bmi1 (Pietersen *et al*., 2008).

L'équipe de Nusse a révélé récemment l'existence dans la glande mammaire adulte d'une population répondant à la signalisation Wnt et enrichie en cellules souches à potentiel régénératif *in vivo* (Zeng & Nusse, 2010 ; van Amerongen *et al*., 2012 ; Zeng & Nusse, 2010). En culture, les facteurs Wnt stimulent l'expansion clonale des cellules souches mammaires qui peuvent être maintenues après de nombreux passages sans perdre leur potentiel de régénération. Ces données indiquent un rôle important de la voie de signalisation Wnt/β-caténine dans l'autorenouvellement des cellules souches mammaires.

Finalement, il a été rapporté que différents facteurs de transcription impliqués dans la mise en place de l'alvéologenèse (Section 1.2.3 de cette Introduction) jouent un rôle important dans le contrôle du développement du lignage luminal. Yamaji *et al*., ont montré que les défauts d'alvéologenèse et de lactation observés chez les souris dépourvues de STAT5 étaient corrélés à un défaut du nombre de cellules progénitrices (Yamaji *et al*., 2009). Les souris déficientes pour Gata-3 ou Elf-5 dans les cellules luminales de la glande mammaire présentent, au contraire, une augmentation aberrante du nombre de cellules luminales progénitrices (Kouros-Mehr *et al*., 2006 ; Asselin-Labat *et al*., 2007).

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

La transition épithélio-mésenchymateuse (EMT, de l'anglais « Epithelial-Mesenchymal Transition ») joue un rôle central dans l'embryogenèse, l'organogenèse, la régénération des tissus adultes et le processus tumoral (pour revue, voir Thiery *et al*., 2009). Les mécanismes d'EMT contrôlent la plasticité des cellules épithéliales en induisant la perte de leurs propriétés d'adhésion intercellulaire et de polarité cellulaire au profit d'un phénotype mésenchymateux incluant des propriétés de motilité cellulaire. Les facteurs de transcription Snail et Slug (codés respectivement par les gènes *Snai1 et Snai2*) jouent un rôle clé dans l'EMT notamment en réprimant directement l'expression de la E-cadhérine.

Dans la glande mammaire murine et humaine, seules les cellules basales expriment Slug et son niveau d'expression est particulièrement élevé en comparaison avec celui d'autres facteurs de transcriptions impliqués dans l'EMT (Proia *et al*., 2011 ; Guo *et al*., 2012). En 2008, deux études indiquaient que l'expression ectopique de Slug conférait à des cellules

épithéliales mammaires non-tumorigéniques des caractéristiques phénotypiques de cellules souches (Mani *et al*., 2008 ; Morel *et al*., 2008).

Plus récemment il a été rapporté que l'inactivation de *Snai2* (Slug) dans des cellules épithéliales mammaires humaines favorise un destin luminal (Proia *et al*., 2011). Chez la souris, l'équipe de Weinberg a montré que Slug est essentiel à l'activité des cellules souches mammaires et que son expression forcée dans les progéniteurs luminaux leur confère des propriétés de régénération mammaire, caractéristique fonctionnelle des cellules souches. Par ailleurs, la co-expression de Slug et Sox9 suffit à convertir une cellule luminale différenciée en cellule souche mammaire (Guo *et al*., 2012).

L'ensemble de ces travaux indique que les mécanismes de l'EMT jouent un rôle important dans l'acquisition des propriétés des cellules souches mammaires.

1.4 La tumorigenèse mammaire

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

1.4.1 Les cancers du sein

L'apparition d'hyperplasies épithéliales, qui consistent en la prolifération anormale de cellules, constitue l'étape précoce de la tumorigenèse mammaire. Ces hyperplasies peuvent évoluer ensuite en carcinomes *in situ*, localisés dans les canaux ou les lobules (on parle de carcinomes canalaires ou lobulaires). La croissance progressive de ces carcinomes peut entrainer leur expansion au delà de la membrane basale, les rendant alors invasifs. Les cellules tumorales envahissent le tissu conjonctif mammaire et peuvent atteindre les ganglions lymphatiques et d'autres tissus via le système circulatoire, où elles forment des métastases.

Plusieurs facteurs de risque de cancer du sein ont été identifiés, comme par exemple une puberté précoce, une absence de grossesse ou encore une grossesse tardive (pour revue, voir 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. A 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.

D'un point de vue histologique, les tumeurs du sein peuvent être globalement séparées en deux groupes : d'une part, les carcinomes d'origine canalaire (70 à 80% des cas de cancers du sein), et d'autre part, les carcinomes d'origine lobulaire (10 à 15%). Les carcinomes canalaires présentent un pronostic clinique variable, dépendant des caractéristiques morphologiques cellulaires, ainsi que de l'expression des récepteurs hormonaux ER et PR, ou encore le marqueur de prolifération Ki67. Les carcinomes lobulaires constituent le deuxième type de tumeurs mammaires les plus diagnostiquées. 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 (Berx *et al*., 1996 ; Cleton-Jansen, 2002). 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. L'expression des récepteurs hormonaux ER et PR donne une information essentielle sur la réponse prévisible des tumeurs mammaires aux thérapies hormonales. L'expression du récepteur à tyrosine kinase ErbB2 est également un bon facteur prédictif de la réponse thérapeutique des tumeurs mammaires. Les patientes développant des tumeurs ErbB2+ bénéficient d'un traitement thérapeutique ciblé, l'Herceptine, un anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur ErbB2. D'autres marqueurs moléculaires sont également utilisés pour prévoir l'évolution 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, ou stade G0.

Le compartiment stromal mammaire joue également un rôle important dans le développement et la progression des carcinomes mammaires. Plusieurs travaux indiquent que la croissance tumorale requiert des interactions stromales locales et systémiques, permettant la régulation de la croissance néoplasique de l'épithélium mammaire (pour revue, voir Place *et al*., 2011). Le groupe de Weinberg a par ailleurs montré que la présence de cellules souches mésenchymateuses avec des cellules cancéreuses mammaires augmente de façon significative la dissémination des cellules cancéreuses via l'action paracrine de la chimiokine CCL5 (Karnoub *et al*., 2007). Ces données suggèrent que la composition du stroma peut profondément influencer la progression et le potentiel métastatique des cellules de cancer du sein (pour revue, voir Place *et al*., 2011).

1.4.2 Classification moléculaire des cancers du sein

Le cancer du sein est une maladie très hétérogène au plan histologique mais aussi moléculaire. Au cours de ces dernières années, l'analyse des profils transcriptionnels des tumeurs mammaires humaines a révélé différentes signatures moléculaires permettant d'affiner la classification des cancers du sein.

Initialement, Charles Perou et ses collaborateurs ont constaté que les tumeurs ER+ et les tumeurs ER- constituent deux entités bien distinctes en termes moléculaires (Fig. 13). Ces travaux ont identifié cinq sous-groupes tumoraux sur la base de leur profil d'expression génique : deux groupes caractérisés par l'expression de marqueurs luminaux (tumeurs luminales de type A et B) comprenant majoritairement des tumeurs ER+, et généralement associées à un bon prognostic clinique. Les trois groupes restants, constituant essentiellement des tumeurs ER-, sont les cancers de type basal, surexprimant le récepteur ErbB2 (HER2 chez L'Homme ; ErbB2+ ou HER2+) et de type « normal-like » (Perou *et al*., 2000 ; Sorlie *et al*., 2001 ; Sorlie *et al*., 2003). Les tumeurs ER- sont très souvent de haut grade, proliférantes, non différenciées, et associées à un pronostic clinique sévère.

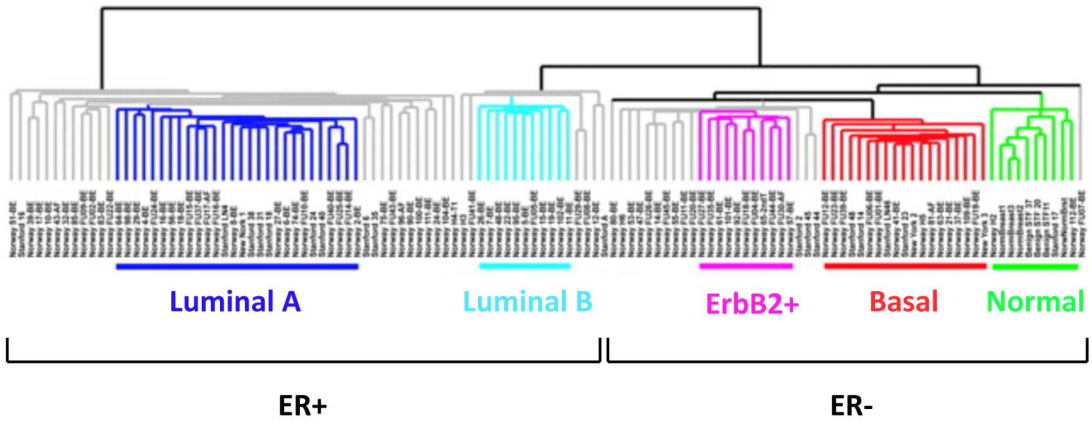


Figure 13 : Classification moléculaire des cancers du sein

Classification hiérarchique ascendante à partir de tumeurs mammaires issues de 115 patientes, permettant de classer les tumeurs en cinq sous-groupes, en fonction de leurs niveaux d'expression d'une liste de plus de 530 gènes. On distingue les tumeurs de type luminal (luminal A et luminal B), qui sont notamment positives pour le récepteur aux œstrogènes (ER+). Les trois autres sous-groupes sont caractérisés par l'absence d'expression de ER (ER-) : le sous-groupe ErbB2+, présentant une amplifiaction du locus ErbB2, le sous-groupe "basal", caractérisé par l'expression de marqueurs cellulaires de type basal, et le sous-groupe "normal-like".
(Modifié d'après Sorlie *et al*., 2003)

Ces dernières années, des études plus approfondies ont mis en évidence l'existence de deux nouveaux types moléculaires de cancer du sein: le groupe de tumeurs dites « claudin-low » caractérisées par une faible expression des marqueurs de jonction cellulaire, une augmentation des marqueurs de l'EMT, ainsi qu'une faible expression des marqueurs de différenciation luminale (Prat *et al*., 2010), et le groupe de tumeurs dites « apocrines » (Farmer *et al*., 2005) caractérisées par l'expression du récepteur aux androgènes (pour revue, voir Visvader, 2009 ; Reis-Filho & Pusztai, 2011).

Récemment, la combinaison d'analyses génomiques et transcriptionnelles d'un grand nombre de tumeurs du sein (2000 échantillons) a révélé de nouveaux sous-groupes à l'intérieur des cinq groupes décrits, avec des pronostics cliniques différents (Curtis *et al*., 2012). L'analyse globale des tumeurs du sein en utilisant des méthodes à grande échelle (incluant le nombre de copies d'ADN génomique, la méthylation de l'ADN, l'analyse transcriptomique, le séquençage des microRNAs et l'analyse des protéines en chromatographie en phase reverse), a confirmé que les différentes altérations génétiques et épigénétiques, convergent en quatre phénotypes majeurs des cancers du sein, les tumeurs luminales de type A et B, les tumeurs ErbB2+ et les « basal-like » (Cancer Genome Atlas Network, Comprehensive molecular portraits of human breast tumours, Nature, 2012).

Cette classification moléculaire confirme donc l'hétérogénéité du cancer du sein, observée au niveau histologique, et souligne l'importance du statut des récepteurs aux œstrogènes.

1.4.3 Les tumeurs du sein de type basal

Les tumeurs basales représentent entre 15 et 20% des tumeurs du sein. D'un point de vue histologique, ce sont majoritairement des carcinomes canalaires invasifs, mais elles comprennent aussi des tumeurs métaplastiques et médullaires (Fadare & Tavassoli, 2007). Les tumeurs basales se caractérisent par un niveau d'expression élevé des kératines de type basal, telles que K5, K14 et K17, ainsi que d'autres marqueurs des cellules basales comme la cadhérine P, l'intégrine β4, le facteur de transcription p63, et la métalloprotéase CD10 (pour revue, voir Bertucci *et al*., 2012). En revanche, elles n'expriment pas les récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone, et ne surexpriment pas la protéine ErbB2, et de ce fait ces tumeurs ont été aussi nommées « triple-négatives ». Cependant, la comparaison entre les tumeurs triples négatives identifiées par analyse en immunohistochimie et les tumeurs de type moléculaire basal a révélé une discordance entre les deux groupes de 30% (pour revue, voir Bertucci *et al*., 2012). Les altérations moléculaires les plus fréquentes dans les tumeurs basales incluent la perte de PTEN, l'activation de la voie de signalisation PI3K/AKT (Andre et al., 2009), l'inactivation de *Brca1*, ainsi que, comme l'on verra plus tard, des mutations inactivatrices du facteur de transcription *Trp53* (Sorlie *et al*., 2001 ; Cancer Genome Atlas Network, Comprehensive molecular portraits of human breast tumours, Nature, 2012). Par ailleurs, les tumeurs basales présentent une surexpression des gènes activateurs du cycle cellulaire, de l'angiogenèse et de la motilité cellulaire.

Les carcinomes de type basal sont généralement associés à un mauvais pronostic clinique à cause de leur tendance à développer des métastases ainsi que par le manque de thérapies ciblées, car l'absence des récepteurs hormonaux et les faibles niveaux d'expression d'ErbB2 limitent les approches thérapeutiques possibles (pour revue, voir Bertucci *et al*., 2012). Toutefois, les analyses transcriptionnelles ont ouvert de nouvelles perspectives dans le développement de thérapies spécifiques plus efficaces des cancers du sein de type basal (Rodler *et al*., 2010).

1.4.4 Les différentes théories menant à l'hétérogénéité tumorale

A l'hétérogénéité « inter-tumorale » que nous venons de voir s'ajoute une hétérogénéité « intra-tumorale », chaque tumeur présentant une grande diversité cellulaire et génétique. Deux mécanismes essentiels ont été proposés pour expliquer l'hétérogénéité inter-tumorale : un modèle stochastique et un modèle de cellules souches cancéreuses (pour revue, voir Clevers, 2011).

1.4.4.1 Le modèle « stochastique » ou « d'évolution clonale »

Ce modèle est basé sur les théories classiques de sélection des mutants les plus aptes à survivre dans des environnements spécifiques. Dans ce modèle, des mutations peuvent survenir dans n'importe quel type cellulaire, et être sélectionnées si elles confèrent à la cellule un avantage de survie ou prolifératif. Différents types de lésions génétiques ou épigénétiques survenant dans la même cellule cible conduiraient à des tumeurs de phénotype divers (Fig. 14A). Des mutations aléatoires supplémentaires dans les cellules cancéreuses permettent d'acquérir des propriétés tumorales correspondant à chaque stade de l'évolution du cancer entrainant ainsi une diversité cellulaire au sein de la tumeur (Nowell, 1976 ; Merlo *et al*., 2006).

Une des principales observations indiquant une évolution clonale dans les carcinomes du sein est le profil de mutations des cellules tumorales (Fujii *et al*., 1996 ; Kuukasjarvi *et al*., 1997).

1.4.4.2 Le modèle « hiérarchique » ou « des cellules souches cancéreuses »

Le deuxième modèle de tumorigenèse prend en compte l'organisation hiérarchique du tissu normal comprenant des cellules souches, progénitrices et différenciées. Un même événement oncogénique survenant dans des cellules distinctes conduirait à la formation de sous-types tumoraux différents (Fig. 14B). Les cellules souches et/ou progénitrices pourraient être les cibles initiales de la transformation maligne. L'hétérogénéité cellulaire observée dans une tumeur résulterait des différenciations aberrantes d'une cellule souche cancéreuse pour former la masse désordonnée reconnue histologiquement (pour revue, voir Spike & Wahl, 2011).

Cette hypothèse est notamment soutenue par des études réalisées sur le système hématopoiétique, et plus particulièrement sur le développement des leucémies myéloïdes aiguës. En effet, en 1994, il a été établi que ces leucémies comprennent une petite population cellulaire, exprimant des marqueurs de cellules souches hématopoiétiques normales, et pouvant former des leucémies avec la même hétérogénéité que la tumeur d'origine lorsqu'elles sont transplantées dans des souris NOD-SCID, alors que les autres cellules tumorales en sont incapables (Lapidot *et al*., 1994) permettant aux chercheurs de déduire une relation « parent-progéniture » (Bonnet & Dick, 1997).

Dans le cancer du sein, les expériences de xénogreffe ont permis l'identification d'une sous-population particulière de cellules tumorales capables de régénérer une tumeur similaire à la tumeur d'origine (Reya *et al*., 2001 ; Al-Hajj *et al*., 2003). Ces cellules initiatrices de tumeurs ont été notamment caractérisées par la présence du marqueur de surface CD44 et, par la suite, d'autres marqueurs ont été utilisés pour isoler ces cellules, comme l'aldéhyde déshydrogénase 1 (ALDH1) (Ginestier *et al*., 2007).

1.4.4.3 Modèle stochastique ou hiérarchique ?

Vraisemblablement, chacun des deux modèles évoqués décrit certains aspects de la progression tumorale. Tout d'abord des mutations affecteraient la fonction des cellules souches et/ou progénitrices leur permettant ainsi d'acquérir des propriétés tumorales, et générer probablement une variété de types cellulaires. Ces mutations déclencheraient le processus de transformation mais seraient insuffisantes pour assurer la progression tumorale, qui nécessiterait l'accumulation de mutations additionnelles suivant le modèle stochastique pour générer des cellules tumorales plus agressives (pour revue, voir Clevers, 2011).

Dans les cancers du sein, l'hétérogénéité tumorale serait également générée par des mécanismes faisant intervenir à la fois des propriétés de l'hypothèse d'évolution clonale et du modèle de cellules souches cancéreuses (Campbell & Polyak, 2007). L'équipe de Visvader a constaté une accumulation de progéniteurs luminaux dans les tumeurs associées aux mutations *Brca1* (Lim *et al*., 2009). En accord avec ce résultat, l'équipe de Smalley a montré que l'inactivation de *Brca1* dans les cellules luminales des souris transgéniques induit des tumeurs similaires aux tumeurs humaines de type basal. Ces travaux indiquent que les progéniteurs luminaux seraient à l'origine des tumeurs de type basal (Molyneux *et al*., 2010).

Il est probable aussi que les mutations puissent affecter des cellules différenciées, leur conférant des propriétés de cellules souches notamment d'autorenouvellement. Dans ce cas, la cellule cible initiale, celle qui subit la première mutation à l'origine du cancer, ne serait pas identique à la cellule souche cancéreuse, cette dernière étant plutôt assimilée à une cellule « propagatrice » de tumeur, responsable du maintien, de la croissance maligne de la tumeur, et de l'induction de nouvelles tumeurs. L'identification et la caractérisation des cellules initiatrices et propagatrices font l'objet de nombreuses recherches dont les résultats visent à améliorer la détection des cancers aux stades initiaux et à développer de nouvelles thérapies mieux adaptées (pour revue, voir Visvader, 2011).

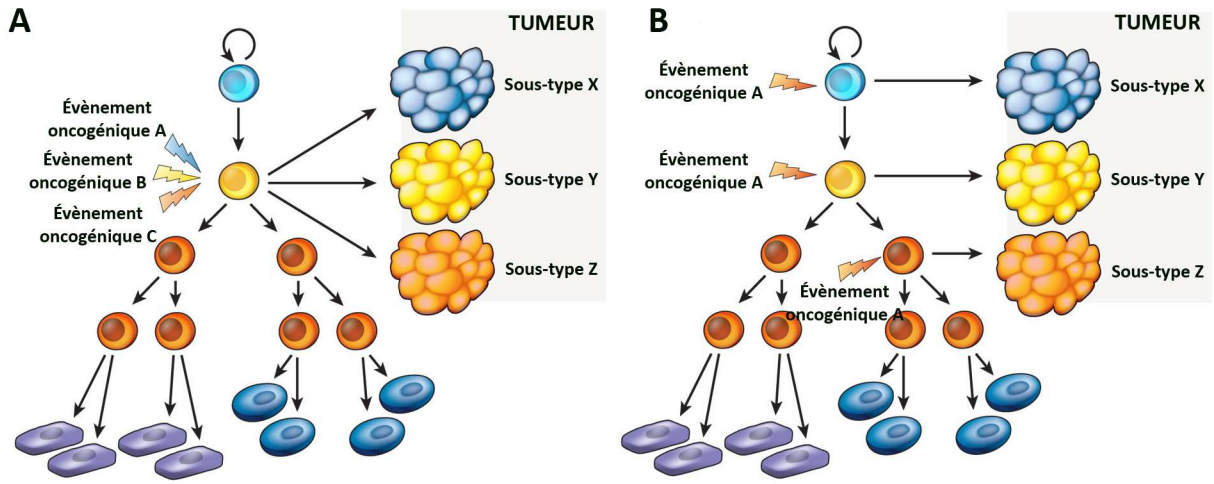


Figure 14 : Modèles expliquant l'hétérogénéïté inter-tumorale

(A) Le type de mutation détermine le sous-type tumoral.
(B) La cellule d'origine de la tumeur détermine le sous-type tumoral.
(Modifié d'après Visvader, 2011)

1.5 Rôle de la voie Wnt/β-caténine dans la tumorigenèse mammaire

Comme nous l'avons précédemment mentionné, la voie Wnt/β-caténine est impliquée dans la régulation des cellules souches et progénitrices mammaires, dans leur autorenouvellement, et dans leur différenciation (Badders *et al*., 2009 ; Zeng & Nusse, 2010). Une dérégulation de la signalisation Wnt/β-caténine est observée de façon fréquente pendant la tumorigenèse (pour revue, voir Incassati *et al*., 2010).

La famille des lipoprotéines Wnt contrôle la stabilité de la β-caténine, en intéragissant avec les récepteurs Fz (Frizzled) et LRP5/6 (Fig. 15). En absence d'un ligand Wnt, la β-

caténine est retrouvée presque exclusivement dans les jonctions adhérentes. Tout excès de β-caténine est rapidement dégradé par un complexe de destruction formé principalement par les protéines GSK3-β (Glycogene Synthase Kinase 3β), APC (Adenomatous Polyposis Coli) et axine (Fig. 15). La GSK3-β phosphoryle la β-caténine au niveau des résidus Sérine et Thréonine conservés dans la région NH_2-terminale, entrainant sa reconnaissance par une ubiquitine ligase et sa dégradation par le protéasome. La fixation d'un ligand Wnt sur ses récepteurs entraine l'activation de la protéine Dsh (Dishevelled), qui inhibe l'action de la GSK3-β et empêche ainsi la dégradation de la β-caténine, qui s'accumule dans le cytoplasme. La β-caténine passe dans le noyau, s'associe aux facteurs de transcription LEF/TCF, et participe à l'activation de la transcription de gènes cibles, tels que *Myc* ou *Ccnd1* (codant pour la Cycline D1) (pour revue, voir Incassati *et al*., 2010).

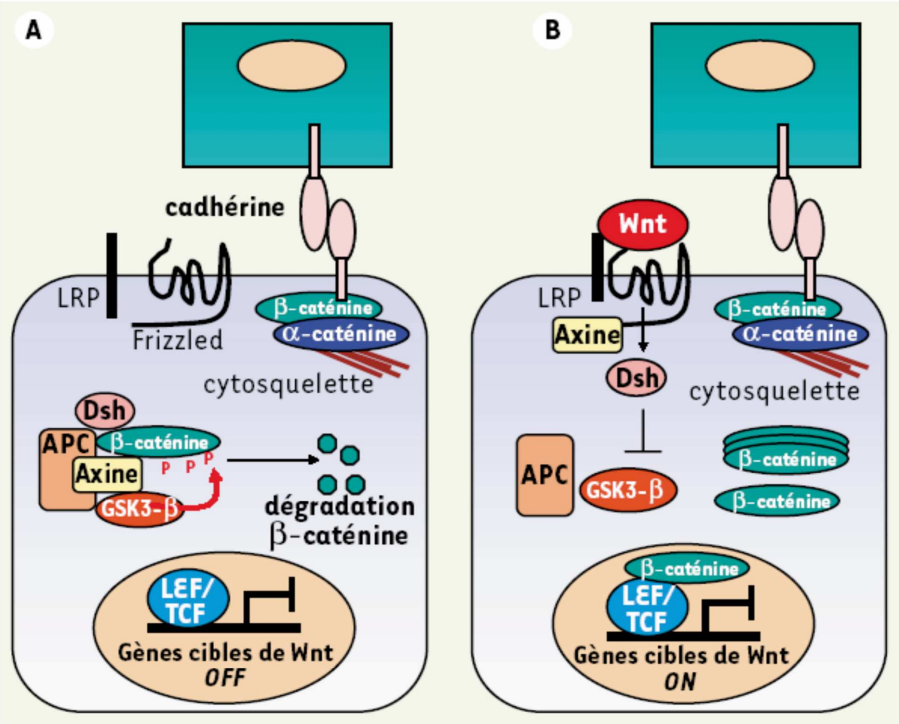


Figure 15 : La voie de signalisation Wnt/β-caténine

(A) La β-caténine participe à la formation des jonctions adhérentes cellulaires. En absence d'un ligand de la famille Wnt, l'excès de β-caténine est dégradé par le protéasome, via un complexe protéique faisant intervenir les protéines APC, Axine, Dishevelled (Dsh) et GSK3-β.
(B) En présence d'un ligand Wnt, l'action du complexe de dégradation est inhibée, et la β-caténine s'accumule dans le cytoplasme. La β-caténine peut alors entrer dans le noyau et, en s'associant aux facteurs de transcription de la famille LEF/TCF, activer la transcription de gènes cibles.
(Modifié d'après Reya & Clevers, 2005)

Dans certains cancers, notamment celui du colon, des mutations des protéines régulatrices comme l'APC, sont très fréquentes (pour revue, voir Giles *et al*., 2003). Bien que

de telles mutations soient rares dans le cancer du sein, différents travaux ont mis en évidence d'autres mécanismes conduisant à une activation de la signalisation Wnt/β-caténine (pour revue, voir Incassati *et al*., 2010). Ainsi, 50% des carcinomes mammaires présentent une stabilisation de la β-caténine associée à une surexpression de la cycline D1 et à un mauvais pronostic de survie (Lin *et al*., 2000). Par ailleurs, la diminution de l'expression de la β-caténine membranaire est corrélée à un mauvais pronostic de survie (Dolled-Filhart *et al*., 2006). De façon intéressante, l'activation de cette voie a été récemment associée aux cancers mammaires de type basal. En effet, une accumulation de la β-caténine a été plus souvent observée dans les carcinomes *in situ* de type basal que dans les autres types de cancers mammaires *in situ*, suggérant que l'activation de cette signalisation peut être un événement précoce dans le développement des carcinomes de type basal (DiMeo *et al*., 2009 ; Khramtsov *et al*., 2010).

Différents modèles animaux ont été développés pour étudier la tumorigenèse mammaire induite par la β-caténine (Imbert *et al*., 2001 ; Tsukamoto *et al*., 1988). Notre laboratoire a généré des souris transgéniques développant avec l'âge des tumeurs mammaires de type basal suite à une dérégulation la voie Wnt/β-caténine (Teuliere *et al*., 2005). En effet, les souris K5ΔNβcat expriment spécifiquement dans la couche basale de l'épithélium mammaire une forme de la β-caténine tronquée en N-terminal et par conséquent, constitutivement active. L'activation de la voie de signalisation Wnt/β-caténine dans la couche basale mammaire de ces souris entraine la formation d'hyperplasies canalaires constituées essentiellement de cellules basales (positives pour K5) en absence de différenciation myoépithéliale (négatives pour α-SMA), à partir d'un âge moyen de 10 mois. Ces lésions hyperplasiques évoluent par la suite en carcinomes mammaires *in situ* puis en carcinomes invasifs (Fig. 16).

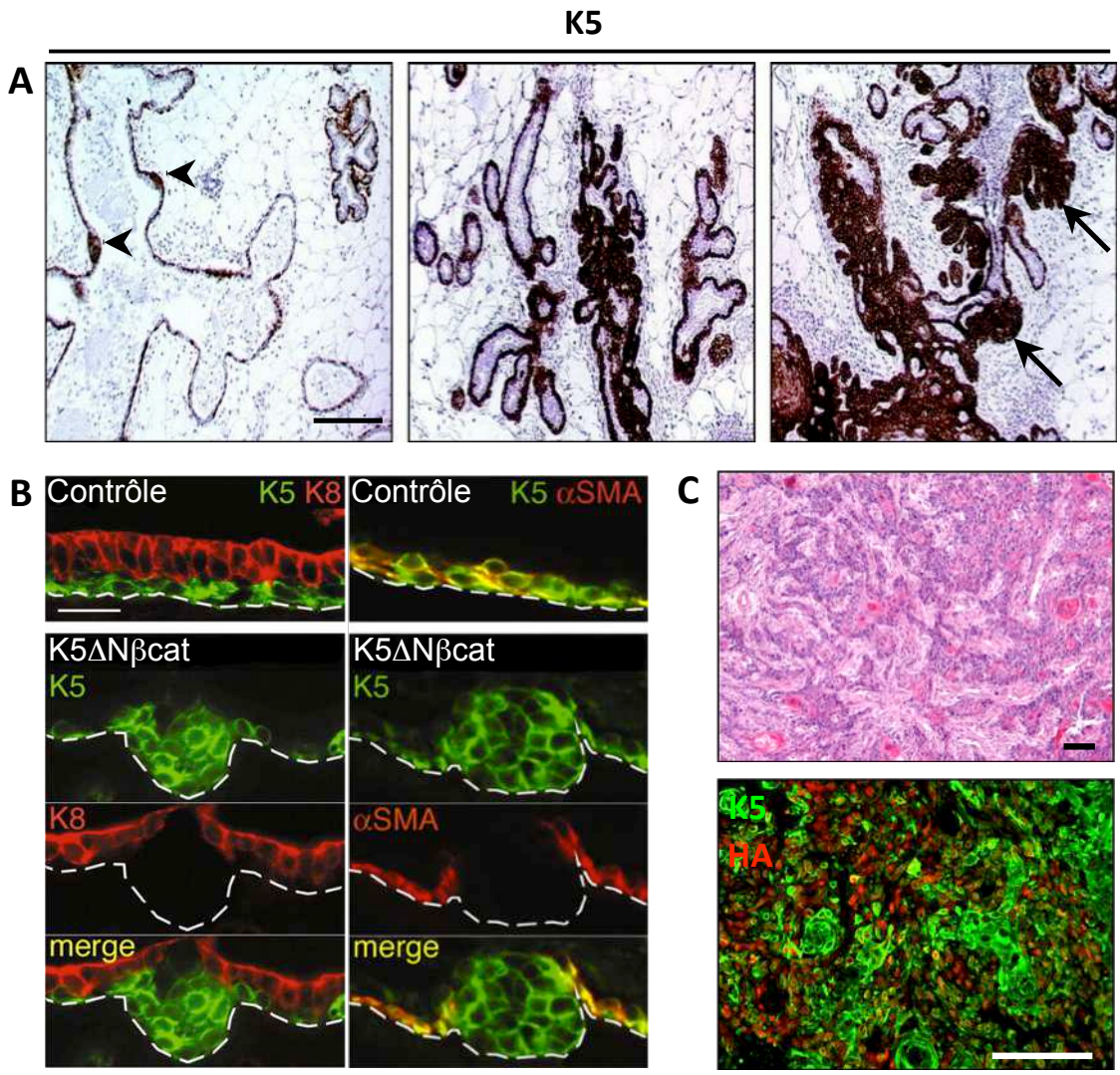


Figure 16 : Les souris K5ΔNβcat développent avec l'âge des tumeurs mammaires de type basal

(A) Immunomarquage sur coupe de glande mammaire d'une souris nullipare K5ΔNβcat âgée de 18 mois 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).
(B) Immunofluorescence sur coupes de glandes mammaires d'une souris contrôle et d'une souris nullipare K5ΔNβcat âgée de 12 mois, à l'aide des 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 indifférenciées (négatives pour αSMA). La ligne discontinue indique la position de la membrane basale.
(C) Haut : Coupe de carcinomes mammaires invasifs d'une souris K5ΔNβcat âgée de 12 mois (coloration hématoxyline et éosine). **Bas :** Immunofluorescence sur coupes de carcinomes mammaires invasifs d'une souris K5ΔNβcat âgée de 12 mois avec les anticorps anti-K5 et anti-HA (HA : Hémagglutinine co-exprimée avec le transgène ΔNβcat).
Barres d'échelle : A : 150 µm; B : 30 µm; C : 100 µm.
(Modifié d'après Teulière *et al.*, 2005)

2. Le proto-oncogène *Myc*

Le proto-oncogène *Myc* (Myc pour la protéine) est un des gènes le plus étudiés au cours des dernières décennies. Il a été identifié chez l'Homme en 1982 comme étant l'homologue chez les mammifères d'un oncogène viral *v-Myc*, présent dans le génome du virus aviaire MC29 et participant activement à la formation de tumeurs chez le poulet. Dans un contexte physiologique, la protéine Myc est aujourd'hui connue pour jouer un rôle central dans le contrôle des fonctions cellulaires comme la prolifération, la différenciation, la croissance, l'apotose ou encore l'angiogenèse (pour revue, voir Meyer & Penn, 2008). Son rôle dans la tumorigenèse a été étudié de façon approfondie et sa propriété oncogénique n'est plus à démontrer. Son amplification est par ailleurs observée dans les cancers du sein chez la femme, d'abord à un niveau génomique, puis au niveau de l'ARN (Jamerson *et al*., 2004).

2.1 Structure de la protéine Myc

La protéine Myc est formée de 439 acides aminés (autant chez l'homme que chez la souris) et est constituée de plusieurs domaines structuraux fonctionnellement distincts (Fig. 17) (Meyer & Penn, 2008) :

- **Une région de transactivation**, localisée en N-terminal (acides aminés (aa) 1-143), est impliquée dans l'activation transcriptionnelle des gènes cibles de Myc en recrutant la machinerie de transcription.

- **Myc homology box I** (aa 44-63). Ce petit domaine est localisé dans la région de transactivation et est impliqué dans la régulation de Myc, notamment par la phosphorylation des acides aminés Thr58 et Ser62.

- **Myc homology box II** (aa 128-143), qui est également situé dans le domaine de transactivation, joue un rôle important dans l'activation et la répression transcriptionnelle. Des mutations dans cette région perturbent la liaison de la plupart des co-activateurs de Myc.

- **Myc homology box IIIa** (aa 188-199) et **Myc homology box IIIb** (aa 259-270). Ces deux domaines sont nécessaires à la transformation cellulaire et sont impliqués dans la régulation de l'activité pro-apoptotique de Myc.

- **Myc homology box IV** (aa 304-324) joue également un rôle important dans la régulation de l'activité apoptotique de Myc, ainsi que dans la transformation cellulaire et la liaison de Myc à l'ADN.

- **Une région basique** (aa 355-369). Cette région est essentielle pour l'activité de transformation de Myc et est responsable de la liaison spécifique du dimère Myc/Max à l'ADN, au niveau des sites E-box.

- **Un domaine bHLH-LZ (**basic Helix Loop Helix Leucine Zipper; aa 370-439), impliqué dans l'interaction avec la protéine Max. Les domaines bHLH-LZ sont des séquences conservées et retrouvées dans beaucoup d'autres facteurs de transcription.

Myc possède au moins deux protéines homologues, N-Myc et L-Myc, deux facteurs de transcription codés par deux gènes différents, possédant une organisation structurale et une activité similaires à celles de Myc. Il a été montré que, chez la souris, N-Myc peut remplacer Myc *in vivo*, suggérant que ces deux protéines ont des actions similaires (Malynn *et al*., 2000). Les gènes codant pour N-Myc et L-Myc sont fréquemment amplifiés, respectivement dans les neuroblastomes et dans le cancer du poumon à petites cellules.

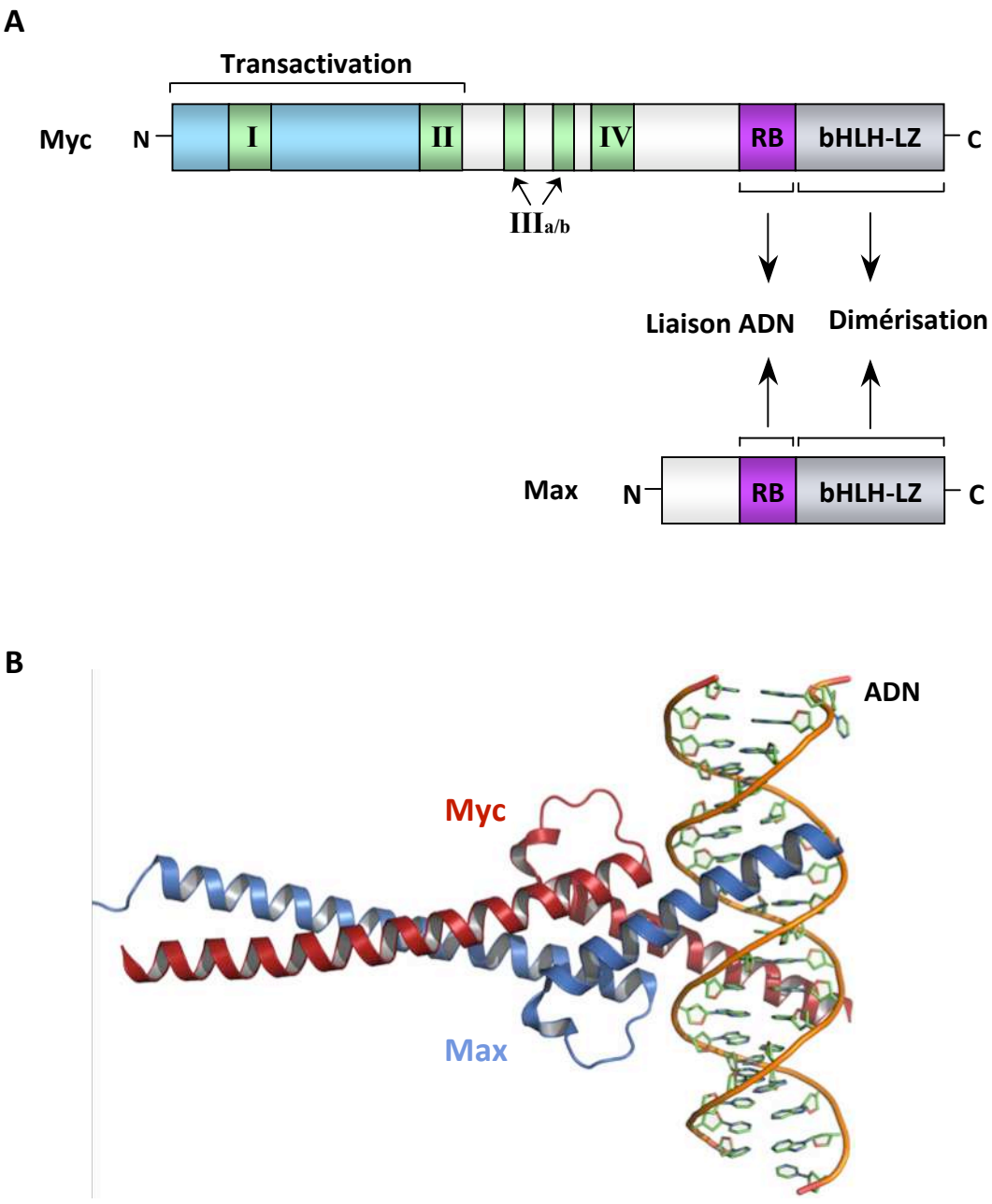


Figure 17 : Structure de la protéine Myc

(A) Représentation schématique des domaines structuraux des protéines Myc et Max. Les domaines Myc homology Box I, II, IIIa, IIIb et IV sont en vert. RB : région basique jouant un rôle essentiel dans la liaison à l'ADN. bHLH-LZ : domaine "basic Helix Loop Helix Leucine Zipper", intervenant dans la dimérisation avec la protéine Max.
(B) Structure cristallographique aux rayons X des domaines bHLH-LZ de l'hétérodimère Myc-Max intéragissant avec une séquence d'ADN cible (E-box). La structure a été déterminée à une résolution de 1,9 Å (Nair & Burley, 2003).

2.2 Activation et fonctions de Myc

Comme nous l'avons mentionné, le facteur de transcription Myc est impliqué dans la régulation de l'expression de nombreux gènes contrôlant des fonctions cellulaires diverses (Fig. 18) (pour revue, voir Eilers & Eisenman, 2008). La liaison à l'ADN et l'activité transcriptionnelle de Myc nécessitent une hétérodimérisation préalable avec Max (de l'anglais « Myc-Associated factor-X »), une protéine de 151 acides aminés qui présente également une région bHLH-LZ (Fig. 17). Le dimère Myc-Max se lie à l'ADN en reconnaissant la séquence consensus CAC(A/G)TG, appelée également E-box. Ce complexe va ensuite réguler la transcription de nombreux gènes, principalement par l'augmentation locale de l'acétylation des histones au niveau des promoteurs cibles (pour revue, Cowling & Cole, 2006). Ce mécanisme d'acétylation des histones entraine alors un déroulement de la chromatine et permet la transactivation des gènes cibles de Myc. Le complexe Myc-Max peut également inhiber la transcription en intéragissant avec le facteur transcriptionnel Miz-1 au niveau des promoteurs de gènes tels que *Cdkn1a* (codant pour la protéine p21) (Peukert *et al*., 1997).

Une des principales fonctions de Myc est d'initier la croissance et la prolifération cellulaire induite par une grande variété de facteurs de croissance, de cytokines et autres facteurs mitogéniques, tels que l'EGF, le PDGF, l'interleukine-2 ou les facteurs de la famille Wnt. En effet, le gène *Myc* est l'une des principales cibles de la voie Wnt/β-caténine (He *et al*., 1998). En réponse à la stimulation par ces différents facteurs, Myc active notamment l'expression des cyclines A2, B1, D1, D2 et E1, ou encore de la protéine CDK4 (Bouchard *et al*., 2001 ; Hermeking *et al*., 2000 ; Fernandez *et al*., 2003). Myc entraine également l'activation de l'expression des protéines de la famille E2F, qui sont des régulateurs essentiels de la synthèse de l'ADN (Sears *et al*., 1997). *A contrario*, en intéragissant avec Miz-1, Myc réprime, entre autres, l'expression des protéines inhibitrices du cycle cellulaire, comme p27, p21 et p15 (Yang *et al*., 2001 ; Claassen & Hann, 2000 ; Staller *et al*., 2001), ainsi que de la protéine Gadd45, impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN (Marhin *et al*., 1997).

A l'inverse de la prolifération cellulaire, Myc peut également induire l'apoptose, vraisemblablement par l'activation du facteur pro-apoptotique Bax (Soucie *et al*., 2001 ; Juin *et al*., 2002). Un autre mécanisme fait intervenir l'interaction de Myc avec la protéine p19, permettant l'activation indirecte de l'apoptose via la protéine p53 (Zindy *et al*., 1998).

Cependant, les gènes cibles de Myc impliqués dans l'apoptose ne sont pas encore totalement identifiés.

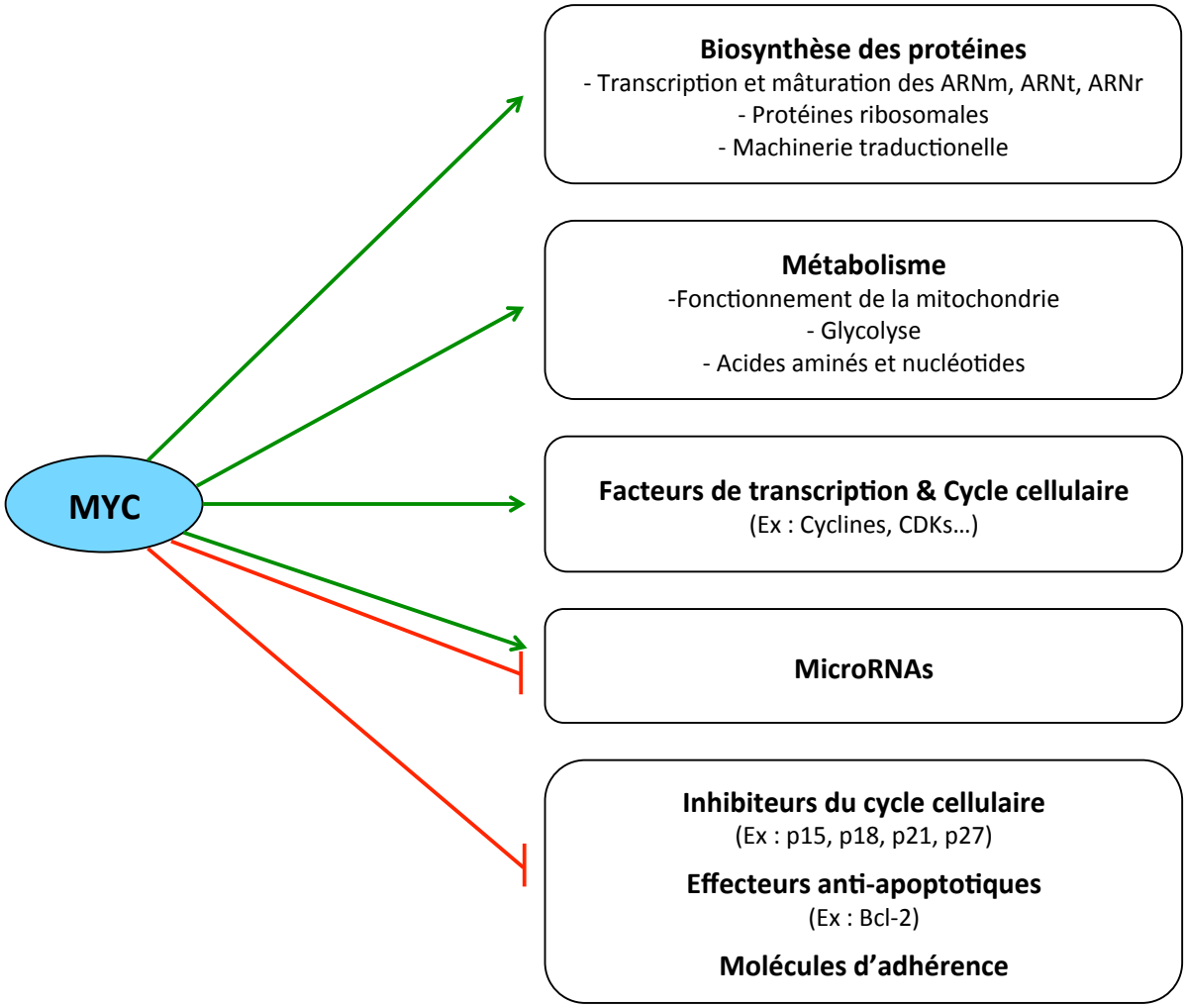


Figure 18 : Résumé des principales fonctions cellulaires régulées par Myc

Comme mentionné dans le texte, Myc régule positivement l'expression (flèches vertes) d'un large panel de gènes, impliqués dans des fonctions cellulaires aussi variées que le cycle cellulaire, la biosynthèse des protéines et le métabolisme. D'autre part, Myc réprime l'expression (flèches rouges) de gènes participant à l'inhibition du cycle cellulaire ou de l'apoptose. L'expression des microRNAs est régulée positivement ou négativement par Myc, en fonction du type de microRNA et de son rôle biologique.
(Modifié d'après Eilers & Eisenman, 2008)

Une autre activité importante de Myc est la régulation de la différenciation cellulaire. Ainsi, l'activation de Myc dans plusieurs lignées cellulaires (hématopoïétiques, neuronales, musculaires...) inhibe la différenciation *in vitro*, ce qui est en accord avec la forte diminution de l'expression de Myc lorsque les cellules en culture se différencient (Nguyen *et al*., 1995 ; Hoshimaru *et al*., 1996 ; La Rocca *et al*., 1994). Cependant, il a également été montré que l'activation de Myc peut induire la différenciation cellulaire dans plusieurs tissus *in vivo*,

comme la peau, en induisant notamment l'amplification et la mobilisation de cellules progénitrices (Gandarillas & Watt, 1997). L'effet biologique de Myc dépend donc du type cellulaire concerné mais implique majoritairement le maintien d'un état prolifératif et la régulation du processus de différenciation terminale.

Myc est reconnu également comme un régulateur central de la croissance cellulaire, de la biogénèse des ribosomes et de la traduction des protéines (Iritani & Eisenman, 1999). En effet, Myc possède la capacité d'activer l'expression de plusieurs gènes codant pour des protéines ribosomales, des facteurs de traduction, ainsi que des protéines impliquées dans la biosynthèse et la maturation des ARN ribosomaux (Menssen & Hermeking, 2002).

Plusieurs voies du métabolisme cellulaire sont également régulées par la protéine Myc, comme le métabolisme du glucose (Osthus *et al*., 2000), des nucléotides (Bello-Fernandez *et al*., 1993) ou encore du fer (Wu *et al*., 1999).

Des études plus récentes impliquent Myc dans la régulation de l'expression de gènes codant pour des microARN (He *et al*., 2005 ; O'Donnell *et al*., 2005). Ainsi, Myc induit l'expression de miR-17-92, qui a pour effet d'augmenter l'angiogénèse, notamment en réprimant l'expression de la thrombospondine (Dews *et al*., 2006). Par ailleurs, en régulant négativement l'expression de miR-23a et miR-23b, Myc participe activement à la stimulation du métabolisme de la glutamine (Gao *et al*., 2009). La régulation des miRNAs par Myc a été surtout étudiée dans un contexte tumoral. Comme exemple, il a été récemment rapporté qu'en coopération avec les facteurs de modification des histones HDAC3 et EZH2, Myc inhibe l'expression de miR-29 dans certains lymphomes (Zhang *et al*., 2012).

2.3 Rôle de Myc dans le maintien des cellules souches et progénitrices

Le rôle de la protéine Myc dans la régulation de la prolifération cellulaire et dans le contrôle de l'homéostasie des tissus a incité des nombreuses équipes de recherche à étudier le lien éventuel existant entre la protéine Myc et l'activité des cellules souches.

Dans les cellules souches embryonnaires (ES), l'expression de Myc est induite en réponse au facteur LIF (de l'anglais « Leukemia Inhibitory Factor »), assurant ainsi la capacité d'autorenouvellement des cellules ES. L'expression ectopique de Myc dans les

cellules ES permet de maintenir leur propriété d'autorenouvellement, même en absence de LIF (Cartwright *et al*., 2005).

Chez l'adulte, le rôle de Myc dans la régulation des cellules souches est plus complexe et varie selon le type de tissus (pour revue, voir Laurenti *et al*., 2009 ; Singh & Dalton, 2009). Des modèles murins d'invalidation ciblée de *Myc* ont été utilisés dans ces études. Ainsi, dans la peau, l'inactivation conditionnelle du gène *Myc* dans les cellules basales de l'épiderme induit une diminution des cellules souches, altère leur capacité d'autorenouvellement et conduit à une différenciation précoce des cellules épidermiques basales (Zanet *et al*., 2005). Dans le système hématopoiétique, la perte de Myc, conjointement avec son homologue N-Myc, résulte en une diminution importante de la population des cellules souches associée à des défauts de prolifération, de différenciation et de la survie de cette population (Laurenti *et al*., 2008). Par ailleurs, la perte de Myc dans les cellules de la crypte intestinale conduit à une diminution de la taille et du nombre de cryptes, soulignant le rôle de ce gène dans le maintien des cellules souches et l'homéostase de l'intestin adulte (Muncan *et al*., 2006). Dans la glande mammaire, la perte de Myc dans les cellules luminales différenciées affecte le développement des greffons issus de la transplantation de fragments épithéliaux, suggérant que Myc joue un rôle dans le contrôle de la population progénitrice luminale (Stoelzle *et al*., 2009). Cependant, les fonctions de Myc dans la régulation des cellules souches n'ont pas encore été étudiées.

Enfin, la protéine Myc a été identifiée comme un des quatre facteurs incluant Sox2, Oct4 et Klf4, pouvant induire la reprogrammation de fibroblastes adultes en cellules souches pluripotentes (Takahashi & Yamanaka, 2006 ; Takahashi *et al*., 2007). En effet, l'absence de Myc réduit de manière significative l'efficacité de reprogrammation, même si son expression n'est pas indispensable à l'induction des cellules pluripotentes (Wernig *et al*., 2008 ; Nakagawa *et al*., 2008).

2.4 Rôle de Myc dans la tumorigenèse

L'implication du gène *Myc* dans la tumorigenèse à été mise en évidence dès 1982 grâce à l'observation que des translocations chromosomiques du gène *Myc* étaient responsables des lymphomes de Burkitt (Dalla-Favera *et al*., 1982 ; Taub *et al*., 1982). Des études ultérieures ont montré que la surexpression de Myc était une des anomalies les plus

courantes associées aux cancers (pour revue, voir Chen & Olopade, 2008). La surexpression de Myc peut être associée à la régulation transcriptionnelle et/ou à l'amplification génique, *Myc* étant un des oncogènes les plus souvent amplifiés dans les cancers humains (Beroukhim *et al*., 2010).

Dans les cancers du sein, l'amplification du gène *Myc* dans près de 15% des cas de carcinomes mammaires humains, ainsi que la surexpression de la protéine Myc dans plus de 50% des cas ont été raportées (Deming *et al*., 2000). En particulier, des études récentes ont montré une activation de la voie de signalisation de Myc dans les cancers de type basal et triple négatifs (Alles *et al*., 2009 ; Horiuchi *et al*., 2012).

Différents modèles murins ont été développés pour tenter de comprendre le rôle de Myc dans la tumorigenèse mammaire. Les promoteurs MMTV et WAP ont notamment été utilisés pour activer l'expression du gène *Myc*. Ainsi, les souris MMTV-*Myc* développent des tumeurs mammaires avec une incidence de 100% chez les femelles ayant eu préalablement au moins une portée (multipares) et de 50% chez les femelles vierges. Ces tumeurs sont majoritairement des adénocarcinomes agressifs de haut grade (Stewart *et al*., 1984; pour revue, voir Jamerson *et al*., 2004). Les souris WAP-*Myc* développent également des adénocarcinomes à l'état multipare dans plus de 80% des cas, mais aucune lésion tumorale n'a été observée à l'état vierge (Schoenenberger *et al*., 1988).

Les mécanismes associés aux propriétés oncogéniques de Myc sont très divers et incluent l'activation du cycle cellulaire, de la croissance et du métabolisme ainsi que les effets de Myc dans l'adhésion cellulaire et l'angiogenèse (pour revue, voir Dang, 2012). A l'inverse, la suppression de Myc dans des lignées cancéreuses réduit la prolifération et induit parfois l'apoptose (Cappellen *et al*., 2007 ; Wang *et al*., 2008). Récemment il a été montré que Myc est également impliqué dans la progression tumorale en permettant aux cellules d'acquérir des propriétés de l'EMT. En effet, Myc est capable d'activer l'expression de Bmi-1 qui réprime à son tour l'expression du gène suppresseur de tumeur *PTEN* et induit l'EMT sur des cellules épithéliales humaines (Song *et al*., 2009). De plus, le microARN miR-9 est activé par Myc et inhibe l'expression de la E-cadhérine favorisant ainsi la formation de métastases (Ma *et al*., 2010).

3. Le gène suppresseur de tumeur *Trp53*

La découverte de la protéine p53 a été l'aboutissement de deux types d'études portant sur une approche virologique et une approche sérologique. Elle a été identifiée pour la première fois en 1979, comme une protéine cellulaire co-précipitant avec l'antigène T du virus SV40 (Lane & Crawford, 1979 ; Linzer & Levine, 1979). Parallèlement, différents travaux ont montré que les animaux développant plusieurs types de tumeurs développaient une réponse immunitaire activant spécifiquement p53 (Kress *et al*., 1979 ; Melero *et al*., 1979 ; Rotter *et al*., 1980).

Initialement présenté comme un oncogène, il est apparu rapidement que p53 est un facteur de transcription jouant un rôle essentiel dans la protection des cellules de l'organisme contre la tumorigenèse. En effet, l'analyse de tumeurs a montré que la plupart d'entre elles, notamment les cancers du sein et du côlon, présentent un dysfonctionnement de p53 (Vogelstein *et al*., 2000). Ainsi, au cours des vingt dernières années, de nombreuses études ont été menées pour comprendre la fonction et la régulation de p53, afin de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques anti-cancéreuses.

3.1 Structure de la protéine p53

Chez l'Homme, le gène *Tp53* est localisé sur le bras court du chromosome 17 (locus 17p13.1), région qui est fréquemment supprimée dans les cancers humains. Il est composé de 20303 nucléotides divisés en 11 exons - parmi lesquels le premier n'est pas codant – et 10 introns (Isobe *et al*., 1986 ; Oren, 1985).

Chez la souris, le gène *Trp53* code pour une protéine constituée de 387 acides aminés (393 chez l'Homme), composée de cinq domaines principaux (Fig. 19) (pour revue, voir May & May, 1999) :

- **un domaine de transactivation,** localisé en N-terminal (acides aminés (aa) 1-42), impliqué dans l'activation transcriptionnelle des gènes cibles de p53 en recrutant les protéines de la machinerie de transcription.

- **un domaine riche en prolines** (aa 60-104), permettant la liaison aux domaines SH3 des protéines de signalisation comme par exemple SIN3, qui préserve p53 de la dégradation protéasomale.

- **un domaine central de liaison à l'ADN** (aa 96-286) permettant la reconnaissance et l'interaction de la protéine p53 avec l'ADN au niveau de séquences consensus 5'-RRRC(A/T)(A/T)GYYY-3' (el-Deiry *et al*., 1992). De façon intéressante, il a été mis en évidence que dans les tumeurs, la majorité des mutations de *Trp53* sont localisées dans le site de liaison à l'ADN. Ces mutations modifient la structure tridimensionnelle de la protéine, ou entrainent la perte de résidus essentiels, altérant ainsi l'interaction de p53 avec l'ADN et la transcription de gènes cibles.

- **un domaine d'oligomérisation** (aa 319-350), site assurant l'interaction des protéines p53 entre elles, sous forme de tétramères. L'oligomérisation de p53 s'effectue tout d'abord par une dimérisation, suivie de l'association de deux dimères, formant un complexe tétramérique fonctionnel.

- **un domaine régulateur**, situé dans le domaine C-terminal (aa 362-381), qui assure la régulation du domaine de liaison à l'ADN.

L'architecture de la protéine p53 est fortement conservée entre les espèces. D'autres protéines de la même famille ont été identifiées : p63 et p73, protéines codées par deux gènes différents, *Trp63* et *Trp73* (Kaghad *et al*., 1997 ; Yang *et al*., 1998). p63 et p73 présentent une structure protéique très similaire à p53, à la différence qu'elles possèdent un domaine supplémentaire en C-terminal, appelé domaine SAM (de l'anglais « Sterile Alpha Motif »), impliqué dans les interactions protéiques. La présence d'un second promoteur interne dans les trois gènes donne lieu à des isoformes protéiques issue de différents épissages alternatifs (Yang & McKeon, 2000 ; Bourdon *et al*., 2005).

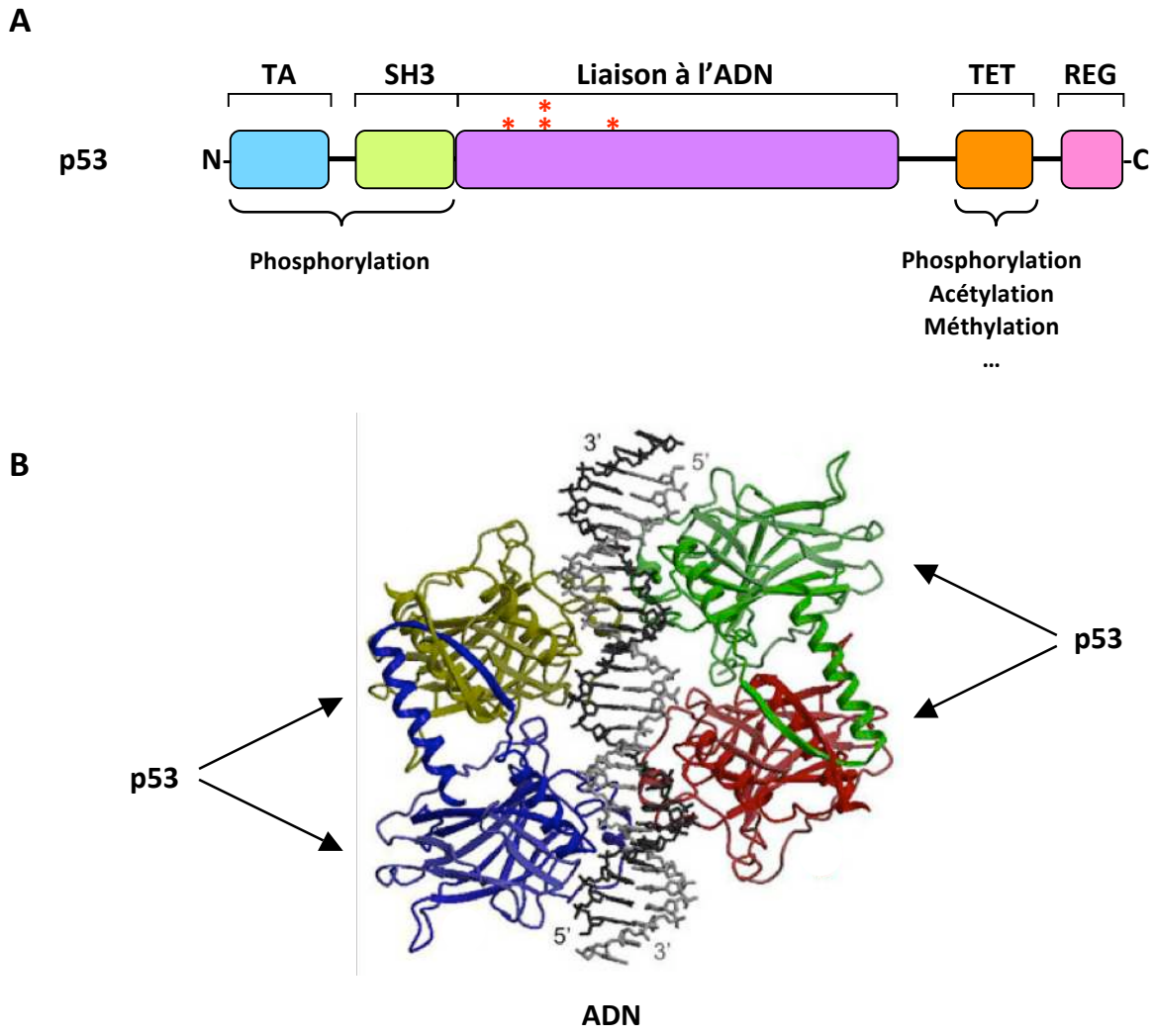


Figure 19 : Structure de la protéine p53

(A) Représentation schématique des domaines structuraux de la protéine p53. On distingue, de la région N-terminale à la région C-terminale, un domaine de transactivation (TA), un domaine riche en prolines permettant la liaison aux domaines SH3 (SH3), un domaine central de liaison à l'ADN, un domaine impliqué dans la tétramérisation de la protéine (TET) et une région régulatrice (REG). Les domaines TA, SH3 et TET sont les cibles de modifications post-traductionnelles. * Dans les cancers, la plupart des mutations de la protéine p53 sont localisées dans le domaine de liaison à l'ADN.
(B) Structure cristallographique aux rayons X du complexe tétramérique de la protéine p53 intéragissant de manière spécifique avec l'ADN. Les quatre monomères p53 sont représentés avec des couleurs différentes.
(Dridi *et al*., 2006)

3.2 Régulation de p53

Bien que p53 soit exprimé de manière constitutive dans la plupart des cellules, dans une cellule saine et en l'absence de tout stress, la protéine p53 est présente en très faible quantité et sa demi-vie varie entre 6 et 20 minutes, s'autorégulant par un rétrocontrôle négatif. En effet, la protéine p53 active, entre autres, la transcription du gène *Mdm2* qui code pour une

E3 ubiquitine ligase. MDM2 entraine la dégradation de p53 au niveau du protéasome formant ainsi une boucle d'autorégulation où chaque protéine contrôle le niveau de l'autre (Haupt *et al*., 1997 ; Kubbutat *et al*., 1997). Par ailleurs, la protéine MDM4 agit aussi comme inhibiteur de p53 en régulant son activité transcriptionnelle. L'utilisation de MDM2 et MDM4 comme cibles thérapeutiques dans les tumeurs présentant une surexpression de ces molécules en présence de la forme sauvage de p53 est explorée depuis quelques années (pour revue, voir Toledo & Wahl, 2007).

Sous l'effet d'un stress oncogénique, p53 est rapidement stabilisée suite à l'inhibition de MDM2. Cette inhibition est assurée par l'activation de la protéine p19/ARF, qui se lie à MDM2 et neutralise son activité E3-ligase, permettant la stabilisation de p53 et sa translocation dans le noyau (Honda & Yasuda, 1999). Enfin, un autre suppresseur de tumeurs, la protéine Rb, en reprimant la famille de facteurs de transcription E2F, regule aussi l'activité de p53 (Nevins, 2001). En somme, le complexe de signalisation Rb-E2F-ARF-MDM2 est essentiel dans la régulation de p53.

p53 est également la cible de plusieurs types de modifications post-traductionnelles, telles que la phosphorylation ou l'acétylation, qui ont lieu en réponse à différents évènements comme les lésions causées à l'ADN. Ainsi, la phosphorylation de p53 joue un rôle important dans l'activation et la stabilisation de la protéine (Dumaz & Meek, 1999). Des protéines kinases interviennent dans ce processus, notamment ATM, ATR, CHK1 et CHK2. D'autre part, l'acétylation contribue également à la stabilisation de la protéine p53 en empêchant son ubiquitinylation par MDM2 (pour revue, voir Brooks & Gu, 2003). D'autres modifications de la protéine p53 comme la sumoylation ou la méthylation ont été décrites et jouent également un rôle dans la régulation de l'activité de p53 (pour revue, voir Toledo & Wahl, 2006).

3.3 Activation et fonction de p53

Le gène *Trp53* code pour un facteur de transcription qui, en réponse à divers signaux de stress cellulaires, allant de la délétion d'un nucléotide à la surexpression d'un oncogène, est stabilisé et active la transcription de nombreux gènes (pour revue, voir Menendez *et al*., 2009). Cette activité s'effectue en recrutant des protéines de la machinerie transcriptionnelle (Thut *et al*., 1995) et entraine soit l'arrêt transitoire du cycle cellulaire, permettant la

réparation de l'ADN et la survie cellulaire, soit, lorsque les dommages causés à l'ADN sont trop importants, la mort cellulaire par sénescence ou par apoptose (Fig. 20). Ce rôle protecteur pour la cellule de p53 est à l'origine de son surnom "gardien du génome" (Lane, 1992).

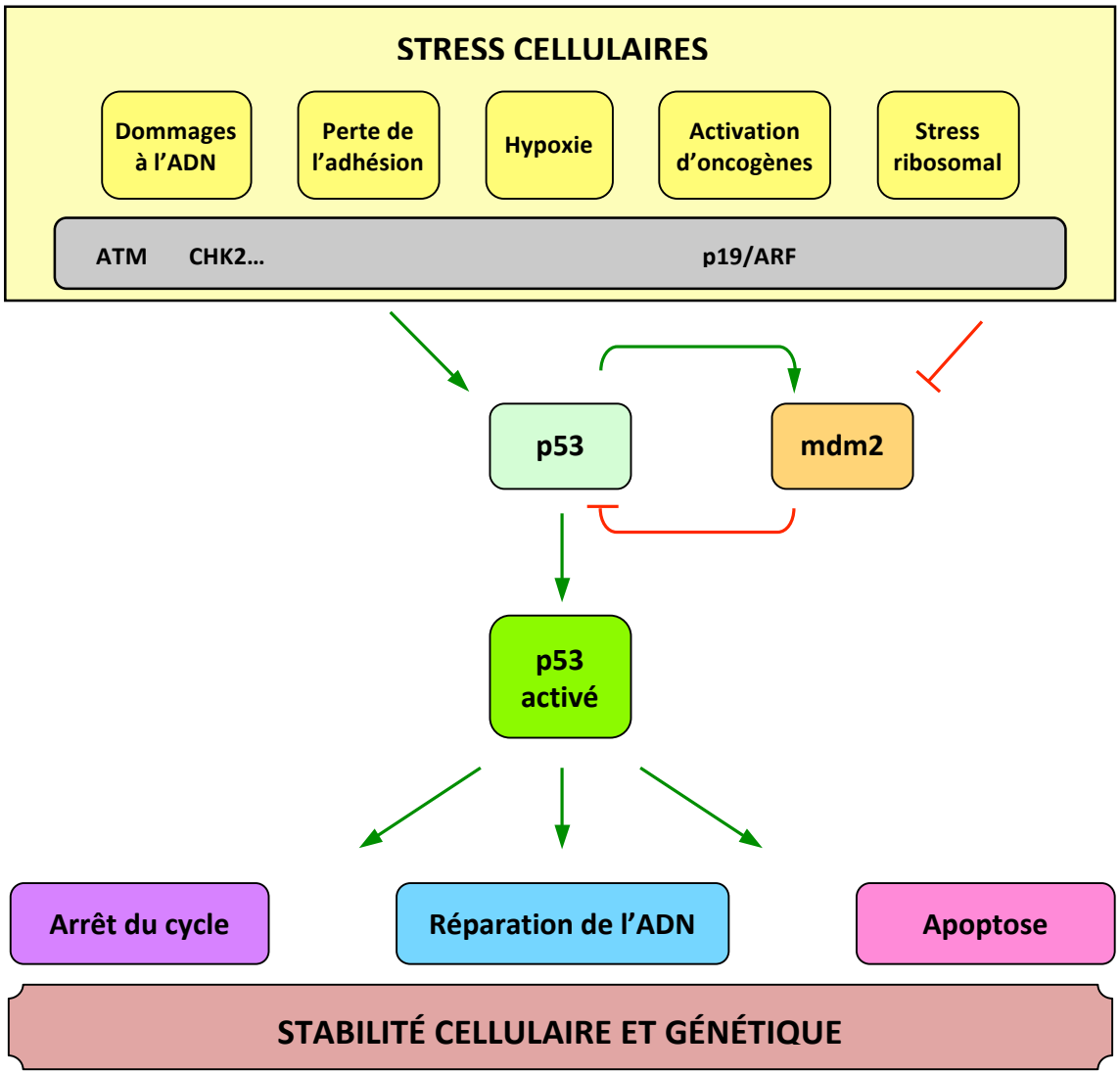


Figure 20 : Résumé des principaux signaux d'activation et des principales fonctions de p53

La protéine p53 joue un rôle essentiel dans l'initiation de réponses cellulaires en réponse à différents types de stress. Le rôle principal de p53 est de protéger la cellule contre ces stress, principalement par l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN ou la mort cellulaire.
(Modifié d'après The p53 web site http://p53.free.fr/p53_info/p53_Pathways.html)

Les différents stress cellulaires, génotoxiques et non-génotoxiques, à l'origine de l'activation de p53 sont présentés dans la Figure 20 (pour revue, voir Vousden & Lane, 2007). Parmi ces signaux de stress, on distingue notamment les lésions de l'ADN cellulaire, qui peuvent avoir plusieurs causes, physiques (radiations UV) ou chimiques (radicaux libres). Ces dommages causés à l'ADN entrainent une activation rapide de p53, puis sont réparés par

différents groupes de protéines spécialisées (pour revue, voir Reinhardt & Schumacher, 2012). D'autres signaux, tels que les mutations activatrices d'oncogènes, l'hypoxie, ou le raccourcissement des télomères entrainent aussi l'activation de p53.

En réponse à certains types de stress, p53 entraine l'arrêt du cycle cellulaire, en activant la transcription du gène *Cdkn1a* codant pour la protéine p21 (Agarwal *et al*., 1995). Cette protéine, en inhibant l'activité kinase du complexe Cdk2/Cycline, bloque la transition entre les phases G1 et S du cycle cellulaire (el-Deiry *et al*., 1993). L'arrêt de cycle cellulaire en phase G1 permet à la cellule de réparer l'ADN endommagé avant de le répliquer. Dans le cas où les cellules ne parviennent pas à réparer leur ADN, l'activation de p53 induit l'apoptose, via l'expression de facteurs pro-apoptotiques comme Bax, Puma ou Noxa.

Les gènes codant pour des protéines ne sont pas les seules cibles transcriptionnelles de p53. En effet, p53 peut réguler directement l'expression de micro-ARN, notamment miR-34, miR-192, miR-215 ou miR-145 (pour revue, voir Feng *et al*., 2011). Ces micro-ARN inhibent l'expression de gènes impliqués dans l'apoptose, comme le gène anti-apoptotique *Bcl2*, ou encore de gènes codant pour des protéines du cycle cellulaire, comme CDK4 ou la cycline E2. p53 contrôle également l'expression des microRNA miR-200c, miR34 et miR-192 impliqués dans la régulation de la transition épithélio-mésenchymateuse (Chang *et al*., 2011 ; Kim *et al*., 2011b).

Par ailleurs, d'autres fonctions de p53 indépendantes de la transcription des gènes ont été décrites. Par exemple, la protéine p53 active est capable de détecter et réparer certaines lesions de l'ADN, (Dahm-Daphi *et al*., 2005) ou encore, de se lier aux protéines Bcl-2 et Bcl-xl en inhibant leur effet anti-apoptotique (Mihara *et al*., 2003).

Enfin, Bmi1 (identifié comme un proto-oncogène) est également un autre régulateur de la voie de signalisation de p53. La surexpression de Bmi1 atténue l'activité de p53 en inhibant l'expression de p19/ARF (Jacobs *et al*., 1999). Ce mécanisme d'inhibition de p53 est retrouvé dans plusieurs cancers comme les cancers de la vessie, peau, prostate, ovarien, colorectal et mammaire (Shakhova *et al*., 2005). Plus récemment, Liu *et al*., ont également montré sur des cellules *in vitro* que la perte de Bmi permettait d'augmenter l'expression de p53 (Liu *et al*., 2012).

3.4 Rôle de p53 dans le développement et dans les cellules souches

3.4.1 p53 et développement

Les premières souris ayant le gène *Trp53* inactivé sur un (*Trp53*$^{+/-}$) ou deux (*Trp53*$^{-/-}$) allèles ont été obtenues en 1992 (Donehower *et al*., 1992). Cette première étude montrait que l'invalidation totale du gène *Trp53* permet l'obtention d'animaux adultes viables, qui, à partir de l'âge de 6 mois, développent de façon spontanée une variété de tumeurs. Postérieurement, le groupe de A.R. Clarke rapportait que l'invalidation totale du gène *Trp53* chez la souris induit des défauts de formation du tube neural seulement dans une certaine proportion des embryons (Armstrong *et al*., 1995). L'analyse approfondie de la période embryonnaire chez ces souris a montré l'importance d'un niveau adéquat de p53 dans les cellules au cours du développement (Choi & Donehower, 1999). D'autres études ont montré la participation de p53 à la différenciation des neurones (Eizenberg *et al*., 1996) et des lymphocytes B et T (Almog & Rotter, 1997 ; Jiang *et al*., 1996) et ses propriétés anti-tératogéniques, qui apportent une protection aux embryons (Nicol *et al*., 1995 ; Norimura *et al*., 1996).

Par ailleurs, les autres membres de la famille p53, p63 et p73, jouent un rôle crucial au cours du développement embryonnaire et leur inactivation entraine des défauts sévères, tels que des malformations des membres, des altérations épithéliales ou encore des défauts de neurogénèse (Yang *et al*., 1999 ; Yang *et al*., 2000). Il a été suggéré que la présence de p63 et p73 pourrait expliquer l'absence de phénotype dans une partie des embryons *Trp53*$^{-/-}$. En effet, les trois membres de la famille p53 ont de nombreuses cibles transcriptionnelles en commun, ce qui pourrait compenser les effets de la déficience en p53 pendant le développement.

3.4.2 p53 et cellules souches embryonnaires

Le rôle de p53 dans les cellules souches embryonnaires a fait l'objet de nombreuses études. Bien que les niveaux de p53 dans ces cellules soient élevés, sa fonctionnalité est discutée (pour revue, voir Spike & Wahl, 2011). Toutefois, il a été rapporté que l'activation de p53 dans les cellules souches embryonnaires murines induit la différenciation par répression de l'expression de Nanog, un facteur de transcription essentiel pour l'autorenouvellement de ces cellules (Lin *et al*., 2005).

Par ailleurs, p53 joue un rôle dans la reprogrammation des cellules différenciées. Dans une étude pionnière, le groupe de Yamanaka a montré que des fibroblastes différenciés adultes pouvaient être reprogrammés vers un état pluripotent similaire à celui des cellules ES par expression forcée des facteurs de transcription Oct3/4, Sox2, Klf4 et Myc (Takahasi et Yamanaka, 2006). Quelques années après, cinq études indépendantes ont rapporté que l'inactivation de *Trp53* améliore l'efficacité de reprogrammation cellulaire vers l'état souche pluripotent (Hong *et al*., 2009 ; Li *et al*., 2009 ; Kawamura *et al*., 2009 ; Utikal *et al*., 2009 ; Marion *et al*., 2009). L'action de p53 semble en partie liée au contrôle que cette protéine exerce sur le cycle cellulaire, l'apoptose et la sénescence. Ces travaux suggèrent que la protéine p53 a un rôle important dans le maintien de l'état différencié et que sa perte favoriserait l'acquisition de propriétés caractéristiques aux cellules souches.

3.4.3 p53 et cellules souches adultes

Différentes études sur des modèles murins ont permis de montrer que p53 régule négativement l'autorenouvellement des cellules souches adultes hématopoïétiques et neurales (pour revue, voir Spike & Wahl, 2011 ; Bonizzi *et al*., 2012). Dans le système hématopoïétique, p53 favorise l'état quiescent des cellules souches, tandis que la perte de p53 conduit à une augmentation de leur autorenouvellement et à l'expansion du pool de cellules souches (pour revue, voir Asai *et al*., 2011).

Bien qu'on dispose d'un nombre plus limité de données, p53 semble également impliquée dans la régulation de la dynamique du compartiment souche de certains tissus épithéliaux. L'ablation de *Trp53* restaure la fonctionnalité des cellules souches épidermiques de souris déficientes en télomérase (Flores & Blasco, 2009). Par ailleurs, plusieurs études suggèrent que l'épithélium mammaire de souris déficientes en p53 présente une activité accrue des cellules souches (Cicalese *et al*., 2009 ; Huang *et al*., 2009). Medina et collaborateurs ont démontré que les greffons issus de fragments épithéliaux de glande mammaire déficiente en p53 peuvent être re-transplantés de façon quasi-illimitée (Parsa *et al*., 2008), tandis que le potentiel régénératif de l'épithélium mammaire normal décline après quelques greffes en série. D'autres études indiquent que la fréquence des cellules morphogénétiques est plus forte dans les glandes mammaires de souris *Trp53*$^{-/-}$ que dans les sauvages (Huang *et al*., 2009 ; Cicalese *et al*., 2009). Ces travaux ont mené à la conclusion

que p53 restreint la prolifération et l'autorenouvellement des cellules souches résidant dans l'épithélium mammaire.

Aucune de ces études n'a cependant déterminé si la perte de p53 affecte les cellules souches et progénitrices des compartiments basal et luminal de l'épithélium mammaire. La prolifération et la différenciation des cellules basales et luminales mammaires sont contrôlées par des mécanismes moléculaires différents. De plus, seules les cellules basales sont aptes à régénérer la glande après transplantation, soulignant l'intérêt d'analyser séparément les propriétés fonctionnelles des deux populations. Enfin, dans le cas de la mutation germinale de *Trp53*, la possibilité d'effets systémiques et/ou de régulations stromales sur la fonction des cellules souches ne pouvant pas être exclue, il est difficile de définir les altérations spécifiques à l'épithélium de ces souris déficientes.

3.4.4 Mécanismes possibles d'action de p53 sur la régulation du compartiment cellulaire souche

Récemment, plusieurs nouveaux mécanismes ont été proposés pour expliquer comment p53 pourrait affecter l'autorenouvellement des cellules souches et les orienter vers un processus de différenciation, contribuant ainsi à réguler la dynamique de ce compartiment dans différents tissus.

L'homéostasie du compartiment souche est contrôlée par la nature des divisions symétriques ou asymétriques des cellules souches y résidant. Lorsque deux cellules filles souches sont générées par division symétrique, le compartiment souche est amplifié tandis qu'une division asymétrique entraine son maintien. En l'absence de p53, une augmentation de la fréquence des divisions symétriques a été observée *in vitro* dans une sous-population de cellules épithéliales mammaires définie par son aptitude à retenir le marqueur membranaire PKH26 (Cicalese *et al*., 2009). Cette population enrichie en activité régénératrice reste à caractériser de façon précise. Par ailleurs, dans la lignée épithéliale mammaire MCF10A, le déterminant du destin cellulaire Numb permet l'activation de p53 en bloquant son ubiquitination par MDM2 (Colaluca *et al*., 2008), suggérant que la liaison p53-Numb pourrait être impliquée dans le processus initial contrôlant la nature de division des cellules souches.

Nous avons mentionné plus haut les travaux établissant un lien entre état souche et EMT, en particulier dans le tissu mammaire (Proia *et al*., 2011 ; Guo *et al*., 2012). Des études

récentes réalisées avec des lignées de cellules épithéliales mammaires indiquent que p53 jouerait un rôle dans la régulation de l'EMT en modulant l'expression de différents microARNs (miRNA), dont les membres de la famille miR-200c et miR-192 (Chang *et al*., 2011). Ces miRNAs inhibent l'expression de plusieurs effecteurs de l'EMT comme Zeb1 et Zeb2 en ciblant leur mRNA (pour revue, voir Brabletz & Brabletz, 2010).

Un autre mécanisme évoqué découle de la capacité de p53 à réguler l'expression de certains gènes de la voie Wnt. Par exemple, p53 est capable d'induire l'expression de la E3 ligase SIAH qui inhibe l'expression de la β-caténine entrainant ainsi une réduction de la signalisation Wnt (Fiucci *et al*., 2004 ; Iwai *et al*., 2004). Comme mentionné dans la Section 1.3.4 de cette Introduction, les facteurs Wnt jouent un rôle important dans la balance entre autorenouvellement et différenciation des cellules souches dans différents tissus.

Enfin, l'implication de p53 dans la reprogrammation des cellules différenciées en cellules souches pluripotentes suggère que sa perte ou son inactivation pourraient permettre l'induction d'une reprogrammation de cellules progénitrices ou différenciées en cellules souches dans les tissus adultes, participant ainsi à l'expansion du compartiment souche.

3.5 Rôle de p53 dans la tumorigenèse

3.5.1 Les mutations du gène *Trp53* ont fréquentes dans les cancers

Des mutations inactivatrices du gène codant pour p53 (noté TP53 chez l'Homme) sont identifiées dans plus de 50% des cancers humains sporadiques. De plus, la plupart des tumeurs restantes présentent des altérations fonctionnelles des protéines régulatrices de p53. Dans la majorité des cas de cancers humains, ces mutations sont des mutations faux-sens, ponctuelles, et qui touchent le domaine de liaison à l'ADN de la protéine p53, bloquant ainsi son activité transcriptionnelle et son rôle anti-prolifératif (pour revue, voir Olivier *et al*., 2010 ; Soussi & Wiman, 2007).

La fréquence des mutations de p53 dans les cancers varie d'un type de cancer à l'autre, de 10% dans les leucémies à plus de 60% dans les cancers ovariens et colorectaux. Dans le cas du cancer du sein 20 à 40% des tumeurs présentent l'expression d'une forme mutée de la protéine p53 et ce taux passe à 80% dans les cancers de type basal, cancer peu différencié

(Sorlie *et al*., 2001 ; Mizuno *et al*., 2010). De façon intéressante, dans les carcinomes du sein de type médullaire, la fréquence de mutations de *TP53* avoisine les 100% (de Cremoux *et al*., 1999). Par ailleurs, plusieurs études ont montré que les mutations somatiques du gène *Trp53* dans le cancer du sein sont impliquées dans la résistance aux thérapies (Lowe *et al*., 1994 ; Bergh *et al*., 1995 ; Aas *et al*., 1996) et sont clairement associées à un développement de tumeurs agressives ainsi qu'à un mauvais pronostic clinique (Pharoah *et al*., 1999 ; Olivier *et al*., 2006).

3.5.2 p53 et cellules souches cancéreuses

Les études portant sur les fonctions de p53 dans le processus tumoral sont très nombreuses et incluent l'utilisation de lignées humaines de cancer du sein ainsi que de modèles murins (pour revue, voir Donehower, 2009 ; Lacroix *et al*., 2006). Il est bien établi que l'activation de p53 empêche l'émergence des cellules cancéreuses en déclenchant l'arrêt du cycle cellulaire, la sénescence ou l'apoptose. Compte tenu de son rôle dans la régulation de l'homéostase du compartiment des cellules souches de divers tissus, il a été proposé que p53 pourrait également contrôler l'expansion des cellules souches cancéreuses (pour revue, voir Spike & Wahl, 2011 ; Bonizzi *et al*., 2012).

Deux études publiées en 2008, suggèrent que la perte de p53 permettrait l'expansion des cellules souches cancéreuses dans les cancers mammaires murins et sur des lignées de cancer du sein. Tout d'abord, grâce à des expériences de transplantation de sous-populations cellulaires de tumeurs mammaires murines dépourvues de p53, Zhang *et al*. ont identifié une population de cellules initiatrices de tumeurs à capacité d'autorenouvellement (Zhang *et al*., 2008). Chez l'humain, la population $CD44^{fort}$ $CD24^{faible}$ est enrichie en cellules souches mammaires (Shipitsin *et al*., 2007). Parallèlement à ces résultats, il a été rapporté que p53 réprimait l'expression de CD44, un marqueur putatif des cellules souches cancéreuses (Godar *et al*., 2008), permettant d'établir un lien entre la perte de p53 et l'expansion des cellules initiatrices de tumeurs.

L'absence de p53 induit la division symétrique et l'amplification de la population souche sur des cellules dérivées d'une tumeur mammaire surexprimant le récepteur ErbB2 (Cicalese *et al*., 2009). Ces études suggèrent que, dans un contexte tumoral, la perte

des protéines p53 favoriserait la division symétrique des cellules souches cancéreuses, contribuant donc à la croissance de la tumeur.

Par ailleurs, l'activation de p53 dans les cellules cancéreuses induit l'expression des membres de la famille de miR-34 et miR-192 permettant ainsi d'inhiber Snail, Slug et Zeb1 et d'empêcher l'EMT (Kim *et al*., 2011a ; Kim *et al*., 2011b ; Siemens *et al*., 2011). De façon réciproque, l'inhibition des miRNAs induit des propriétés de migration et d'invasion caractéristiques de l'EMT. Ces données soulignent l'importance de la régulation de l'axe p53/miRNAs dans le processus tumoral.

Comme mentionné plus haut, le proto-oncogène Bmi est impliqué dans le maintien des cellules souches mammaires (Pietersen *et al*., 2008). Par ailleurs il a été montré que dans les tumeurs du sein, Bmi est activé dans la population des cellules souches cancéreuses (Liu *et al*., 2006). Bmi étant un inhibiteur de p53, ce mécanisme d'inhibition pourrait jouer un rôle important dans le contrôle des cellules souches cancéreuses par p53.

La démonstration que p53 est un obstacle puissant à la reprogrammation des cellules différenciées (Section 3.4.2 de cette Introduction) a provoqué un regain d'intérêt pour l'idée que la dédifférenciation et l'acquisition de propriétés caractéristiques des cellules souches peuvent être liées à une perturbation de la signalisation de p53 dans les tumeurs.

De façon intéressante, l'analyse du profil transcriptionnel de différentes collections de tumeurs du sein a mis en évidence une corrélation entre la perte de p53 et l'expression augmentée des gènes caractéristiques des cellules souches embryonnaires et des cellules reprogrammées (Mizuno *et al*., 2010). Ces résultats suggèrent un lien entre l'inactivation de p53 au cours de la tumorigenèse et l'acquisition des propriétés de plasticité associées à la reprogrammation des cellules tumorales.

4. Objectifs et approches expérimentales

Le but de ce travail a été d'étudier les rôles joués par les facteurs de transcription p53 et Myc dans le développement et la tumorigenèse mammaires, ainsi que leur implication dans le maintien et l'autorenouvellement des cellules souches et progénitrices mammaires.

Pour cela, nous avons généré des souris mutantes présentant une inactivation conditionnelle des gènes *Trp53* ou *Myc* spécifiquement dans la couche basale de l'épithélium mammaire, en utilisant le système Cre-Lox ; l'expression de Cre-recombinase a été ciblée dans la couche basale à l'aide du promoteur K5 et les lignées obtenues ont été désignées K5Cre; *Trp53*$^{F/F}$ et K5Cre; *Myc*$^{F/F}$. Nous avons analysé le développement mammaire des souris mutantes et isolé les cellules basales et luminales de l'épithélium mammaire de ces souris pour évaluer l'effet de l'inactivation des gènes *Trp53* et *Myc* sur les fonctions des cellules souches et progénitrices mammaires. Pour cela, nous avons utilisé des approches *in vivo* – la transplantation dans le coussin adipeux – et *in vitro* – les essais de clonogénicité, en culture cellulaire en deux et trois dimensions.

Afin d'évaluer le rôle de p53 et de Myc dans la formation des carcinomes mammaires de type basal induits par l'activation de la voie de signalisation Wnt/β-caténine, les souris K5Cre; *Trp53*$^{F/F}$ et K5Cre; *Myc*$^{F/F}$ ont été croisées avec les souris K5ΔNβcat générées précédemment au laboratoire.

MATERIELS & METHODES

1. Souris transgéniques

Les souris K5Cre, exprimant la recombinase Cre sous le contrôle du promoteur de la kératine 5 (actif dans les cellules basales des épithélia stratifiés, dont la glande mammaire), ont été fournies par le Dr. J.L. Jorcano (CIEMAT, Madrid, Espagne ; Ramirez *et al*., 2004. Les souris *Trp53*$^{F/F}$ et *Myc*$^{F/F}$ ont été données respectivement par les Drs J. Jonkers (National Cancer Institute, Amsterdam, Pays-Bas ; Jonkers *et al*., 2001) et I.M. de Alboran (Centro Nacional de Biotecnologia, Madrid, Espagne ; de Alboran *et al*., 2001). Les souris K5Cre ont été croisées avec les souris *Trp53*$^{F/F}$ ou *Myc*$^{F/F}$, afin d'obtenir des souris K5Cre; *Trp53*$^{F/F}$ ou K5Cre; *Myc*$^{F/F}$, présentant respectivement une inactivation des gènes *Trp53* ou *Myc* dans la couche basale de l'épithélium mammaire. Nous avons également croisé ces souris avec les souris *Rosa26LacZ* possédant une cassette loxP-stop-loxP-LacZ (Soriano, 1999).

Afin d'étudier la tumorigenèse induite par l'activation de la β-caténine, nous avons croisé les souris K5Cre; *Trp53*$^{F/F}$ et K5Cre; *Myc*$^{F/F}$ avec les souris K5ΔNβcat générées précédemment dans notre laboratoire (Teuliere *et al*., 2005). Les souris issues de ces croisements ont été suivies régulièrement afin d'observer l'apparition de tumeurs mammaires. Toutes les expériences réalisées sur les souris ont été menées en accord avec la réglementation européenne en vigueur (L358-86/609EEC).

Les souris *Trp53*$^{F/F}$, *Myc*$^{F/F}$ ou C57/BL6J ont été utilisées comme contrôles dans les expériences impliquant les souris K5Cre; *Trp53*$^{F/F}$, K5Cre; *Myc*$^{F/F}$ ou K5ΔNβcat respectivement.

2. Génotypage

Pour extraire l'ADNg, les fragments de queues de souris ont été incubés dans une solution de lyse (Tris 100 mM, pH 7,5 ; EDTA 50 mM, pH 8 et SDS 0,5 % ; protéinase K 0,3 mg/ml). La digestion des tissus a été réalisée à 55°C sur la nuit sous agitation. Après une centrifugation de 15 minutes à 14.000 rpm, pour permettre la sédimentation du matériel non digéré, l'ADNg contenu dans le surnageant a été précipité par ajout d'un volume d'isopropanol. L'ADNg a été lavé en éthanol 70 % puis séché 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 les gènes *Trp53* et *Myc* ($p53^F$ et myc^F), ainsi que du transgène K5ΔN57βcat (noté ΔNβcat) a été détectée par PCR (Mastercycler Gradient, Eppendorf). Les séquences des amorces utilisées, ainsi que les conditions de chaque PCR sont indiquées dans le tableau ci-dessous (Tableau 1).

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
Myc	5'- GCCCCTGAATTGCTAGGAAGACTG -3' 5'- CCGACCGGGTCCGAGTCCCTATT -3'	1 min 94°C 1 min 68°C 1 min 72°C } 37 cycles	450 pb (myc) 500 pb (myc^F)
Rosa26	5'- AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT -3' 5'- GCGAAGAGTTTGTCCTCAACC -3' 5'- GGAGCGGGAGAAATGGATATG -3'	45 sec 95°C 45 sec 54°C 1 min 72°C } 38 cycles	300 pb ($rosa^R$) 600 pb (sauvage)
Trp53	5'- AAGGGGTATGAGGGACAAGG -3' 5'- GAAGACAGAAAAGGGGAGGG -3'	1 min 94°C 45 sec 59°C 45 sec 72°C } 35 cycles	481 pb (trp53) 584 pb ($trp53^F$)
ΔNβcat	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 1 : 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 est terminé par une étape d'élongation de 7 min à 72°C. Les produits de la réaction PCR ont ensuite été déposés sur un gel d'agarose contenant du SYBRSafe (Applied Biosystems; 0,004%) pour une migration électrophorétique afin de visualiser les différents amplicons.

3. Isolement des cellules mammaires par cytométrie en flux

Afin d'analyser les populations épithéliales mammaires par cytométrie en flux, les glandes mammaires ont été collectées, dissociées mécaniquement, puis soumises à une série de digestions enzymatiques et protéolytiques à base de collagénase A (3 mg/mL, Roche), 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 (Shackleton *et al*., 2006 ; Stingl *et al*., 2006 ; Sleeman *et al*., 2007). Enfin, les érythrocytes ont été éliminés à l'aide d'un tampon de lyse à base de chlorure

d'ammonium, puis la solution a été filtrée à 40-μm afin de retirer les fragments tissulaires non dissociés.

Les cellules mammaires ainsi dissociées ont ensuite été marquées avec les anticorps suivants : anti-CD31-APC (clone MEC13.3, Biolegend, dilution 1/100), anti-CD45-APC (clone 30-F11, Biolegend, dilution 1/100), anti-CD24-PE (clone M1/69, BD Pharmingen, dilution 1/100), anti-CD49f-FITC (clone GoH3, BD Pharmingen, dilution 1/25), et anti-Ly6A/E-PE-Cy5 (clone D7, e-Biosciences, dilution 1/50). Des anticorps IgG couplés aux mêmes fluorochromes ont été utilisés comme contrôles. Après lavage, les cellules marquées ont été triées par cytométrie en flux à l'aide de l'appareil FACSvantage (BD), nous permettant ainsi d'isoler les cellules mammaires luminales ($CD45^{neg}$ $CD31^{neg}$ $CD24^{fort}$ $\alpha6^{faible}$) des cellules mammaires basales ($CD45^{neg}$ $CD31^{neg}$ $CD24^{faible}$ $\alpha6^{fort}$). L'analyse des données est réalisée grâce au logiciel FlowJo. Les cellules triées étaient pures à 94-98%. Le test d'exclusion au bleu de trypan nous a permis d'estimer une viabilité des cellules après tri de l'ordre de 80 à 92%.

Les populations cellulaires obtenues ont ensuite été utilisées pour culture cellulaire, pour des expériences de transplantations ou pour en extraire l'ARN en vue d'analyses d'expression génique.

4. Essai de formation des colonies

La veille de la mise en culture des cellules mammaires, des fibroblastes (NIH-3T3L1 irradiés à 20 Gy) ont été ensemencés sur une plaque de 24 puits pour recréer une assise de cellules permettant aux cellules épithéliales d'adhérer au support. Comme décrit précédemment (Shackleton *et al*., 2006 ; Stingl *et al*., 2006), les cellules fraîchement isolées ont été mises en culture à une densité de 250 cellules/puits (cellules luminales) et de 1000 cellules/puits (cellules basales) et cultivées pendant 7 jours. Le milieu de culture, à base de DMEM/F12 (Gibco Invitrogen), des colonies luminales contenait : FCS (10%, Lonza 85B011), Insuline (5 μg/mL, Sigma), EGF (10 ng/mL, Invitrogen Molecular Probes), Choléra Toxine (100 ng/mL, Sigma), Pénicilline+Streptomycine (10 mM, Gibco) et Glutamine (10 mM, Gibco). Le milieu de culture des colonies basales était similaire à l'exception d'une concentration de FCS de 1% et l'ajout de B27 (1%, Gibco).

Les colonies cellulaires formées ont ensuite été fixées en paraformaldéhyde 4% (ou PFA) pendant 15 minutes à température ambiante pour être colorées en hématoxyline/éosine et photographiées sous loupe binoculaire (MZ8, Leica Microsystems GmbH, Allemagne). Pour dénombrer les colonies et pour connaître leur taille, le logiciel ImageJ (version 1.40g Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) a été utilisé. Pour l'analyse de la prolifération, les colonies ont été incubées avec du BrdU (5-bromo-2-deoxyuridine, Sigma-Aldrich) à 5µm/mL pendant une heure et fixées avec de l'éthanol 70% froid. Les colonies ont ensuite été traitées avec de l'acide chlorhydrique 2N pendant 20 minutes à température ambiante pour dénaturer l'ADN, puis avec 0,1M de tampon borax pour neutraliser l'acide avant immunomarquage avec un anticorps anti-BrdU.

5. Essai de formation des mammosphères

L'essai de formation de mammosphères a été réalisé selon le protocole décrit par Dontu *et al*. (Dontu *et al*., 2003) et modifié par Spike *et al*. (Spike *et al*., 2012). Les populations cellulaires fraîchement isolées par cytométrie en flux, à partir des épithéliums mammaires contrôles et mutants ont été mises en culture sur des plaques 24 puits à faible adhérence (Corning) à une densité de 5000 cellules/puits dans un milieu à base de DMEM/F12 (Gibco Invitrogen), composé de B27 (1%, Gibco), EGF (20 ng/mL, Invitrogen), bFGF (20 ng/mL, Gibco), Héparine (4 µg/mL, Sigma-Aldrich), Insuline (10 µg/mL, Sigma-Aldrich), Matrigel (2%, BD Pharmingen), Pénicilline+Streptomycine (10 mM, Gibco) et Glutamine (10 mM, Gibco). Les cellules ont été cultivées ainsi pendant 12-14 jours, avec un ajout de milieu tous les trois jours.

Après 12-14 jours de culture, les puits ont été photographiés à la loupe binoculaire. Pour dénombrer les mammosphères et pour connaître leur taille, le logiciel ImageJ a également été utilisé. Les tailles des structures ont été évaluées en nombre de pixels occupés en photographie et classées en trois catégories : agrégats cellulaires (inférieure à 50 pixels), microsphères (entre 50 et 200 pixels) et mammosphères (supérieure à 200 pixels). Pour estimer le pourcentage de cellules clonogéniques - c'est-à-dire aptes à générer des mammosphères d'origine clonale -, le nombre de mammosphères a été rapporté au nombre de cellules ensemencées.

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

Pour les essais d'incorporation du BrdU, les mammosphères de première génération ont été dissocées et réensemencées à la densité de 30.000 cellules/mL et cultivées une nuit dans le milieu mammosphère. Puis les cellules ont été incubées avec du BrdU (5 μM) pendant 5 heures puis centrifugées dans une cytospin (Thermo Scientific Cytospin® 4 Cytocentrifuge) pendant 5 minutes à 1500 rpm, fixées en éthanol 70% froid comme décrit précédemment et marquées avec un anticorps anti-BrdU.

Pour étudier le rôle de la voie de signalisation de Notch dans la formation des mammosphères, l'inhibiteur de la g-sécrétase (N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester, DAPT, Sigma) à été ajouté dans le milieu de culture à la concentration finale de 5 nM tous les 2-3 jours (concentration finale de DMSO 0,1%).

6. Transplantation de cellules isolées et de fragments de tissu mammaire dans le coussin adipeux

Le potentiel de régénération des différentes populations cellulaires isolées à partir des épithélia mammaires a été étudié grâce à des essais de transplantation. Des cellules épithéliales isolées et diluées dans du milieu CO_2 indépendant (Invitrogen) et contenant 50% de matrigel (BD Biosciences), ou des fragments épithéliaux d'environ 1 mm^3, ont été greffés dans des coussins adipeux mammaires « hôtes » de femelles immunodéficientes âgées de 3 semaines (« nudes Balb/c ») dont le rudiment épithélial mammaire endogène a été enlevé préalablement par microchirurgie (Deome *et al*., 1959 ; Taddei *et al*., 2008). L'existence de glandes bilatérales offre la possibilité d'injecter deux populations cellulaires dans la même souris receveuse, et permet donc de procéder à une comparaison rigoureuse de leurs capacités morphogénétiques dans un même contexte hormonal. Les greffons ont été analysés 10-12 semaines après transplantation. Dans certains cas, les souris greffées ont été soumises à une stimulation hormonale avec de l'estradiol et de la progestérone comme décrit précédemment (Rajkumar *et al*., 2007 ; Moumen *et al*., 2012) ou accouplées afin d'étudier le développement lobulo-alvéolaire des transplants mammaires.

En outre, des expériences de transplantations secondaires et tertiaires de fragments épithéliaux des greffons ou de cellules basales fraîchement isolées des greffons ont été réalisées sur les coussins adipeux de nouvelles souris receveuses en suivant le même protocole.

Dans les expériences de compétition, des cellules basales contrôles génétiquement marquées avec le gène *LacZ* (*lacZ*+) ont été isolées des souris K5Cre; *Rosa26LacZ* et mélangées dans une proportion 1:1 soit avec des cellules contrôles non marquées (*lacZ*-), soit avec des cellules déficientes pour p53 *lacZ*- isolées à partir des souris K5Cre; $Trp53^{F/F}$.

Dans les transplantations de cellules luminales, les cellules ont été triées deux fois pour limiter le risque de contamination par des cellules basales. De plus, mille cellules obtenues après dissociation des mammosphères contrôles et K5Cre; $Trp53^{F/F}$ ont été transplantées afin de tester leur potentiel régénératif.

7. Etude morphologique et histologique des échantillons

7.1 Prélèvement, fixation et coupes histologiques

Les glandes et les tumeurs mammaires ont été prélevées, étalées sur une lame histologique, puis fixées sur la nuit. On utilise deux types de fixation selon l'utilisation que nous ferons des échantillons : le Methacarn et le paraformaldéhyde (PFA).

Pour l'analyse morphologique *in toto*, après fixation sur la nuit au Methacarn (60% méthanol ; 30% chloroforme ; 10% acide acétique), les glandes ont été passées successivement dans un bain d'éthanol 70% pendant 15 min, puis 5 minutes en eau distillée et enfin toute la nuit en rouge carmin (Sigma, 0,2%). Le lendemain, les glandes ont été déshydratées dans des bains d'éthanol de concentration croissante (de 50% à 100%) et placées dans 2 bains de xylène pendant 45 min, puis elles ont été photographiées sous loupe binoculaire (MZ8, Leica Microsystems GmbH, Allemagne). Pour inclusion en paraffine, les glandes ont été passées dans un mélange de xylène/paraffine (50/50) pendant une heure à 60°C et ensuite dans un bain de paraffine pure pendant encore une heure. Après un deuxième bain de paraffine sur la nuit, les échantillons ont été refroidis à température ambiante jusqu'à ce que la paraffine devienne solide.

Pour les immunohistochimies avec certains anticorps, les glandes ont été fixées au PFA 4% en PBS sur la nuit à 4°C, rincées exhaustivement en PBS à 4°C, puis incubées successivement dans des solutions d'éthanol de concentrations croissantes (de 50% à 100%) pendant 40 minutes à température ambiante. 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 ont été collectées par centrifugation. Le culot de mammosphères est resuspendu dans une goutte de 50 µL de Matrigel (BD Biosciences) puis laissé pendant 2 à 3h à 37°C pour permettre la polymérisation du matrigel. Les échantillons ont ensuite été fixés au Methacarn, puis incubés en méthanol 100%, 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 inclus comme décrit.

Les blocs de paraffine obtenus ont été conservés au froid avant d'être coupés au microtome (Leica RM 2035). Nous avons réalisé des coupes sériées de tissu de 6-7 µm d'épaisseur que nous avons étalé sur des lames histologiques facilitant l'adhérence.

7.2 Marquage au X-gal

Afin de détecter l'expression de la β-gal, les glandes mammaires ont étés prélevées, préfixées en PFA 2,5% dans du PBS pendant 1 heure et colorées *in toto* au X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside) 1,5 mg/mL sur la nuit à 30°C avant d'être post fixées en PFA 4% durant 1 heure (Biology of the Mammary Gland, http://mammary.nih.gov). Pour les expériences de transplantation en compétition, après le marquage au X-gal pour détecter les canaux mammaires issus des cellules *lacZ*+, les glandes ont été post fixées en acétone pendant 30 minutes puis réhydratées avant de commencer une coloration au rouge carmin permettant de visualiser les canaux issus des cellules *lacZ*-. Les glandes ont ensuite été inclues dans la paraffine.

7.3 Colorations histologiques

La coloration Hématoxyline/Eosine a été réalisée, sur une coupe sur cinq. Elle permet d'étudier la morphologie des structures, ainsi que de sélectionner les lames qui seront utilisées pour un marquage par immunofluorescence. Après déparaffinage des coupes dans deux bains successifs de xylène, pendant 10 minutes chacun, les coupes ont été 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 est débutée par un bain de 1 minute dans l'hématoxyline (RAL diagnostics), suivi d'un lavage avec de l'eau du robinet. Les coupes ont ensuite été plongées dans un bain d'éosine à 0,5% pendant 2 minutes, suivit par un lavage dans de l'eau osmosée. Les coupes ont ensuite été déshydratées et montées avec du milieu EUKIT, (Electron Microscopy Sciences) avant visualisation au microscope optique (Labophot-2, Nikon, Japon).

Une coloration unique au Fast Red (Vector laboratories) pendant 2 minutes a été utilisée dans le cas où les glandes ont été marquées au X-gal comme décrit précédemment.

8. Immunohistologie - Immunocytologie

Le marquage des échantillons inclus en paraffine débute par un déparaffinage et une réhydratation des coupes comme décrit précédemment. Les coupes ont ensuite été lavées dans un bain de PBS pendant 5 minutes. Puis, une étape de "démasquage antigénique" a été réalisée dans certains cas. Pour cela, les lames ont été placées dans une solution tampon de citrate de sodium 10mM pH 6 préchauffée à 95°C et incubées à une température proche de l'ébullition (micro-ondes à 850 Watt) pendant 10 minutes, puis refroidies 20 à 30 minutes à température ambiante. Les lames ont ensuite été recouvertes de la solution de blocage composée de PBS et de sérum de veau fœtal (FCS) à 5% afin de saturer tous les sites de fixation potentiels non spécifiques. Puis les coupes ont été incubées avec les anticorps primaires (Tableau 2) dilués en solution de blocage et placées en chambre humide à 4°C sur la nuit. Après rinçage trois fois dans du PBS pendant cinq minutes, les coupes ont été incubées avec l'anticorps secondaire couplé aux fluorochromes alexaFluor488 ou alexaFluor594 (Molecular Dynamics) pendant 2 heures à température ambiante à l'abri de la lumière. Après marquage spécifique des noyaux au DAPI (1µg/mL dans H_2O) pendant 10

minutes, les lames ont été lavées dans du PBS, montées dans une solution aqueuse Immu-Mount et observées par microscopie à épifluorescence (DM 600B, Leica). Les logiciels Metamorph (MDS Analytical Technologies Inc., USA) ont été utilisés pour l'acquisition des images et Adobe Photoshop (Adobe Systems Incorporated, USA) pour le traitement de celles ci.

Pour les immunohistochimies dans le visible, nous avons utilisé les kits Envision+ System HRP, Dako. Après déparaffinage et réhydratation, les coupes ont été incubées avec de l'eau oxygénée H_2O_2 à 1% pendant 10 min afin de bloquer l'activité peroxydase endogène, puis rincées à l'eau osmosée puis au PBS avant de procéder à l'étape de blocage et l'incubation avec les anticorps primaires sur la nuit à 4°C comme indiqué précédemment. Les anticorps secondaires couplés à la péroxidase fournis avec le kit ont été incubés pendant 45 minutes avant la révélation avec le substrat visible, le DAB, dilué au 1/100ème comme indiqué dans le kit. Ensuite, les lames ont été rincées puis contre colorées à l'hématoxyline avant d'être déshydratées et montées en solution EUKITT.

L'immunomarquage des cellules ou des colonies ne nécessite pas de blocage. Après fixation, les colonies et les cellules ont été directement incubées avec les anticorps primaires (Tableau 2) dilués dans une solution de PBS pendant une heure à 37°C, puis rincées en PBS et incubées avec l'anticorps secondaire couplé aux fluorochromes pendant 45 minutes à 37°C. Pour finir les noyaux sont marqués au DAPI (1µg/mL) pendant 10 minutes à température ambiante. Les lamelles ont ensuite été montées dans une solution aqueuse Immuno-Mount sur une lame histologique après 3 rinçages au PBS.

9. Anticorps

Les anticorps primaires utilisés pour les expériences d'immunofluorescences et d'immunohistochimies ainsi que leurs conditions d'utilisation sont présentés dans le Tableau 2. Pour les anticorps secondaires, nous avons utilisé les anticorps de chèvre anti-IgG de la gamme Alexa Fluor, Alexa 488 et Alexa 594 (Invitrogen) dilués au 1/500ème, ou ceux fournis dans le kit Dako comme décrit précédemment.

Anticorps	Origine	Dilution	D.A.	Fournisseur (Réf)
α-SMA^{Cy3}	Souris	1/200	-	Sigma (L9393)
β-caséine	Lapin	1/500	-	Collaborateur (Dr Medina)
BrdU	Souris	1/100	-	BD/Pharmigen (BD/Ph 555627)
ERα	Souris	1/20	+	Dako Cytomation (M7047)
HA	Rat	1/100	-	Roche (11867423)
K5	Lapin	1/500	-	Covance (PRB-160P)
K8	Souris	1/100	+	Covance (MMS-162P)
Ki67	Lapin	1/100	+	Epitomics (4203-1)
MUC 1	Lapin	1/200	-	Abcam (AB37435)
Myc	Lapin	1/20	+	Santa Cruz Biotech. (SC-764)
PR	Lapin	1/200	+	Santa Cruz Biotech. (SC-7208)
Stat5 a	Lapin	1/500	-	Santa Cruz Biotech. (SC-1081)
TK	Lapin	1/100	-	Dako (Z0622)

Tableau 2 : Liste des anticorps utilisés pour les expériences d'immunohistochimies et d'immunofluorescences.

TK : Total Keratins ; D.A. : Démasquage antigénique ; Les « + » et « - » indiquent la nécessité de précéder le marquage d'un démasquage antigénique.

10.RT-PCR en temps réel

Les ARN totaux des cellules triées à partir des glandes mammaires ont été extraits à l'aide du kit RNeasy (Qiagen GmbH) en suivant les instructions décrites par le fabricant. Les ARN obtenus ont été rétrotranscrits avec la transcriptase inverse Mo-MuLV (200 U, Promega), en utilisant la méthode d'amorçage au hasard (amorces hexamériques; 1 μg, Roche) afin d'obtenir des ADN complémentaires (ADNc). Pour chaque échantillon, une réaction témoin a été effectuée au cours de laquelle les ARN totaux n'ont pas été mis en présence de la transcriptase inverse. Des expériences de PCR en temps réel ont ensuite été 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 (Roche), intégré aux nucléotides utilisés.

Les amorces oligonucléotidiques spécifiques des gènes d'intérêt, ont été obtenus à l'aide du logiciel Oligo 6.8 (Molecular Biology Insights) et fournies par Eurogentec, sont présentées dans le Tableau 3. Dans certains cas, des amorces commerciales ont également été utilisées (SABiosciences). Les conditions expérimentales comportaient une étape de dénaturation pendant 10 min à 95°C, puis 40 cycles de 15 secondes à 95°C suivi d'une minute

à 60°C. Les niveaux de transcription des gènes d'intérêts (Tableau 3) ont été rapportés aux niveaux de transcription du gène de référence glycéraldéhyde phosphate deshydrogénase (*Gapdh*), suivant la formule $2^{(Ct\ GAPDH\ -\ Ct\ gène\ cible)}$, où le Ct correspond au nombre de cycles PCR permettant l'obtention de 50 % de la totalité des produits d'amplification. Des duplicats ont été réalisés pour chaque échantillon.

Gènes	Séquence des amorces
Acta2	5'- GACCCAGATTATGTTTGAGAC -3' 5'- GTCCAGCACAATACCAGTTC -3'
Bcn	5'- CTATCGGCTGTACTCTGAAC -3' 5'- CACTTGGCTTGTTGGATACAC -3'
Brca1	5'- CTGAGGGCATAAGAAACATTG -3' 5'- GGCTCCACACACACATTTGA -3'
Ccna2	SABiosciences/Qiagen
Ccnb1	SABiosciences/Qiagen
Ccnb2	SABiosciences/Qiagen
Cdh1	5'- ATCCTCGCCCTGCTGATTC -3' 5'- ACCACCGTTCTCCTCCGTA -3'
Cdh3	5'- ACGAAGCCCCTGTGTTTGTT -3' 5'- GTCCTGTGCGGTATAGATGC -3'
Cdk4	5'- CCTTCCCGTCAGCACAGTT -3' 5'- CCATCAGCCGTACAACATTG -3'
Cdk6	SABiosciences/Qiagen
Cdkn2a	SABiosciences/Qiagen
Cenpe	SABiosciences/Qiagen
Csn2	5'- CCTCTGAGACTGATAGTATTT -3' 5'- TGGATGCTGGAGTGAACTTTA -3'
Elf5	5'- CCAACGCATCCTTCTGTGAC -3' 5'- AGGCAGGGTAGTAGTCTTCA -3'
Esr1	5'- CTGGACAGGAATCAAGGTAAA -3' 5'- GAGGCACACAAACTCTTCTC -3'
Gapdh	5'- CCAATGTGTCCGTCGTGGATC -3' 5'- GTTGAAGTCGCAGGAGACAAC -3'
Gata3	5'- AGGCAGGGAGTGTGTGAAC -3' 5'- TTCGCTTGGGCTTGATAAGG -3'
Hey1	SABiosciences/Qiagen
Id2	SABiosciences/Qiagen
Jag2	SABiosciences/Qiagen
Kit	5'- AGTGCTTCCGTGACATTCAAC -3' 5'- TGCCATTTATGAGCCTGTCGT -3'
Kit 22	SABiosciences/Qiagen
Krt14	5'- CGGCAAGAGTGAGATTTCTG -3' 5'- TCCAGCAGGATTTTGTACTG -3'
Krt18	5'- CCTTGCCGCCGATGACTTTA -3' 5'- CAGCCTTGTGATGTTGGTGT -3'
Lalba	SABiosciences/Qiagen
Mcm2	SABiosciences/Qiagen
Mki67	5'- TCAGATGGCTCAAAGAACAGT -3' 5'- CAGAAGTGGGCTCTACTATG -3'
Myc	5'- CACCAGCAGCGACTCTGAA -3' 5'- CCCGACTCCGACCTCTTG -3'
Mycn	SABiosciences/Qiagen
Pgr	5'- CCACCTGTACTGCTTGAATAC -3'

	5'- CAACTGGGCAGCAATAACTTC -3'
Prlr	5'- ATAAAAGGATTTGATACTCATCTG -3' 5'- GTCATCCACTTCCAAGAACTC -3'
Prom1	SABiosciences/Qiagen
Snai1	5'- ACACCTGTTTCACAGCAGTT -3' 5'- TAGTTCTGGGAGACACATTG -3'
Snai2	5'- GATGCCCAGTCTAGGAAATC -3' 5'- CCCAGTGTGAGTTCTAATGT -3'
Spc24	SABiosciences/Qiagen
Stmn1	SABiosciences/Qiagen
Top2a	SABiosciences/Qiagen
Trp53	5'- AGGGTCGAGACACAATCCTC -3' 5'- GCAGAGACCTGACAACTATCA -3'
Trp63	5'- TGCCCAGACTCAATTTAGTGA -3' 5'- GAGGAGCCGTTCTGAATCTG -3'
Trp73	5'- CAGCCTTTGGTTGACTCCTA -3' 5'- ACCGTGTACCTTGTTCATTG -3'
Vim	5'- CCAAGCAGGAGTCAAACGA -3' 5'- TAAGGGCATCCACTTCACAG -3'
Wap	5'- TTGAGGGCACAGAGTGTATC -3' 5'- TTTGCGGGTCCTACCACAG -3'
Zeb1	SABiosciences/Qiagen

Tableau 3 : Liste des oligonucléotides utilisés au cours des expériences de PCR en temps réel.

Les séquences présentées dans ce tableau ont été déterminées manuellement à l'aide du logiciel Oligo 6.8.

11.Analyse statistique des résultats

Pour tous les essais, au moins trois expériences indépendantes ont été réalisées. Dans les tests des colonies et des mammosphères, trois puits par expérience ont été analysés et quantifiés. Les valeurs moyennes ± déviation standard sont présentées. Le test student a été utilisé pour les analyses statistiques.

Pour les expériences de transplantation en dilution limite, la fréquence des cellules présentant une capacité de régénération (cellules souches) a été calculée en utilisant un logiciel crée en 2009 et mis à disposition sur internet (http://bioinf.wehi.edu.au/software/elda/index.html) par les auteurs (Hu & Smyth, 2009).

RESULTATS

1. Le proto-oncogène *Myc* est essentiel à la fonction des cellules souches mammaires (Article 1)

Contexte et justification de la recherche :

Le facteur de transcription Myc est surexprimé dans plus de 50% des carcinomes mammaires humains (Deming *et al*., 2000). Myc est impliqué dans la régulation des cellules souches embryonnaires et des cellules souches adultes, notamment dans le système hématopoïétique. Dans la glande mammaire, les cellules basales et les cellules progénitrices luminales sont caractérisées par une forte expression de Myc (Kendrick *et al*., 2008). Cependant, les fonctions de Myc dans le maintien des populations souches et progénitrices mammaires n'avaient pas été étudiées auparavant. Nous avons généré des souris K5Cre; $Myc^{F/F}$ présentant une inactivation conditionnelle de *Myc* dans la couche basale mammaire afin d'étudier l'effet de la perte de Myc dans le développement de la glande et dans les différentes populations souches et progénitrices mammaires.

Résumé des principaux résultats :

1.1 La perte de Myc dans les cellules basales mammaires diminue la prolifération cellulaire dans les deux couches de l'épithélium mammaire conduisant à une hypoplasie de la glande

Nous avons trouvé des perturbations dans le développement mammaire des souris K5Cre; $Myc^{F/F}$ à l'état vierge comme après plusieurs gestations (glandes hypoplasiques par rapport aux contrôles), avec une diminution dans la production des protéines du lait et une incapacité à allaiter chez la plupart des femelles. L'utilisation de lacZ comme marqueur génétique permettant de suivre l'excision de *myc* dans les cellules K5+ et dans leur progénie, (souris K5Cre; *Rosa26LacZ;* $Myc^{F/F}$) a mis en évidence que l'ensemble des cellules basales était dépourvu de Myc, alors que les cellules luminales restaient Myc-positives suggérant qu'une grande partie des progéniteurs luminaux a échappé à la recombinaison. Nous avons isolé les populations cellulaires mammaires par cytométrie en flux et constaté une diminution des populations épithéliales dans les souris K5Cre; $Myc^{F/F}$, notamment dans le compartiment

basal. En accord avec les expériences de traçage cellulaire, l'expression de Myc était fortement dimunuée dans les cellules basales mutantes mais peu dans les luminales. L'analyse du cycle cellulaire a montré que la prolifération des cellules luminales et basales est diminuée dans les souris mutantes, ce qui explique leur phénotype hypoplasique.

1.2 La perte de Myc dans les cellules basales mammaires affecte les cellules souches/progénitrices mammaires

Nous avons mis en évidence une forte diminution de la capacité des cellules basales et luminales des souris K5Cre; *Myc*$^{F/F}$ à former des colonies clonales *in vitro*. L'analyse par cytométrie en flux a révélé environ deux fois moins de cellules progénitrices dans le compartiment luminal mammaire des souris K5Cre; *Myc*$^{F/F}$. De façon cohérente, l'expression de marqueurs des cellules progénitrices était diminuée dans les cellules luminales des souris mutantes, confirmant une altération dans l'équilibre entre cellules progénitrices et cellules différenciées. Ces résultats suggèrent que la perte de Myc dans les cellules basales mammaires affecte les cellules souches/progénitrices dans les deux couches de l'épithélium mammaire, basale et luminale.

1.3 La perte de Myc dans la couche basale mammaire perturbe fortement la fonction des cellules souches mammaires

Pour analyser l'effet de la perte de Myc sur la fonction des cellules souches mammaires *in vivo*, nous avons effectué des expériences de transplantation. Nous avons trouvé que le potentiel de régénération de l'épithélium K5Cre; *Myc*$^{F/F}$ était totalement aboli après trois transplantations sériées, suggérant que la perte de Myc dans les cellules basales affecte l'autorenouvellement des cellules souches présentes dans l'épithélium mammaire adulte. Les transplantations en dilution limite des cellules mammaires des souris K5Cre; *Myc*$^{F/F}$ ont révélé une diminution de la fréquence des cellules souches fonctionnelles de plus de 200 fois. Enfin, la transplantation des cellules basales mutantes isolées n'a pas permis de régénérer un épithélium mammaire, indiquant que Myc est nécessaire à la fonction des cellules souches.

1.4 La stimulation par des hormones ovariennes ne suffit pas à restaurer la fonction des cellules souches/progénitrices déficientes en Myc

Deux études récentes ont montré que les hormones ovariennes (E : œstrogènes, P : progestérone) étaient d'importants régulateurs de la fonction des cellules souches (Asselin-Labat *et al*., 2010 ; Joshi *et al*., 2010). Nous avons donc cherché à savoir si la stimulation hormonale pouvait restaurer la fonction des cellules souches en absence de Myc. La stimulation par E/P des souris hôtes a permis la régénération d'un épithélium mammaire déficient en Myc (Myc-KO) dans plus de la moitié des coussins adipeux injectés par des cellules basales mutantes. En revanche, le développement lobulo-alvéolaire était fortement perturbé dans l'épithélium Myc-KO. De plus, la transplantation secondaire de fragments épithéliaux Myc-KO n'a pas donné, dans la plupart des cas, de nouvelles glandes. L'analyse des populations basales et luminales isolées à partir de l'épithélium régénéré après stimulation hormonale, a révélé une forte diminution de leur capacité à former des colonies et une inhibition de l'expression de gènes caractéristiques des cellules souches/progénitrices. L'ensemble de ces résultats indique que, bien que les hormones restaurent partiellement les capacités morphogénétiques des cellules dépourvues en Myc, les fonctions des cellules souches et progénitrices présentes dans l'épithélium mammaire déficient en Myc restent très perturbées après la stimulation par E/P.

Conclusion de l'article : ces résultats indiquent que dans la glande mammaire adulte, Myc est essentiel pour le maintien des cellules souches et progénitrices et agit en aval des hormones ovariennes pour induire l'amplification des cellules progénitrices nécessaire à l'alvéologenèse durant la gestation.

Article 1 : *The proto-oncogene Myc is essential for mammary stem cell function*

Stem Cells

STEM CELLS®
TISSUE-SPECIFIC STEM CELLS

The Proto-Oncogene Myc Is Essential for Mammary Stem Cell Function

MEJDI MOUMEN,[a,b] AURÉLIE CHICHE,[a,b] MARIE-ANGE DEUGNIER,[a,b] VALÉRIE PETIT,[a,b] ALBERTO GANDARILLAS,[c,d] MARINA A. GLUKHOVA,[a,b] MARISA M. FARALDO[a,b]

[a]Institut Curie, Centre de Recherche, Paris, France; [b]CNRS, UMR144, Paris, France; [c]Fundación Marqués de Valdecilla-IFIMAV, Santander, Spain; [d]Inserm ADR Languedoc, Roussillon, Montpellier, France

Key Words. Mammary gland • Stem cells • Self-renewal • Progenitors • Myc

ABSTRACT

The mammary epithelium comprises two major cell lineages: basal and luminal. Basal cells (BCs) isolated from the mammary epithelium and transplanted into the mouse mammary fat pad cleared from the endogenous epithelium regenerate the mammary gland, strongly suggesting that the basal epithelial compartment harbors a long-lived cell population with multipotent stem cell potential. The luminal cell layer is devoid of the regenerative potential, but it contains cells with clonogenic capacity, the luminal progenitors. Mammary BCs and luminal progenitors express high levels of the transcription factor Myc. Here, we show that deletion of Myc from mammary basal epithelial cells led to impaired stem cell self-renewal as evaluated by limiting dilution and serial transplantation assays. Luminal progenitor population was significantly diminished in mutant epithelium suggesting control by the BC layer. Colony formation assay performed with isolated BCs showed that clonogenic capacity was abolished by Myc deletion. Moreover, transplanted BCs depleted of Myc failed to produce epithelial outgrowths. Stimulation with ovarian hormones estrogen (E) and progesterone (P) partially rescued the repopulation capacity of Myc-depleted BCs; however, the Myc-deficient mammary epithelium developed in response to E/P treatment lacked stem and progenitor cells. This study provides the first evidence that in the mammary gland, Myc has an essential nonredundant function in the maintenance of the self-renewing multipotent stem cell population responsible for the regenerative capacity of the mammary epithelium and is required downstream from ovarian hormones, for the control of mammary stem and progenitor cell functions. STEM CELLS *2012;30:1246–1254*

Disclosure of potential conflicts of interest is found at the end of this article.

INTRODUCTION

The transcription factor proto-oncogene Myc regulates the expression of numerous genes involved in the control of cellular metabolism, growth, and proliferation [1]. Myc is required for the maintenance of embryonic stem cells [2]. Several studies implicate Myc in the regulation of self-renewal and differentiation of hematopoietic stem cells [3] and the maintenance of stem/progenitor cell function in the epidermis and intestine [4, 5]. The related factor N-Myc plays an important role in the regulation of neural stem/progenitor cells [6].

The over-expression of Myc is one of the common anomalies associated with human cancer. Myc expression is often deregulated in breast cancer, in particular, in the triple-negative subtype [7, 8]. Moreover, Myc is an estrogen receptor-α (ERα) target, and there is a significant overlap between ERα- and Myc-regulated genes associated with the control of proliferation [9].

The mammary epithelium is organized as a bilayer, with a layer of basal myoepithelial cells and a luminal cell layer. In mice and humans, the basal and luminal lineages segregate during perinatal period (reviewed in [10]). Both mammary lineages originate from embryonic precursor cells that express the basal-type cytokeratins 5 and 14 (K5 and K14, respectively). In adult tissue, the mammary basal cells (BCs), rather than the luminal cells, are able to regenerate mammary gland upon transplantation into mouse mammary fat pad cleared of endogenous epithelium. This strongly suggests that the basal epithelial compartment harbors a long-lived cell population with multipotent stem cell properties [11, 12]. The luminal cell layer contains clonogenic cells, the luminal progenitors, which are thought to give rise to secretory alveoli during pregnancy [11–13]. Lineage tracing experiments have suggested that the basal and luminal compartments are

Author Contributions: M.M.: collection and assembly of data, data analysis and interpretation, and final approval of manuscript; A.C. and V.P.: collection and assembly of data, data analysis and interpretation; M.A.D.: conception and design, data analysis and interpretation, and final approval of manuscript; A.G.: initiation of the study, provision of study material, data interpretation, and final approval of manuscript; M.A.G.: conception and design, financial support, data analysis and interpretation, manuscript writing, and final approval of manuscript; M.M.F.: conception and design, data analysis and interpretation, manuscript writing, and final approval of manuscript. M.A.G. and M.M.F. contributed equally to this work.

Correspondence: Marina A. Glukhova, Ph.D., UMR 144 CNRS-Institute Curie, 26 rue d'Ulm, 75248 Paris Cedex 05, France. Telephone: +33-1-56-24-63-31; Fax: +33-1-56-24-63-49; e-mail: Marina.Glukhova@curie.fr Received January 31, 2012; accepted for publication March 5, 2012; first published online in STEM CELLS *EXPRESS* March 21, 2012. © AlphaMed Press 1066-5099/2012/$30.00/0 doi: 10.1002/stem.1090

independently maintained by their respective unipotent stem/progenitor cells in adult animals [14].

In the mammary gland, high levels of Myc expression are characteristic of BCs and of luminal progenitors [15]. Myc over-expression in the luminal layer of the mouse mammary gland leads to unscheduled lobulo-alveolar development and tumorigenesis [16, 17]. Myc deletion from the differentiated luminal cells affects milk secretion and moderately reduces the repopulating capacity of the mammary epithelium as evaluated by transplantation of tissue fragments [18]. However, neither the functions of Myc in the mammary basal epithelial compartment nor the effects of Myc deletion on distinct mammary stem/progenitor populations have been studied so far.

Materials and Methods

Mice

Transgenic mice expressing the Cre recombinase under the control of the K5 promoter (*K5-cre*) were kindly provided by Dr. J. Jorcano [19], *Rosa26LacZ* reporter strain, carrying a loxP-stop-loxP-lacZ cassette, by P. Soriano [20], mycF/F strain, by I.M. de Alboran [21]. All mice were bred in a 129SV/C57BL6 genetic background. $myc^{F/+}$ or $myc^{F/F}$ mice were used as controls unless indicated otherwise. Experiments were conducted in accordance with French Veterinary Guidelines and those formulated by the Council of Europe for experimental animal use (L358-86/609EEC).

Estrogen/Progesterone Stimulation

For hormone stimulation, silicon tubes containing estrogen/progesterone (E/P) were implanted subcutaneously 5 weeks after transplantation as previously described [22]. Mammary glands were analyzed 4 weeks after tube implantation.

Preparation of Mammary Epithelial Cells and Cell Cycle Analysis

The inguinal mammary glands of four to six 20-week-old virgin females were pooled to prepare single-cell suspensions, and cells were processed for flow cytometry as described [12, 13, 23]. The following conjugated antibodies were used: anti-CD24-PE (clone M1/69; BD Pharmingen, San Diego, CA, http://www.bdbiosciences.com), anti-CD49f-FITC (clone GoH3; BD Pharmingen), anti-CD45-APC (clone 30-F11; Biolegend, San Diego, CA, http://www.biolegend.com), anti-CD31-APC (clone MEC13.3; Biolegend), and anti-Ly6A/E-PE-Cy5 (clone D7; eBiosciences, San Diego, CA, http://www.ebiosciences.com). Labeled cells were analyzed and sorted on a FACSVantage flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA). Sorted cell populations were routinely reanalyzed and found to be 94%–98% pure. As estimated by trypan blue exclusion, cell viability after sorting was between 80% and 88%. For cell cycle studies, cells isolated from six pooled mammary fat pads were incubated with Hoechst 33342 (Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, http://www.sigmaaldrich.com/france; 6 μg/ml) for 1 hour at 37°C before cell surface labeling and flow cytometry. Cell cycle analysis was performed using FLowJo software. Data from one of three independent experiments are shown.

Transplantation Assays

Fragments of mammary epithelium or 1,000–5,000 sorted BCs in 10 μl of 50% growth-factor-reduced matrigel (BD Biosciences, San Diego, CA, http://www.bdbiosciences.com) were implanted into the inguinal fat pads of 3-week-old nude BALB/c females cleared of endogenous epithelium as described elsewhere [23]. In limiting dilution assays, 500–100,000 of total unsorted mammary cells per fat pad were transplanted in matrigel. Mutant and control epithelial fragments and cells were grafted into two contralateral fat pads of the same recipient mouse, and the outgrowths were analyzed 10 weeks after transplantation. Repopulating unit frequency was calculated using the Extreme Limiting Dilution Analysis software [24].

Cell Culture Assays

Sorted luminal cells were cultured at a density of 250 cells per well as described elsewhere [13]. Sorted BCs were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/F12 medium containing 1% fetal calf serum (FCS), B27 at a density of 500–1,000 cells per well [11]. For cultures on matrigel, 15,000 control or 45,000 mutant BCs were seeded on LabtekII slides (Nalge/Nunc International, Rochester, NY, http://www.nalgenenunc.com) coated with matrigel (BD Pharmingen) and grown in 2% FCS DMEM/F12 medium.

X-Gal Test

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 (Biology of the Mammary Gland, http://mammary.nih.gov).

Alternatively, cryosections (10–15-μm thick) were cut from mammary gland pieces embedded in Tissue-Tek (Miles Diagnostic Division, Elkhart, IN) and frozen in isopentane cooled by liquid nitrogen. Cryosections were thawed at room temperature for 30 minutes, fixed for 15 minutes in 2% formaldehyde, 0.2% glutaraldehyde, 0.02% Nonidet P40 in PBS, washed with PBS, and incubated with the X-gal staining solution (0.025% X-gal, 3 mM $K_3Fe(CN)_6$, 3 mM $K_4Fe(CN)_6$, 1.5 mM $MgCl_2$, 15 mM NaCl, 40 mM Hepes, and pH 8) overnight at 30°C. The sections were then postfixed with 4% formaldehyde and counterstained with nuclear Fast Red. X-gal staining of colonies was performed as for cryosections after fixation in 2% formaldehyde and 0.2% glutaraldehyde at 4°C for 4 minutes.

Whole-Mount Analysis, Histology, and Immunostaining

Dissected mammary fat pads were spread onto glass slides, fixed in a 1:3:6 mixture of acetic acid/chloroform/methanol, and stained with Carmine in whole mount. For histological analysis, glands were embedded in paraffin. Seven micrometer-thick sections were cut and dewaxed prior to hematoxylin and eosin staining or immunolabeling performed as described elsewhere [25]. Before incubation with primary antibodies, sections were treated with 5% fetal calf serum in PBS for 1 hour. Sections were incubated overnight at 4°C with primary antibodies, 1 hour at room temperature with secondary antibodies, and 3 minutes with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). The following primary antibodies were used: mouse monoclonal anti-α-smooth muscle actin (αSMA; Sigma) and anti-ERα (Dako, Trappes, France, http://www.dako.fr); rabbit polyclonal anti-K5, anti-K8 (Covance, Princeton, NJ, http://www.covance.com), anti-Ki67 (Novocastra Labs., Newcastle upon Tyne, UK, http://www.novocastra.co.uk), and anti-signal transducer and activator of transcription 5A (STAT5A, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, http://www.scbt.com). Alexafluor-conjugated secondary antibodies (1/1,000; Invitrogen Saint Aubin, France, http://www.invitrogen.com) were used for immunofluorescence labeling. The Envision+ System HRP kit (Dako) was used for immunohistochemistry.

Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

RNA was retro-transcribed with Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (Promega, Madison, WI, http://

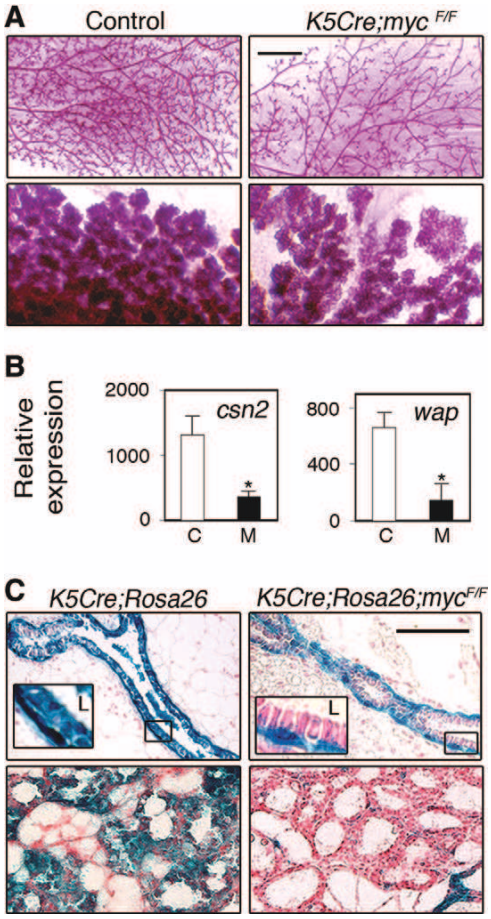


Figure 1. Mammary development in *K5Cre;myc*$^{F/F}$ mice. **(A):** Mammary glands from control and *K5Cre;myc*$^{F/F}$ mice stained with Carmine in whole mount. Upper panels, 4-month-old virgin; lower panels, 1-day-lactating mice, third pregnancy. Bars = 1.5 mm in upper panels and 0.5 mm in lower panels. **(B):** *csn2* (*β*-casein) and *wap* (WAP) gene expression in control and mutant mammary glands on the second day of lactation, third pregnancy. Q-PCR. *, $p < .05$ and .02 for *csn2* and *wap*, respectively. Three control and three mutant mice were analyzed. The values reported are normalized to *gapdh* expression. **(C):** Sections through control, *K5Cre;Rosa26*, and mutant, *K5Cre;Rosa26;myc*$^{F/F}$, mouse mammary glands X-gal-stained in whole mount. Upper panels, 4-month-old virgin; lower panels, 1-day-lactating mice. Bar = 100 μm. Abbreviation: L, lumen.

www.promega.com), and quantitative RT-PCR (q-PCR) was performed by monitoring in real time the increase in fluorescence of the SYBR Green dye on an ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, http://www.appliedbiosystems.com). The primers used for q-PCR analysis are listed in Supporting Information.

Results

Deletion of Myc from BCs Leads to Diminished Proliferation Rates in both Mammary Epithelial Cell Layers and Gland Hypoplasia

To investigate the role of Myc in the control of mammary stem and progenitor cell function, we deleted Myc from mammary basal epithelial cells. *K5-Cre* transgenic mice were bred with mice carrying conditional *myc* alleles (*myc*$^{F/F}$). As reported previously, *K5Cre;myc*$^{F/F}$ mice are viable and fertile [4]. Mammary glands were found to be slightly hypoplastic in adult virgin *K5Cre;myc*$^{F/F}$ females, if compared with those of age-matched control animals (Fig. 1A). Most *K5Cre;myc*$^{F/F}$ mothers lost part of their litters, and the weight of surviving pups was lower than that of pups fed by control females (Supporting Information Fig. S1A). In lactating mice, the amount of secretory alveoli was found to be lower in mutants than in controls especially in the second and third pregnancies (Fig. 1A and data not shown). Consistently, the levels of milk protein gene transcripts were decreased in mutant glands as compared to control (Fig. 1B).

To analyze the distribution of Myc-deficient cells in mutant mammary epithelium, control and *K5Cre;myc*$^{F/F}$ mice were bred with the Rosa26*LacZ*-reporter (R26) mouse strain. Thus, *LacZ* served as BC genetic marker permitting lineage tracing and, in addition, monitoring of the Myc deletion in mutant tissue. All BCs and approximately 80% of luminal cells in control virgin *K5Cre;R26* mice were *LacZ*-positive indicating that K5-driven Cre expression led to recombination in mammary stem/early progenitor cells (Fig. 1C). As could be expected, in control lactating mouse glands, most alveolar cells were *LacZ*-positive (Fig. 1C). Strikingly, in mutant virgin mice, *LacZ* expression was limited to the BC layer with most luminal cells being *LacZ*-negative, whereas during lactation, most mammary alveoli comprised *LacZ*-negative luminal cells (Fig. 1C). Thus, in mutant mammary epithelium, *myc* was deleted from BCs only, and in pregnancy, secretory alveoli were developed from Myc-positive progenitors. We suggest that the luminal cell population in mutant epithelium originated during early stages of the gland development, from cells committed to luminal lineage that switched off the K5 promoter and escaped Myc deletion. In agreement with this hypothesis, in mutant E18-embryos, in contrast to control, cells that escaped recombination and remained *LacZ*-negative were found in the central (future luminal) part of the developing mammary ducts (Supporting Information Fig. S1B). Many of these cells displayed luminal features, that is, expressed K8 and were negative for K5 (Supporting Information Fig. S1B).

Next, we separated mammary basal and luminal cells using flow cytometry cell sorting (Fig. 2A). The full gating strategy used to sort mammary basal and luminal cells is shown in Supporting Information Figure S2. In agreement with the results of whole-mount and histological analyses, the number of basal and luminal cells was found to be decreased in mutant mouse glands (Fig. 2B). Moreover, the ratio between basal and luminal cell populations was altered in *K5Cre;myc*$^{F/F}$ mammary epithelium. In control, BCs (CD31−/CD45−/CD24+/CD49f-high) represented 42.4% ± 6.6% of the total mammary epithelial population (CD31−/CD45−/CD24+), whereas in the mutant, 20.4% ± 5.9% only (Fig. 2C).

Cre expression was found only in BCs from mutant glands (Supporting Information Fig. S2B). Myc was efficiently deleted from the BC population, as its transcript levels were 15- to 20-fold lower in mutant BCs (Fig. 2D). In luminal cells from mutant mammary epithelium, *myc* expression levels were only 20%–25% lower than the control value, confirming that *myc* was not deleted from most luminal cells (Fig. 2D). *mki67* expression was markedly decreased not only in basal but also in luminal cells from the mutant mammary glands suggesting that proliferation was inhibited in both compartments of *K5Cre;myc*$^{F/F}$ mammary epithelium (Fig. 2D). This was confirmed by flow cytometry cell cycle analyses of mammary epithelial cells isolated from virgin mouse glands. In basal and luminal populations, the

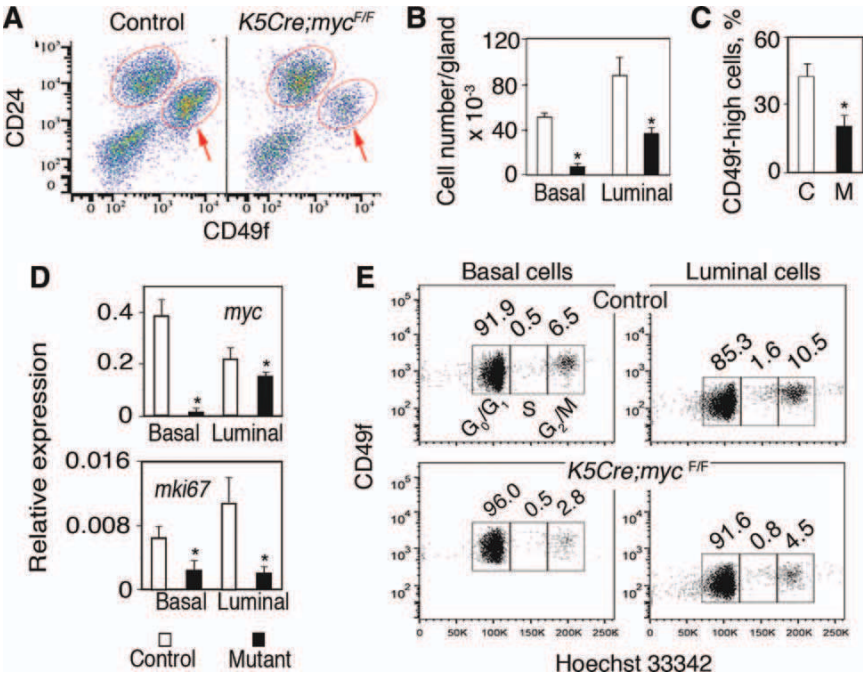


Figure 2. Mammary epithelial cell populations in *K5Cre;myc*$^{F/F}$ mice. **(A):** Dot plot showing separation of luminal (CD31−/CD45−/CD24+/CD49f-low) and basal (CD31−/CD45−/CD24+/CD49f-high) epithelial cells from 4-month-old virgin mouse mammary glands by flow cytometry. Red ovals indicate separated luminal and basal cell (BC) populations, arrows point to BC population. **(B):** Diagram showing the absolute number of basal and luminal cells per gland isolated from mammary glands of control and mutant 4-month-old virgin mice. The values obtained in four independent cell-sorting experiments are shown as mean ± SEM. *, $p < 10^{-5}$ for BCs and .023 for luminal cells. **(C):** Diagram showing percentages of CD49f-high cells in CD45−/CD31−/CD24+ cell populations. The values obtained in seven independent cell-sorting experiments are shown as mean ± SEM. *, $p < .001$. **(D):** q-PCR analysis of gene expression in freshly isolated basal and luminal mammary epithelial cells from 4-month-old virgin mice. The values normalized to *gapdh* and shown as mean ± SEM were obtained in five and three independent experiments for *myc* and *mki67*, respectively. * indicates $p < .008$ for *myc* and $p < .05$ for *mki67*. **(E):** Flow cytometry cell cycle analysis of freshly isolated mammary epithelial cells from 4-month-old virgin mice (a representative experiment). Percentages of cells in G_0/G_1, S, and G_2/M are indicated.

proportions of cells in S-G_2-M cell cycle phases in the mutants were approximately half those in controls (Fig. 2E). Thus, deletion of Myc from mammary BCs led to a moderate gland hypoplasia, a decrease of the BC population size, and diminished proliferation rates in both basal and luminal compartments.

Deletion of Myc from Mammary Epithelial BCs Affects Colony-Forming Stem/Progenitor Populations in Basal and Luminal Compartments

Sorted Myc-deficient BCs were able to proliferate, when seeded on matrigel-coated surface at high density; however, the percentage of Ki67-positive cells was 2.4-fold lower in mutant than control BC cultures (Fig. 3A). Mammary BCs have been reported to form clonal colonies on a fibroblast feeder layer, a property attributed to stem and progenitor cells [11]. Colony-forming cells constituted 2.5% ± 0.2% and 2.7% ± 0.5% of total BC population in 4- and 18-month-old control mice, respectively, whereas Myc-deficient BCs did not form colonies (Fig. 3B).

Interestingly, luminal cell population was affected by Myc deletion from BCs. Amount of luminal colony-forming cells (luminal progenitors) was found to be decreased approximately threefold in mutant epithelium from 4-month-old females (Fig. 3C). In *K5Cre;R26;myc*$^{F/F}$ epithelium, all colony-forming cells were LacZ-negative, that is, expressed Myc (Supporting Information Fig. S3). Strikingly, luminal cells isolated from 18-month-old mutant mice did not exhibit any clonogenic capacity (Fig. 3D).

Luminal progenitors have been reported to be enriched in Sca1-negative luminal cell fraction, whereas Sca1-positive population has been found to contain essentially mature luminal cells that express hormone receptors [13]. Consistently with the low clonogenic capacity, in luminal cells isolated from mutant glands, Sca1-positive cell population was significantly increased when compared with control (Fig. 3E). In agreement with this result, analysis of gene expression by q-PCR revealed higher levels of ERα (*esr1*) and PrlR (*prlr*) transcripts and diminished expression of kit1 (*kit*) and Elf5 (*elf5*), characteristic of luminal progenitors, in luminal cells from mutant mice when compared with those from control animals. The Notch pathway has been implicated in the control of the luminal progenitor amplification [26]. Luminal cells from *K5Cre;myc*$^{F/F}$ mice displayed low expression levels of Hey1 (*hey1*), a Notch pathway target, indicating impaired Notch signaling. Expression levels of the transcription factor Gata3 (*gata3*) known to regulate luminal cell differentiation [27, 28] were not altered, whereas *BRCA1* (*brca1*) transcript levels were diminished in luminal cells from *K5Cre;myc*$^{F/F}$ mice (Fig. 3F). In addition, q-PCR analysis revealed elevated expression levels of p16 (*cdnk2a*), marker of senescence, in luminal cells isolated from mutant mouse mammary epithelium (Fig. 3F). In agreement with the PCR data, immunohistochemical analysis demonstrated that luminal cell layer from mutant mammary epithelium contained significantly more ERα-positive cells than control (Fig. 3G). Taken together, these data clearly indicate that deletion of Myc from BCs affected clonogenic stem/progenitor cell function in both mammary epithelial layers, basal, and luminal.

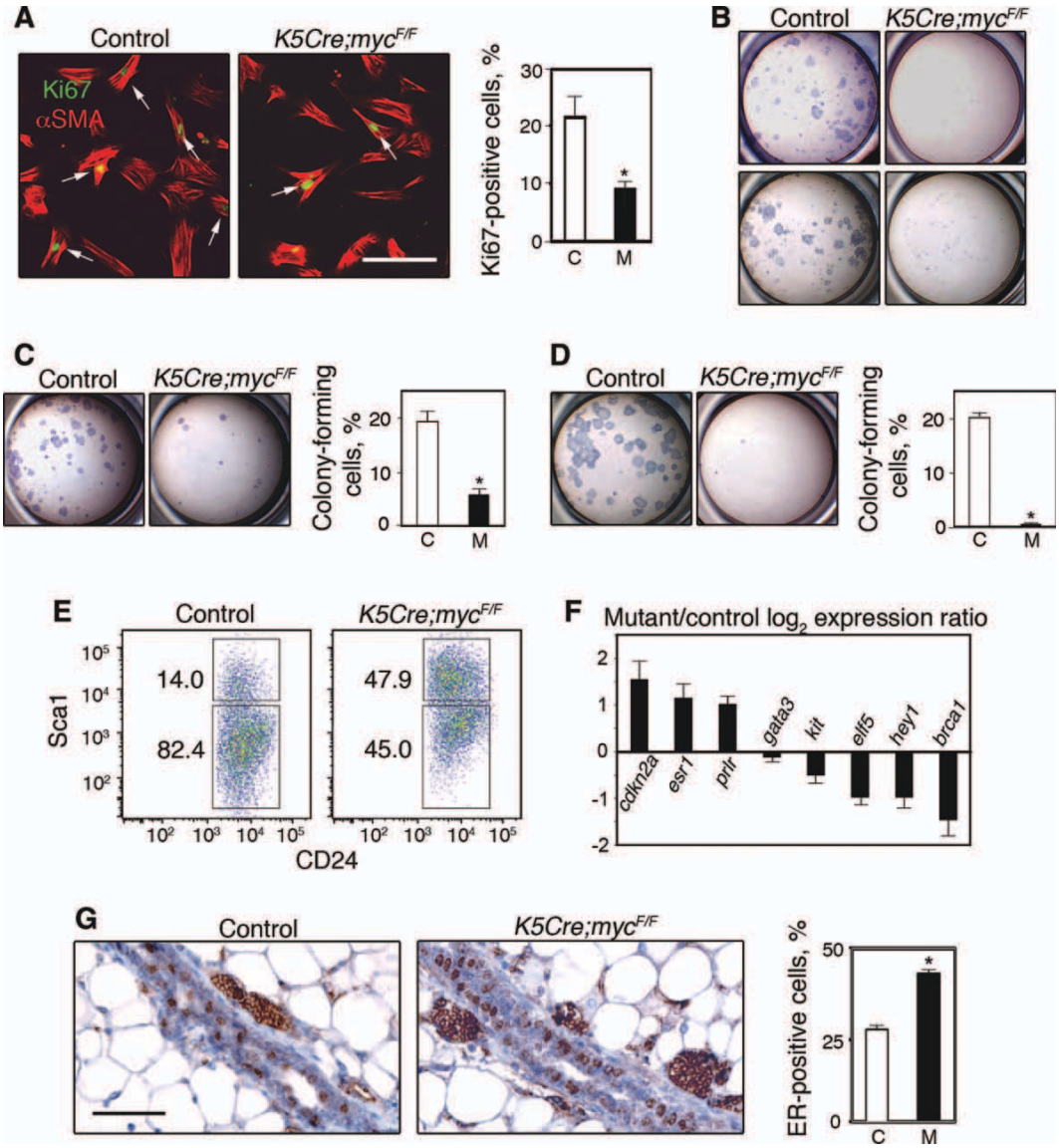


Figure 3. Deletion of Myc from mammary epithelial basal cells (BCs) affects colony-forming stem/progenitor populations in basal and luminal compartments. **(A):** Double immunofluorescence labeling of mammary BCs seeded on matrigel with anti-Ki-67 and anti-αSMA antibodies. Arrows indicate Ki67-positive nuclei. The values shown in the diagram represent means ± SEM from three independent experiments; *, $p < .04$. Bar = 70 μm. **(B):** Colonies formed by 1,000 mammary BCs isolated from 4- (upper panels) or 18- (lower panels) month-old virgin mice. **(C):** Colonies formed by 250 mammary luminal cells isolated from 4-month-old virgin mice. The values shown in the diagram represent means ± SEM from four independent experiments; *, $p < .002$. **(D):** Colonies formed by 250 luminal cells isolated from 18-month-old virgin mice. The values shown in the diagram represent means ± SEM from three independent experiments; *, $p < .025$. **(E):** Separation of luminal progenitor-enriched cell populations from 4-month-old control and *K5Cre;myc$^{F/F}$* mouse mammary epithelia, flow cytometry. CD45−/CD31−/CD24-high (luminal) cell fraction is shown. **(F):** q-PCR analysis of gene expression in luminal cells isolated from 4-month-old control and *K5Cre;myc$^{F/F}$* mouse mammary glands. Three luminal cell preparations isolated in independent cell-sorting experiments were analyzed. **(G):** Immunolabeling of sections through 4-month-old control or mutant virgin mouse mammary gland with antiestrogen receptor antibodies. The values shown in the diagram represent means ± SEM for four control and four mutant mice; *, $p < .01$. Bar = 70 μm.

Deletion of Myc from the Mammary BC Layer Severely Impairs Stem Cell Function

To analyze the effects of Myc deletion on stem cell function in the mammary epithelium, we performed three series of experiments: (a) serial transplantation of mammary epithelial fragments; (b) limiting dilution transplantation of mammary cells obtained by tissue dissociation; and (c) transplantation of sorted BCs.

All grafted epithelial fragments produced outgrowths in the first transplant; however, the density of the ductal network developed in virgin or pregnant hosts was lower for mutant than control tissue (Fig. 4A; Supporting Information Fig. S4).

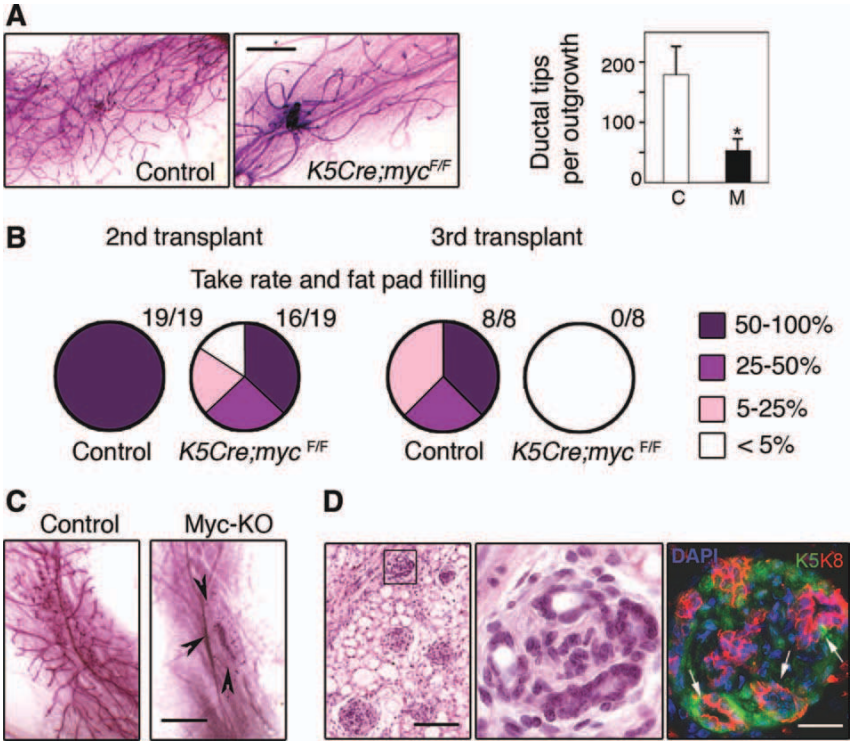


Figure 4. Deletion of Myc from the basal cell (BC) layer affects the stem cell self-renewal. **(A):** Outgrowths developed from control and *K5Cre;myc*$^{F/F}$ mammary epithelial fragments transplanted into the cleared fat pads. The diagram presents quantitative evaluation of the ductal branching complexity in control and mutant outgrowths (11 transplanted mice, mean ± SEM levels are presented, *, $p < .001$). Bar = 3 mm. **(B):** Take rate and fat pad filling in serial transplants of control and *K5Cre;myc*$^{F/F}$ mammary epithelial fragments. **(C):** Mammary epithelial outgrowths developed from isolated mammary BCs transplanted into the cleared mammary fat pads. Arrowheads indicate the host mouse mammary fat pad area containing the aggregates formed by Myc-deficient mammary BCs. Bar = 3 mm. **(D):** Sections through virgin mouse mammary fat pad transplanted with Myc-deficient BCs. Left and central panels, H&E; right panel, double immunofluorescence labeling of sections through Myc-KO cell aggregates with anti-K5 and anti-K8 antibodies. Arrows indicate bilayered mammary acinus-like structure. Bar = 0.22 mm, left panel, and 38 μm, other panels.

Table 1. Limiting dilution transplantation of mammary cells from control and *K5Cre/myc*$^{F/F}$ epithelium

Number of transplanted cell	Control	*K5Cre/myc*$^{F/F}$
100,000		2/3
50,000	2/2	6/14
20,000	11/11	1/2
10,000	6/6	
5,000	4/4	1/4
500	3/4	0/4

Repopulating unit frequency in total mammary epithelial cell population, as determined in limiting dilution transplantations was of 1/361 (1/1,227-1/107) for control and of 1/76,146 (1/145,582-1/39,828) for mutant; CI 95%, p value 4.34e-276.

The regenerative potential of the mutant epithelium was exhausted after two transplantations suggesting that deletion of Myc from the BC layer affected the self-renewal potential of the stem cell population(s) present in the adult mammary epithelium (Fig. 4B).

To evaluate the functional stem cell content, mammary cells from control and mutant glands were transplanted at limiting dilutions. *K5Cre;myc*$^{F/F}$ mouse mammary cells produced only few outgrowths (Table 1). The repopulating unit frequency in the total mammary cell population was 1/361 (1/1227-1/107) for controls and 1/76,146 (1/145582-1/39828) for the mutant (CI 95%, $p = 4.34e-276$). Thus, the number of functional multipotent stem cells in the adult virgin mutant mouse mammary gland was 200-fold lower than that in controls. Consistently with these data and the results of the colony formation assays, transplanted Myc-deficient BCs (1,000–5,000 of sorted BCs per fat pad, 20 transplanted mice, and three independent experiments) failed to develop outgrowths suggesting that multipotent stem cell population was affected by Myc deletion (Fig. 4C). Small dense cell aggregates were visible at transplantation sites, and immunolabeling of the sections through these areas revealed small-cell clusters, with more or less visible lumen, comprising luminal (K8+/K5$^-$) and basal (K8−/K5$^+$) cells (Fig. 4D). Altogether, these data reveal that Myc is essential for the self-renewal and function of the longed-lived mammary stem cell population residing in the basal epithelial compartment.

Ovarian Hormones Confer a Limited Repopulating Potential to Myc-Deficient BCs, but Fail to Restore Functional Stem and Progenitor Cell Populations

Two recent studies have shown that the key regulators of mammary development, the ovarian hormones E and P, control mammary stem cell function via paracrine mechanisms [29, 30]. The induction of receptor activator of NF-κB-ligand (RANKL, a member of the tumor necrosis factor family) in luminal cells, in response to E/P-stimulation, leads to the amplification of multipotent stem cells in the basal mammary

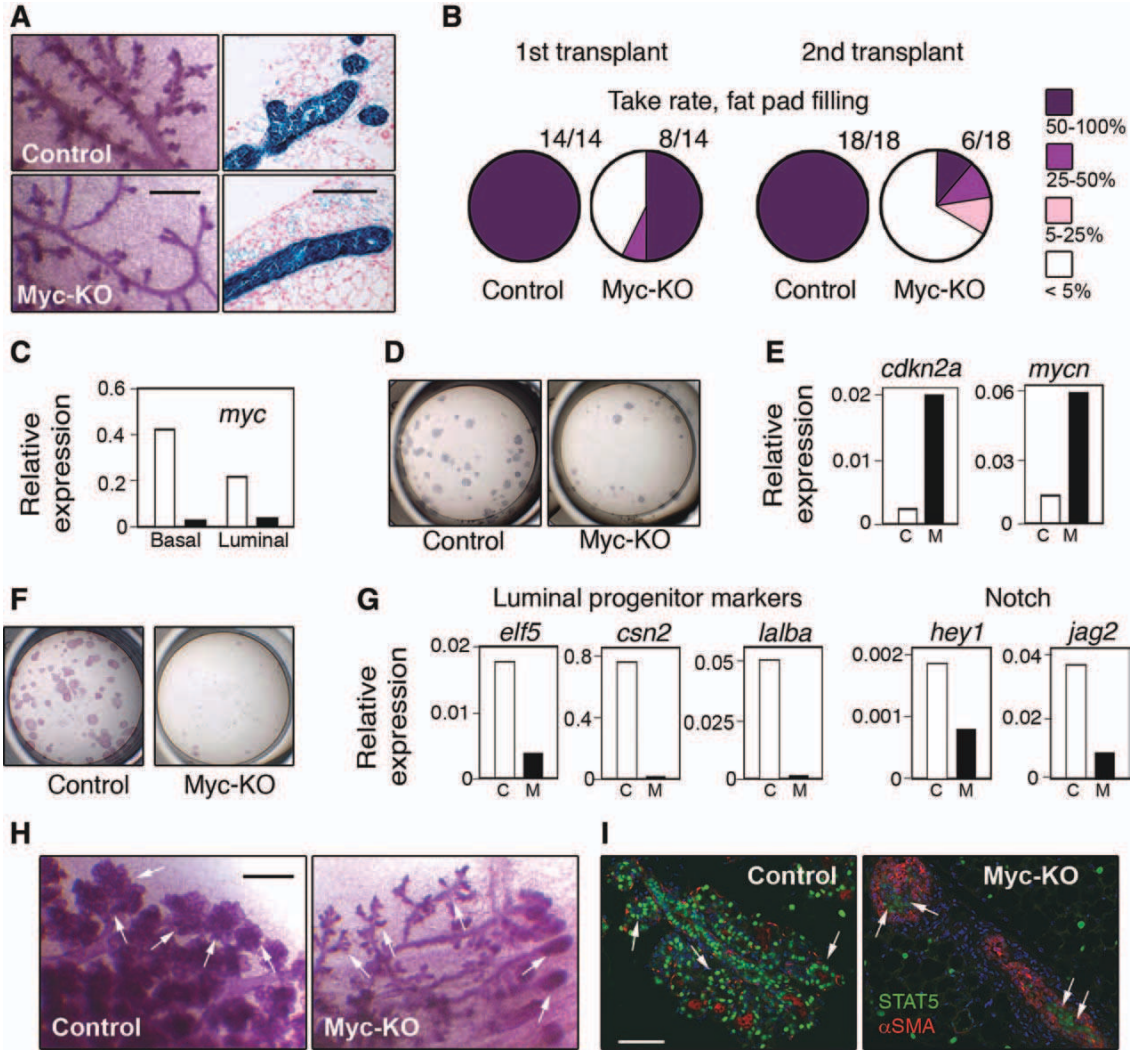


Figure 5. Ovarian hormones confer a limited repopulating potential to Myc-deficient basal cells (BCs) but fail to rescue functional stem/progenitor cell populations. **(A):** Mammary outgrowths produced by control and Myc-deficient (Myc-KO) mammary BCs in hosts stimulated with E/P. Left panels, fragments of the outgrowths Carmine stained in whole mount; right panels, section through whole-mount X-gal-stained outgrowths. Bars = 0.8 mm, left panels and 0.2 mm, right panels. **(B):** Serial transplantation of control and Myc-deficient BCs in E/P-stimulated hosts. First transplant generation, outgrowths developed from 1,000 transplanted BCs; second transplant generation, outgrowths developed from primary outgrowth fragments retransplanted into new hosts. Primary and secondary hosts were E/P-treated as described in Materials and Methods. **(C):** q-PCR analysis of Myc expression in basal and luminal cell isolated from the outgrowths developed in E/P-stimulated hosts (a representative experiment). The values reported are normalized to *gapdh* expression. **(D):** Colonies formed by 1,000 BCs isolated from the outgrowths developed in E/P-stimulated hosts. **(E):** q-PCR analysis of *cdkn2a* and *mycn* expression in BCs isolated from the outgrowths developed in E/P-stimulated hosts (a representative experiment). The values were normalized to *gapdh* expression. **(F):** Colonies formed by 250 luminal cells isolated from the outgrowths developed in E/P-stimulated hosts. **(G):** q-PCR analysis of gene expression in luminal cells isolated from the outgrowths developed in E/P-stimulated hosts (representative experiments). The values reported are normalized to *gapdh* expression. **(H):** Fragments of mammary outgrowths developed from transplanted control or mutant BCs in 19-day-pregnant host. The entire outgrowths are shown in Supporting Information Figure S5. Arrows point to lateral branches and aberrant bud-like structures in mutant tissue. Bar = 0.8 mm. **(I):** Double immunofluorescence labeling of sections through the outgrowths developed from control or Myc-deficient BCs in pregnant host with anti-STAT5A and anti-αSMA antibodies. Arrows point to alveoli with bright nuclear STAT5 staining in control and weak diffuse staining in mutant tissue. Bar = 175 μm.

compartment. We, therefore, examined that the regenerative potential of Myc-deficient mammary BCs could be rescued by E/P stimulation of the transplant hosts. In eight out of the 14 animals stimulated with E/P, isolated Myc-deficient BCs produced mammary ductal outgrowths occupying 50%–100% of the fat pad (Fig. 5A, 5B). However, when retransplanted into secondary hosts, the epithelial fragments dissected from the Myc-deficient outgrowths, in most cases, did not give rise to new epithelial ducts (Fig. 5B). These data indicate that E/P stimulation did not rescue the self-renewing multipotent stem cell population affected by Myc deletion.

Of note, unlike the *K5Cre;myc*$^{F/F}$ mouse mammary epithelium (Figs. 1C, 2D), in the outgrowths developed from Myc-deficient BCs, both, basal and luminal cell layers were depleted of Myc. X-gal-staining and q-PCR analyses confirmed that *myc* expression was abolished not only in basal

cells but also in luminal cells (Fig. 5A, 5C). Therefore, the mammary epithelium developed from Myc-deficient BCs is referred to as Myc-KO.

BCs isolated from Myc-KO outgrowths developed in hormone-stimulated hosts were able to produce colonies, albeit to a significantly lesser extent than control BCs, and displayed elevated p16 (*cdkn2a*) expression suggesting senescence (Fig. 5D, 5E). Three Myc proteins, Myc, L-Myc (*mycl*), and N-Myc (*mycn*), have partially redundant functions [1]. We found that N-Myc was expressed at much lower levels than Myc in mammary BCs, whereas L-Myc levels were below the detection threshold. In BCs isolated from Myc-KO outgrowths, N-Myc transcript levels were higher than those in control BCs (Fig. 5E), possibly accounting for the partial rescue of repopulating capacity, whereas L-Myc was undetectable.

Isolated luminal cells depleted of Myc were almost completely devoid of clonogenic capacity indicating a lack of luminal progenitors (Fig. 5F). In agreement with these data, expression of the genes coding for Elf5 (*elf5*), β-casein (*csn2*), and α-lactalbumin (*lalba*) previously shown to be upregulated in luminal progenitors [31] was very low in mutant luminal cells (Fig. 5G). Myc-deficient luminal cells displayed low expression levels of Notch pathway target, Hey1 (*hey1*), and a Notch ligand, Jag2 (*jag2*), indicating impaired Notch signaling (Fig. 5G). These results suggest that Myc contributes to the control of intercellular signaling interactions in mammary epithelium.

Pregnancy also partially rescued the repopulating capacity of Myc-deficient BCs (Fig. 5H, 5I; Supporting Information Fig. S5A--S5C), but at parturition, only few if any alveoli were found in Myc-KO outgrowths, whereas expression of genes characteristic of luminal progenitors was much lower than in control outgrowths (Fig. 5H; Supporting Information Fig. S5A). These data implicate Myc in the control of the luminal progenitor function during pregnancy. Thus, even though ovarian hormone stimulation conferred a limited repopulating potential to Myc-deficient BCs, mammary epithelial outgrowths depleted of Myc lacked self-renewing multipotent stem cells and luminal progenitors of high proliferative potential giving rise to alveoli in pregnancy.

Discussion

Consistent with other studies, our lineage tracing experiments indicated that early progenitor/stem cells giving rise to both layers of the mammary epithelium in the developing mouse gland express K5 [14]. Therefore, it could be expected that K5-promoter-driven Cre expression should lead to deletion of Myc from basal and luminal mammary epithelial layers. However, we observed that in *K5cre;myc*$^{F/F}$ mice, Myc was deleted from the BC layer only. In contrast to luminal cells, BCs continuously express K5 throughout development and in adult permitting complete deletion of Myc in the basal compartment. Luminal cells emerging early in development lose K5 expression. Myc has been implicated in cell competition phenomenon [32], and, therefore cells that lost K5 expression to acquire luminal phenotype and escaped Myc deletion could out-compete Myc-negative cells within the luminal epithelial compartment.

Deletion of Myc led to a significant reduction of the BC population and moderate but obvious gland hypoplasia. Even though Myc was deleted from the BCs only, luminal cells displayed decreased proliferation rates, and luminal progenitor population was diminished in mutant epithelium. A recent study provided evidence that BCs contribute to the control of mammary branching morphogenesis probably due to production of soluble growth factors stimulating proliferation of luminal cells [33]. We, therefore, suggest that a lack of paracrine or direct intercellular signaling between basal and luminal layers due to low BC number or/and impaired gene expression in Myc-deficient BCs could account for the diminished proliferation and low progenitor cell content in the luminal compartment and decreased branching complexity observed in *K5cre;myc*$^{F/F}$ mammary epithelium. The nature of the signals from basal to luminal cells serving for the maintenance of the luminal progenitor population remains to be defined. Candidate growth factors and pathways include FGFs, Notch, and Eph/ephrin signaling.

Myc regulates the expression of numerous genes essential for various cell functions, including metabolism, replication, protein synthesis, and cell cycle, all converging on the capacity of the cell to proliferate [1, 34]. One of the most striking results of this study was the impaired capacity of isolated Myc-deficient BCs to repopulate the mammary fat pad. Notably, microarray analysis of gene expression in Myc-deficient mammary BCs revealed that glycolysis and oxidative phosphorylation pathways were affected in mutant cells (data not shown). Therefore, inefficient energy metabolism may, at least, in part, account for the impaired proliferative potential of the mutant cells and their progeny, making impossible intensive cell amplification required for the outgrowth formation from transplanted cells and, in particular, for alveologenesis. Furthermore, transplanted Myc-deficient BCs may be unable to reconstitute the microenvironment required for the initiation of ductal morphogenesis, as Myc-regulated genes include those responsible for interactions between the epithelium and stroma [34].

Stimulation of the transplant host by ovarian hormones provided a limited repopulating capacity to Myc-deficient BCs; however, the mammary epithelial outgrowths completely depleted of Myc failed to repopulate the fat pad in serial transplants, lacked clonogenic progenitor cells in both basal and luminal compartments, and could not undergo lobulo-alveolar development. These observations strongly indicate that Myc is required downstream from ovarian hormones for the control of mammary stem and progenitor cell functions.

In addition to ovarian hormones, Wnt signaling has been shown to regulate the mammary stem cell pool by promoting self-renewal [35]. Myc is a transcriptional target of canonical Wnt signaling (http://www.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt), therefore, Myc may mediate the effects of Wnts on mammary stem cells.

We found that Myc deletion targeted to the mammary epithelial BC layer had a relatively moderate effect on mammary gland morphogenesis, in most cases, permitting the development of secretory tissue, albeit hypoplastic, in, at least, three successive pregnancies. On the contrary, lobulo-alveolar development was severely inhibited in Myc-KO epithelium comprising both epithelial layers, basal and luminal, depleted of Myc. These data suggest that, despite the clear importance of Myc for normal homeostasis, the cell type-restricted deletion of Myc does not necessarily lead to severe tissue damage, indicating that Myc could be targeted in cancer treatment.

Conclusions

The transcription factor proto-oncogene Myc is a master regulator of cell metabolism and proliferation, and its over-expression is often associated with breast cancer. Myc is a target of ERα and it is thought to mediate, at least, in part, pro-proliferative ERα function. This study provides the first evidence that in the mammary gland, the proto-oncogene Myc is essential for maintenance of the self-renewing multipotent stem cell population responsible for the regenerative capacity of the mammary epithelium and acts downstream from ovarian hormones to induce progenitor cell amplification required for

alveologenesis in pregnancy. It has been suggested that deregulated expansion of stem cells or committed progenitors could be at the origin of mammary tumorigenesis [36]. Further studies are required to define whether Myc activity contributes to the maintenance and amplification of tumor-initiating cell populations in breast cancer.

Acknowledgments

We are particularly grateful to A. Di Cicco for expert technical assistance, to Dr. I. Grandjean and the personnel of the animal facilities at Institut Curie for taking care of the mice, and to Z. Maciorowski and A. Viguier for excellent assistance with fluorescence-activated cell-sorting analyses. We also thank Dr. J.L. Jorcano, P. Soriano, I.M. de Alboran for providing mouse strains and Dr. D. Medina for valuable discussions. The work was supported by La Ligue Nationale Contre le Cancer (Equipe Labelisée 2009) and a grant from Agence Nationale de la Recherche ANR-08-BLAN-0078-01 to M.A.G. M.M., A.C., and A.G. received funding from Association pour la Recherche sur le Cancer; A.C., from Institut Curie and Servier Laboratories; A.G. from the Instituto de Salud Carlos III (Spain); M.A.G. is Directeur de Recherche, M.M.F., M.A.D., and A.G. are Chargé de Recherche at the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM).

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

The authors indicate no potential conficts of interest.

References

1 Eilers M, Eisenman RN. Myc's broad reach. Genes Dev 2008;22: 2755–2766.
2 Cartwright P, McLean C, Sheppard A et al. LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. Development 2005;132:885–896.
3 Laurenti E, Varnum-Finney B, Wilson A et al. Hematopoietic stem cell function and survival depend on c-Myc and N-Myc activity. Cell Stem Cell 2008;3:611–624.
4 Zanet J, Pibre S, Jacquet C et al. Endogenous Myc controls mammalian epidermal cell size, hyperproliferation, endoreplication and stem cell amplification. J Cell Sci 2005;118:1693–1704.
5 Muncan V, Sansom OJ, Tertoolen L et al. Rapid loss of intestinal crypts upon conditional deletion of the Wnt/Tcf-4 target gene c-Myc. Mol Cell Biol 2006;26:8418–8426.
6 Knoepfler PS, Cheng PF, Eisenman RN. N-myc is essential during neurogenesis for the rapid expansion of progenitor cell populations and the inhibition of neuronal differentiation. Genes Dev 2002;16:2699–2712.
7 Kim J, Woo AJ, Chu J et al. A Myc network accounts for similarities between embryonic stem and cancer cell transcription programs. Cell 2010;143:313–324.
8 Hynes NE, Stoelzle T. Key signalling nodes in mammary gland development and cancer: Myc. Breast Cancer Res 2009;11:210.
9 Musgrove EA, Sergio CM, Loi S et al. Identification of functional networks of estrogen- and c-Myc-responsive genes and their relationship to response to tamoxifen therapy in breast cancer. PLoS One 2008;3: e2987.
10 Moumen M, Chiche A, Cagnet S et al. The mammary myoepithelial cell. Int J Dev Biol 2011;55:763–771.
11 Shackleton M, Vaillant F, Simpson KJ et al. Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. Nature 2006;439:84–88.
12 Stingl J, Eirew P, Ricketson I et al. Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells. Nature 2006;439:993–997.
13 Sleeman KE, Kendrick H, Robertson D et al. Dissociation of estrogen receptor expression and in vivo stem cell activity in the mammary gland. J Cell Biol 2007;176:19–26.
14 Van Keymeulen A, Rocha AS, Ousset M et al. Distinct stem cells contribute to mammary gland development and maintenance. Nature 2011;479:189–193.
15 Kendrick H, Regan JL, Magnay FA et al. Transcriptome analysis of mammary epithelial subpopulations identifies novel determinants of lineage commitment and cell fate. BMC Genomics 2008;9:591.
16 Blakely CM, Sintasath L, D'Cruz CM et al. Developmental stage determines the effects of MYC in the mammary epithelium. Development 2005;132:1147–1160.
17 Stewart TA, Pattengale PK, Leder P. Spontaneous mammary adenocarcinomas in transgenic mice that carry and express MTV/myc fusion genes. Cell 1984;38:627–637.
18 Stoelzle T, Schwarb P, Trumpp A et al. c-Myc affects mRNA translation, cell proliferation and progenitor cell function in the mammary gland. BMC Biol 2009;7:63.
19 Ramirez A, Page A, Gandarillas A et al. A keratin K5Cre transgenic line appropriate for tissue-specific or generalized Cre-mediated recombination. Genesis 2004;39:52–57.
20 Soriano P. Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. Nat Genet 1999;21:70–71.
21 de Alboran IM, O'Hagan RC, Gartner F et al. Analysis of C-MYC function in normal cells via conditional gene-targeted mutation. Immunity 2001;14:45–55.
22 Rajkumar L, Kittrell FS, Guzman RC et al. Hormone-induced protection of mammary tumorigenesis in genetically engineered mouse models. Breast Cancer Res 2007;9:R12.
23 Taddei I, Deugnier MA, Faraldo MM et al. Beta1 integrin deletion from the basal compartment of the mammary epithelium affects stem cells. Nat Cell Biol 2008;10:716–722.
24 Hu Y, Smyth GK. ELDA: Extreme limiting dilution analysis for comparing depleted and enriched populations in stem cell and other assays. J Immunol Methods 2009;347:70–78.
25 Teuliere J, Faraldo MM, Deugnier MA et al. Targeted activation of beta-catenin signaling in basal mammary epithelial cells affects mammary development and leads to hyperplasia. Development 2005;132:267–277.
26 Bouras T, Pal B, Vaillant F et al. Notch signaling regulates mammary stem cell function and luminal cell-fate commitment. Cell Stem Cell 2008;3:429–441.
27 Kouros-Mehr H, Slorach EM, Sternlicht MD et al. GATA-3 maintains the differentiation of the luminal cell fate in the mammary gland. Cell 2006;127:1041–1055.
28 Asselin-Labat ML, Sutherland KD, Barker H et al. Gata-3 is an essential regulator of mammary-gland morphogenesis and luminal-cell differentiation. Nat Cell Biol 2007;9:201–209.
29 Asselin-Labat ML, Vaillant F, Sheridan JM et al. Control of mammary stem cell function by steroid hormone signalling. Nature 2010;465:798–802.
30 Joshi PA, Jackson HW, Beristain AG et al. Progesterone induces adult mammary stem cell expansion. Nature 2010;465:803–807.
31 Lim E, Wu D, Pal B et al. Transcriptome analyses of mouse and human mammary cell subpopulations reveal multiple conserved genes and pathways. Breast Cancer Res 2010;12:R21.
32 Baker NE, Li W. Cell competition and its possible relation to cancer. Cancer Res 2008;68:5505–5507.
33 Macias H, Moran A, Samara Y et al. SLIT/ROBO1 signaling suppresses mammary branching morphogenesis by limiting basal cell number. Dev Cell 2011;20:827–840.
34 Soucek L, Evan GI. The ups and downs of Myc biology. Curr Opin Genet Dev 2010;20:91–95.
35 Zeng YA, Nusse R. Wnt proteins are self-renewal factors for mammary stem cells and promote their long-term expansion in culture. Cell Stem Cell 2010;6:568–577.
36 Visvader JE. Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis. Genes Dev 2009;23:2563–2577.

See www.StemCells.com for supporting information available online.

Figure S1 - Glukhova

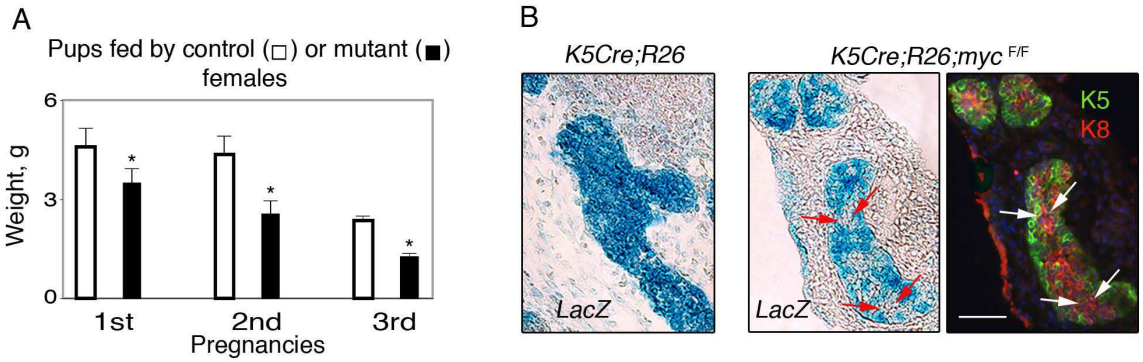


Figure S1 : Mammary development in *K5Cre;myc*$^{F/F}$ mice

(A) Diagrams showing weight of pups fed by control or mutant females. Pups were weighed on the 7th day of lactation of the 1st and 2nd pregnancies and on the 2nd day of the 3rd pregnancy. Mean±SEM values are shown. * $p < 0.01$, 0.006 and 0.0007 for the 1st, 2nd and 3rd pregnancies, respectively. Four litters in each case were analyzed for the 1st and 2nd pregnancies, and three litters, for the 3rd pregnancy.

(B) Sections through mammary glands from E18.5 control (left) and mutant (central and right) embryos X-gal-stained in whole-mount. Right panel shows double immunofluorescence labeling of the mutant gland section with anti-K5 and anti-K8 antibodies. Nuclei are visualized with DAPI. Arrows indicate LacZ-negative K8+/K5- cells in the mammary duct from mutant embryo. Bar, 75 µm.

Figure S2 - Glukhova

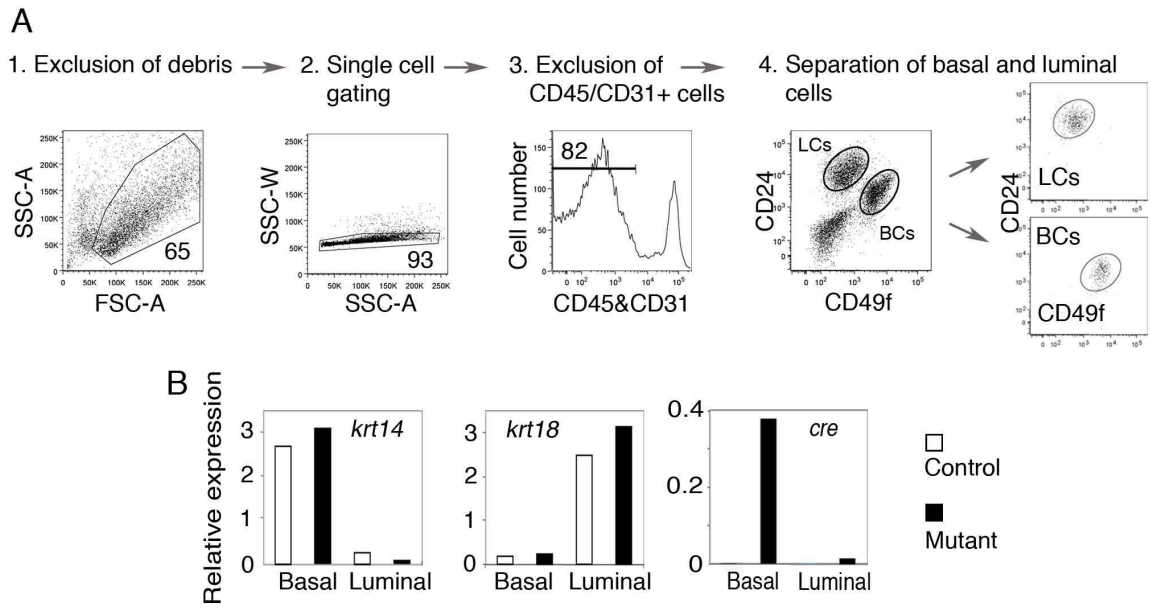


Figure S2 : Isolation of basal and luminal cell populations from *K5Cre;myc*$^{F/F}$ mouse mammary epithelium

(A) Gating procedure applied to isolate basal and luminal cell populations by flow cytometry. The sequential gating steps were: 1) exclusion of debris using dot plot display of forward scatter (FSC-A) and side scatter areas (SSC-A); 2) single cell gating using dot plot display of side scatter area and width (SSC-A, SSC-W); 3) exclusion of CD31+ and CD45+ cells using histogram of fluorescence distribution; 4) selection of luminal (LCs) and basal (BCs) cell populations on dot plot showing CD24 and CD49f expression. Percentages of gated populations are indicated in panels 1-3.

(B) *krt14*, *krt18* and *cre* expression in freshly isolated basal (CD24+/CD49f-high) and luminal (CD24-high/CD49f-low) cell populations from four month-old virgin control and *K5Cre;myc*$^{F/F}$ mouse mammary glands (q-PCR, the cell sorting experiment shown in Figure 2A). The values reported are normalized to *gapdh* expression.

Figure S3 - Glukhova

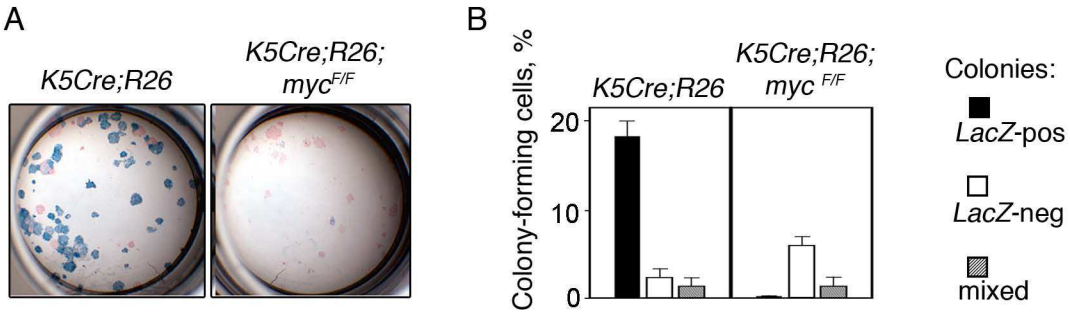


Figure S3 : Colony formation by luminal cells isolated from control and mutant mouse mammary epithelium

(A) Colonies formed by luminal cells isolated from control (*K5cre;R26*) and mutant (*K5Cre;R26;myc*$^{F/F}$) mouse mammary glands. X-gal staining and nuclear Fast Red counterstaining. **(B)** Quantitative evaluation of LacZ-positive and negative luminal progenitor content in control (*K5cre;R26*) and mutant (*K5Cre;R26;myc*$^{F/F}$) epithelium. The values shown in the diagram represent means±S.E.M. from three independent experiments.

Figure S4 - Glukhova

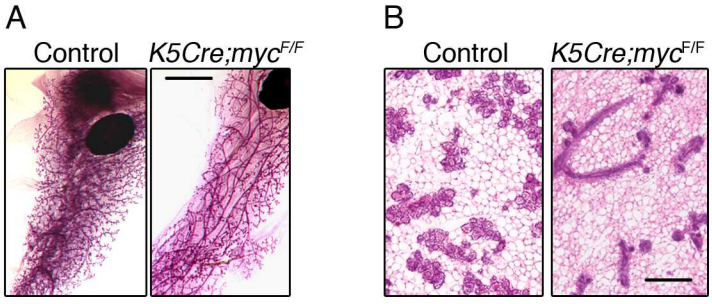


Figure S4 : Outgrowths developed from control or mutant epithelial fragments or Myc-deficient basal cells transplanted into the cleared mouse mammary fat pads

(A) and **(B)** Lobulo-alveolar development in the outgrowths produced by epithelial fragments from control and *K5Cre;myc*$^{F/F}$ mice in pregnant (16 *p.c.*) host. (A) whole- mount Carmine staining. Bar, 3.5 mm. (B) sections, H&E staining. Bar, 0.30 mm.

Figure S5 - Glukhova

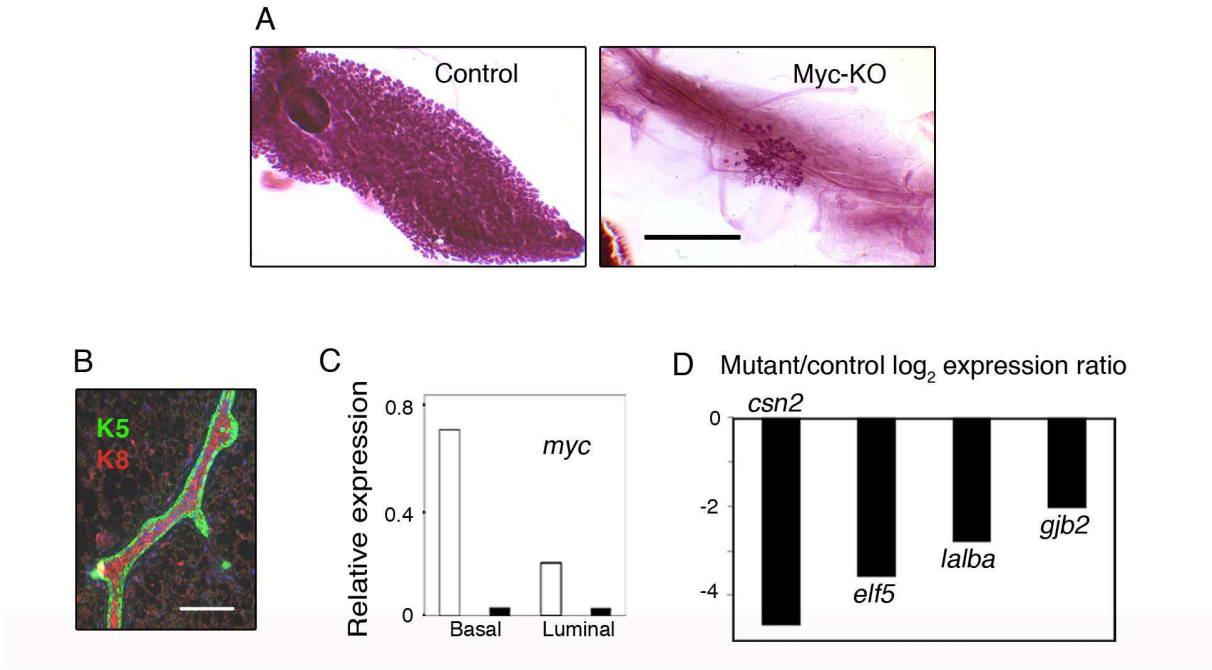


Figure S5 : Lack of lobulo-alveolar development in mammary outgrowths produced by Myc-deficient basal cells in pregnant hosts

(A) Mammary outgrowths developed from transplanted control or mutant BCs in pregnant (19 *p.c.*) host. Bar, 5 mm.

(B) Double immunofluorescence labeling of a section through a Myc-KO mammary outgrowth developed in pregnant (15.5 *p.c.*) host with anti-K5 and anti-K8 antibodies. Bar, 150 µm.

(C) *myc* expression in basal and luminal cells isolated from control and Myc-KO mammary outgrowths developed in pregnant (15.5 *p.c.*) host. Real-time RT-PCR.

(D) Luminal progenitor marker expression in control and Myc-KO epithelial outgrowths developed in pregnant host. Real-time RT-PCR. RNAs were isolated from the transplanted mammary fat pads at 15.5 *p.c.* The values reported are normalized to *krt18* expression.

SUPPLEMENTAL MATERIALS AND METHODS

List of primers for q-PCR

cre-s	5'- TTCCCGCAGAACCTGAAGAT - 3'
cre-as	5'- GCCGCATAACCAGTGAAACA - 3'
csn2-s	5'- CCTCTGAGACTGATAGTATTT - 3'
csn2-as	5'- TGGATGCTGGAGTGAACTTTA - 3'
gapdh-s	5'- CCAATGTGTCCGTCGTGGATC - 3'
gapdh -as	5'- GTTGAAGTCGCAGGAGACAAC - 3'
ki67-s	5'- TCAGATGGCTCAAAGAACAGT - 3'
ki67-as	5'- CAGAAGTGGGCTCTACTATG – 3
krt14-s	5'- CGGCAAGAGTGAGATTTCTG - 3'
krt14-as	5'- TCCAGCAGGATTTTGTACTG - 3'
krt18-s	5'- CCTTGCCGCCGATGACTTTA - 3'
krt18-as	5'- CAGCCTTGTGATGTTGGTGT - 3'
myc-s	5'- CACCAGCAGCGACTCTGAA - 3'
myc-as	5'- CCCGACTCCGACCTCTTG - 3'
wap-s	5'- TTGAGGGCACAGAGTGTATC - 3'
wap-as	5'- TTTGCGGGTCCTACCACAG - 3'

Other primers were purchased from SABiosciences/Qiagen.

2. La perte de p53 entraine l'amplification des cellules souches/progénitrices dans les compartiments basal et luminal mammaires (Manuscrit)

Contexte et justification de la recherche :

Une grande majorité des cancers du sein de type basal présente une perte de fonction de p53. p53 a été impliquée dans le contrôle des fonctions des cellules souches dans plusieurs tissus. Dans la glande mammaire, il a été rapporté que l'absence de p53 favorise la division symétrique et l'amplification de la population souche (Cicalese *et al*., 2009 ; Tao *et al*., 2011). Cependant ces résultats ont été obtenus soit en culture, hors du contexte physiologique naturel des cellules mammaires soit à partir d'une population épithéliale totale, non triée, ne permettant donc pas une étude détaillée du rôle de p53 dans la régulation des cellules souches et progénitrices *in vivo*, dans les couches basale et luminale de l'épithélium mammaire. Nous avons donc généré des souris K5Cre; $Trp53^{F/F}$ présentant une inactivation conditionnelle de *Trp53* dans la couche basale mammaire afin d'étudier l'effet de la perte de p53 dans les différentes populations souches et progénitrices mammaires.

Résumé des principaux résultats :

2.1 L'expression de la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur de la Kératine 5 entraine une suppression du gène Trp53 et une augmentation des populations cellulaires dans la couche basale et luminale de l'épithélium mammaire

Nous avons constaté que les glandes mammaires des femelles K5Cre; $Trp53^{F/F}$ étaient plus développées que les glandes contrôles. Ces résultats ont été confirmés par l'estimation du nombre de cellules épithéliales mammaires par cytométrie en flux. L'analyse des souris K5Cre; *Rosa26LacZ;* $Trp53^{F/F}$ a montré que l'ensemble des cellules basales et luminales sont LacZ-positives, suggérant une recombinaison efficace de l'allèle $Trp53^{F}$ dans les cellules basales (K5+) mais aussi dans les progéniteurs luminaux. L'analyse de l'expression génique de *Trp53* a confirmé une suppression de p53 à la fois dans la couche basale et luminale de l'épithélium mammaire.

2.2 La perte de p53 induit une expansion des cellules progénitrices luminales ainsi qu'une augmentation de leur potentiel d'autorenouvellement

Afin d'étudier les effets de la perte de p53 dans la population luminale nous avons analysé les niveaux d'expression de certains gènes caractéristiques de la population luminale progénitrice ou différenciée. Les cellules luminales isolées à partir des souris K5Cre; *Trp53*$^{F/F}$ expriment plus fortement les gènes caractéristiques des cellules progénitrices que les cellules contrôles. L'analyse par cytométrie en flux a confirmé l'augmentation de la population progénitrice dans les cellules luminales déficientes en p53. L'analyse fonctionnelle des populations progénitrices montre que l'absence de p53 entraine l'augmentation du nombre et de la taille des colonies et des mammosphères dérivées des cellules luminales. De plus, seules les mammosphères formées à partir des cellules luminales K5Cre; *Trp53*$^{F/F}$ peuvent être maintenues en culture au delà de 20 repiquages indiquant une augmentation de leur capacité à s'autorenouveller.

2.3 La perte de p53 induit l'expansion des cellules progénitrices basales ainsi qu'une augmentation de leur potentiel d'autorenouvellement

Comme décrit pour la population luminale, les cellules basales déficientes en p53 forment plus de colonies et de mammosphères que les cellules contrôles et ces structures présentent une prolifération accrue. Contrairement aux mammosphères contrôles, les mammosphères dépourvues en p53 se maintiennent en culture après plusieurs repiquages et maintiennent l'expression de la kératine 5, indiquant la présence de cellules basales. De plus, les niveaux d'expressions des transcrits de gènes caractéristiques de l'EMT sont augmentés dans les mammosphères dérivées des cellules basales K5Cre; *Trp53*$^{F/F}$ ce qui est en corrélation avec l'acquisition de propriétés de cellules souches.

2.4 L'activation de la signalisation de Notch est nécessaire à la formation des mammosphères basales et luminales

Nous avons étudié les effets de l'inhibition de la signalisation Notch sur les populations épithéliales triées. Le traitement au DAPT (un inhibiteur de cette voie) des cellules luminales et basales diminue le nombre de mammosphères contrôles et K5Cre;

Trp53$^{F/F}$. Ces résultats suggèrent que l'activation de la signalisation Notch est nécessaire aux fonctions des progéniteurs de type basal et luminal quel que soit le statut de p53.

2.5 L'absence de p53 induit une augmentation de la fréquence des cellules souches ainsi qu'une augmentation de leur autorenouvellement in vivo

Pour analyser l'effet de la perte de p53 sur les propriétés des cellules souches mammaires, nous avons procédé à quatre types d'expériences de transplantation. Dans les expériences de compétition, nous avons co-transplanté des cellules basales contrôles et K5Cre; *Trp53*$^{F/F}$. L'analyse des greffons révèle que la majorité des régénérations sont issues des cellules basales K5Cre; *Trp53*$^{F/F}$ indiquant que les cellules basales dépourvues en p53 possèdent une capacité de régénération plus forte que les cellules basales contrôles. Les transplantations en dilution limite montrent que la fréquence des cellules avec capacité de régénération est augmentée d'environ 3 fois dans les cellules déficientes en p53 suggérant que l'absence de p53 conduit à une amplification des cellules souches. Les transplantations sériées ont montré que les cellules souches mammaires déficientes en p53 possèdent une capacité d'autorenouvellement augmentée. Enfin, nous avons transplanté les cellules obtenues après dissociation des mammosphères basales. Les cellules provenant des mammosphères déficientes en p53 possèdent une capacité de régénération plus importante, indiquant que des cellules souches morphogénétiques sont maintenues en culture en absence de p53.

Conclusion de l'article : l'ensemble de ces résultats indique que p53 inhibe l'amplification et l'autorenouvellement des cellules souches et progénitrices mammaires, et fournit de nouvelles informations permettant de préciser l'impact possible de la perte de p53 dans les tumeurs mammaires.

Manuscrit : *Somatic loss of p53 leads to stem/progenitor cell amplification in both mammary epithelial compartments, basal and luminal*

Soumis à Stem Cells

Somatic loss of p53 leads to stem/progenitor cell amplification in both mammary epithelial compartments, basal and luminal

Aurélie Chiche[1,2], Mejdi Moumen[1,2], Valérie Petit[1,2], Jos Jonkers[3], Daniel Medina[4], Marie-Ange Deugnier[1,2], Marisa M. Faraldo[1,2,5], and Marina A. Glukhova[1,2,5]

[1]Institut Curie, Centre de Recherche, Paris, F-75248 France;

[2]CNRS, UMR144, Paris, F-75248, France;

[3]The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, The Netherlands;

[4]Baylor College of Medicine, Houston, Texas, USA

Author contributions: A.C., M.M. and V.P.: collection and assembly of data; J.J.: provision of study material; D.M. and M.A.D.: conception and design; M.M.F.: conception and design, manuscript writing; M.A.G.: conception and design, financial support, manuscript writing. All authors contributed to data analysis and interpretation and final approval of the manuscript. M.M.F. and M.A.G contributed equally to this work.

[5] Authors for correspondence:

Marina A. Glukhova, E-mail: Marina.Glukhova@curie.fr

and

Marisa M. Faraldo, E-mail: Maria-Luisa.Faraldo@curie.fr

UMR 144 CNRS-Institute Curie, 26 rue d'Ulm, 75248, Paris Cedex 05, France

Phone: +33 1 56 24 63 31

The work was supported by *La Ligue Nationale Contre le Cancer (Equipe Labelisée 2009)* and a grant from *Agence Nationale de la Recherche* ANR-08-BLAN-0078-01 to MAG. AC and MM received funding from *Association pour la Recherche sur le Cancer*; AC, from *Institut Curie* and Servier Laboratories; MAG is *Directeur de Recherche*, MMF and MAD are *Chargé de Recherche* at the *Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM).*

Key words: mammary gland, stem cells, self-renewal, progenitors, p53, breast cancer

ABSTRACT

Mammary epithelium comprises a layer of luminal cells and a basal myoepithelial cell layer. Both mammary epithelial compartments, basal and luminal, contain stem or progenitor cells, but only basal cells (BCs) are capable of gland regeneration on ectopic transplantation. Aberrant expansion of stem/progenitor cell populations is considered to contribute to breast tumorigenesis. Germline deletions of p53 in humans and mice confer a predisposition to tumors, and stem cell frequency is abnormally high in the mammary epithelium of p53-deficient mice. However, it is unknown whether stem/progenitor cell amplification occurs in both the basal and luminal mammary epithelial cell populations in p53-deficient mammary tissue. We used a conditional gene deletion approach to study the role of p53 in stem/progenitor cells residing in the mammary luminal and basal layers. Using two- and three-dimensional cell culture assays, we showed that p53 loss led to the expansion of clonogenic stem/progenitor cells in both mammary epithelial cell layers. Moreover, following p53 deletion, luminal and basal stem/progenitor cells acquired a capacity for unlimited propagation in mammosphere culture. Notch pathway activity was required for luminal and basal clonogenic stem/progenitor function, regardless of p53 status. Furthermore, limiting dilution and serial transplantation assays revealed amplification and enhanced self-renewal in the basal regenerating cell population of p53-deficient mammary epithelium. These data suggest that p53 restricts the propagation and self-renewal of stem/progenitor cells in both layers of the mammary epithelium and provide further insight into the impact of p53 loss in breast cancerogenesis.

INTRODUCTION

The mammary epithelium is composed of two cell layers: a luminal layer lining the lumen of ducts and alveoli, and an external basal myoepithelial layer. The remarkable proliferative potential of the mammary epithelium, allowing lobulo-alveolar development in subsequent pregnancies and repopulation of the cleared mammary fat pad upon transplantation of tissue fragments or dispersed cells, strongly suggests that stem and progenitor cells are present in this tissue (1). Transplantation experiments with sorted epithelial cells from adult mouse mammary gland revealed that only BCs could regenerate bilayered mammary ducts and alveoli (2-4). On the basis of these experiments, it was assumed that the mammary BC layer harbored multipotent stem cells responsible for adult gland homeostasis. However, lineage-tracing studies have shown that, although early mammary progenitors display BC characteristics (i.e., they express the BC cytokeratins, K5 and K14) during the postnatal period, the BC compartment makes little or no contribution to the luminal cell layer (5-7), and that both the luminal and basal mammary epithelial compartments are maintained by their specific unipotent stem cells (6). Furthermore, the possible existence of a bipotent stem/progenitor cell giving rise to alveoli in subsequent pregnancies remains a matter of debate (7).

Precise molecular markers of mammary stem cells remain to be defined, and the mechanisms controlling the maintenance and self-renewal of these cells are only partly understood. Wnt/β-catenin, RANKL/RANK and Notch pathways and transcription factors, such as cEBPb and Myc, have been implicated in the regulation of stem and progenitor cell function in the mammary gland (8-13).

The transcription factor p53 controls multiple tumor suppressor pathways and is frequently mutated in breast cancer (14). Inactivating mutations of the *Tp53* gene have been found in most basal-like mammary carcinomas, a type of tumor thought to originate from mammary stem or progenitor cells (14-16). Germline mutations of the gene encoding p53 in humans and mice confer a predisposition to cancer (17-20). Consistently, somatic deletion of p53 from the mouse mammary epithelium leads to frequent estrogen receptor (ER)-positive or -

negative cancers, the hormonal status of the tumor depending on the cell population targeted for gene deletion (21, 22).

p53 has been implicated in the control of stem cell function in various tissues, including hematopoietic and neural systems and the mammary gland (reviewed in 23, 24). The regenerative potential of normal mammary epithelium declines markedly after a few serial transplantations, whereas fragments of p53-deficient mouse glands can be retransplanted in an almost unlimited manner (25). The frequency of regenerating cells has been shown to be higher in the mammary glands of p53-null mice than in normal mammary tissue (26, 27). These studies led to the conclusion that p53 restricts the proliferation and self-renewal of mammary gland-resident stem cells. However, the functions of p53 in the maintenance of the distinct stem and progenitor cell populations residing in the luminal and basal mammary epithelial compartments were not studied specifically.

In this study, we used a conditional gene deletion approach to study p53 functions in basal and luminal mammary cell populations. We found that K5 promoter-driven Cre expression resulted in the deletion of the *Trp53* gene from both mammary epithelial layers, leading to 1) the expansion of clonogenic stem/progenitor cell populations in luminal and basal compartments and the acquisition of a capacity for unlimited propagation in cell culture; 2) amplification and enhanced self-renewal of the regenerating BC population. We also found that Notch pathway activity was required for luminal and basal clonogenic stem/progenitor function in three-dimensional culture, regardless of p53 status.

MATERIALS AND METHODS

Mice

Transgenic mice expressing the Cre recombinase under the control of the K5 promoter (K5-*Cre*) were kindly provided by Dr. J. Jorcano (28), *Rosa26LacZ* reporter strain, carrying a loxP-stop-loxP-lacZ cassette, by Dr. P. Soriano (29). The generation of $Trp53^{F/F}$ mice has been described previously (30). All mice were bred in a 129SV/C57BL6 genetic background. $Trp53^{F/+}$ or $Trp53^{F/F}$ mice were used as controls unless indicated otherwise. Experiments were conducted in accordance with French veterinary guidelines and those formulated by the Council of Europe for experimental animal use (L358-86/609EEC).

Whole-mount mammary gland analyses

For whole-mount Carmine-Alum staining, dissected mammary fat pads were spread onto glass slides, fixed in a 1/3/6 mixture of acetic acid/chloroform/methanol and stained as described elsewhere (31). For whole-mount X-gal staining, mammary glands were fixed in 2.5% paraformaldehyde in PBS, pH 7.5, for 1 hour at 4°C, and stained overnight at 30°C (Biology of the Mammary Gland, http://mammary.nih.gov). For histological analyses, glands were embedded in paraffin, and seven µm-thick sections were cut, de-waxed and counterstained with Fast Red. In competition experiments, following X-gal staining, glands were dehydrated, post-fixed in acetone for 30 min, rehydrated and stained with Carmine-Alum.

Primary mammary epithelial cells preparation

The inguinal mammary glands of three to five 16- to 20-week-old virgin females were pooled for the preparation of a single-cell suspension, and cells were processed for flow cytometry, as described elsewhere (2, 4, 5). The following conjugated antibodies were used: anti-CD24-PE (clone M1/69; BD Biosciences, San Diego, CA, http://www.bdbiosciences.com), anti-CD49f-FITC (clone GoH3; BD Biosciences), anti-CD45-APC (clone 30-F11; Biolegend, San Diego, CA, http://www.biolegend.com), anti-CD31-APC (clone MEC13.3; Biolegend) and anti-Ly6A/E-PE-Cy5 (clone D7; e-Biosciences, San Diego, CA, http://www.ebiosciences.com). Labelled cells were analyzed and sorted on a FACSVantage flow cytometer (BD Biosciences). Sorted cell populations were routinely reanalyzed and found to be 94-98% pure. As estimated by trypan blue exclusion, cell viability after sorting was between 83% and 92%.

Transplantation Assays

Sorted BCs were resuspended in 10 µl of 50% growth factor-reduced Matrigel (BD

Biosciences) and injected into the inguinal fat pads of three-week-old nude balb/c females cleared of endogenous epithelium as described elsewhere (5, 32). Repopulating unit frequency was calculated with Extreme Limiting Dilution Analysis software (33).

In competition assays, before transplantation, BCs isolated from K5*Cre;Rosa26* mouse glands were mixed in a 1:1 ratio with either control (*Trp53*$^{F/F}$), or mutant (K5*Cre*;*Trp53*$^{F/F}$) BCs.

For serial transplantation assays, 450 BCs per fat pad were injected to obtain primary outgrowths; 10 weeks after transplantation, half the transplanted fat pads were stained with Carmine-Alum to visualize the outgrowths, whereas another half was pooled to isolate BCs and re-transplant them sequentially at a density of 100 cells per fat pad to obtain 2nd- and 3rd-generations outgrowths.

For mammosphere transplantation assays, BC mammospheres were dissociated and injected into the cleared mammary fat pads (1000 cells per fat pad). The outgrowths were analyzed 10-12 weeks after transplantation.

In all experiments, control and mutant cells were grafted into two contralateral fat pads of the same recipient mouse.

Cell culture assays

Sorted luminal cells were cultured at a density of 250 cells per well as described elsewhere (4). Sorted BCs were cultured in DMEM/F12 medium containing 1% fetal calf serum (FCS), B27 (GIBCO Invitrogen Saint Aubin, France, http://www.invitrogen.com) at a density of 1000 cells per well (3). After one week of culture, colonies were incubated with 5 µM BrdU (5-bromo-2-deoxyuridine, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, http://www.sigmaaldrich.com/france) for 1 hour and fixed with 70% Ethanol at 4°C. Prior to immunolabeling with anti-BrdU antibodies, cells were treated with 2N HCl for 20 min at room temperature and next, with 0.1M borax buffer.

For mammosphere cultures, freshly isolated cells were seeded on ultralow-adherence 24-well plates (Corning, NY, http://www.corning.com/lifesciences) at the density of 5000 cells/well, in mammosphere media: DMEM/F12 medium supplemented with B27 (GIBCO), 20ng/mL EGF, (Invitrogen), 20 ng/mL bFGF (GIBCO), 4 µg/mL heparin (Sigma-Aldrich), 10 µg/mL insulin (Sigma-Aldrich) and 2% Matrigel (BD Pharmingen) as described elsewhere (34). Every two weeks, mammospheres were dissociated with 0.05% trypsin (GIBCO) and reseeded as described above. When mentioned, to inhibit the Notch pathway, DAPT, 5µM solution in DMSO, was added to culture medium. To evaluate mammosphere size, ImageJ software was used. Mammospheres of 200-400 pixels were defined as small; 400-600 pixels, medium; > 600 pixels, large.

For the mammosphere BrdU incorporation analysis, 1st-generation mammospheres were dissociated and seeded at a density of 30000 cells/mL overnight in mammosphere culture conditions. Next, cells were incubated with BrdU for 5 hours, spun down at 1500 rpm for 5 minutes, fixed and proceeded for immunolabeling.

Immunofluorescence analysis

For immunofluorescence analysis, mammospheres were resuspended in 50 µL Matrigel and incubated for 3 hours at 37°C. They were then fixed in a 1/3/6 mixture of acetic acid/chloroform/methanol and embedded in paraffin. Sections (7 µm) were cut and dewaxed for immunolabeling, as described elsewhere (31).

Fixed colonies and cytospinned cells were incubated for 1 hour at 37°C with primary antibodies, for 1 hour at room temperature with secondary antibodies and for 3 min with DAPI.

The following primary antibodies were used: rabbit polyclonal anti-K5, and anti-K8 (Covance, Princeton, NJ, http://www.covance.com), anti pan-keratin (Dako, Trappes, France, http://www.dako.fr), anti-BrdU (BD Pharmingen). Alexafluor-conjugated secondary antibodies (1/1,000; Invitrogen) were used for immunofluorescence labeling.

Reverse transcription-polymerase chain reaction

RNA was reverse-transcribed with MMLV H(-) Point reverse transcriptase (Promega, Madison, WI, http://www.promega.com), 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, http://www.roche.com). The values obtained were normalized to *Gapdh* levels. The primers used for qPCR analysis are listed in the Supplemental Data section.

RESULTS

K5 promoter-driven Cre expression leads to *Trp53* gene deletion and an increase in cell number in the mammary basal and luminal epithelial cell layers

To study the effects of p53 deletion on mammary stem and progenitor cells, K5*Cre* mice were crossed with mice carrying conditional alleles of the *Trp53* gene (*Trp53*$^{F/F}$). Overall, the mammary glands of K5*Cre*;*Trp53*$^{F/F}$ mice developed normally and the females were able to feed normal-size litters. However, mature virgin K5*Cre*;*Trp53*$^{F/F}$ mice had a higher duct density, with more side branches, than control littermates (Fig. 1A). The mutant mice did not develop mammary tumors within the 12-month observation period.

The K5 promoter is active in early mammary progenitors suggesting that K5-driven Cre expression should lead to conditional (floxed) allele excision from the entire mammary epithelium (12). We analyzed the distribution of *Trp53*-deficient cells in mutant mammary epithelium, by crossing control and K5*Cre*;*Trp53*$^{F/F}$ mice with the *Rosa26-LacZ*-reporter mouse strain (*R26*). As expected, all BCs and most of the luminal cells were *LacZ*-positive in control K5*Cre;R26* mice (Fig. 1B). Similarly, in mutant mouse mammary glands, all the BCs were *LacZ*-positive, and the number of *LacZ*-positive cells in the luminal layer was even greater than that in the control (Supporting Information Fig. S1). These data strongly suggest that p53 was deleted from both cell layers of the K5*Cre*;*Trp53*$^{F/F}$ mammary epithelium (Fig. 1B).

Flow cytometry cell sorting and the isolation of basal and luminal cells from the mammary tissue of control and mutant mice revealed that both compartments of the mutant mammary epithelium contained larger absolute numbers of cells than those of control animals (Fig. 1C,D). However, the increase in cell number was greater for the luminal compartment, resulting in a slight change in the proportions of basal and luminal cells in the mutant epithelium (Fig. 1E). Consistent with the results of X-gal assay (Fig. 1B), a q-PCR analysis of *Trp53* expression suggested that the gene was deleted from both mammary epithelial layers in mutant mice (Fig. 1F).

p53 deletion leads to the expansion of the luminal progenitor population, with increases in proliferative potential and self-renewal capacity

To analyze the effects of p53 deletion on the luminal progenitor population, we examined in freshly sorted luminal cells using q-PCR, the expression of several genes known to be differentially regulated in progenitors and mature luminal cells. Mutant luminal cells had higher transcript levels for the *Csn2*, *Hey1*, *Elf5* and *Kit* genes (encoding β-casein, Hey1, ELF5 and c-Kit, respectively), characteristic of progenitor-enriched population, and lower levels of transcripts for the *Pgr*, *Prlr*, *Esr1* and *Prom1* genes (encoding progesterone receptor, prolactin receptor, estrogen receptor α and prominin 1, respectively), which are known to be expressed by mature ductal luminal cells (Fig. 2A). Notably, levels of *Mki67* (Ki67) expression were higher in mutant luminal cells than in control cells, strongly suggesting the presence of a larger number of proliferating cells (Fig. 2A).

The luminal cell fraction negative for Sca-1 has been reported to be enriched in progenitors, whereas hormone receptor-expressing cells have been found essentially in the Sca-1-positive fraction (4). Consistently with the q-PCR data, flow cytometry analysis of Sca-1 expression in mammary luminal cells revealed that the progenitor-enriched Sca-1-negative population was larger in mutant epithelium (Fig. 2B).

Functional evaluation of progenitor cell content in control and mutant luminal cells was carried out using colony formation and

mammosphere assays. Mutant luminal cells, when seeded on a fibroblast feeder layer formed more and larger colonies than control cells (Fig. 2C). T The percentage of colony-forming cells was 16.8±1.4 for control cultures and 22.2±1.8 for mutant cultures. Consistently, the number of BrdU-incorporating cells in the colonies formed by mutant p53-deficient luminal cells was found to be about twice that in the control colonies (Fig. 2D).

Wahl's team recently described a method for the evaluation of stem/progenitor cell content in sorted mammary cell populations grown in the presence of 2% Matrigel (34). Using this technique, we found that freshly isolated luminal cells deficient for p53 formed larger mammospheres, with greater numbers of proliferating cells than those formed by control luminal cells (Fig. 2E, Supporting Information S2), and the percentage of mammosphere-forming cells was 2.8±1.1 for control and 6.6±1.6 for mutant luminal cell preparations. When control mammospheres were dissociated and the cells obtained were reseeded in the Matrigel-containing medium, they formed only a few second-generation mammospheres of similar size, and further passages resulted in smaller cell aggregates only (Fig. 2E-G). By contrast, the mammospheres formed by p53-deficient luminal cells could be maintained in culture for at least 25 generations (Fig. 2F, and data not shown). The primary mammospheres formed by control or mutant luminal cells consisted essentially of cells expressing the luminal cytokeratin K8 and contained only a few $K5^+$ cells (Fig. 2G). A small number of $K5^+$ cells were detected in the mammospheres formed by mutant luminal cells, in all passages (Fig. 2G and data not shown).

p53 deletion leads to expansion and enhanced self-renewal in the basal progenitor population

Like mutant luminal cells, the p53-deficient BC population contained a higher proportion of colony-forming cells than the control BC population (2.7±0.5% and 4.9±0.8% for control and mutant BC preparations, respectively, Fig. 3A). The colonies that developed from mutant BCs were significantly larger than control colonies and contained a higher proportion of proliferating cells, as evaluated by BrdU incorporation assays (Fig. 3A, B). Similarly, the mammospheres formed by mutant BCs were more numerous and larger than those formed by control cells, and contained larger numbers of BrdU-incorporating cells (Fig. 3 C-E; Supporting Information Fig. S3A). Control BC mammospheres could be passaged once, any further passaging being accompanied by substantial decreases in the number and size of mammospheres. In the fourth generation, control BCs formed only small cell aggregates (Fig. 3C-E). By contrast, mutant BC-mammospheres could be maintained in culture for at least 25 generations. The percentage of mammosphere-forming cells in sorted BC preparations (1^{st} generation of mammospheres) was 1.7±0.6 for control cells and 5.8±1.4 for mutant cells.

Of note, K5-positive cells were detected in most mutant BC mammospheres, in all generations, whereas K5 expression decreased markedly during the passaging of control BC mammosphere cultures (Fig. 3E,F). Recent studies have suggested that activation of the epithelium-to-mesenchyme transition (EMT) program in mammary epithelial cells is associated with the acquisition of stem cell properties (35, 36). The expression levels of several EMT-associated genes (*Vim*, *Snai1*, *Snai2*, *Zeb1*) were higher in mutant BC mammospheres than in control mammospheres, whereas the level of the *Cdh1* (E-cadherin) transcript was lower (Supporting Information Fig. S3B).

Notch activity is required for mammosphere formation by luminal and basal cells

It has recently been reported that p53 represses mammosphere formation by unsorted, non adherent mammary cells, by inhibiting the Notch pathway (26). We therefore examined effects of Notch inhibitor DAPT on the mammosphere formation by sorted luminal and basal cells. In the presence of DAPT, control and mutant luminal cells formed fewer mammospheres (Fig. 4A). The size of the mammospheres was also altered, particularly in control cell cultures, with significantly smaller mammospheres in the cultures treated with DAPT (Fig. 4B).

BC mammosphere formation also was affected by DAPT treatment, with fewer mammospheres formed in the presence of

DAPT by both control and mutant BCs (Fig. 4C). Notch inhibition resulted in smaller mammospheres in control, and to a lesser extent, mutant BC cultures (Fig. 4D). These data suggest that the Notch pathway is required for mammosphere formation from luminal and basal cells, regardless of p53 status.

Mammary BCs depleted of p53 display enhanced stem cell activity and self-renewal

We evaluated the effects of p53 deletion on the regenerative capacity of BCs, by carrying out four series of transplantation experiments: 1) co-transplantation of freshly isolated control and mutant BCs into the cleared mammary fat pads; 2) transplantation of BCs at limiting dilutions; 3) serial transplantation of sorted BCs, and 4) transplantation of cells obtained after the dissociation of control or mutant BC mammospheres.

In the first series of experiments, we mixed equal numbers of freshly isolated unlabeled control or mutant BCs with *LacZ*-labeled control BCs isolated from K5*Cre;R26* mouse mammary glands and transplanted the resulting cell mixtures into cleared fat pads. Ten weeks after transplantation, to analyze the origin of the developed outgrowths, the transplanted fat pads were consecutively stained with X-gal and Carmine-Alum in whole-mount. As expected, in the fat pads transplanted with a mixture of labeled and unlabeled control BCs, *LacZ*-positive and *LacZ*-negative outgrowths, each, occupied approximately half of the total transplanted fat pad surface (Fig. 5A, left panels and data not shown). By contrast, the outgrowths developed in the fat pads transplanted with a mixture of p53-deficient unlabeled and control *LacZ*-labeled BCs were almost entirely *LacZ*-negative, with only a few small blue branches observed in some fat pads (Fig. 5A, right panels and data not shown). These data suggest that p53-deficient BCs have higher levels of repopulating activity and an advantage over p53-positive BCs.

To compare the frequency of the repopulating cells, we transplanted control and p53-deficient BCs at limiting dilutions (Fig. 5B). The repopulating unit frequency in BC populations was found to be 1/20 (1/31-1/13) for control and 1/7 (1/5-1/11) for mutant (CI 95%, p value 0.000194). Thus, the deletion of p53 led to an expansion of the regenerating BC population.

We then analyzed the role of p53 in stem cell self-renewal, by performing serial transplantations of sorted BCs. In the first transplant generation, the rate of engraftment was 100% for both control and mutant BCs. In the second transplant generation, when 100 BCs per fat pad were transplanted, the engraftment rate appeared to be below 50% for the control, whereas mutant BCs developed elaborate outgrowths in all transplanted fat pads (Fig. 5C). Furthermore, in the third transplant generation, engraftment was observed in one and eight of the 23 transplanted fat pads, for control and mutant BCs, respectively (Fig. 5C). These data suggest that p53-deficient mammary stem cells have an enhanced self-renewal capacity.

Finally, we investigated whether a cell population with repopulating capacity was maintained in the mammospheres, by dissociating second-generation mammospheres developed from control and p53-deficient BCs and transplanting them into cleared mammary fat pads. Cells from p53-deficient BC mammospheres had markedly higher levels of stem cell activity than cells from control mammospheres (Fig. 5D). The regenerating cell population was maintained in the mammospheres formed from p53-deficient BCs after numerous passages (Supporting Information Fig. S4).

DISCUSSION

In this study, we used a Cre-Lox approach for conditional deletion of the *Trp53* gene from mouse mammary epithelium and analyzed the effects of p53 loss on stem cell function in luminal and basal cell populations, separately. Several previous studies have shown that the mammary epithelium of p53-deficient mice displays enhanced stem cell activity (25-27). However, they did not determine whether the loss of p53 affected stem cells in both the luminal and basal compartments of the mammary epithelium. In addition, in the case of germline p53 deletion, the possibility of stromal and systemic effects on stem cell function cannot be excluded, making it difficult to define epithelium-specific alterations in these mouse mutants.

We found that p53 was deleted from both mammary epithelial layers of K5*Cre*;*Trp53*$^{F/F}$ mice, the basal and the luminal. These data are consistent with the results of lineage-tracing experiments suggesting that the K5 promoter is active in early mammary progenitors (12, and this study). We previously used a similar approach to delete the *myc* gene from the mammary epithelium (K5*Cre*;*Myc*$^{F/F}$ mice, 12). Unlike p53, Myc was deleted from the basal layer but not from luminal cells (12).

Thus, in the context of the developing mammary gland, the efficiency of Cre-Lox-mediated gene deletion does not depend exclusively on the specificity of the promoter delivering Cre. It also depends on the properties of the protein encoded by the targeted gene. The deletion of p53 conferred an advantage to mutant cells, in that they proliferated more rapidly. By contrast, the absence of Myc limited cell propagation. Both p53 and Myc have been implicated in cell competition, a biological phenomenon involving the selection of cells with a growth or survival advantage within a particular cellular compartment (37, 38). Lower levels of p53 and higher levels of Myc make cells highly competitive, probably accounting for the complete p53 and partial Myc deletion from the mammary epithelial bilayer of mouse mutants with Cre expression driven by the basal K5 promoter.

Two-dimensional colony-formation and non adherent mammosphere assays are generally used to analyze the function of mammary stem/progenitor cells *in vitro* (2, 4, 26, 39). Classical non adherent mammosphere assays are performed with total unsorted mammary cells, and the identity of the cells generating such mammospheres is unknown. In this study, we used colony-formation assays and a recently described mammosphere-formation assay adapted for sorted luminal and basal cells (34). Like the colony-formation assay, this method can be used to evaluate clonogenic cell number and proliferative potential within tested populations, with mammosphere passaging making it possible to evaluate the self-renewal capacity of stem/progenitor cells.

We found that the deletion of p53 led to an increase in clonogenic cell number and proliferative capacity and conferred an unlimited capacity for self-renewal to luminal and basal stem/progenitor cells in mammosphere culture, suggesting that p53 restricts the amplification of stem/progenitor cells residing in the luminal and basal compartments of the mammary epithelium.

Mammospheres formed by cells retaining the membrane dye PKH26 isolated from p53-deficient mouse glands have been reported to contain several stem cells, whereas control mammospheres contain only one stem cell each (27). We observed a rapid loss of expression of the basal marker K5 from control BC mammospheres upon passaging, whereas in p53-deficient BC mammospheres, basal K5-positive cells were detected at all passages. Recent studies have suggested that activation of the EMT program is associated with the acquisition of stem cell properties, whereas mammary BCs, which have regenerative potential, express numerous genes relating to EMT, including the Slug transcription factor (35, 40). Consistent with this observation and the presence of BCs in the mammospheres, we were able to detect the upregulation of EMT-associated genes in mutant BC mammosphere cultures. It would have been interesting to determine whether the potential for self-renewal and the regenerative capacity were associated with this basal K5^{+} cell population within the mammospheres. However, expression of the surface markers used to isolate BC by flow cytometry, the α6 and β1 integrins, was upregulated in all cells within the mammospheres, making it impossible to isolate a specific BC population. We are currently trying to identify other surface markers that could be used for the isolation of BC from the mammospheres, to determine whether clonogenic activity and regenerative potential are associated with this cell population.

An evaluation of the regenerative potential of isolated BCs revealed that p53 loss increased the capacity of the cells to repopulate the mammary fat pad and led to expansion of the regenerating BC population. Furthermore, serial transplantations with limited numbers of cells suggested that the self-renewal capacity of the regenerating BCs was enhanced by p53 deletion. Interestingly, the regenerative capacity of p53-deficient BCs declined in serial transplantations, although it remained

markedly higher than that of control cells. By contrast, the mammosphere-forming potential of basal p53-deficient cells did not decrease with numerous passages. Thus, to maintain the stem cell properties, sorted p53-deficient BCs, when transplanted into the cleared mammary fat pad, may require some additional factors such as the presence of luminal cells and growth factors provided in the mammosphere assays, or, when tissue fragments are transplanted.

It has been suggested that mutations leading to abnormal function of stem and progenitor cells can lead to cancer (41). Two studies have provided evidence that mammary luminal progenitors are at the origin of basal-like Brca1-associated breast cancer (15, 16). Most basal-like breast tumors are characterized by inactivating mutations of p53 (14). Thus, our data, connecting p53 loss to luminal progenitor amplification and the acquisition of unlimited self-renewal potential, provide new insight into the cellular and molecular events leading to breast tumorigenesis.

Studies of p53 functions in ES cells and various adult tissues have suggested that p53 may control the amplification and self-renewal of stem/progenitor populations via several mechanisms, including the modulation of Wnt signaling, the inhibition of rapid cell cycle progression, the promotion of asymmetric stem cell divisions and prevention of the EMT program activation (23, 27, 42). It has been suggested that p53 restricts mammary stem/progenitor cell activity by affecting the Notch pathway (26). However, we found that Notch inhibition resulted in a decrease in the number and size of mammospheres, not only in p53-deficient, but also in control basal and luminal cells. These observations indicate that the Notch pathway contributes to the proliferative potential of luminal and basal clonogenic cells, regardless of p53 status. Further investigations are required to establish the precise molecular mechanisms underlying the connection between p53 loss and stemness.

In summary, in this study, we show that loss of p53 led to an expansion of the clonogenic basal and luminal cell populations *in vivo*, and the acquisition of unlimited self-renewal capacity *in vitro*, in mammosphere culture, by basal and luminal stem/progenitor cells. In addition, p53 depletion from mammary epithelium resulted in an increased number of regenerating BCs and their enhanced self-renewal capacity *in vivo*. Altogether, these observations revealing the functions of p53 in the maintenance of specific mammary stem and progenitor pools provide further insights into the impact of p53 loss in breast cancer.

ACKNOWLEDGMENTS

We are particularly grateful to A. Di Cicco and C. Lambert for expert technical assistance, to Dr. I. Grandjean and the personnel of the animal facilities at Institut Curie for taking care of the mice and to Z. Maciorowski and A. Viguier for excellent assistance with FACS analyses. We also thank Drs. J.L. Jorcano and P. Soriano for providing mouse strains, and Dr. G. Wahl for sharing the mammosphere protocol with us before publication.

DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

The authors indicate no potential conficts of interest.

REFERENCES

1. Visvader JE, Smith GH. Murine mammary epithelial stem cells: discovery, function, and current status. Cold Spring Harb Perspect Biol 2011;3. pii: a004879.
2. Stingl J, Eirew P, Ricketson I, et al. Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells. Nature 2006;439:993-997.
3. Shackleton M, Vaillant F, Simpson KJ, et al. Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. Nature 2006;439:84-88.
4. Sleeman KE, Kendrick H, Robertson D, et al. Dissociation of estrogen receptor expression and in vivo stem cell activity in the mammary gland. J Cell Biol 2007;176:19-26.

5. Taddei I, Deugnier MA, Faraldo MM, et al. Beta1 integrin deletion from the basal compartment of the mammary epithelium affects stem cells. Nat Cell Biol 2008;10:716-722.

6. Van Keymeulen A, Rocha AS, Ousset M, et al. Distinct stem cells contribute to mammary gland development and maintenance. Nature 2011;189-193.

7. van Amerongen R, Bowman AN,Nusse R. Developmental Stage and Time Dictate the Fate of Wnt/beta-Catenin-Responsive Stem Cells in the Mammary Gland. Cell Stem Cell 2012;11:387-400.

8. Zeng YA,Nusse R. Wnt proteins are self-renewal factors for mammary stem cells and promote their long-term expansion in culture. Cell Stem Cell 2010;6:568-577.

9. Bouras T, Pal B, Vaillant F, et al. Notch signaling regulates mammary stem cell function and luminal cell-fate commitment. Cell Stem Cell 2008;3:429-441.

10. Asselin-Labat ML, Vaillant F, Sheridan JM, et al. Control of mammary stem cell function by steroid hormone signalling. Nature 2010;465:798-802.

11. Joshi PA, Jackson HW, Beristain AG, et al. Progesterone induces adult mammary stem cell expansion. Nature 2010;465:803-807.

12. Moumen M, Chiche A, Deugnier MA, et al. The proto-oncogene Myc is essential for mammary stem cell function. Stem Cells 2012;30:1246-1254.

13. LaMarca HL, Visbal AP, Creighton CJ, et al. CCAAT/enhancer binding protein beta regulates stem cell activity and specifies luminal cell fate in the mammary gland. Stem Cells 2010;28:535-544.

14. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. Proc Natl Acad Sci U S A 2001;98:10869-10874.

15. Lim E, Vaillant F, Wu D, et al. Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers. Nat Med 2009;15:907-913.

16. Molyneux G, Geyer FC, Magnay FA, et al. BRCA1 basal-like breast cancers originate from luminal epithelial progenitors and not from basal stem cells. Cell Stem Cell 2010;7:403-417.

17. Malkin D, Li FP, Strong LC, et al. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. Science 1990;250:1233-1238.

18. Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, et al. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. Nature 1992;356:215-221.

19. Kuperwasser C, Hurlbut GD, Kittrell FS, et al. Development of spontaneous mammary tumors in BALB/c p53 heterozygous mice. A model for Li-Fraumeni syndrome. Am J Pathol 2000;157:2151-2159.

20. Jerry DJ, Kittrell FS, Kuperwasser C, et al. A mammary-specific model demonstrates the role of the p53 tumor suppressor gene in tumor development. Oncogene 2000;19:1052-1058.

21. Lin SC, Lee KF, Nikitin AY, et al. Somatic mutation of p53 leads to estrogen receptor alpha-positive and -negative mouse mammary tumors with high frequency of metastasis. Cancer Res 2004;64:3525-3532.

22. Liu X, Holstege H, van der Gulden H, et al. Somatic loss of BRCA1 and p53 in mice induces mammary tumors with features of human BRCA1-mutated basal-like breast cancer. Proc Natl Acad Sci U S A 2007;104:12111-12116.

23. Spike BT,Wahl GM. p53, Stem Cells, and Reprogramming: Tumor Suppression beyond Guarding the Genome. Genes Cancer 2012;2:404-419.

24. Bonizzi G, Cicalese A, Insinga A, et al. The emerging role of p53 in stem cells. Trends Mol Med 2012;18:6-12.

25. Medina D, Kittrell FS, Shepard A, et al. Biological and genetic properties of the p53 null preneoplastic mammary epithelium. Faseb J 2002;16:881-883.

26. Tao L, Roberts AL, Dunphy KA, et al. Repression of mammary stem/progenitor

cells by p53 is mediated by Notch and separable from apoptotic activity. Stem Cells 2010;29:119-127.

27. Cicalese A, Bonizzi G, Pasi CE, et al. The tumor suppressor p53 regulates polarity of self-renewing divisions in mammary stem cells. Cell 2009;138:1083-1095.
28. Ramirez A, Page A, Gandarillas A, et al. A keratin K5Cre transgenic line appropriate for tissue-specific or generalized Cre-mediated recombination. Genesis 2004;39:52-57.
29. Soriano P. Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. Nat Genet 1999;21:70-71.
30. Jonkers J, Meuwissen R, van der Gulden H, et al. Synergistic tumor suppressor activity of BRCA2 and p53 in a conditional mouse model for breast cancer. Nat Genet 2001;29:418-425.
31. Teuliere J, Faraldo MM, Deugnier MA, et al. Targeted activation of beta-catenin signaling in basal mammary epithelial cells affects mammary development and leads to hyperplasia. Development 2005;132:267-277.
32. Deome KB, Faulkin LJ, Jr., Bern HA, et al. Development of mammary tumors from hyperplastic alveolar nodules transplanted into gland-free mammary fat pads of female C3H mice. Cancer Res 1959;19:515-520.
33. Hu Y,Smyth GK. ELDA: extreme limiting dilution analysis for comparing depleted and enriched populations in stem cell and other assays. J Immunol Methods 2009;347:70-78.
34. Spike BT, Engle DD, Lin JC, et al. A mammary stem cell population identified and characterized in late embryogenesis reveals similarities to human breast cancer. Cell Stem Cell 2012;10:183-197.
35. Mani SA, Guo W, Liao MJ, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. Cell 2008;133:704-715.
36. Scheel C, Eaton EN, Li SH, et al. Paracrine and autocrine signals induce and maintain mesenchymal and stem cell states in the breast. Cell 2011;145:926-940.
37. Vivarelli S, Wagstaff L,Piddini E. Cell wars: regulation of cell survival and proliferation by cell competition. Essays Biochem 2012;53:69-82.
38. de Beco S, Ziosi M,Johnston LA. New frontiers in cell competition. Dev Dyn 2012;241:831.
39. Dontu G, Abdallah WM, Foley JM, et al. In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. Genes Dev 2003;17:1253-1270.
40. Kendrick H, Regan JL, Magnay FA, et al. Transcriptome analysis of mammary epithelial subpopulations identifies novel determinants of lineage commitment and cell fate. BMC Genomics 2008;9:591.
41. Visvader JE. Cell of origin in cancer. Nature 2011;469:314-322.
42. Chang CJ, Chao CH, Xia W, et al. p53 regulates epithelial-mesenchymal transition and stem cell properties through modulating miRNAs. Nat Cell Biol 2010;13:317-323.

Figure 1

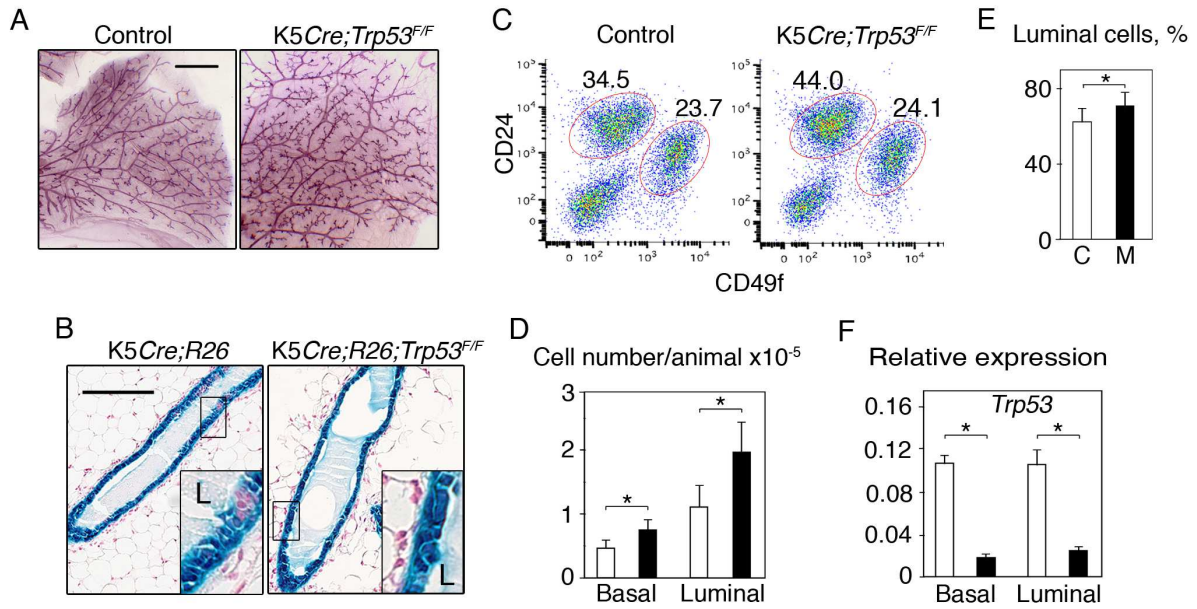


Figure 1 : Mammary development and mammary epithelial cell populations in K5*Cre;Trp53*$^{F/F}$ mice

(A) Whole mounts of mammary glands from 18-week-old virgin control and K5*Cre;Trp53*$^{F/F}$ mice stained with Carmine-Alum. Bars, 1.5 mm.

(B) Sections through whole mounts of virgin mouse mammary glands from 18-week-old control K5*Cre;R26*, and mutant K5*Cre;R26;Trp53*$^{F/F}$ mice, stained with X-gal. L, lumen. Bar, 100 μm.

(C) Separation, by flow cytometry, of basal (CD49f-high) and luminal (CD49f-low) epithelial cells from 18-week-old virgin mouse mammary glands. The values shown represent percentages of luminal and basal cells in CD45/CD31-neg cell populations. A representative experiment.

(D) Absolute numbers of CD49f-high (basal) and CD49f-low (luminal) cells in CD45/CD31-neg/CD24-pos cell fractions from the mammary glands of control and mutant mice. The values obtained in eight independent cell sorting experiments are shown as means ± SEM. * $p < 0.01$ and < 0.015 for the basal and luminal populations, respectively.

(E) Percentages of CD49f-low (luminal) cells in CD45/CD31-neg/CD24-pos cell populations isolated from control and mutant glands. The values obtained in 10 independent cell sorting experiments are shown as means ± SEM. * $p < 0.015$.

(F) q-PCR analysis of gene expression in freshly isolated basal and luminal mammary epithelial cells from 18-week-old virgin mice. The values normalized to *Gapdh* and shown as means ± SEM, were obtained in four independent experiments. * $p < 0.0005$ and < 0.005 for basal and luminal cells, respectively.

Figure 2

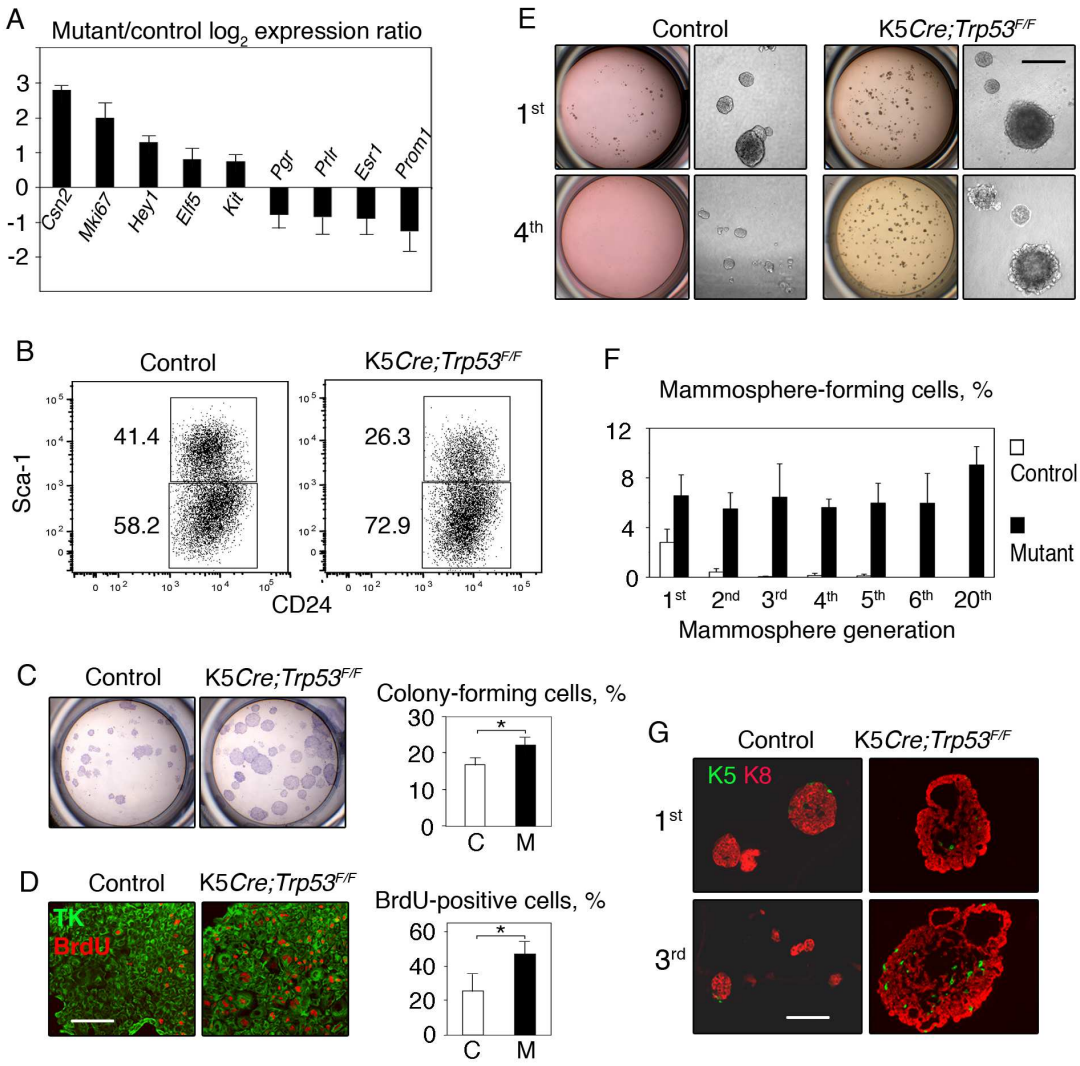


Figure 2 : The deletion of p53 leads to expansion and enhanced self-renewal of the luminal progenitor population

(A) q-PCR analysis of gene expression in luminal cells isolated from 18-week-old virgin control and K5*Cre;Trp53*$^{F/F}$ mouse mammary glands. Three luminal cell preparations isolated in independent cell sorting experiments were analyzed.

(B) Separation of luminal progenitor-enriched cell populations from 18-week-old virgin control and K5*Cre;Trp53*$^{F/F}$ mouse mammary epithelia by flow cytometry (a representative experiment is shown). The numbers indicate the percentage of cells in each subpopulation. Only the CD45/CD31-negative/CD24-high cell fraction is shown.

(C) Colonies formed by 250 mammary luminal cells isolated from 18-week-old virgin control or mutant mice. The values shown in the diagram are means ± SEM from five independent experiments; * $p < 0.006$.

(D) Double indirect immunolabeling of the colonies formed by luminal cells isolated from control or mutant glands with anti-total keratin (TK) and anti-BrdU antibodies. The diagram shows the percentage of BrdU-incorporating cells in the colonies. The values shown are means ± SEM from six independent experiments; * $p < 0.003$.

(E) Microphotographs of the mammospheres formed by control and mutant luminal cells.

(F) Percentages of mammospheres-forming cells in control or mutant luminal cell preparations in primary culture (1st generation) and after consecutive passages. The values shown are the means ± SEM from five independent expriments.

(G) Double indirect immunolabeling of the 1st- and 3rd-generation mammospheres formed by luminal cells isolated from control and mutant glands with anti-K5 and anti-K8 antibodies. Bars, 0.17 mm in D, 0.5 mm in E, and 0.22 mm in G.

Figure 3

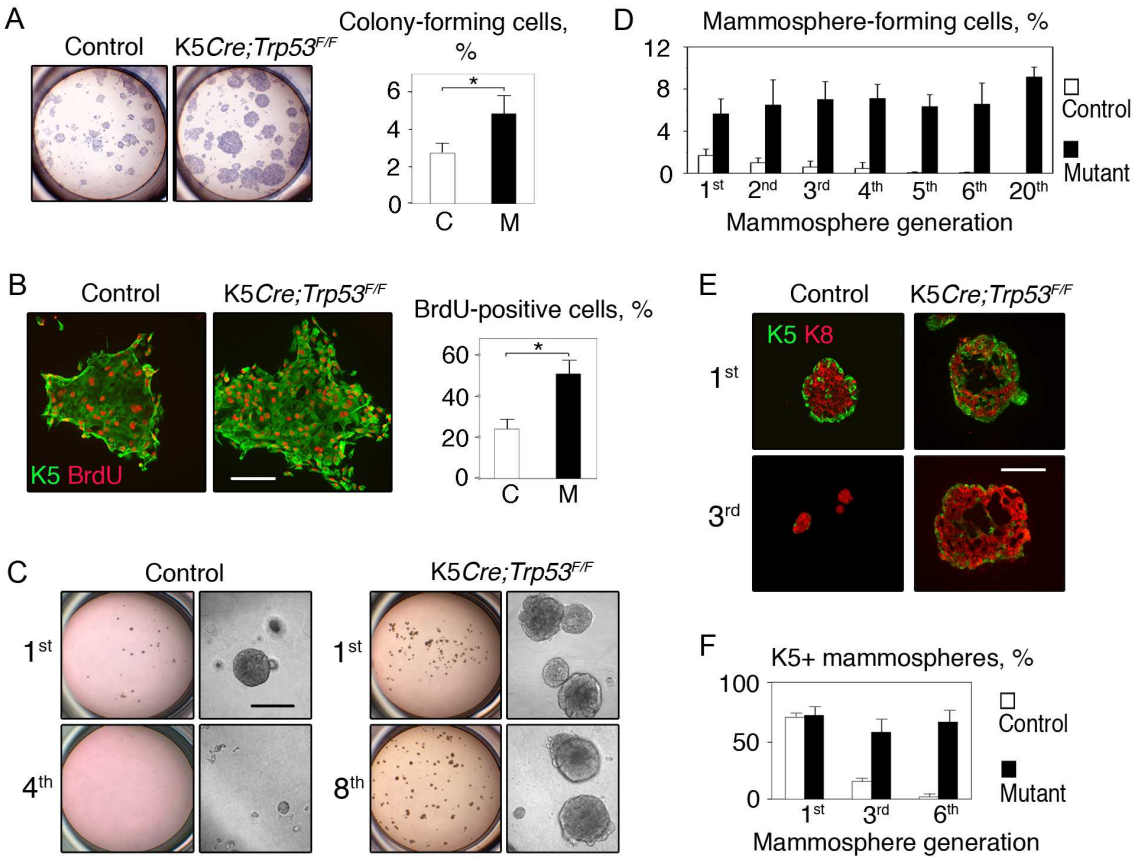


Figure 3 : Expansion of the clonogenic stem/progenitor cell population in the basal compartment of the K5*Cre;Trp53*$^{F/F}$ mouse mammary epithelium

(A) Colonies formed by 1000 BCs isolated from virgin 18-week-old control or mutant mice. The values shown are the means ± SEM from seven independent experiments, * $p < 0.01$.

(B) Double indirect immunolabeling of the colonies formed by control or p53-deficient BCs with anti-K5 and anti-BrdU antibodies. The diagram shows percentage of BrdU-incorporating cells in the colonies. The values shown are means ± SEM from four independent experiments, * $p < 0.003$.

(C) Microphotographs of the mammospheres formed by control or p53-deficient basal cells.

(D) Percentages of mammosphere-forming cells in control or mutant BC preparations in primary culture (1st generation) and after consecutive passages. The values shown are the means ± SEM from five independent experiments.

(E) Double indirect immunolabeling of the 1st- and 3rd-generation mammospheres formed by control and p53-deficient BCs with anti-K5 and anti-K8 antibodies.

(F) Diagram showing the percentage of BC-mammospheres containing K5^{+} cells in consecutive passages. The values shown are the means ± SEM from three independent expriments.

Bars, 0.15 mm in B, 0.5 mm in C, 0.22 mm in E.

Figure 4

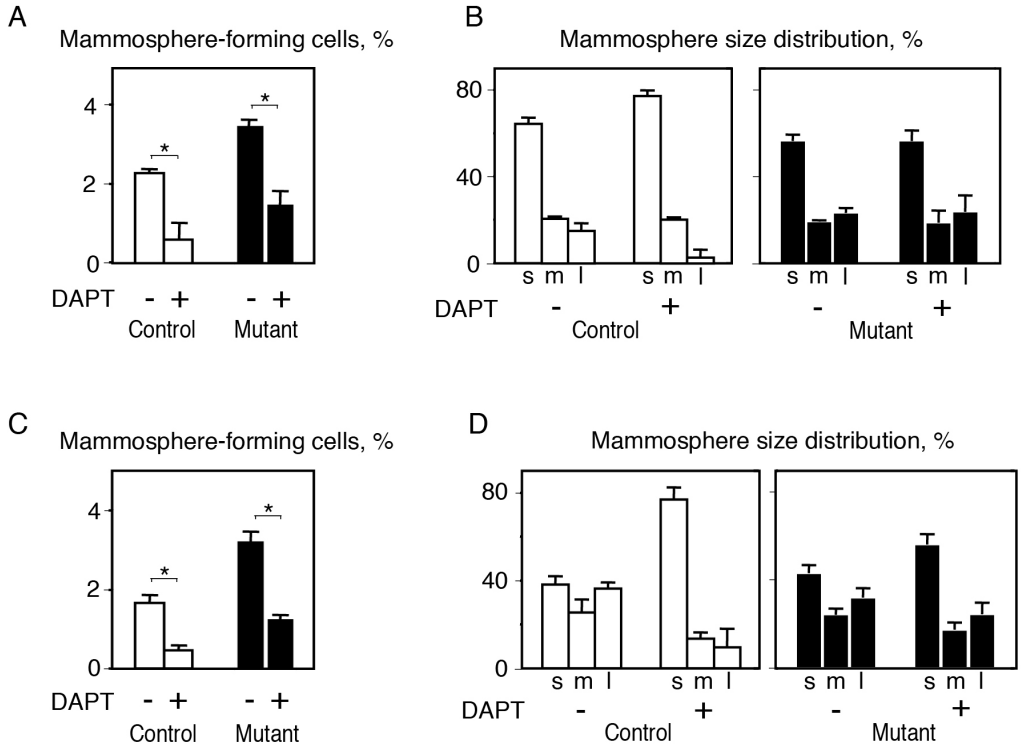


Figure 4 : Notch pathway activity is required for mammosphere formation by luminal and basal cells

(A) Diagram showing the effect of DAPT treatment on mammosphere formation by sorted luminal cells. The values shown are means±SEM for three measurements, *$p < 0.017$ for control and $p < 0.009$ for mutant cells. Data from one of two independent experiments are shown.

(B) Diagram showing luminal cell mammosphere size distribution in control and DAPT-treated cultures. The values shown are means ± SEM for three measurements. Data from one of two independent experiments.

(C) Diagram showing the effect of DAPT treatment on mammosphere formation by sorted BCs. The values shown are means±SEM for three measurements, * $p < 0.004$ for control and mutant cells. Data from one of two independent experiments are shown.

(D) Diagram showing BC mammosphere size distribution in control and DAPT-treated cultures. The values shown are means ± SEM for three measurements. Data from one of two independent experiments. In (B) and (D), s, small; m, medium; l, large.

Figure 5

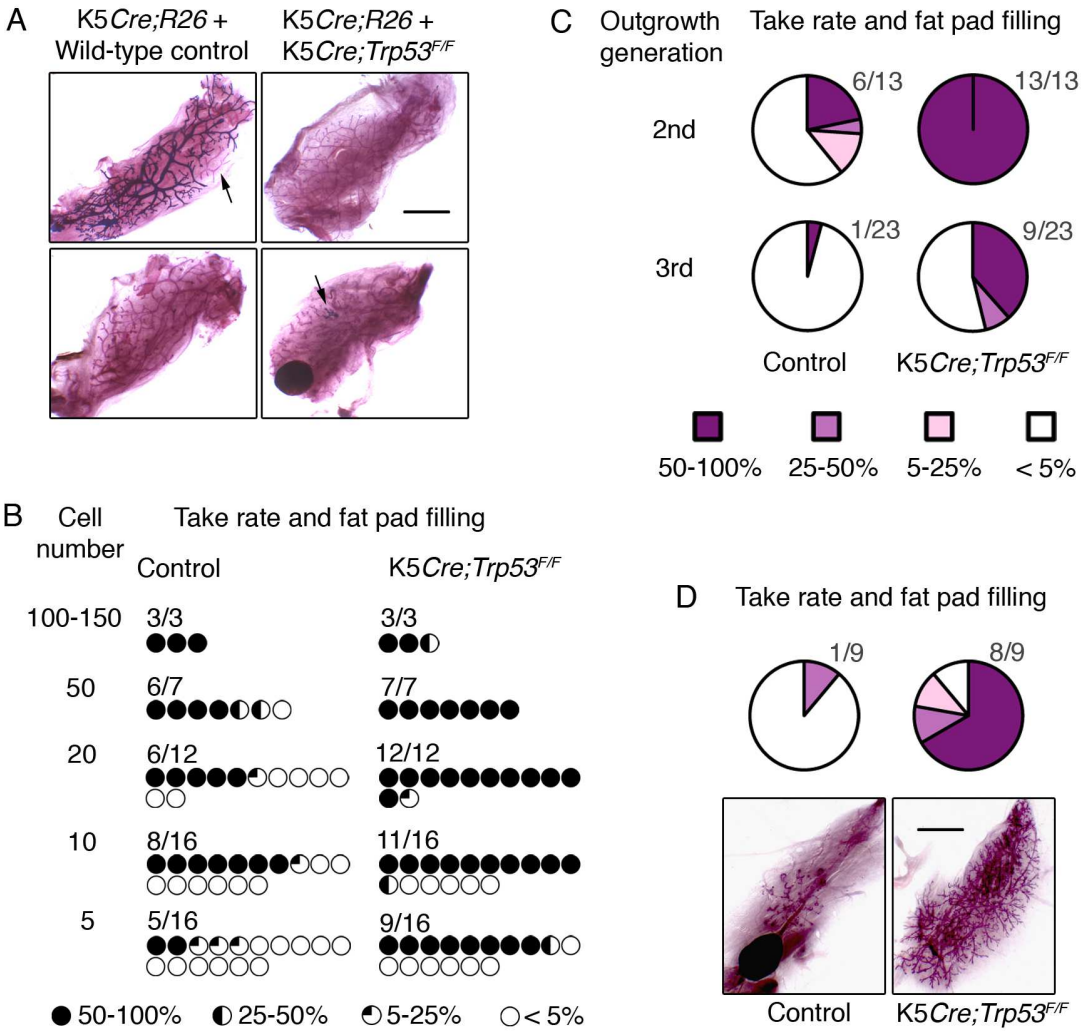


Figure 5 : p53-deficient mammary BCs display enhanced stem cell activity

(A) Outgrowths developed from cotransplanted *LacZ*$^{+}$ and *LacZ*$^{-}$ mammary BCs sequentially stained with X-gal and Carmine-Alum in whole-mount preparations. Before transplantation, 50 mammary BCs isolated from K5*Cre;R26* mice were mixed with either 50 wild-type BCs (left panels) or 50 p53-deficient BCs (right panels).

(B) Transplantation of control and p53-deficient mammary BCs at limiting dilutions.

(C) Serial transplantation of sorted BCs from control and mutant mammary glands.

(D) Transplantation of cells from 2nd-generation mammospheres formed by control or p53-deficient BCs.

Bars, 2 mm.

Supporting Information

Supplemental Material and Methods

List of primers for q-PCR

Cdh1-s	5'- ATCCTCGCCCTGCTGATTC - 3'
Cdh1-as	5'- ACCACCGTTCTCCTCCGTA - 3'
Cre-s	5'- TTCCCGCAGAACCTGAAGAT - 3'
Cre-as	5'- GCCGCATAACCAGTGAAACA - 3'
Csn2-s	5'- CCTCTGAGACTGATAGTATTT - 3'
Csn2-as	5'- TGGATGCTGGAGTGAACTTTA - 3'
Elf5-s	5'- CCAACGCATCCTTCTGTGAC - 3'
Elf5-as	5'- AGGCAGGGTAGTAGTCTTCA - 3'
Esr1-s	5'- CTGGACAGGAATCAAGGTAAA - 3'
Esr1-as	5'- GAGGCACACAAACTCTTCTC - 3'
Gapdh-s	5'- CCAATGTGTCCGTCGTGGATC - 3'
Gapdh -as	5'- GTTGAAGTCGCAGGAGACAAC - 3'
Kit-s	5'- AGTGCTTCCGTGACATTCAAC - 3'
Kit-as	5'- TGCCATTTATGAGCCTGTCGT - 3'
Mki67-s	5'- TCAGATGGCTCAAAGAACAGT - 3'
Mki67-as	5'- CAGAAGTGGGCTCTACTATG - 3'
Pgr-s	5'- CCACCTGTACTGCTTGAATAC - 3'
Pgr-as	5'- CAACTGGGCAGCAATAACTTC - 3'
Prlr-s	5'- ATAAAAGGATTTGATACTCATCTG - 3'
Prlr-as	5'- GTCATCCACTTCCAAGAACTC - 3'
Snai1-s	5'- ACACCTGTTTCACAGCAGTT - 3'
Snai1-as	5'- TAGTTCTGGGAGACACATTG - 3'
Snai2-s	5'- GATGCCCAGTCTAGGAAATC - 3'
Snai2-as	5'- CCCAGTGTGAGTTCTAATGT - 3'
Trp53-s	5'- AGGGTCGAGACACAATCCTC - 3'
Trp53-as	5'- GCAGAGACCTGACAACTATCA - 3'
Vim-s	5'- CCAAGCAGGAGTCAAACGA - 3'
Vim-as	5'- TAAGGGCATCCACTTCACAG - 3'

Other primers were purchased from SABiosciences/Qiagen.

Figure S1

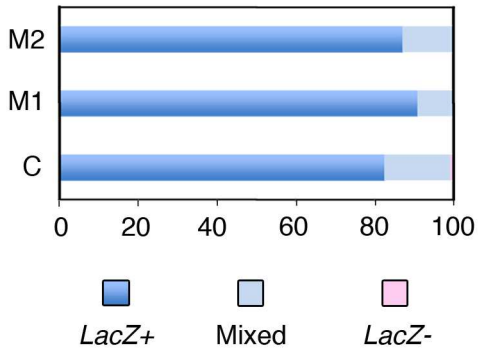


Figure S1 : Quantitative evaluation of *LacZ* expression in the mammary ducts from 18-week-old virgin control (K5*Cre;R26*) and mutant (K5*Cre;R26;Trp53*$^{F/F}$) mice

The diagram shows the percentage of ducts containing *LacZ*+ cells only, a mixture of *LacZ*+ and *LacZ*- cells, or *LacZ*- cells only in the luminal layer. *LacZ*- cells were not detected in the BC layer.

Figure S2

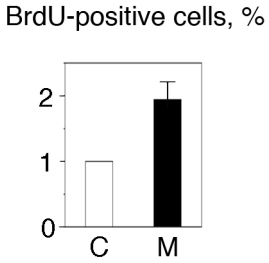


Figure S2 : Quantification of cell proliferation in the mammospheres developed from control and p53-deficient luminal cells

The diagram shows the percentage of BrdU-incorporating cells in the mammospheres formed by luminal cells. The values shown are means ± SEM from four independent experiments, * $p < 0.003$.

Figure S3

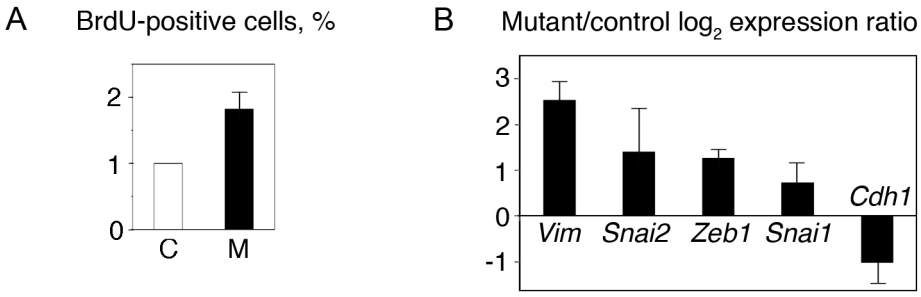


Figure S3 : Enhanced proliferation and EMT gene expression in the mammospheres developed from p53-deficient BCs

(A) Quantification of cell proliferation in the mammospheres developed from control and p53-deficient BCs. The diagram shows the percentage of BrdU-incorporating cells in the BC-mammospheres. The values shown are means ± SEM from four independent experiments, * $p < 0.003$.

(B) Expression of the EMT-associated genes in the mammospheres formed by mammary BCs, as assessed by q-PCR. Data from three independent experiments.

Figure S4

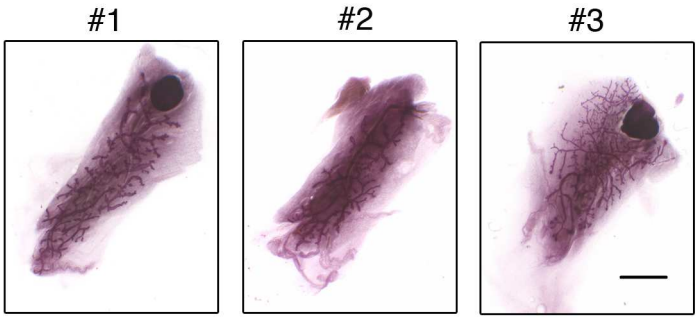


Figure S4 : p53-deficient BCs display enhanced stem cell activity

Transplantation of cells from 9th-generation p53-deficient BC-mammospheres. The outgrowths developed in three out of four transplanted fat pads. Bar, 2.5 mm.

2.6 Analyse du potentiel de régénération des cellules luminales déficientes pour p53 (données préliminaires)

Comme nous l'avons décrit dans le manuscrit précédent (Pages 99-118), les souris K5Cre; *Trp53*$^{F/F}$ présentent une augmentation significative de la taille de la population des cellules luminales progénitrices. Afin d'étudier si la suppression de p53 induisait dans les cellules luminales des capacités de régénération, nous avons effectué des transplantations de cellules luminales isolées (Fig. 21). Pour ces expériences, nous avons utilisé les souris K5Cre; *Trp53*$^{F/F}$; *Rosa26* afin de pouvoir détecter les cellules transplantées et leur progénie à l'aide d'un marquage au X-gal.

La coloration au X-gal des glandes entières transplantées avec des cellules luminales contrôles a montré une régénération significative (greffon occupant plus de 50% de la surface du cousin adipeux) seulement dans une glande sur six. Dans 4 glandes sur 6, aucun épithélium n'est détecté. En revanche, l'injection des cellules luminales K5Cre; *Trp53*$^{F/F}$ a produit des greffons de tailles diverses dans tous les cas, la moitié des injections (3 glandes sur 6) ayant produit des régénérations occupant plus de 50% du coussin adipeux.

Les coupes histologiques des glandes colorées (Fig. 21B) montrent des structures épithéliales en bicouche, avec les deux couches, basale et luminale, marquées au X-Gal. L'analyse par immunofluorescence confirme la distribution caractéristique en bicouche mammaire, avec une couche basale exprimant la kératine 5 (K5) et l'actine du muscle lisse (α-SMA), et une couche luminale positive pour la kératine 8 (K8) (Fig. 21B).

Bien que préliminaires, ces résultats suggèrent que la perte de p53 confère des propriétés morphogéniques aux cellules luminales.

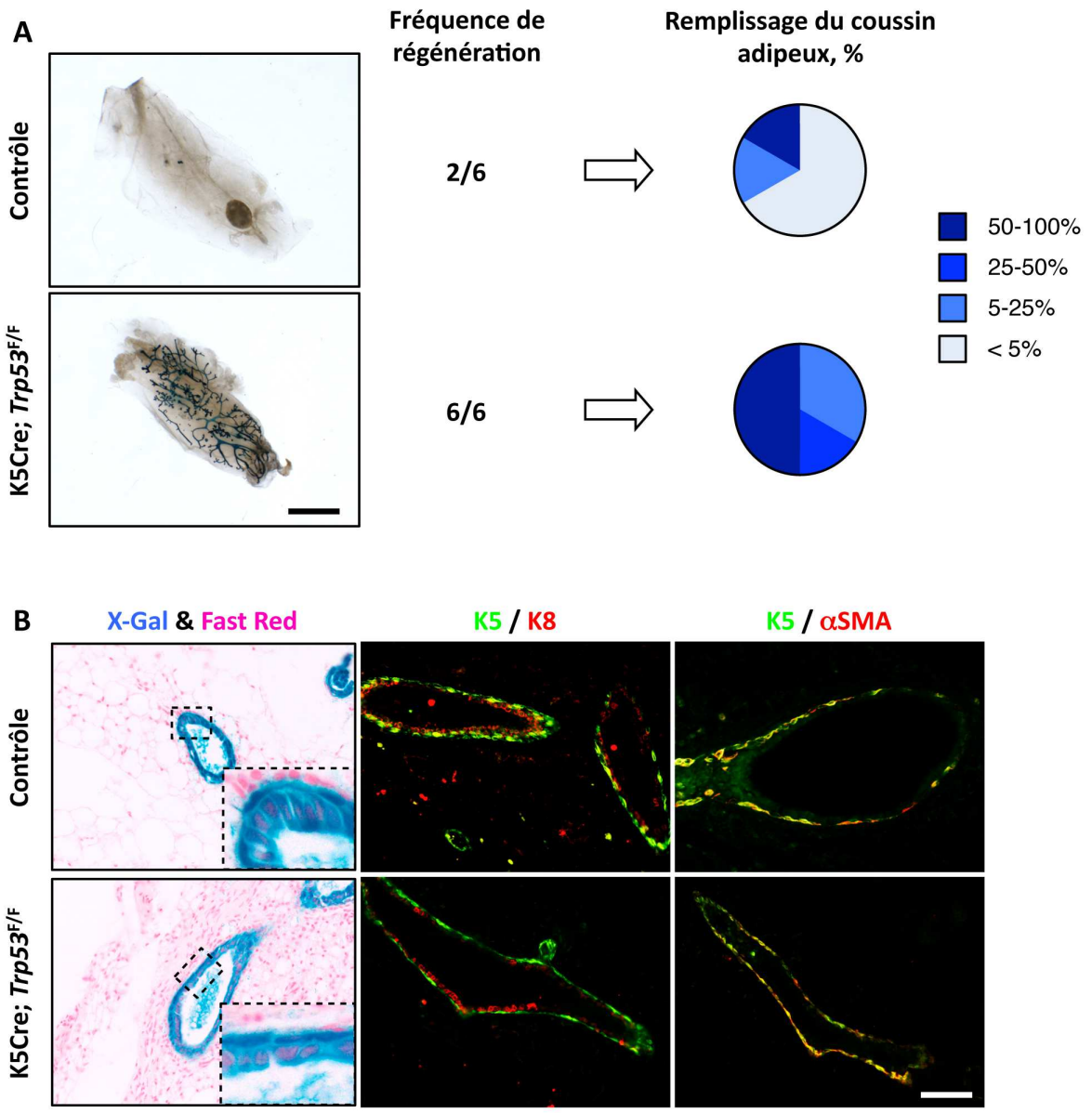


Figure 21 : Analyse du potentiel de régénération des cellules luminales des souris K5Cre; *Trp53*$^{F/F}$

(A) Marquage X-gal des greffons obtenus après transplantation de 1000 cellules luminales contrôles et K5Cre; *Trp53*$^{F/F}$. Les schémas à droite représentent la proportion de régénération en fonction du pourcentage du coussin adipeux rempli par les greffons. Barre d'échelle : 4 mm.
(B) A gauche : Coupes histologiques des glandes marquées au X-Gal et au Fast Red.
Au centre et à droite : Double immunofluorescence avec des anticorps anti-K5 (en vert) et anti-K8 (en rouge) ou anti-αSMA (en rouge). Barre d'échelle : 50 µm.

3. Myc est indispensable pour l'amplification des cellules souches et progénitrices mammaires et le développement de tumeurs de type basal induite par l'activation de la signalisation Wnt/β-caténine

3.1 L'activation de la voie Wnt/β-caténine dans les cellules basales mammaires induit le développement de tumeurs de type basal

Les femelles K5ΔNβcat développent des lésions mammaires, vers l'âge de 11-12 mois (Teuliere *et al*., 2005). Aux stades initiaux, nous pouvons observer l'apparition d'hyperplasies canalaires qui avec le temps évoluent en carcinomes invasifs avec, notamment, des régions présentant une expression de marqueurs épidermiques (métaplasies) (Teuliere *et al*., 2005). Ces lésions sont constituées de cellules basales (K5-positives) et non myoépithéliales (α–SMA-négatives) (Fig. 22A, B). De plus, elles sont négatives pour les récepteurs aux œstrogènes (ER) et à la progestérone (PR) (Fig. 22C, D) et elles ne surexpriment pas ErbB2 (Moumen, Chiche *et al*., manuscrit en préparation).

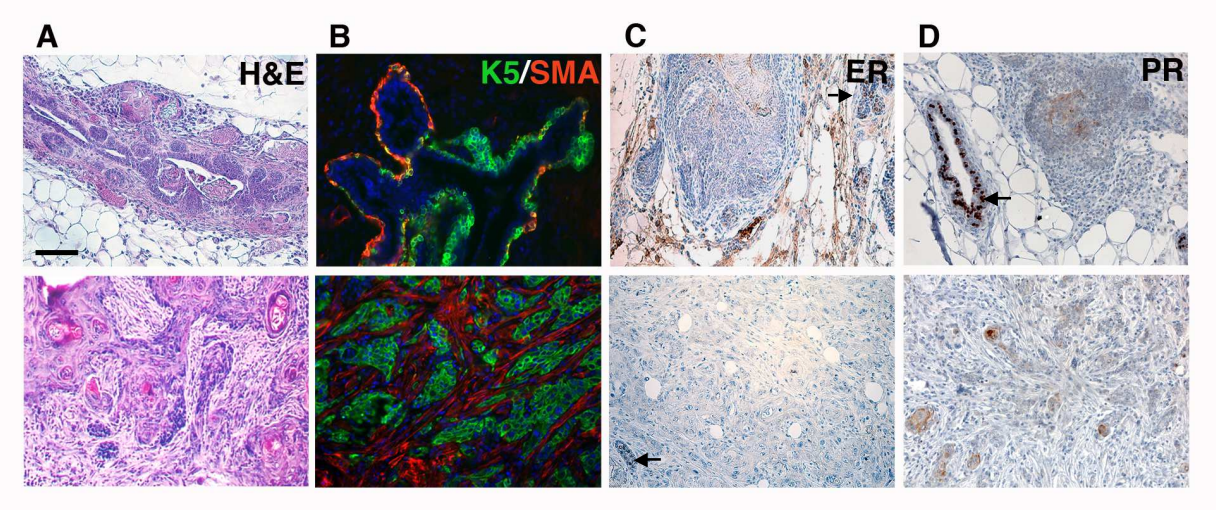


Figure 22 : Les tumeurs mammaires K5ΔNβcat présentent des caractéristiques de tumeurs triple négatives

Histologie et immunomarquages de lésions mammaires de femelles K5ΔNβcat aux stades hyperplasiques (haut) ou tumoraux (bas).
(A) Coloration à l'hématoxyline & éosine.
(B) Double immunofluorescence avec un anti-K5 (en vert) et un anti-αSMA (en rouge). Les noyaux sont marqués au DAPI.
(C & D) Immunohistochimie avec un anti-ER (C) et un anti-PR (D). Les flèches indiquent des canaux mammaires non hyperplasiques où l'expression de ER et PR est maintenue.
Barre d'échelle : 75 µm

Afin de mieux caractériser les lésions mammaires induites par l'activation de la β-caténine dans notre modèle de souris transgéniques, une analyse transcriptionnelle sur puce à ADN (Affymetrix) a été effectuée en collaboration avec le Département de Recherche Translationnelle de l'Institut Curie. Nous avons comparé les expressions géniques des groupes suivants : glandes mammaires contrôles (4 échantillons), hyperplasies (5 échantillons) et tumeurs (11 échantillons), les deux derniers groupes provenant des femelles K5ΔNβcat (Moumen, Chiche *et al.*, manuscrit en préparation). L'analyse comparative des données obtenues a confirmé la nature basale des tumeurs développées par les souris K5ΔNβcat. Ainsi, on détecte une surexpression de gènes caractéristiques des cellules basales (*Krt5, Krt14, Trp63, Trp73, Bcn*), ainsi qu'une sous-expression de gènes luminaux (*Krt18, Krt19, Esr1, Prlr, Pgr, Foxa1*). Les gènes définissant la population basale myoépithéliale sont quant à eux sous-exprimés également (*Acta2, Myh11, Cnn1*). Confirmant les analyses histologiques réalisées précédemment (Teuliere et al., 2005), l'expression de plusieurs gènes caractéristiques de la différenciation épidermique est augmentée (*Krt1, Krt10, Ivl*). Pour certains gènes, les données des puces ont été validées par PCR-Q (Fig. 23).

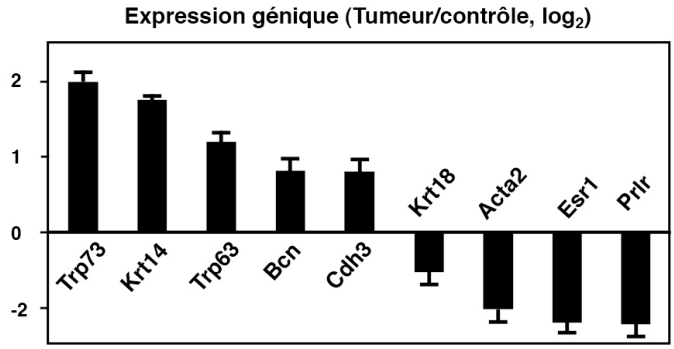


Figure 23 : Analyse de l'expression génique des tumeurs mammaires K5ΔNβcat

Analyse par PCR-Q de gènes caractéristiques des cellules basales et luminales. Quatre échantillons contrôles et quatre échantillons tumoraux K5ΔNβcat ont été analysés.

Ces résultats nous indiquent que les tumeurs développées par les souris K5ΔNβcat présentent des caractéristiques similaires à celles des cancers du sein de type basal avec des éléments de carcinome métaplastique.

3.2 Myc est nécessaire à la formation des tumeurs K5ΔNβcat

Nous avons identifié plusieurs cibles directes de la β-caténine qui sont surexprimées dans les tumeurs de souris K5ΔNβcat et parmi ces cibles, le proto-oncogène *Myc*.

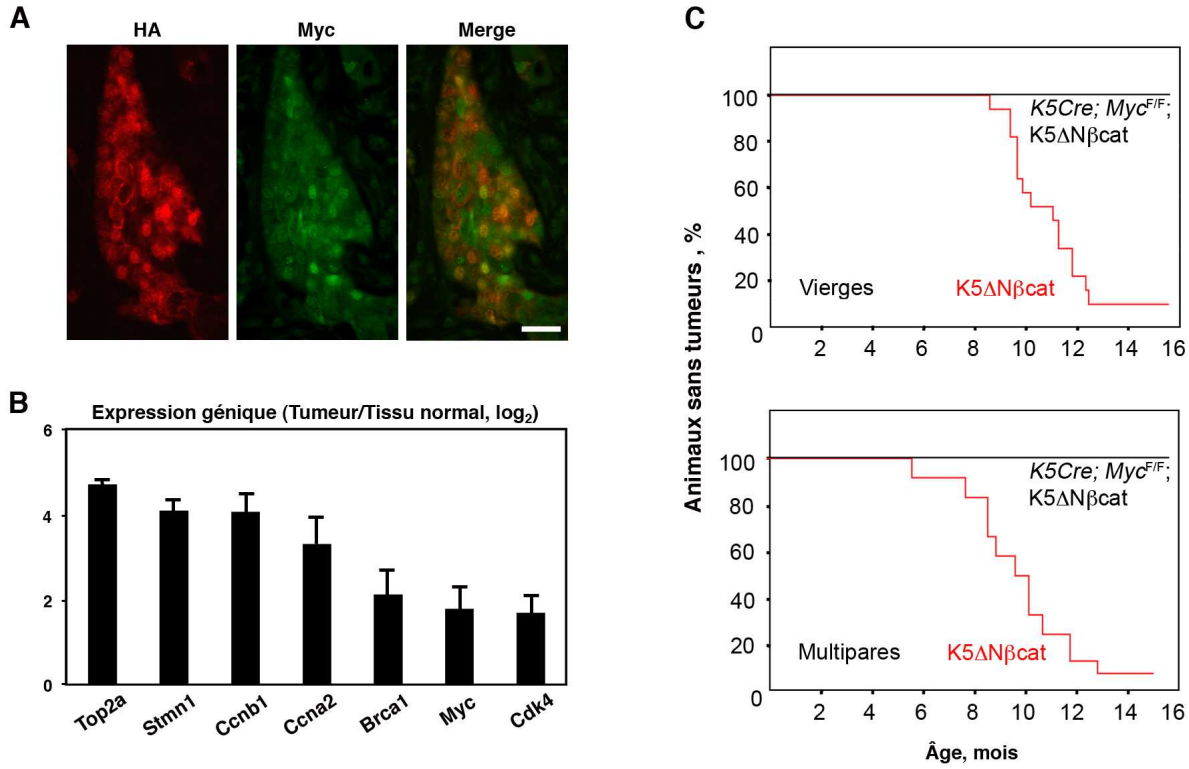


Figure 24 : Myc est nécessaire à la formation des tumeurs mammaires induites par la β-caténine

(A) Analyse par immunofluorescence des tumeurs K5ΔNβcat avec des anticorps anti-HA (en rouge) et anti-Myc (en vert). Barre d'échelle : 40 µm.
(B) Analyse par PCR-Q des cibles de Myc. 4 tissus contrôles et 5 tumeurs K5ΔNβcat ont été analysées.
(C) Incidence des tumeurs mammaires chez les souris K5ΔNβcat (N=17 souris vierges et 12 souris multipares) et K5Cre; *Myc*$^{F/F}$; K5ΔNβcat (N=12 souris vierges et 10 souris multipares).

L'analyse par immunofluorescence des lésions mammaires de souris K5ΔNβcat révèle une accumulation de Myc dans les noyaux des cellules tumorales, souvent colocalisé avec la protéine transgénique HAΔN57βcat, détectée avec un anticorps anti-HA (Fig. 24A). De plus, l'analyse par PCR-Q a montré que l'expression du gène *Myc* ainsi que certains de ses gènes cibles est augmentée dans les tumeurs K5ΔNβcat (Fig. 24B).

Ces résultats indiquent que Myc est activé dans les tumeurs induites par l'expression de la ΔNβ-caténine dans les cellules basales mammaires. Ainsi, afin de déterminer si Myc est nécessaire à la formation de ces tumeurs, nous avons croisé les souris K5ΔNβcat avec les

souris K5Cre; *Myc*$^{F/F}$ dont le gène *Myc* a été inactivé dans les cellules basales mammaires (Moumen *et al*., 2012). Nous avons surveillé l'apparition de tumeurs mammaires dans les femelles K5Cre; *Myc*$^{F/F}$; K5ΔNβcat vierges ou multipares (ayant eu au moins 2 portées) pendant une période de 16 mois.

Une grande majorité des souris K5ΔNβcat (90-95%) a développé des tumeurs mammaires pendant la période étudiée, avec une latence moyenne de 11 mois pour les souris vierges (N=17), et de 9,6 mois pour les souris multipares (N=12) (Fig. 24C). En revanche, aucune des femelles K5Cre; *Myc*$^{F/F}$; K5ΔNβcat n'a développé de tumeurs mammaires palpables qu'elles soient vierges (N=12) ou multipares (N=10). De plus, les analyses morphologiques des glandes mammaires de ces souris n'ont pas révélé de lésions hyperplasiques (données non montrées).

Ces résultats indiquent clairement que Myc joue un rôle essentiel dans la formation des tumeurs mammaires induites par la β-caténine.

3.3 Myc est nécessaire à l'amplification des cellules souches et progénitrices mammaires induite par l'activation de la voie Wnt/β-caténine

Comme nous l'avons décrit précédemment, les lésions mammaires précoces des femelles K5ΔNβcat sont caractérisées par l'expression de la kératine 5 et l'absence du marqueur de différenciation myoépithéliale α-SMA suggérant que ces tumeurs se développent grâce à une amplification de cellules souches/progénitrices d'origine basale (Teuliere *et al*., 2005). Afin de tester cette hypothèse, nous avons étudié les propriétés fonctionnelles des cellules basales isolées à partir des glandes mammaires de souris vierges K5ΔNβcat âgées de dix mois (glande mammaire pré-néoplasique) en les comparant aux cellules contrôles. Par ailleurs, tenant compte de nos résultats impliquant Myc dans le contrôle des cellules souches mammaires dans un contexte physiologique (Moumen *et al*., 2012) nous avons étudié si l'absence de Myc était aussi indispensable à l'amplification des cellules souches dans les souris K5ΔNβcat.

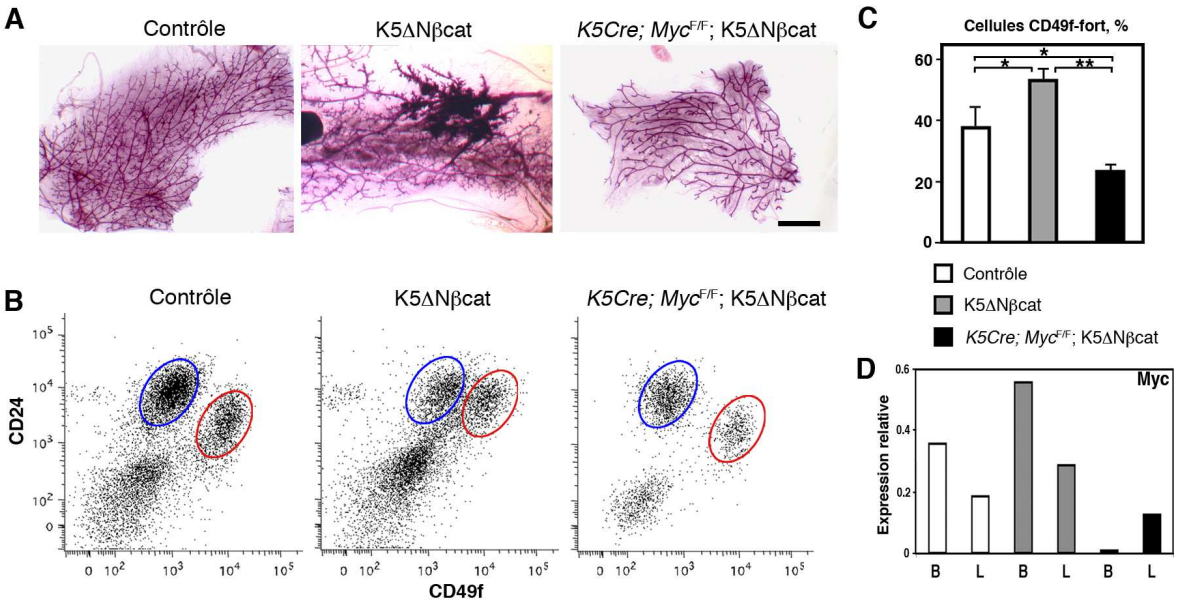


Figure 25 : Analyse des glandes mammaires des souris contrôles, K5ΔNβcat et K5Cre; *Myc*$^{F/F}$; K5ΔNβcat âgés de 10 mois

(A) Morphologie des glandes mammaires de femelles contrôles, K5ΔNβcat et K5Cre; *Myc*$^{F/F}$; K5ΔNβcat âgées de 10 mois. Coloration au rouge carmin. Barre d'échelle : 3 mm.
(B) Cytogramme montrant la séparation des populations épithéliales basales (CD24^{+} CD49f^{fort}, ellipses rouges) et luminales (CD24^{+} CD49f^{faible}, ellipses bleues) à partir de glandes mammaires de souris vierges de 10 mois.
(C) Graphique montrant la moyenne de 3 expériences indépendantes de séparation (*p=0 ,04 ; **p=0,001).
(D) Analyse par PCR-Q de l'expression de *Myc* dans les populations basales (B) et luminales (L).

La Figure 25A montre la morphologie des glandes mammaires des femelles contrôles, K5ΔNβcat et K5Cre; *Myc*$^{F/F}$; K5ΔNβcat à l'âge de dix mois. Nous avons utilisé les marqueurs de surface CD24 et CD49f (intégrine α6) pour séparer les populations mammaires basales et luminales comme décrit précédemment (Stingl *et al*., 2006 ; Taddei *et al*., 2008) (Fig. 25B). Nous pouvons observer que les cellules basales isolées à partir des glandes pré-néoplasiques des souris K5ΔNβcat expriment plus fortement le marqueur CD24 que les cellules basales contrôles (Fig. 25B). De plus, la proportion des cellules basales et luminales dans les glandes mammaires des souris K5ΔNβcat est modifiée. En effet, dans les glandes mammaires contrôles, les cellules basales (CD24^{+} CD49f^{fort}) représentent 37,8 ± 6% de la population épithéliale totale (CD24^{+}) alors que dans les souris K5ΔNβcat, cette proportion est de 53,4 ± 3,5% (Fig. 25C) indiquant une amplification du compartiment basal. Chez les souris K5Cre; *Myc*$^{F/F}$; K5ΔNβcat le compartiment basal est, au contraire, diminué (23,4 ± 1,5%) (Fig. 25B, C). L'analyse par PCR-Q montre que l'expression de *Myc* est légèrement augmentée dans les populations basale et luminale des souris K5ΔNβcat (Fig. 25D) ; dans la population basale

des femelles K5Cre; *Myc*$^{F/F}$; K5ΔNβcat l'expression de *Myc* est très diminuée, confirmant l'inactivation du gène dans ces cellules (Fig. 25D).

Afin d'analyser l'effet de l'activation de la voie Wnt/β-caténine sur la population des cellules souches et progénitrices mammaires, les cellules basales fraîchement isolées ont été soit mises en culture pour former des colonies ou des mammosphères, soit transplantées dans les coussins adipeux de souris pré-pubères (Fig. 26).

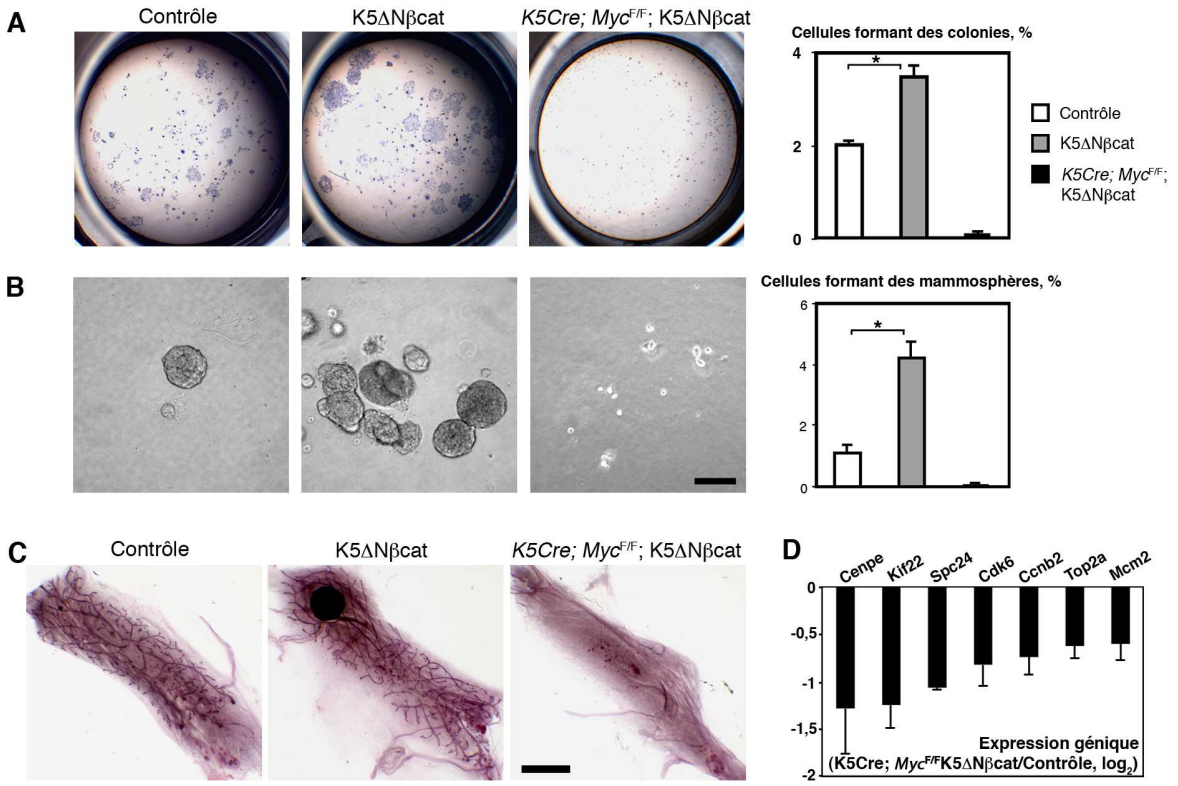


Figure 26 : Analyse des propriétés progénitrices des cellules basales des femelles contrôles, K5ΔNβcat et K5Cre; *Myc*$^{F/F}$; K5ΔNβcat âgés de 10 mois

(A) Colonies clonales formées à partir de 1000 cellules basales. Le graphique montre la moyenne de 3 expériences indépendantes (*p=0,01).
(B) Formation de mammosphères par les cellules basales. Le graphique montre le pourcentage des cellules formant des mammosphères (moyenne de 3 expériences indépendantes ; *p=0,01). Barre d'échelle : 100 µm.
(C) Régénérations épithéliales mammaires obtenues à partir de 1000 cellules basales transplantées dans un coussin adipeux dépourvu de l'épithélium endogène. Coloration au rouge carmin. Barre d'échelle : 4 mm.
(D) Analyse par PCR-Q des cellules basales mammaires des femelles K5Cre; *Myc*$^{F/F}$; K5ΔNβcat de 10 mois. Le graphique représente le ratio d'expression génique par rapport aux cellules basales contrôles.

La fréquence des cellules basales formant des colonies (cellules progénitrices) représente 2 ± 0,07% et 3,6 ± 0,2% des cellules basales totales dans les souris contrôles et K5ΔNβcat respectivement, soit une augmentation de 1,8 fois environ (Fig. 26A). Les expériences d'incorporation du BrdU ont révélé que le taux de prolifération des cellules

basales K5ΔNβcat est également augmenté : les pourcentages de cellules BrdU-positives sont de 16,3 ± 0,4% dans les colonies contrôles et 23,6 ± 1,1% dans les colonies K5ΔNβcat (p=0,03 ; N=3 ; données non montrées).

De façon cohérente, nous avons trouvé que les cellules basales isolées à partir des glandes pré-néoplasiques des souris K5ΔNβcat étaient capables de former 4 fois plus de mammosphères (1,1 ± 0,33% et 4,2 ± 0,6% de cellules basales contrôles et K5ΔNβcat respectivement formant des mammosphères) (Fig. 26B). Les cellules basales isolées à partir des glandes mammaires des souris K5Cre; *Myc*$^{F/F}$; K5ΔNβcat n'ont pas été capables de former des colonies en 2D ou des mammosphères en 3D (Fig. 26A, B).

Nous avons ensuite analysé la capacité de régénération des cellules basales mammaires grâce à des expériences de transplantation en dilution limite. La fréquence des cellules morphogénétiques (présentant une capacité de régénération) dans la population basale était de 1/66 (1/134 – 1/32) pour les cellules contrôles et de 1/14 (1/23 – 1/8) pour les cellules K5ΔNβcat (Tableau 4) indiquant que le nombre de cellules souches fonctionnelles dans l'épithélium mutant K5ΔNβcat est environ 5 fois plus élevé que dans l'épithélium contrôle. De plus, les transplantations de cellules basales dépourvues de Myc n'ont jamais régénéré un épithélium mammaire (Fig. 26C).

Myc est impliqué dans la régulation de nombreux gènes contrôlant la croissance cellulaire. L'analyse par PCR-Q a montré une diminution significative de l'expression de plusieurs de ces gènes dans les cellules basales des femelles K5Cre; *Myc*$^{F/F}$; K5ΔNβcat par rapport aux cellules basales contrôles (Fig. 26D).

Nombre de cellules transplantées	Contrôle	K5ΔNβcat
500	3/3	3/3
100	3/4	4/4
20	3/12	10/12
10	2/11	5/11

Tableau 4 : Transplantation en dilution limite de cellules basales mammaires isolées des épithélia contrôles ou K5ΔNβcat

La fréquence des cellules présentant une capacité de régénération dans la population basale est de 1/66 (1/134 – 1/32) pour les cellules contrôles et de 1/14 (1/23 – 1/8) pour les cellules K5ΔNβcat. CI 95%, p=0,000284.

Ces résultats montrent une amplification des cellules souches et/ou progénitrices basales mammaires dans les souris K5ΔNβcat préalablement au développement tumoral. Par

ailleurs, nos données indiquent que Myc est nécessaire à l'activité des cellules souches mammaires chez les souris K5ΔNβcat.

3.4 L'activation de la voie Wnt/β-caténine dans les cellules basales mammaires induit un développement épithélial mammaire chez les mâles

De façon surprenante, nous avons observé que l'activation de la voie Wnt/β-caténine pouvait induire un développement épithélial mammaire chez les mâles. Ces observations seront détaillées dans la Section 5 des Résultats.

4. La perte de p53 dans la couche basale mammaire dans le contexte d'une activation de la voie Wnt/β-caténine induit une augmentation de la fréquence des cellules souches cancéreuses

4.1 La perte de p53 dans la couche basale mammaire accélère la tumorigenèse induite par la β-caténine

L'analyse par immunofluorescence des coupes histologiques des lésions développées par les souris K5ΔNβcat a permis de détecter une accumulation de p53 au niveau du noyau des cellules hyperplasiques. De plus, l'analyse transcriptionnelle des puces à ADNc, a révélé une activation de la voie p53 dans ces lésions (Marisa Faraldo, données non publiées).

Afin d'étudier le rôle de p53 dans la formation des tumeurs induites par la β-caténine, nous avons croisé les souris K5Cre; *Trp53*$^{F/F}$ avec les souris K5ΔNβcat pour obtenir des souris double-mutantes dont le gène *Trp53* est inactivé dans les cellules basales, dans le contexte d'une activation constitutive de la voie β-caténine.

Nous avons ensuite suivi le développement des tumeurs mammaires, et nous les avons caractérisées histologiquement. Les lésions développées en absence de p53 sont très similaires à celles développées chez les souris K5ΔNβcat. En effet, les hyperplasies canalaires commencent tout d'abord par une amplification locale de cellules basales non myoépithéliales, puis progressent en carcinomes invasifs avec des composants métaplastiques (Fig. 27A).

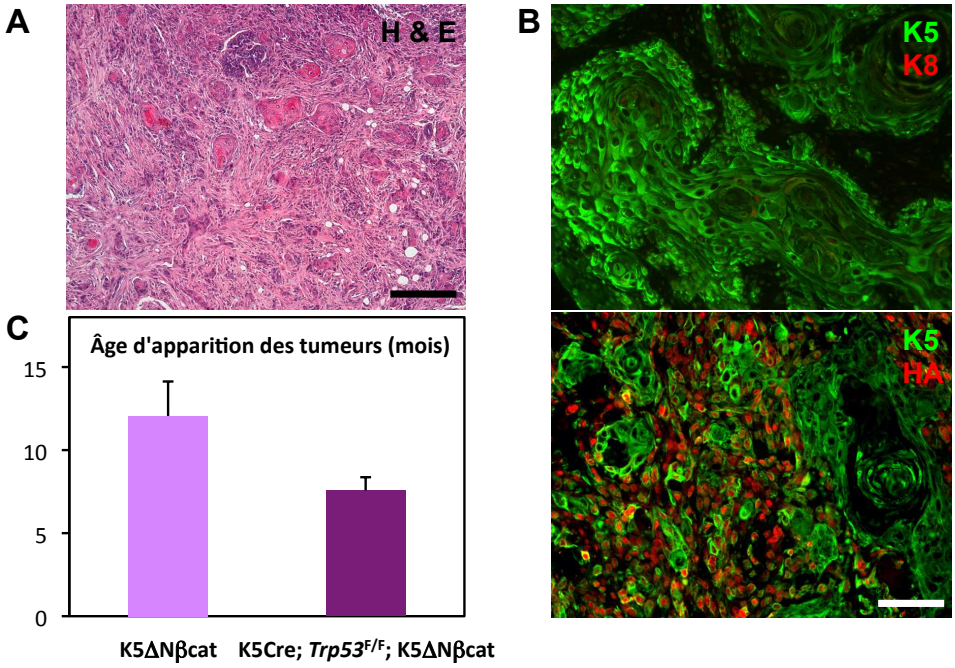


Figure 27 : La perte de p53 chez les souris K5ΔNβcat accélère la tumorigenèse mammaire

(A) Coupe histologique d'une tumeur de souris K5Cre; *Trp53*$^{F/F}$; K5ΔNβcat. Coloration à l'hématoxyline & éosine. Barre d'échelle : 100 µm.
(B) Double immunomarquages sur coupes histologiques de tumeurs mammaires de souris K5Cre; *Trp53*$^{F/F}$; K5ΔNβcat à l'aide d'anticorps anti-K5 (en vert), et anti-K8 ou anti-HA (en rouge). Barre d'échelle : 50 µm.
(C) Représentation graphique de l'âge moyen d'apparition de tumeurs mammaires chez les souris K5ΔNβcat (12,1 ± 2,1 mois ; N=12) et K5Cre; *Trp53*$^{F/F}$; K5ΔNβcat (7,6 ± 0,8 mois ; N=7) ; p=0,00029

Comme les tumeurs K5ΔNβcat, les tumeurs développées en absence de p53 sont essentiellement composées de cellules basales K5-positives (Fig. 27B). Grâce à l'étiquette HA, nous avons localisé le transgène dans le noyau des cellules tumorales des souris K5Cre; *Trp53*$^{F/F}$; K5ΔNβcat, indiquant ainsi une activation de la voie Wnt/β-caténine (Fig. 27B, image inférieure).

Nous avons constaté qu'en absence de p53 les tumeurs apparaissaient plus rapidement. Alors que les tumeurs K5ΔNβcat développent des tumeurs en moyenne vers l'âge de 12,1 ± 2,1 mois, chez les femelles K5Cre; *Trp53*$^{F/F}$; K5ΔNβcat les tumeurs apparaissent en moyenne à l'âge de 7,6 ± 0,8 mois (Fig. 27C).

Nous avons étudié la capacité des tumeurs induites par la β-caténine en présence ou en absence de p53 à induire de nouvelles tumeurs après transplantation. Pour ceci, nous avons dissocié les tumeurs mammaires des femelles K5ΔNβcat et K5Cre; *Trp53*$^{F/F}$; K5ΔNβcat et transplanté les cellules tumorales isolées, dans les coussins adipeux de souris

immunodéficientes. L'analyse histologique des tumeurs obtenues après plusieurs transplantations successives a révélé des caractéristiques similaires à la tumeur d'origine indiquant la présence de cellules possédant des propriétés d'autorenouvellement (Fig. 28).

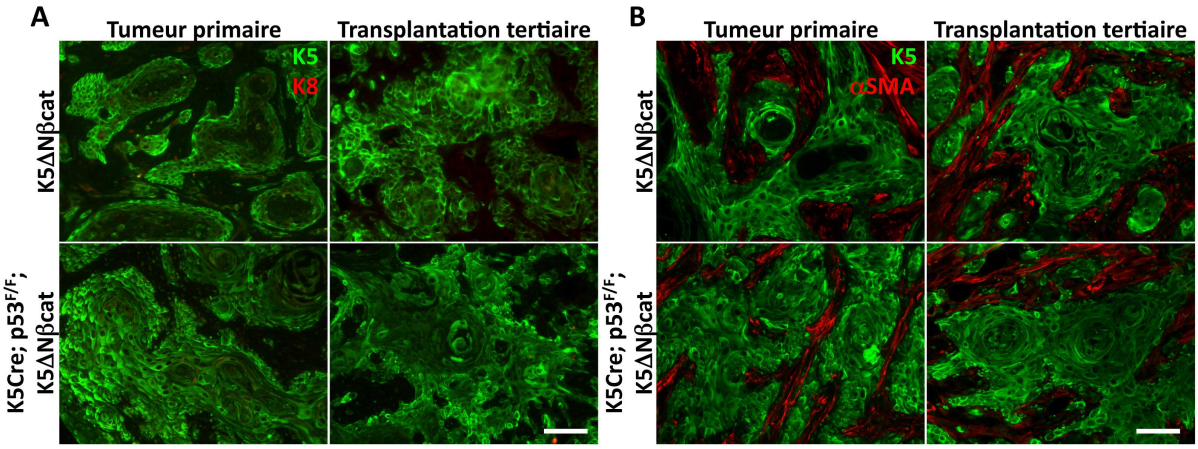


Figure 28 : Analyse par immunofluorescence des tumeurs primaires et des tumeurs obtenues après trois transplantations sériées des cellules tumorales dissociées des souris K5ΔNβcat et K5Cre; *Trp53*$^{F/F}$; K5ΔNβcat

(A) Double immunomarquages à l'aide d'anticorps anti-K5 (en vert), et anti-K8 (en rouge).
(B) Double immunomarquages à l'aide d'anticorps anti-K5 (en vert), et anti-αSMA (en rouge).
Barres d'échelle : 50 µm.

De façon intéressante, après 2-3 transplantations, nous avons constaté une accélération de la vitesse d'apparition des tumeurs greffées K5ΔNβcat ou K5Cre; *Trp53*$^{F/F}$; K5ΔNβcat, suggérant que les transplantations successives contribuent à l'amplification des cellules initiatrices de tumeurs (Valérie Petit, données non publiés). Pour comparer le développement tumoral en présence ou en absence de p53, nous avons transplanté 5000 cellules isolées à partir de tumeurs tertiaires de souris K5ΔNβcat ou K5Cre; *Trp53*$^{F/F}$; K5ΔNβcat.

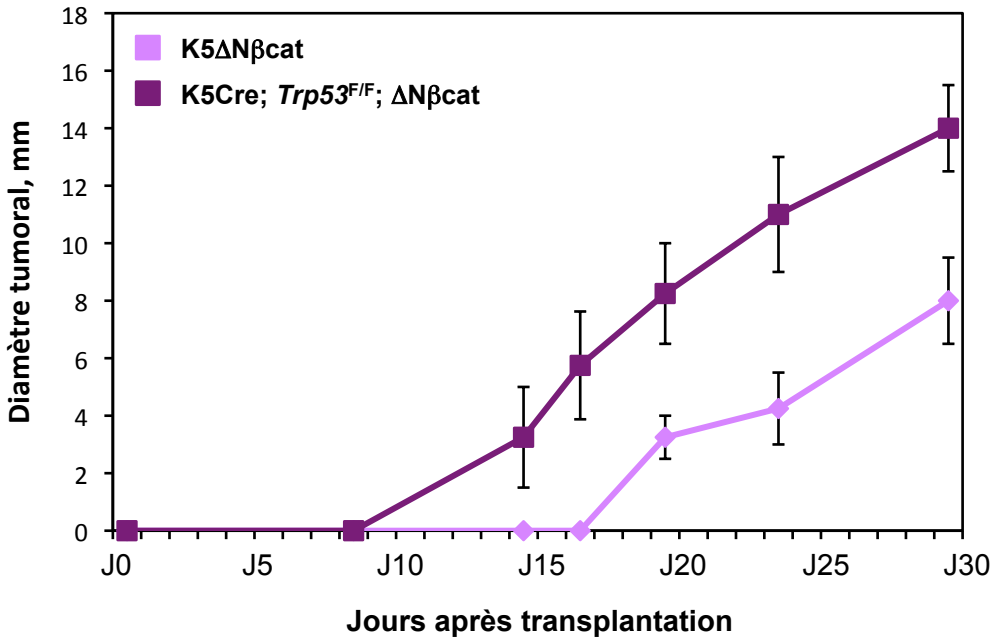


Figure 29 : Cinétique de la croissance tumorale après transplantation

5000 cellules tumorales isolées à partir des tumeurs dissociées de souris K5ΔNβcat et K5Cre; *Trp53*$^{F/F}$; K5ΔNβcat ont été injectées par coussin adipeux (N=4).

Nous avons mesuré la croissance des tumeurs dans les souris injectées pendant une période de quatre semaines. La transplantation de 5000 cellules tumorales a permis le développement de nouvelles tumeurs dans toutes les souris injectées. La comparaison des courbes de croissance montre une accélération de la croissance tumorale en absence de p53 (Fig. 29).

4.2 La perte de p53 dans la couche basale mammaire augmente la fréquence des cellules souches cancéreuses

Pour estimer la fréquence des cellules initiatrices de tumeurs dans les tumeurs K5ΔNβcat et K5Cre; *Trp53*$^{F/F}$; K5ΔNβcat, nous avons procédé à des transplantations en dilution limite.

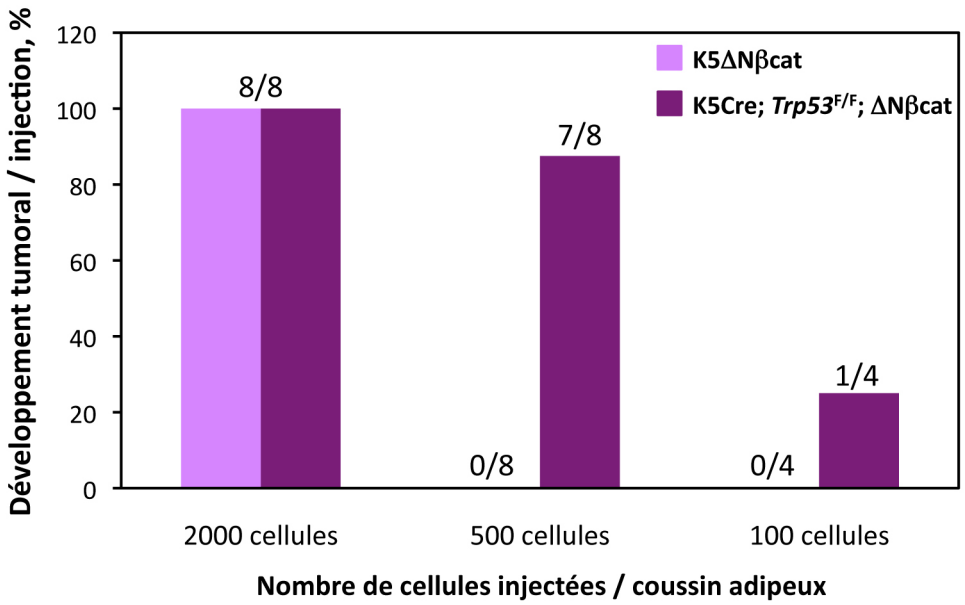


Figure 30 : Transplantation en dilution limite de cellules isolées à partir des tumeurs K5ΔNβcat ou K5Cre; *Trp53*$^{F/F}$; K5ΔNβcat

2000 et 500 cellules : N=8 ; 100 cellules : N=4.

La transplantation de 2000 cellules K5ΔNβcat a permis le développement d'une nouvelle tumeur dans toutes les souris transplantées. En revanche, nous n'avons pas détecté de tumeurs après transplantation de 500 ou 100 cellules exprimant p53 suggérant que la fréquence des cellules souches cancéreuses dans les tumeurs K5ΔNβcat est inférieure à 1/500. Les cellules tumorales des femelles K5Cre; *Trp53*$^{F/F}$; K5ΔNβcat ont généré de nouvelles tumeurs même après transplantation à faibles doses (7 cas sur 8 transplantations de 500 cellules et 1 cas sur 4 transplantations de 100 cellules) (Fig. 30). Ces résultats indiquent que l'absence de p53 dans les tumeurs K5ΔNβcat augmente la fréquence des cellules initiatrices de tumeurs.

4.3 La transplantation de cellules tumorales issues des souris K5Cre; *Trp53*$^{F/F}$; K5ΔNβcat induit un développement lobulo-alvéolaire dans les glandes mammaires des souris hôtes

Nous avons analysé les glandes mammaires endogènes des souris transplantées avec des cellules tumorales K5ΔNβcat ou K5Cre; *Trp53*$^{F/F}$; K5ΔNβcat afin d'étudier si la croissance tumorale pouvait agir sur l'épithélium mammaire sain. En particulier, nous avons

analysé la morphologie des glandes thoraciques (glandes #3) des femelles dont le coussin adipeux de la glande abdominale (glandes #4) a été greffé (Fig. 31).

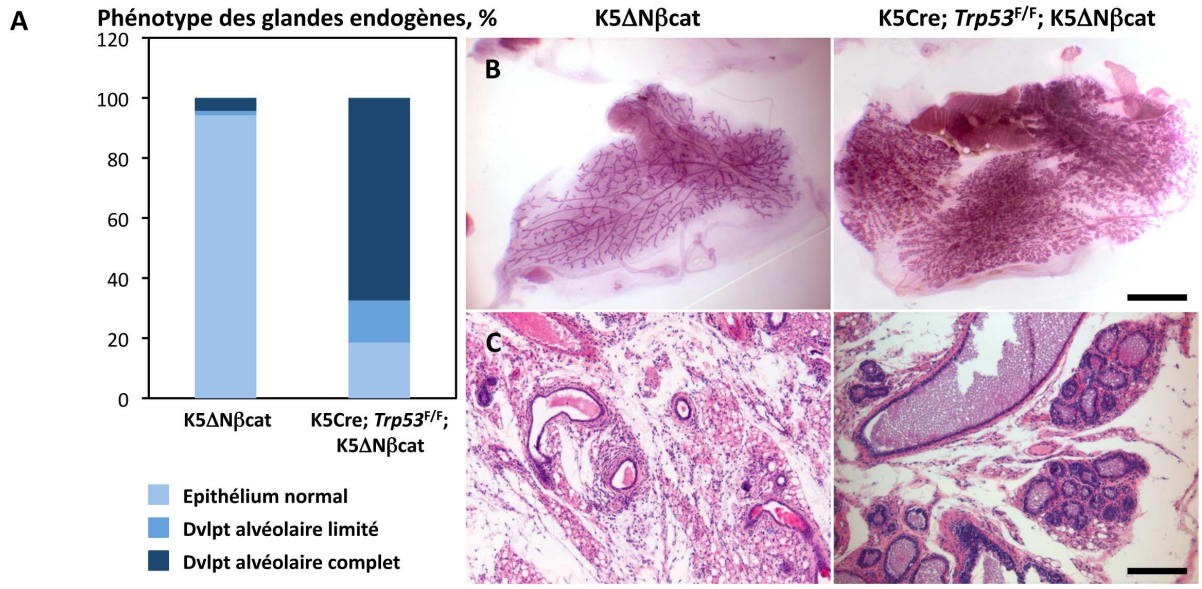


Figure 31 : Les souris transplantées par des cellules tumorales K5Cre; *Trp53*$^{F/F}$; K5ΔNβcat présentent un développement lobulo-alvéolaire dans leurs glandes mammaires endogènes

(A) Répartition des souris injectées avec des cellules tumorales K5ΔNβcat (N=70) ou K5Cre; *Trp53*$^{F/F}$; K5ΔNβcat (N=43) en fonction du phénotype de leur glande mammaire endogène, en pourcentage. « Dvlpt » : Développement.
(B) Morphologie d'une glande mammaire endogène de souris transplantées par des cellules tumorales K5ΔNβcat ou K5Cre; *Trp53*$^{F/F}$; K5ΔNβcat. Coloration au rouge carmin. Barre d'échelle : 4 mm.
(C) Coupes histologiques des glandes mammaires endogènes de souris transplantées par des cellules tumorales K5ΔNβcat ou K5Cre; *Trp53*$^{F/F}$; K5ΔNβcat. Coloration à l'hématoxyline & éosine. Barre d'échelle : 50 µm.

Nos résultats montrent que le développement de tumeurs K5ΔNβcat n'entraine pas de modification morphologique majeur des glandes mammaires endogènes dans 94,3% des cas. En revanche, la majorité des souris transplantées avec des cellules K5Cre; T*rp53*$^{F/F}$; K5ΔNβcat (67,4%) présentent un développement lobulo-alvéolaire de leurs glandes endogènes anormal chez une souris vierge (Fig. 31B). Les structures épithéliales des glandes endogènes des souris injectées avec des cellules K5ΔNβcat ont été analysées histologiquement et se sont révélées normales (Fig. 31C). Chez les souris greffées avec des cellules K5Cre; *Trp53*$^{F/F}$; K5ΔNβcat, les glandes mammaires endogènes présentent des canaux dilatés avec sécrétion dans le lumen, et des structures alvéolaires similaires à celles d'une souris à mi-gestation (Fig. 31C).

Les analyses par immunofluorescence ont révélé une activation de STAT5a qui est retrouvé dans les noyaux et de plus, une expression des protéines du lait comme la β-caséine (Fig. 32).

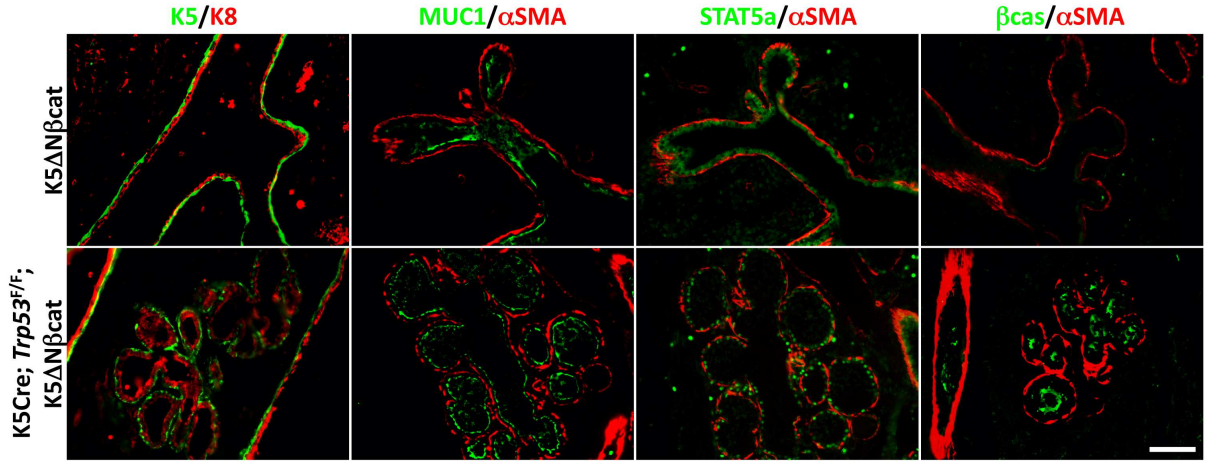


Figure 32 : Analyse par immunofluorescence des glandes mammaires endogènes de souris transplantées par des cellules tumorales K5ΔNβcat ou K5Cre; *Trp53*$^{F/F}$; K5ΔNβcat.

Double immunomarquages à l'aide d'anticorps anti-K5, anti-MUC1, anti-STAT5a ou anti-βcaséine (en vert), et anti-K8 ou anti-αSMA (en rouge). Barre d'échelle : 50 µm.

5. La perte de p53 dans la couche basale mammaire dans le contexte d'une activation de la voie Wnt/β-caténine induit un développement lobulo-alvéolaire chez les mâles

Nous avons analysé l'effet de l'activation de la β-caténine en présence ou en absence de p53, sur le développement des glandes mammaires des souris mâles dans nos différents modèles transgéniques.

L'analyse morphologique des glandes mammaires des mâles K5ΔNβcat révèle que dès l'âge de 5-6 mois, l'activation de la voie β-caténine dans les cellules basales mammaires induit un développement épithélial inattendu chez 76,7% des mâles analysés, avec des canaux remplissant plus de 50% du coussin adipeux. La perte de p53 augmente fortement la proportion des mâles ayant un développement épithélial (97,1%). De plus, chez certains mâles K5Cre; *Trp53*$^{F/F}$; K5ΔNβcat, nous avons constaté un développement lobulo-alvéolaire. Enfin, 4 mâles sur 34 ont développé des hyperplasies ou des tumeurs mammaires (Fig. 33).

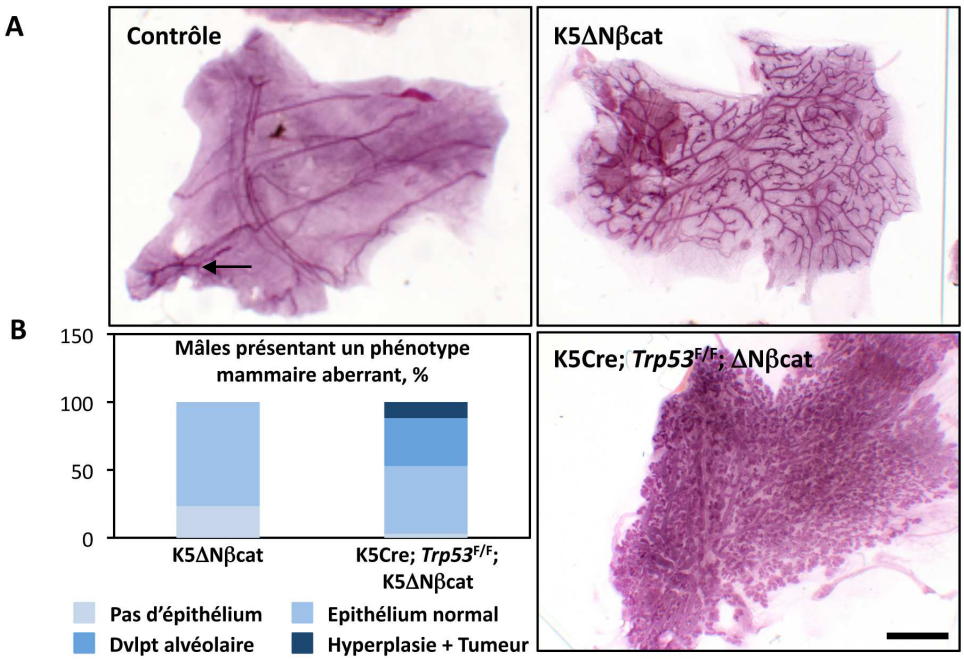


Figure 33 : L'activation de la voie Wnt/β-caténine dans les cellules basales mammaires induit le développement d'un épithélium mammaire chez les mâles, allant jusqu'au développement lobulo-alvéolaire en absence de p53

A) Morphologie des glandes mammaires de mâles contrôles, K5ΔNβcat et K5Cre; *Trp53*$^{F/F}$; K5ΔNβcat âgés de 8 mois. Coloration au rouge carmin. La flèche indique le rudiment épithélial observé chez les mâles contrôles. Barre d'échelle : 4 mm
(B) Graphique représentant la répartition des mâles K5ΔNβcat (N=30) et K5Cre; *Trp53*$^{F/F}$; K5ΔNβcat (N=34) âgés d'au minimum 5 mois en fonction du phénotype de leur glande mammaire, en pourcentage. « Dvlpt » : Développement.

Les marquages immunohistologiques montrent que les épithélia développés, comme chez les femelles, sont constitués d'une couche de cellules basales K5 et αSMA-positives et d'une couche de cellules luminales K8-positives. Le marqueur de polarité cellulaire MUC-1 est exprimé sur la surface apicale des cellules luminales. Nous avons détecté STAT5a dans les noyaux des cellules luminales alvéolaires des mâles K5Cre; *Trp53*$^{F/F}$; K5ΔNβcat présentant un développement lobulo-alvéolaire, suggérant l'activation de la voie de signalisation JAK2-STAT5 (Fig. 34).

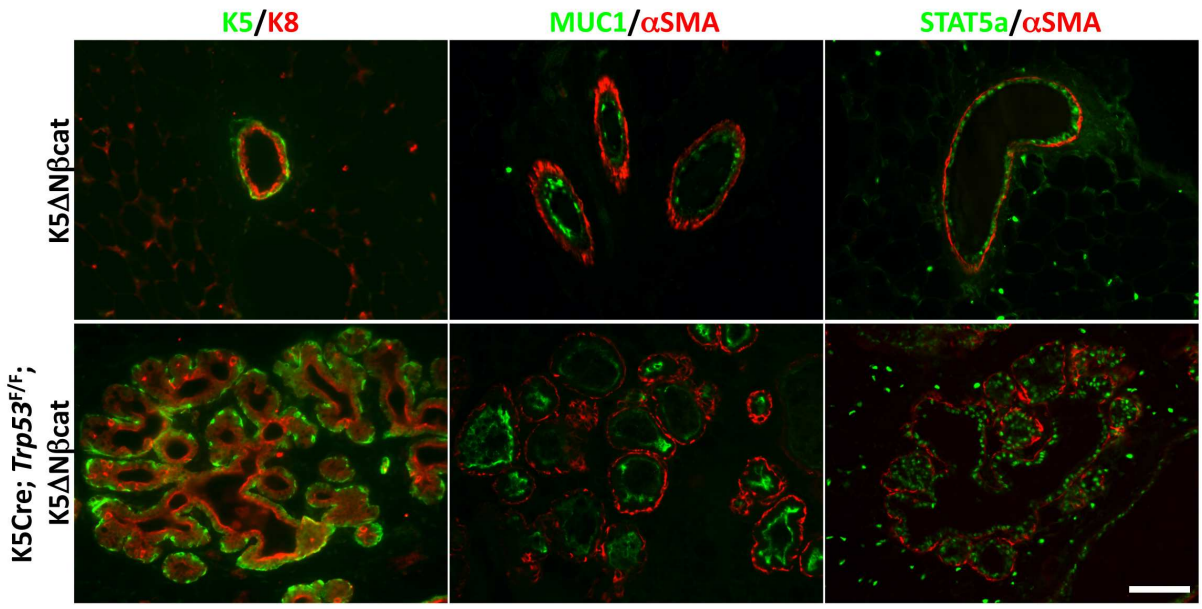


Figure 34 : Analyse par immunofluorescence des glandes mammaires des mâles K5ΔNβcat ou K5Cre; *Trp53*$^{F/F}$; K5ΔNβcat.

Double immunomarquages à l'aide d'anticorps anti-K5, anti-MUC1 ou anti-STAT5a (en vert), et anti-K8 ou anti-αSMA (en rouge). Barre d'échelle : 50 µm.

L'ensemble de ces données montre que le développement mammaire chez les mâles, induit par l'activation de la β-caténine est stimulé par la perte de p53, suggérant une coopération entre les deux voies.

DISCUSSION & PERSPECTIVES

Les cellules souches et progénitrices de la glande mammaire font l'objet d'une attention particulière car ces populations minoritaires pourraient être les cibles initiales de la transformation tumorale dans le cancer du sein (pour revue, voir Stingl & Caldas, 2007). L'identification et la caractérisation de ces cellules, ainsi que l'analyse des mécanismes et des voies de signalisation qui contrôlent leur fonction, présentent un intérêt majeur pour une utilisation éventuelle en thérapie cellulaire ainsi que dans la prévention et le traitement des cancers mammaires. Dans ce contexte, les données de la pathologie mammaire sont maintenant interprétées en référence à la biologie du développement de la glande, et notamment aux mécanismes qui contrôlent l'autorenouvellement des cellules souches mammaires, leur différenciation et leur possible plasticité.

Mon travail de thèse a porté sur les rôles joués par les facteurs de transcription Myc et p53 dans le développement et la tumorigenèse mammaires, ainsi que leur implication dans le maintien et l'autorenouvellement des cellules souches et progénitrices mammaires.

Notre stratégie expérimentale est fondée sur l'analyse du phénotype mammaire de souris mutantes déficientes en Myc ou p53, dans le compartiment basal de l'épithélium mammaire où résident les cellules souches à potentiel régénératif. Les souris K5Cre ont été utilisées pour inactiver les gènes *Myc* ou *Trp53* dans les cellules basales mammaires. En plus d'une analyse globale de la morphogenèse mammaire, nous avons isolé les cellules basales et luminales mammaires des mutants obtenus (K5Cre; $Myc^{F/F}$ et K5Cre; $Trp53^{F/F}$) et évalué l'activité des cellules souches et progénitrices en utilisant des essais fonctionnels *in vivo* et *in vitro*. Pour étudier le rôle de Myc et p53 dans l'induction et le développement des carcinomes mammaires de type basal, les souris mutantes ont été croisées avec les souris transgéniques K5ΔNβcat obtenues précédemment dans notre groupe.

Invalidation de gènes dans la glande mammaire murine grâce à l'expression de la recombinase Cre sous le contrôle du promoteur K5

Nos expériences de traçage génétique indiquent que les cellules souches/progénitrices à l'origine des deux couches de l'épithélium mammaire de la souris expriment K5 (Moumen *et al*., 2012 ; Chiche *et al*, Manuscrit présenté en page 99 de cette thèse). Par conséquent, l'expression de la Cre sous le contrôle du promoteur K5 devrait conduire à la perte du gène cible (entouré des séquences LoxP) dans les deux couches épithéliales mammaires, basales et

luminales. Nous avons en effet trouvé que la protéine p53 est absente des couches épithéliales mammaires basales et luminales des souris K5Cre; *Trp53*$^{F/F}$. En revanche, chez les souris K5Cre; *Myc*$^{F/F}$, la perte de Myc est uniquement observée dans la couche basale.

Ces observations suggèrent que dans le contexte de croissance de la glande mammaire, l'efficacité de la recombinaison du gène ne dépend pas exclusivement de la spécificité du promoteur contrôlant l'expression de Cre. Elle dépend aussi des propriétés de la protéine codée par le gène ciblé. La suppression de p53 confère un avantage aux cellules mutantes, en ce sens qu'elles prolifèrent plus rapidement. En revanche, l'absence de Myc limite la propagation cellulaire. Les cellules luminales émergeant tôt dans le développement perdent l'expression de K5 et, une partie d'entre elles échappent ainsi à l'inactivation de *Myc*. Contrairement aux cellules luminales, les cellules basales expriment en permanence K5 au cours du développement, permettant chez l'adulte la suppression complète de Myc dans le compartiment basal. p53 et Myc sont impliqués dans la compétition cellulaire, un phénomène biologique entrainant la sélection de cellules possédant un avantage de croissance ou de survie dans un compartiment cellulaire particulier (Vivarelli *et al*., 2012 ; de Beco *et al*., 2012). Des niveaux faibles de p53 ou des niveaux plus élevés de Myc rendent les cellules fortement compétitives, ce qui explique sans doute la perte complète de p53 et partielle de Myc dans la bicouche épithéliale mammaire des souris mutantes K5Cre; *Trp53*$^{F/F}$ ou K5Cre; *Myc*$^{F/F}$.

Le proto-oncogène Myc joue un rôle essentiel dans la fonction des cellules souches et progénitrices mammaires

Nous avons trouvé que les femelles portant une inactivation du gène *Myc* dans la couche basale de l'épithélium mammaire développent des glandes mammaires hypoplasiques avec moins de ramifications que les glandes contrôles. Après plusieurs cycles reproductifs, la plupart des femelles mutantes présentent des défauts du développement lobulo-alvéolaire et ne sont pas capables d'allaiter leurs petits. Ces données suggèrent que la population de progéniteurs alvéolaires est réduite dans l'épithélium mutant.

Afin de mieux comprendre les mécanismes aboutissant à ces phénotypes, nous avons isolé et analysé les populations épithéliales mammaires. Nous avons observé une réduction significative de la taille du compartiment basal dans les souris *K5Cre; Myc*$^{F/F}$. Comme

mentionné plus haut, nous avons trouvé que *Myc* est invalidé dans les cellules basales mais que la plupart des cellules luminales des souris mutantes exprime Myc. Pourtant, dans ces souris mutantes, nous trouvons des défauts de prolifération non seulement dans les cellules basales déficientes en *Myc*, mais aussi dans les cellules luminales exprimant Myc. De plus, la population luminale progénitrice est clairement affectée dans les souris *K5Cre; Myc*$^{F/F}$ comme l'indiquent les tests de formation de colonies.

Une étude récente a révélé que les cellules basales participent au contrôle de la ramification au cours de la morphogénèse canalaire probablement par la production de facteurs de croissance qui stimulent la prolifération des cellules luminales (Macias *et al*., 2011). En cohérence avec cette étude, nos résultats suggèrent que la perturbation de signalisation, soit directe intercellulaire, soit paracrine, entre les couches basale et luminale, pourraient affecter les progéniteurs luminaux conduisant à une ramification canalaire réduite dans les souris *K5Cre; Myc*$^{F/F}$. Ces défauts de signalisation seraient dus probablement au nombre diminué des cellules basales dans les souris mutantes ou à des perturbations de l'expression génique dans les cellules basales dépourvues de Myc. La nature des signaux assurant le dialogue entre les deux compartiments épithéliaux de la glande mammaire demeure peu connue ; toutefois, l'analyse d'expression génique des deux populations, basale et luminale, laisse supposer que les FGF/FGFR et les voies de signalisation de Notch, ephrine et leurs récepteurs, entre autres, pourraient jouer un rôle important dans le contrôle des cellules luminales par le compartiment basal (Kendrick *et al*., 2008). Par ailleurs, il a été récemment suggéré que la signalisation paracrine par RANKL entre les différentes sous-populations mammaires joue un rôle dans la propagation des cellules souches et progénitrices mammaires. RANKL est exprimé par les cellules luminales différenciées tandis que son récepteur RANK est présent dans les cellules basales et progénitrices luminales (Asselin-Labat *et al*., 2010 ; Joshi *et al*., 2010).

Nous avons montré que les cellules basales déficientes en *Myc* ont complètement perdu leur potentiel régénératif, indiquant que Myc est nécessaire à l'activité fonctionnelle des cellules souches mammaires. L'analyse de l'expression génique dans les cellules basales mutantes a révélé une expression diminuée des nombreux gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire, la réplication, la synthèse protéique et le métabolisme, toutes ces fonctions convergeant vers la capacité de la cellule à proliférer (Moumen, Chiche *et al*., manuscrit en préparation). Ces résultats suggèrent qu'une synthèse protéique et/ou un métabolisme inefficaces pourraient empêcher l'amplification cellulaire rapide nécessaire à la formation

d'un épithélium à partir des cellules transplantées. De plus, il est possible que les cellules basales déficientes en *Myc* soient incapables de reconstituer le microenvironnement requis pour l'initiation de la morphogenèse canalaire, les gènes régulés par Myc incluant ceux responsable des interactions entre l'épithélium et le stroma (Soucek & Evan, 2010).

La stimulation hormonale des souris greffées a permis de régénérer partiellement un épithélium dans la moitié des souris analysées. Cependant, la capacité d'autorenouvellement de l'épithélium déficient en *Myc* est très perturbée comme le montrent les résultats des transplantations secondaires. Par ailleurs, le développement alvéolaire est limité et la population luminale progénitrice presque inexistante, dans l'épithélium déficient en *Myc*. Ces observations indiquent que Myc agit en aval des hormones ovariennes dans le contrôle des fonctions des cellules souches et progénitrices.

Il a été rapporté que les facteurs Wnts régulent la population de cellules souches mammaires en induisant leur autorenouvellement (Zeng & Nusse, 2010). Myc étant une cible transcriptionnelle de Wnt, il est plausible que Myc soit un des effecteurs principaux des Wnts dans le contrôle des cellules souches mammaires.

Les données des effets de l'invalidation de *Myc* dans l'épithélium mammaire sont résumées dans la Figure 35.

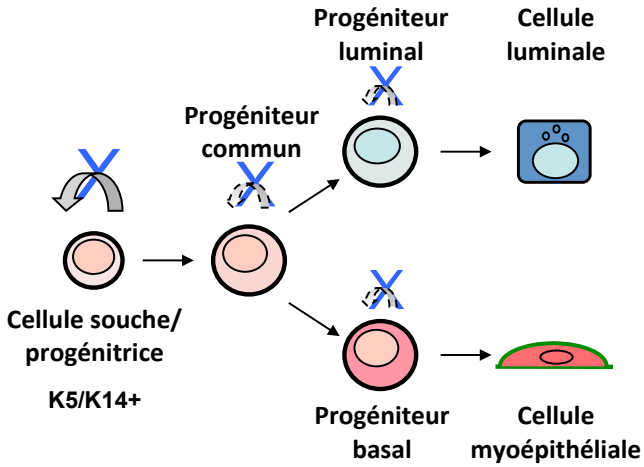


Figure 35 : Modèle hypothétique des effets de la perte de Myc sur les lignages mammaires

L'absence de Myc dans la couche basale de l'épithélium mammaire les souris K5Cre; $Myc^{F/F}$ induit des défauts d'autorenouvellement des cellules souches et des progéniteurs basales mammaires, comme l'indiquent nos expériences *in vivo* (transplantations) et *in vitro* (test de formation de colonies). Bien qu'exprimant Myc, les cellules luminales sont aussi affectées dans les souris K5Cre; $Myc^{F/F}$ avec, notamment une diminution de la population de cellules progénitrices. Ces défauts sont plus sévères dans les greffons Myc-KO (développés après stimulation hormonale), où les cellules luminales dépourvues de Myc perdent complètement leurs propriétés progénitrices, comme l'indiquent l'incapacité de générer des structures alvéolaires différenciées *in vivo* et la perte du potentiel clonogénique *in vitro*.

L'ensemble de nos résultats montre que Myc est un facteur essentiel à la fonction des cellules souches et progénitrices mammaires.

La perte de p53 entraine l'amplification des cellules souches/progénitrices dans les compartiments basaux et luminaux mammaires

Des études concernant notamment le système hématopoïétique ont associé la perte de p53 à l'acquisition de propriétés caractéristiques aux cellules souches (pour revue, voir Spike & Wahl, 2011). Dans la glande mammaire, l'absence de p53 semble induire l'amplification de certaines populations, souche ou progénitrice (Cicalese *et al*., 2009 ; Tao *et al*., 2011). Il a été proposé que cet effet soit lié à une augmentation de la fréquence des divisions symétriques (Cicalese *et al*., 2009). Ces études suggèrent aussi que la perte de p53 favoriserait la division symétrique des cellules souches cancéreuses, conduisant à une augmentation de leur nombre dans la tumeur et contribuant ainsi à sa croissance. Cependant, les expériences rapportées dans ces publications ont été réalisées soit en dehors du contexte tissulaire, soit sur la population totale des cellules mammaires, incluant cellules épithéliales et stromales, ce qui empêche une interprétation nette des résultats.

Pour étudier le rôle de p53 dans les propriétés de cellules souches *in vivo*, nous avons généré des souris K5Cre; *Trp53*$^{F/F}$ présentant une invalidation de *Trp53* dans la couche basale de l'épithélium mammaire. L'analyse des populations épithéliales mammaires de ces souris a révélé que l'expression du gène *Trp53* est significativement diminuée dans les cellules basales mais aussi dans les cellules luminales des souris mutantes indiquant que le promoteur K5 a ciblé les cellules souches multipotentes mammaires (Moumen *et al*., 2012).

Les essais de formation de colonies en deux dimensions ou de mammosphères en trois dimensions sont communément utilisés pour étudier les cellules souches et progénitrices mammaires *in vitro*. Ces deux essais permettent d'estimer la fréquence des cellules clonogéniques, mais la culture de mammosphères présente également l'avantage de permettre l'estimation des capacités d'autorenouvellement des populations souches et progénitrices. Nos résultats montrent que les cellules basales et luminales dépourvues de p53 forment plus de colonies que les cellules contrôles, indiquant une augmentation de la fréquence des progéniteurs. Le potentiel prolifératif de ces cellules est augmenté en absence de p53. De plus, les mammosphères déficientes en p53 maintiennent leur potentiel d'autorenouvellement

après plus de 20 repiquages, ce qui suggère que p53 limite l'amplification des cellules souches et progénitrices mammaires résidant dans les compartiments basal et luminal de l'épithélium mammaire.

Il a été rapporté qu'en l'absence de p53, les mammosphères formées à partir de cellules mammaires ayant retenu PKH26 (un marqueur membranaire permettant de sélectionner des cellules majoritairement quiescentes, propriété attribuée à certaines cellules souches) comprennent plusieurs cellules souches, tandis que les mammosphères contrôles ne contiennent qu'une seule cellule souche (Cicalese *et al*., 2009). De façon cohérente, nous avons observé que l'expression du marqueur basal K5, signant les cellules souches multipotentes, est rapidement perdue dans les mammosphères formées à partir des cellules basales contrôles lors des passages successifs, alors que les mammosphères formées à partir des cellules basales déficientes pour p53 maintiennent la présence de cellules K5+ à tous les passages.

Des études récentes ont associé l'activation de l'EMT avec l'acquisition de propriétés de cellules souches. De plus, les cellules basales mammaires possédant un potentiel régénératif expriment des gènes caractéristiques de l'EMT, dont le facteur de transcription Slug (Mani *et al*., 2008 ; Kendrick *et al*., 2008). En corrélation avec la présence de cellules K5+, nous avons observé une expression augmentée des gènes associés à l'EMT dans les mammosphères formées à partir des cellules basales déficientes pour p53. Nous sommes actuellement à la recherche de nouveaux marqueurs de surface pour isoler par cytométrie en flux les cellules K5+ présentes dans les mammosphères afin de déterminer si l'activité clonogénique et le potentiel de régénération sont associés à cette population. Les marqueurs de surface utilisés à l'heure actuelle, tels que CD24 et les intégrines $\alpha 6$ et $\beta 1$ ne permettent pas de séparer les différentes populations cellulaires contenues dans les mammosphères (M.-A. Deugnier, données non publiées).

Les transplantations en dilution limite des cellules basales isolées montrent que l'absence de p53 augmente la capacité de régénération de l'épithélium mammaire ainsi que la fréquence des cellules souches. De plus, les transplantations sériées montrent également que l'absence de p53 favorise l'autorenouvellement des cellules possédant des capacités de régénération même si celui-ci n'est pas illimité contrairement aux repiquages de mammosphères *in vitro*. Ainsi, pour maintenir une capacité d'autorenouvellement illimitée, les cellules basales fraîchement isolées ont peut-être besoin de différents facteurs comme par

exemple, la présence de cellules luminales et de facteurs de croissance, comme cela est le cas dans les transplantations de mammosphères ou dans les transplantations sériées de fragments épithéliaux déficients pour p53 (Medina *et al*., 2002).

De façon intéressante, les résultats d'une expérience pilote indiquent que les cellules luminales dépourvues en p53 ont un potentiel de régénération accru par rapport aux cellules contrôles, suggérant que l'absence de p53 induit des propriétés de cellules souches dans la population luminale. Cependant, il est difficile d'exclure de façon certaine la présence d'un pourcentage mineur de cellules basales dans la population luminale triée. Pour éliminer définitivement la possibilité d'une contamination de ce type, nous envisageons d'utiliser un traçage génétique des cellules luminales grâce à un promoteur spécifique de ce lignage (souris K8Cre ou K18Cre ; Van Keymeulen *et al*., 2011) afin de confirmer que la perte de p53 dans les cellules luminales confère à ces cellules une certaine capacité morphogénétique.

Nos résultats montrent que la perte de p53 dans les cellules luminales augmente la population de cellules progénitrices et leur permet d'acquérir des capacités à s'autorenouveller de façon illimitée. Deux études récentes indiquent que les cancers de type basal associés à des mutations de *Brca1* auraient pour origine les cellules progénitrices luminales (Lim *et al*., 2009 ; Molyneux *et al*., 2010). La majorité de ces tumeurs présentent également des mutations inactivatrices de *Trp53*. Ainsi nos données connectant la perte de p53 avec l'amplification des cellules luminales progénitrices et l'acquisition d'un potentiel d'autorenouvellement illimité fournit un nouvel éclairage sur les événements cellulaires et moléculaires conduisant à la tumorigenèse mammaire.

Différentes études ont montré que p53 peut réguler l'amplification et l'autorenouvellement des populations souches et progénitrices via de nombreux mécanismes, comme l'inhibition de l'EMT ou de la division asymétrique des cellules (Chang *et al*., 2011 ; Cicalese *et al*., 2009). Tao *et al*. ont rapporté que l'inhibition de la voie Notch avec le DAPT diminue la capacité des cellules dépourvues en p53 à former des mammosphères, suggérant l'utilisation des inhibiteurs de cette voie comme thérapie spécifique des tumeurs avec perte de fonction de p53 (Tao *et al*., 2011). En accord avec ces données, nous avons trouvé que le DAPT diminue le nombre et la taille des mammosphères formées à partir des cellules basales et luminales mammaires déficientes pour p53. Cependant, des effets identiques sont observés avec les cellules contrôles. Ces données indiquent que la signalisation Notch contribue à la prolifération des cellules épithéliales mammaires indépendamment de l'expression de p53.

Les données des effets de l'invalidation de *Trp53* dans l'épithélium mammaire sont résumées dans la Figure 36.

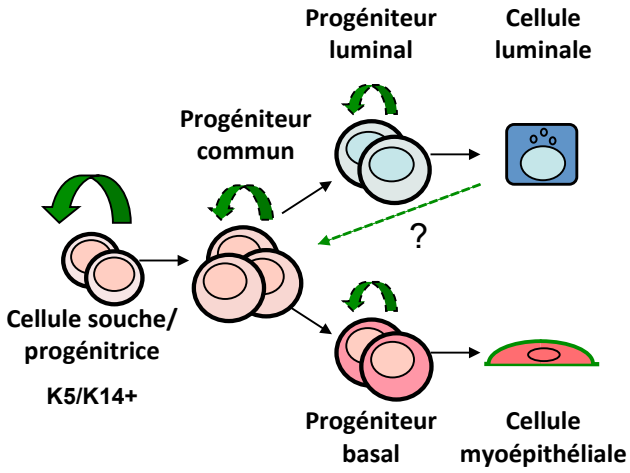


Figure 36 : Modèle hypothétique des effets de la perte de p53 sur les lignages mammaires

Contrairement aux souris K5Cre; *Myc*$^{F/F}$, la perte de p53 est observée dans les deux couches, basale et luminale, des souris K5Cre; *Trp53*$^{F/F}$. Les populations des cellules souches/progénitrices basales et luminales sont amplifiées et leurs propriétés d'autorenouvellement augmentées, comme l'indique l'ensemble de nos expériences *in vivo* et *in vitro*.

L'ensemble de nos résultats met donc en évidence que p53 inhibe l'amplification et l'autorenouvellement des cellules souches et progénitrices mammaires, permettant de mieux comprendre l'impact de la perte de p53 dans la tumorigenèse mammaire.

L'activation de β-caténine dans les cellules basales induit l'amplification de cellules souches/progénitrices mammaires et conduit à la formation de tumeurs de type basal

Nous avons trouvé que l'activation constitutive de la signalisation Wnt/β-caténine induit des tumeurs de type basal, exprimant des marqueurs de cellules basales mammaires (K5, K14 , p63) en absence d'expression des récepteurs hormonaux (ER, PR) et d'ErbB2.

Les tumeurs mammaires des souris K5ΔNβcat présentent une morphologie similaire aux tumeurs du sein dites métaplastiques, qui font partie du groupe de tumeurs de type basal (Weigelt *et al*., 2009). De façon intéressante, deux publications récentes ont associé les tumeurs basales et métaplastiques à l'activation de la voie de signalisation Wnt/β-caténine (DiMeo *et al*., 2009 ; Khramtsov *et al*., 2010) ce qui indique que notre modèle murin est pertinent pour l'étude de la pathologie humaine.

Les tumeurs K5ΔNβcat présentent un phénotype différent de celui décrit précédemment pour deux autres modèles murins (Imbert *et al*., 2001 ; Tsukamoto *et al*., 1988). En effet, dans les souris MMTV-ΔN89βcat, la signalisation par β-caténine est activée dans les progéniteurs luminaux et induit des tumeurs de type luminal négatives pour ER. Chez les souris MMTV-Wnt1, la β-caténine est activée de façon paracrine dans les cellules basales mammaires induisant des tumeurs avec un phénotype « mixte » (K14+ K8+ ER+), suggérant que des cellules souches multipotentes seraient à l'origine de ces tumeurs (Teissedre *et al*., 2009). Ces travaux soulignent l'importance de la cellule d'origine comme déterminant des caractéristiques histologiques de la tumeur, comme proposé par d'autres auteurs pour les tumeurs BRCA1 (Lim *et al*., 2009 ; Molyneux *et al*., 2010). Nos résultats montrent une amplification de la population de progéniteurs mammaires de type basal dans les étapes qui précèdent la formation de tumeurs dans les souris K5ΔNβcat, suggérant que les tumeurs métaplastiques auraient pour origine des progéniteurs de ce type. En accord avec cette hypothèse, il a été récemment rapporté qu'après transformation oncogénique *in vitro*, des cellules mammaires humaines présentant des caractéristiques basales développent des tumeurs métaplastiques chez la souris (Keller *et al*., 2012).

Les mécanismes par lesquels l'activation de la β-caténine induit l'amplification de cellules souches/progénitrices de type basal reste à élucider. Il a été récemment montré que les facteurs Wnt induisent l'autorenouvellement des cellules souches mammaires et leur expansion à long terme *in vitro* (Zeng & Nusse, 2010). On peut donc émettre l'hypothèse que l'activation de la voie β-caténine empêche la différenciation myoépithéliale des progéniteurs mammaires de type basal et augmente leur capacité prolifération. Il est également possible que l'activation de la β-caténine conduise à une dédifférenciation des cellules myoépithéliales. Une plasticité spontanée entre un état différencié et un état de type souche a été révélée dans des cellules basales mammaires humaines *in vitro* (Chaffer *et al*., 2011). L'utilisation de modèles murins exprimant un gène rapporteur sous contrôle de promoteurs liés à la différenciation myoépitheliale permettront de tester cette hypothèse et de mieux étudier l'origine de ces tumeurs.

L'inactivation de Myc abolit l'amplification des cellules souches/progénitrices mammaires et la tumorigenèse induites par la β-caténine

Les gènes codant pour Myc et la Cycline D1, deux cibles importantes de la voie Wnt/β-caténine, sont amplifiés et/ou surexprimés dans le cancer du sein (pour revue, voir Chen & Olopade, 2008 ; Velasco-Velazquez *et al*., 2011). Confirmant nos analyses préalables sur des glandes prénéoplasiques (Teuliere *et al*., 2005), nous n'avons pas détecté de surexpression significative de Cycline D1 dans les tumeurs mammaires des souris K5ΔNβcat (Moumen, Chiche *et al*., manuscrit en préparation). De façon cohérente, des études précédentes réalisées sur des modèles murins, ont rapporté que la Cycline D1 n'est pas requise pour la tumorigenèse induite par l'activation de la voie Wnt/β-caténine (Yu *et al*., 2001 ; Rowlands *et al*., 2003). En revanche, nous avons trouvé une activation de la voie de Myc dans les tumeurs mammaires des souris K5ΔNβcat. En accord avec nos résultats, différentes études ont révélé qu'une signature moléculaire dénotant l'activation de la voie Myc, est associée aux tumeurs du sein de type triple-négatif, y compris de type basal (Alles *et al*., 2009 ; Gatza *et al*., 2010 ; Horiuchi *et al*., 2012). Par ailleurs, la voie Myc est activée dans les tumeurs de haut grade avec une signature apparentée à celle des cellules souches (Ben-Porath *et al*., 2008 ; Wong *et al*., 2008).

Nous avons démontré que l'absence de Myc dans les cellules basales mammaires des souris K5ΔNβcat inhibe l'amplification de la population de cellules souches/progénitrices et abolit la formation des tumeurs mammaires.

Myc étant activé par différents facteurs, il a été proposé comme effecteur potentiel de signaux oncogéniques divers. Ainsi, Myc est nécessaire à la formation des tumeurs mammaires induites par la surexpression de Notch (souris MMTV-N^{IC} Klinakis *et al*., 2006). De plus, l'inactivation de Myc empêche la formation de tumeurs intestinales (Sansom *et al*., 2007) mais n'affecte pas les tumeurs du foie (Reed *et al*., 2008) induites, dans les deux cas, par la perte d'APC et l'activation subséquente de la β-caténine. Ces résultats indiquent que l'implication de Myc dans la formation de tumeurs en aval d'un signal Wnt/β-caténine dépend du contexte tissulaire.

Comme mentionné plus haut, nos travaux montrent un rôle essentiel de Myc dans l'activité de cellules souches mammaires (Moumen *et al*., 2012). L'analyse globale de l'expression génique a révélé une corrélation négative de l'expression de nombreux gènes

impliqués dans le contrôle de la prolifération cellulaire entre les tumeurs des souris K5ΔNβcat et les cellules basales dépourvues de Myc (Moumen, Chiche *et al*., manuscrit en préparation). De façon intéressante, l'expression de plusieurs de ces gènes est également dérégulée dans les cellules basales des souris K5Cre; $Myc^{F/F}$; K5ΔNβcat (Section 3.3 des Résultats, Fig. 26). Ces données nous permettent de suggérer que la perte de Myc empêcherait l'amplification des progéniteurs de type basal et en conséquence, la formation de tumeurs, dans le contexte de l'activation de la β-caténine (Fig. 37).

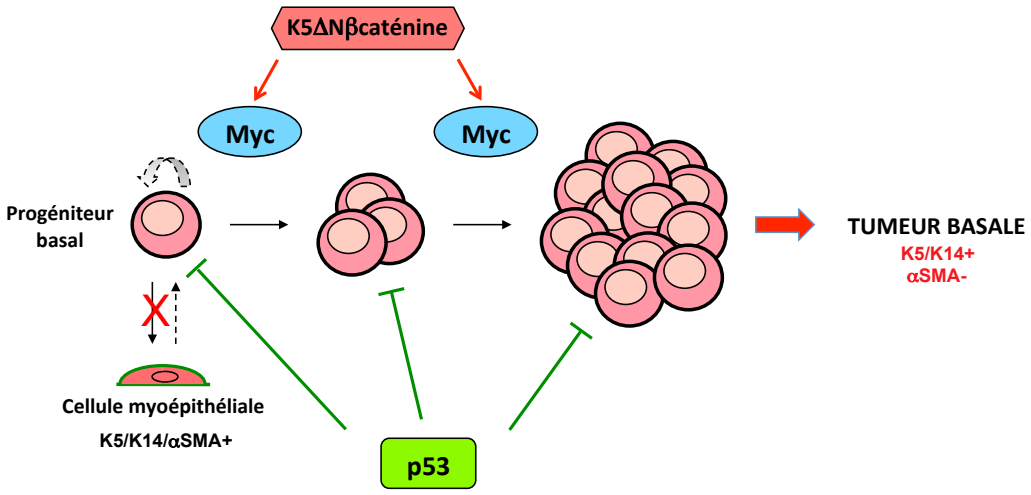


Figure 37 : Schéma récapitulatif des rôles de Myc et p53 dans la tumorigenèse mammaire induite par l'activation de la β-caténine

L'activation de la voie Wnt/β-caténine dans les cellules basales mammaires induit l'amplification des cellules progénitrices de type basal entrainant la formation d'hyperplasies puis de tumeurs de type basal avec une composante métaplastique. L'inactivation de *Myc* inhibe l'amplification de la population de cellules souches/progénitrices et abolit la formation de ces tumeurs. En revanche, l'inactivation de *Trp53* accélère la formation des tumeurs mammaires induites par la β-caténine, et augmente la population de cellules initiatrices de tumeurs.

L'inactivation de *Trp53* induit une augmentation de la fréquence des cellules souches cancéreuses chez les souris K5ΔNβcat

Nos résultats montrent que la perte du gène *Trp53* dans la couche basale mammaire chez les souris K5ΔNβcat accélère la tumorigenèse mammaire sans modifier de façon significative les caractéristiques histologiques des tumeurs. En effet, comme dans les femelles K5ΔNβcat, les tumeurs sont essentiellement composées de cellules K5-positives et αSMA-négatives et présentent un type métaplastique.

Des résultats obtenus dans notre laboratoire indiquent que la voie de p53 est activée dans les hyperplasies mammaires des souris K5ΔNβcat (Marisa Faraldo, données non

publiées). p53 est détecté dans le noyau des cellules hyperplasiques, au stade initial de la maladie, associé à une surexpression de p21, une de ses cibles principales. Ces observations ont été confirmées par l'analyse des données des puces à ADN. Il a été précédemment rapporté que β-caténine induit l'activation de p53 dans des cellules tumorales humaines et murines, ce qui a été interprété comme un mécanisme de défense cellulaire face à un signal oncogénique (Damalas *et al*., 1999). Il est concevable que, dans notre modèle, p53 activé agisse en freinant l'induction tumorale, l'apparition de tumeurs chez les souris K5Cre; *Trp53*$^{F/F}$; K5ΔNβcat accélérant avec sa perte. Comme nos résultats l'indiquent, les tumeurs mammaires des souris K5ΔNβcat résultent de l'amplification de cellules souches/progénitrices dans le compartiment basal de l'épithélium mammaire. Par conséquent, nous proposons que l'accélération de la tumorigenèse induite par la β-caténine suite à la perte de p53 puisse être liée à son rôle dans la régulation de cellules souches (Fig. 37).

Plusieurs études récentes suggèrent l'existence de cellules « propagatrices » de tumeur ayant des propriétés de cellules souches ou progénitrices (pour revue, voir Visvader, 2011). Nos résultats montrent que les tumeurs mammaires des souris K5ΔNβcat contiennent des cellules propagatrices de tumeur capables de redonner une tumeur similaire à la tumeur d'origine après transplantation. Par ailleurs, les transplantations en dilution limite de cellules tumorales indiquent que la fréquence des cellules propagatrices de tumeurs est augmentée en absence de p53. Il a été suggéré que p53 régule la polarité des divisions cellulaires dans les cellules souches mammaires normales et cancéreuses *in vitro* (Cicalese *et al*., 2009). Ainsi l'inactivation de *Trp53* dans les cellules basales des souris K5Cre; *Trp53*$^{F/F}$; K5ΔNβcat pourrait favoriser la division symétrique des cellules souches cancéreuses, entrainant l'accélération du développement de carcinomes mammaires.

L'absence de p53 pourrait également influencer la régulation des microRNA comme miR-34. En effet p53 active l'expression de miR-34 qui est capable de supprimer l'activité transcriptionnelle du complexe LEF/TCF, nécessaire à la signalisation Wnt/β-caténine. Ce mécanisme pourrait mettre ainsi un frein à la formation des tumeurs dans les souris K5ΔNβcat (Kim *et al*., 2011a). L'analyse d'expression globale des microRNA pourrait donner de nouvelles informations sur le mécanisme d'action de p53 sur les cellules cancéreuses dans notre modèle.

De façon surprenante, nous avons observé un développement lobulo-alvéolaire aberrant des glandes endogènes des souris transplantées par des cellules tumorales K5Cre;

Trp53$^{F/F}$; ΔNβcat. Dans la glande mammaire normale, STAT5 est activé au cours de la deuxième moitié de la gestation essentiellement, suite à la liaison de la prolactine à son récepteur (Brisken & O'Malley, 2010). Nous avons trouvé que le facteur de transcription STAT5a est activé dans les glandes mammaires de ces souris en absence de gestation. Ces résultats suggèrent que les tumeurs K5Cre; *Trp53*$^{F/F}$; ΔNβcat produiraient des facteurs sécrétés capables d'induire la prolifération et la différenciation des progéniteurs luminaux et la formation de structures alvéolaires en absence des signaux hormonaux contrôlant la gestation. Nous avons commencé à collecter des échantillons de sang des souris injectées avec des cellules tumorales K5Cre; *Trp53*$^{F/F}$; K5ΔNβcat afin d'analyser les facteurs sécrétés potentiels (hormones, facteurs de croissance) qui pourraient expliquer ces observations. Une autre option possible serait que les tumeurs induisent une perturbation du statut hormonal des animaux transplantés, avec par exemple des niveaux systémiques élevés d'hormones sexuelles.

L'analyse morphologique des glandes mammaires des mâles montre que l'activation de la β-caténine dans les cellules basales mammaires induit le développement d'un épithélium mammaire chez les mâles K5ΔNβcat. Dès 1997, Lane & Leder ont rapporté que la surexpression de Wnt10b dans l'épithélium mammaire des mâles permettait de contourner la nécessité d'une stimulation par les hormones ovariennes, ainsi que les effets inhibiteurs des androgènes, pour induire le développement de la glande mammaire (Lane & Leder, 1997). Dans notre modèle, seuls les mâles K5ΔNβcat possédant une délétion de *Trp53* présentaient également un développement lobulo-alvéolaire. Ces observations indiquent que l'activation de la β-caténine dans les cellules basales peut entrainer le développement d'un épithélium mammaire en absence d'un contexte hormonal approprié, l'inactivation du gène *Trp53* accentuant ce phénomène. Il a été également rapporté que la surexpression de certains facteurs Wnts dans l'épithélium mammaire pouvait induire des tumeurs mammaires chez les mâles (Lane & Leder, 1997). Nous avons en effet détecté l'apparition de lésions mammaires dans quelques mâles K5Cre; *Trp53*$^{F/F}$; K5ΔNβcat.

Des études précédentes sur divers modèles transgéniques ont rapporté une synergie entre la voie Wnt/β-caténine et la perte de p53 dans la carcinogenèse mammaire (Ridgeway *et al*., 2006 ; Meniel *et al*., 2005). Nos données suggèrent que cette synergie pourrait être le résultat de l'effet exercé par ces deux voies sur les cellules souches cancéreuses.

CONCLUSION

En conclusion, au cours de ce travail de thèse, nous avons obtenu les résultats suivants :

- l'invalidation du gène codant pour le proto-oncogène *Myc* dans la couche basale de l'épithélium mammaire abolit le potentiel de régénération de l'épithélium mammaire et affecte les cellules progénitrices alvéolaires. En revanche, la perte de p53 dans les cellules basales de l'épithélium mammaire augmente la fréquence des cellules souches et favorise leur autorenouvellement ; les cellules souches/progénitrices mammaires dépourvues de p53 peuvent être maintenues en culture de façon illimitée.

- les souris K5ΔNβcat présentent une augmentation du nombre de cellules souches et progénitrices dans la couche basale de l'épithélium mammaire suggérant que les tumeurs développées par les souris K5ΔNβcat pourraient provenir de l'amplification de cellules souches/progénitrices de type basal suite à l'activation de la signalisation β-caténine.

- l'invalidation du gène codant pour le proto-oncogène *Myc* dans la couche basale de l'épithélium mammaire des souris K5ΔNβcat abolit la tumorigenèse. L'ablation de *Trp53* dans les cellules basales mammaires des souris K5ΔNβcat augmente le nombre de cellules initiatrices de tumeurs et accélère le développement tumoral.

Nos résultats suggèrent que les cellules souches/progénitrices basales pourraient être à l'origine de certaines tumeurs mammaires de type basal et que les rôles joués par Myc et p53 dans la tumorigenèse sont liés à leurs fonctions régulatrices des cellules souches mammaires.

ANNEXES

Int. J. Dev. Biol. 55: 763-771
doi: 10.1387/ijdb.113385mm

THE INTERNATIONAL JOURNAL OF DEVELOPMENTAL BIOLOGY
www.intjdevbiol.com

The mammary myoepithelial cell

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

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

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

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

Introduction

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

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

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

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

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

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

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

ISSN: Online 1696-3547, Print 0214-6282
© 2011 UBC Press
Printed in Spain

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

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

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

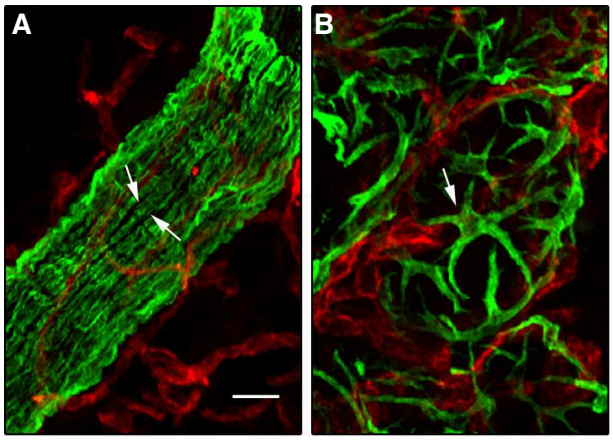


Fig. 1. Morphology of ductal and alveolar myoepithelial cells. *Double immunofluorescence labelling of sections through 10-week-old virgin* **(A)** *and 2-day-lactating* **(B)** *mouse mammary glands with the antibodies against cytokeratin 5 (K5, green) and CD31 (red). Arrows indicate elongated ductal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

Differentiation of mammary myoepithelial cells

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

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

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

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

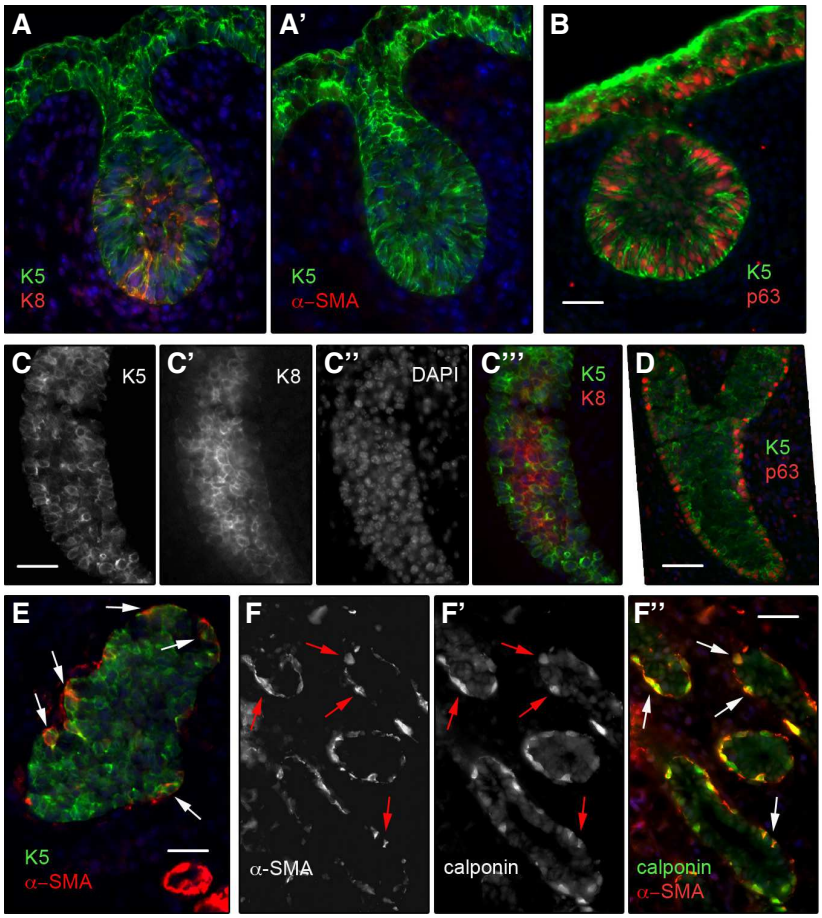


Fig. 2. Distribution of epithelial and smooth muscle markers in developing mouse mammary gland. *Double immunofluorescence labelling of sections through developing mammary glands from mouse embryo (A-E) and newborn female mouse (F) with antibodies against K5, K8, p63, α-SMA and calponin. The nuclei were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

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

The smooth muscle marker expression of myoepithelial cells is not only regulated temporally during development, it is also regulated spatially. In adult quiescent human breast, a specific caldesmon variant implicated in the regulation of smooth muscle contraction is expressed by the myoepithelial cells of large ducts and galactophorous sinuses, but absent from intralobular small ducts and acini (Lazard et al., 1993). Similarly, in the lactating rat mammary gland, ductal and alveolar myoepithelial cells differ in their patterns of contractile and cytoskeletal smooth muscle marker expression (Deugnier et al., 1995). At least in part, this heterogeneity may reflect transient differences in the degree of maturation of the myoepithelial cells located in the various parts of the mammary tree, or differences in the functional properties of ductal and alveolar myoepithelial cells, such as contractile activity. For instance, it seems plausible that the expression of contractile proteins is upregulated in alveolar myoepithelial cells from lactating glands. Jolicoeur (2005) suggested that the heterogeneity of myoepithelial cells "may reflect an innate ability of the mammary basal myoepithelial lineage to adapt to a wide range of environments", enabling these cells to mediate epithelial–stromal interactions adequately.

Contractile function and the control of mammary myoepithelial cell differentiation

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

The contractile activity of myoepithelial cells requires the expression of smooth muscle proteins and appropriate cell-ECM interactions. Similar to smooth muscle cells, differentiation of myoepithelial cells is dependent on serum response factor (SRF), a transcription factor that binds a DNA sequence known as the CArG box, associated with smooth muscle structural genes, such as the α-SMA and smooth muscle myosin heavy chain genes. SRF interacts with members of the myocardin family of transcriptional coactivators that enhance the expression of SRF-dependent genes (see references in Pipes *et al.,* 2006). Myocardin itself is expressed specifically in cardiac and smooth muscle cells, whereas mammary myoepithelial cells express the myocardin-related transcription factors Mkl1 and

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

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

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

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

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

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

Myoepithelial cell-ECM interactions

Cell-ECM interactions play important roles in the control of various aspects of the mammary epithelial cell functional activity. The mammary epithelium is surrounded by a basement membrane consisting essentially of collagen IV, various laminin variants and nidogen (reviewed in Muschler and Streuli 2010). Due to their direct contact with the basement membrane, myoepithelial cells are particularly rich in integrins. Early immunohistochemical studies have revealed the expression of various integrin dimers, including collagen receptors α1β1, α2β1 and fibronectin receptor α5β1, $\alpha_v\beta3$ integrin and high levels of laminin receptors α3β1, α6β1 and α6β4, in rodent and human mammary myoepithelial cells (see references in Taddei *et al.,* 2003 and in Muschler and Streuli 2010).

Mice lacking the α1 or α2 integrin chain are viable. The germline deletion of the α1 integrin gene has no effect on mammary development, whereas ablation of the α2 integrin gene results in a slight decrease in mammary ductal branching complexity in virgin mice (reviewed in Hynes 2002). A lack of α3β1 or α6β4 integrins leads to perinatal lethality (reviewed in Hynes 2002). Therefore, tissue transplantation technique has been employed to study the roles played by these integrins in mammary development. Mammary epithelium deficient for α3 or α6 integrin chain (i.e. depleted of α3β1 or α6β1 and α6β4 integrin dimers), when transplanted into cleared mouse mammary fat pads, produced ducts and alveoli similar to those developed from control tissue, suggesting that these integrins are dispensable for mammary morphogenesis. One possible explanation for these results is the functional redundancy of the α3β1, α6β1 and α6β4 integrins.

To study the roles played by integrins expressed in the mammary myoepithelial cells in mammary gland development, we employed conditional gene deletion involving Cre-Lox approach. We have obtained mouse mutants presenting deletion of β1 or α3 integrin chains in the basal (K5-positive) cell population. The expression of Cre was driven to basal epithelial cells by the K5 promoter (Taddei *et al.,* 2008; Raymond *et al.,* 2011).

The deletion of β1 integrin from basal myoepithelial cells affected mammary branching morphogenesis in virgin mice and lobulo-alveolar development in pregnancy (Taddei *et al.,* 2008). The mutant epithelium was characterized by a largely disorganized general branching pattern, with few side branches. Lobulo-alveolar development was significantly retarded and secretory alveoli developed only late in pregnancy, after 14.5 *p.c.* from integrin-positive progenitor cells residing in the luminal layer. However, the deletion of β1 integrins from the basal myoepithelial cell compartment did not impede ductal growth or differentiation of the two major mammary lineages, the basal myoepithelial and the luminal.

Furthermore, in the mutant epithelium, the lack of β1 integrin altered the orientation of the basal cell division axis and the progeny of β1 integrin-depleted basal cells, identified by a genetic marker, was found in the luminal compartment, by contrast to what was observed for control tissue. These observations led to the conclusion that, in the developed ducts, basal mammary epithelial cells divided parallel to the basement membrane, whereas basal cells lacking β1 integrin escaped this rule. In this case, orientation of the basal cell division plane appeared to be random, so that part of the progeny localized to the luminal compartment and differentiated into luminal cells. These data suggested, that interactions between basal cells and ECM may contribute to cell fate decisions in mammary epithelium.

Serial transplantation experiments revealed that the deletion of β1 integrin from the basal myoepithelial cell layer abolished the regenerative potential of the mammary epithelium. It is not known

how cell-ECM interactions mediated by β1 integrins contribute to maintenance of the mammary stem cell population, and whether the deletion of β1 integrin affects stem cells, directly, or indirectly, by modifying their survival or self-renewal capacity or disturbing the stem cell niche. Numerous studies have shown that cell-ECM adhesion plays an essential role in various stem cell niches (Raymond *et al.,* 2009).

The conditional deletion of a laminin receptor, α3β1 integrin, from myoepithelial cells did not interfere with the integrity or functional differentiation of the mammary epithelium, but led to low rates of milk ejection due to impaired myoepithelial cell contractility (Raymond *et al.,* 2011). This study revealed that in mammary myoepithelial cells, α3β1 integrin-mediated interactions with the ECM play an essential role in the control of FAK-Rac-PAK pathway activation thereby participating in the regulation of the myoepithelial cell post-contraction relaxation. In the mammary glands of lactating mice presenting deletion of α3β1 integrin from basal myoepithelial cells, we observed sustained MLC phosphorylation, low levels of FAK activation/phosphorylation and altered Rho/Rac balance. Cultured mammary myoepithelial cells depleted of α3β1 contracted in response to oxytocin, but were unable to maintain the state of post-contractile relaxation. The expression of constitutively active Rac or its effector PAK, or treatment with MLC-kinase inhibitor rescued the relaxation capacity of mutant cells, strongly suggesting that α3β1-mediated stimulation of the Rac/PAK pathway is required for the inhibition of MLC-kinase activity, permitting completion of the myoepithelial cell contraction/relaxation cycle and successful lactation. This study provided the first *in vivo* evidence implicating integrin signaling in the control of myoepithelial cell contractile function.

Intercellular and paracrine interactions involving myoepithelial cells

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

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

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

Novel information about the nature of cell-cell interactions in the mammary epithelium has been provided by Hinck's laboratory. This team was the first to implicate neural guidance molecules in basal-luminal cell adhesion and crosstalk. In the mammary epithelium, Netrin1, a secreted guidance cue molecule is expressed by luminal cells, whereas, its receptor, Neurogenin is present on the surface of cap and differentiated myoepithelial cells. Loss-of-function mutations in genes coding for Netrin1 and Neurogenin resulted in the disorganization of terminal end buds (Srinivasan *et al.,* 2003). Another neural guidance molecules Slit2 is expressed in both mammary epithelial cell layers, whereas its receptor, Robo1 is restricted to the basal cell population, cap and myoepithelial cells. Deletion of Slit2 or Robo1 from the mammary epithelium results in a phenotype similar to that induced by perturbation of Netrin1/Neurogenin couple, a lack of adhesion between luminal and cap cell layers (Strickland *et al.,* 2006). Furthermore, simultaneous loss-of-function mutations of *slit2* and *ntn1* genes resulted in an enhanced phenotype with separated luminal and basal cell layers in the mammary ducts suggestive of synergy between Slit2 and Netrin 1 during ductal morphogenesis. A recent report from the same laboratory implicated Slit/Robo1 signaling in the control of mammary branching morphogenesis (Macias *et al.,* 2011). The authors suggested that basal myoepithelial cells control the formation of new ductal branches via the production of mitogens for the luminal cells. Macias and coworkers revealed that the TGF-β1-induced expression of Robo1 in basal myoepithelial cells and the interaction of Slit2 with Robo1 inhibited β-catenin signaling, limiting basal cell proliferation and preventing the formation of new branches (Macias *et al.,* 2011).

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

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

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

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

Mammary myoepithelium and stem cells

Studies performed with a mammary cell line CommaD1β, possessing a morphogenetic potential, and with dissociated mammary epithelial cells have strongly suggested that the regenerative capacity of the mammary epithelium, as evaluated by transplantation assays, is associated with the basal epithelial compartment (Deugnier *et al.,* 2006; Shackleton *et al.,* 2006; Stingl *et al.,* 2006; Sleeman *et al.,* 2007). Cell populations enriched in stem cells can be isolated from freshly dissociated mammary epithelium, by flow cytometry, due to the strong expression of α6 or β1 integrins (Shackleton *et al.,* 2006; Stingl *et al.,* 2006). Of note, relatively high integrin expression levels are characteristic of the entire basal mammary cell population, consisting essentially of differentiated myoepithelial cells, whereas stem cells would be expected to display phenotypic characteristics different from those of differentiated cells. Consistently, the morphogenetic cell population isolated from the CommaD1β cell line expresses basal cell markers, such as basal cytokeratins, P-cadherin and ΔNp63, but is negative for the smooth muscle-characteristic proteins (Deugnier *et al.,* 2006).

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

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

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

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

Contribution of myoepithelial cells to mammary tumorigenesis

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

Large-scale analyses of gene expression in human breast

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

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

Conclusions and perspectives

Myoepithelial cells are no longer considered to be a second-class mammary cell population of almost no interest. In addition to its contractile function, which is essential for lactation, the basal cell layer harbors the regenerative potential of the mammary epithelium. Basal myoepithelial cells modulate the proliferation and differentiation of luminal cells, and affect the surrounding stroma. Various aspects of myoepithelial cell biology therefore merit further investigation.

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

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

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

Acknowledgments

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

References

ANBAZHAGAN R, OSIN PP, BARTKOVA J, NATHAN B, LANE EB and GUSTERSON BA (1998). The development of epithelial phenotypes in the human fetal and infant breast. *J Pathol* 184: 197-206.

ANDRES AC and ZIEMIECKI A (2003). Eph and ephrin signaling in mammary gland morphogenesis and cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 8: 475-485.

ASSELIN-LABAT ML, VAILLANT F, SHERIDAN JM, PAL B, WU D, SIMPSON ER, YASUDA H, SMYTH GK, MARTIN TJ, LINDEMAN GJ and VISVADER JE (2010). Control of mammary stem cell function by steroid hormone signalling. *Nature* 465: 798-802.

BAI L and ROHRSCHNEIDER LR (2010). s-SHIP promoter expression marks activated stem cells in developing mouse mammary tissue. *Genes Dev* 24: 1882-1892.

BARSKY SH and KARLIN NJ (2006). Mechanisms of disease: breast tumor pathogenesis and the role of the myoepithelial cell. *Nat Clin Pract Oncol* 3: 138-151.

BOURAS T, PAL B, VAILLANT F, HARBURG G, ASSELIN-LABAT ML, OAKES SR, LINDEMAN GJ and VISVADER JE (2008). Notch signaling regulates mammary stem cell function and luminal cell-fate commitment. *Cell Stem Cell* 3: 429-441.

BRISKEN C and O'MALLEY B (2010). Hormone action in the mammary gland. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2: a003178.

BUZA N, ZEKRY N, CHARPIN C and TAVASSOLI FA (2010). Myoepithelial carcinoma of the breast: a clinicopathological and immunohistochemical study of 15 diagnostically challenging cases. *Virchows Arch* 457: 337-345.

CHOI YS, CHAKRABARTI R, ESCAMILLA-HERNANDEZ R and SINHA S (2009). Elf5 conditional knockout mice reveal its role as a master regulator in mammary alveolar development: failure of Stat5 activation and functional differentiation in the absence of Elf5. *Dev Biol* 329: 227-241.

DEUGNIER MA, FARALDO MM, TEULIERE J, THIERY JP, MEDINA D and GLUKHOVA MA (2006). Isolation of mouse mammary epithelial progenitor cells with basal characteristics from the Comma-Dbeta cell line. *Dev Biol* 293: 414-425.

DEUGNIER MA, MOISEYEVA EP, THIERY JP and GLUKHOVA M (1995). Myoepithelial cell differentiation in the developing mammary gland: progressive acquisition of smooth muscle phenotype. *Dev Dyn* 204: 107-117.

DONTU G, JACKSON KW, MCNICHOLAS E, KAWAMURA MJ, ABDALLAH WM and WICHA MS (2004). Role of Notch signaling in cell-fate determination of human mammary stem/progenitor cells. *Breast Cancer Res* 6: R605-615.

FARALDO MM, TEULIERE J, DEUGNIER MA, BIRCHMEIER W, HUELSKEN J, THIERY JP, CANO A and GLUKHOVA MA (2007). beta-Catenin regulates P-cadherin expression in mammary basal epithelial cells. *FEBS Lett* 581: 831-836.

FARALDO MM, TEULIERE J, DEUGNIER MA, TADDEI-DE LA HOSSERAYE I, THIERY JP and GLUKHOVA MA (2005). Myoepithelial cells in the control of mammary development and tumorigenesis: data from genetically modified mice. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 10: 211-219.

FOULKES WD, SMITH IE and REIS-FILHO JS (2011). Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med* 363: 1938-1948.

FRIEDRICHS N, STEINER S, BUETTNER R and KNOEPFLE G (2007). Immunohistochemical expression patterns of AP2alpha and AP2gamma in the developing fetal human breast. *Histopathology* 51: 814-823.

GUSTERSON B (2009). Do 'basal-like' breast cancers really exist? *Nat Rev Cancer* 9: 128-134.

HAAKSMA CJ, SCHWARTZ RJ and TOMASEK JJ (2011). Myoepithelial cell contraction and milk ejection are impaired in mammary glands of mice lacking smooth musclealpha-actin. *Biol Reprod* DOI:10.1095/biolreprod.110.090639

HARTSHORNE DJ, ITO M and IKEBE M (1989). Myosin and contractile activity in smooth muscle. *Adv Exp Med Biol* 255: 269-277.

HYNES RO (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110: 673-687.

INCASSATI A, CHANDRAMOULI A, EELKEMA R and COWIN P (2010). Key signaling nodes in mammary gland development and cancer: beta-catenin. *Breast Cancer Res* 12: 213.

JOLICOEUR F (2005). Intrauterine breast development and the mammary myoepithelial lineage. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 10: 199-210.

JOSHI PA, JACKSON HW, BERISTAIN AG, DI GRAPPA MA, MOTE PA, CLARKE CL, STINGL J, WATERHOUSE PD and KHOKHA R (2010). Progesterone induces adult mammary stem cell expansion. *Nature* 465: 803-807.

KENDRICK H, REGAN JL, MAGNAY FA, GRIGORIADIS A, MITSOPOULOS C, ZVELEBIL M and SMALLEY MJ (2008). Transcriptome analysis of mammary epithelial subpopulations identifies novel determinants of lineage commitment and cell fate. *BMC Genomics* 9: 591.

KHRAMTSOV AI, KHRAMTSOVA GF, TRETIAKOVA M, HUO D, OLOPADE OI and GOSS KH (2010). Wnt/beta-catenin pathway activation is enriched in basal-like breast cancers and predicts poor outcome. *Am J Pathol* 176: 2911-2920.

LAZARD D, SASTRE X, FRID MG, GLUKHOVA MA, THIERY JP and KOTELIANSKY VE (1993). Expression of smooth muscle-specific proteins in myoepithelium and stromal myofibroblasts of normal and malignant human breast tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 999-1003.

LIM E, VAILLANT F, WU D, FORREST NC, PAL B, HART AH, ASSELIN-LABAT ML, GYORKI DE, WARD T, PARTANEN A, FELEPPA F, HUSCHTSCHA LI, THORNE HJ, FOX SB, YAN M, FRENCH JD, BROWN MA, SMYTH GK, VISVADER JE and LINDEMAN GJ (2009). Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers. *Nat Med* 15: 907-913.

LIM E, WU D, PAL B, BOURAS T, ASSELIN-LABAT ML, VAILLANT F, YAGITA H, LINDEMAN GJ, SMYTH GK and VISVADER JE (2010). Transcriptome analyses of mouse and human mammary cell subpopulations reveal multiple conserved genes and pathways. *Breast Cancer Res* 12: R21.

MACIAS H, MORAN A, SAMARA Y, MORENO M, COMPTON JE, HARBURG G, STRICKLAND P and HINCK L (2011). SLIT/ROBO1 signaling suppresses mammary branching morphogenesis by limiting basal cell number. *Dev Cell* 20: 827-840.

MANI SA, GUO W, LIAO MJ, EATON EN, AYYANAN A, ZHOU AY, BROOKS M, REINHARD F, ZHANG CC, SHIPITSIN M, CAMPBELL LL, POLYAK K, BRISKEN C, YANG J and WEINBERG RA (2008). The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 133: 704-715.

MOLYNEUX G, GEYER FC, MAGNAY FA, MCCARTHY A, KENDRICK H, NATRAJAN R, MACKAY A, GRIGORIADIS A, TUTT A, ASHWORTH A, REIS-FILHO JS and SMALLEY MJ (2010). BRCA1 basal-like breast cancers originate from luminal epithelial progenitors and not from basal stem cells. *Cell Stem Cell* 7: 403-417.

MORITA T, MAYANAGI T and SOBUE K (2007). Dual roles of myocardin-related transcription factors in epithelial mesenchymal transition via slug induction and actin remodeling. *J Cell Biol* 179: 1027-1042.

MORROW D, GUHA S, SWEENEY C, BIRNEY Y, WALSHE T, O'BRIEN C, WALLS D, REDMOND EM and CAHILL PA (2008). Notch and vascular smooth muscle cell phenotype. *Circ Res* 103: 1370-1382.

MUSCHLER J and STREULI CH (2010). Cell-matrix interactions in mammary gland development and breast cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2: a003202.

NACCARATO AG, VIACAVA P, VIGNATI S, FANELLI G, BONADIO AG, MONTRUCCOLI G and BEVILACQUA G (2000). Bio-morphological events in the development of the human female mammary gland from fetal age to puberty. *Virchows Arch* 436: 431-438.

PANDEY PR, SAIDOU J and WATABE K (2011). Role of myoepithelial cells in breast tumor progression. *Front Biosci* 15: 226-236.

PASIC L, EISINGER-MATHASON TSK, VELAYUDHAN BT, MOSKALUK CA, BRENIN DR, MACARA IG, LANNIGAN DA (2011). Sustained activation of the HER1–ERK1/2–RSK signaling pathway controls myoepithelial cell fate in human mammary tissue. *Genes Dev* 25: 1641-1653.

PIPES GC, CREEMERS EE and OLSON EN (2006). The myocardin family of transcriptional coactivators: versatile regulators of cell growth, migration, and myogenesis. *Genes Dev* 20: 1545-1556.

PROIA TA, KELLER PJ, GUPTA PB, KLEBBA I, JONES AD, SEDIC M, GILMORE H, TUNG N, NABER SP, SCHNITT S, LANDER ES and KUPERWASSER C (2010). Genetic predisposition directs breast cancer phenotype by dictating progenitor cell fate. *Cell Stem Cell* 8: 149-163.

RADICE G, FERREIRA-CORNWELL MC, ROBINSON SD, RAYBURN H, CHODOSH LA, TAKEICHI M, HYNES RO (1997). Precocious mammary gland development in P-cadherin-deficient mice. *J Cell Biol* 139: 1025-1032.

RAYMOND K, CAGNET S, KREFT M, JANSSEN H, SONNENBERG A and GLUKHOVA MA (2011). Control of mammary myoepithelial cell contractile function by alpha3beta1 integrin signalling. *EMBO J* 30: 1896-1906.

RAYMOND K, DEUGNIER MA, FARALDO MM and GLUKHOVA MA (2009). Adhesion within the stem cell niches. *Curr Opin Cell Biol* 21: 623-629.

REVERSI A, CASSONI P and CHINI B (2005). Oxytocin receptor signaling in myoepithelial and cancer cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 10: 221-229.

ROSSITER H, BARRESI C, GHANNADAN M, GRUBER F, MILDNER M, FODINGER D and TSCHACHLER E (2007). Inactivation of VEGF in mammary gland epithelium severely compromises mammary gland development and function. *FASEB J* 21: 3994-4004.

RUNSWICK SK, O'HARE MJ, JONES L, STREULI CH and GARROD DR (2001). Desmosomal adhesion regulates epithelial morphogenesis and cell positioning.

Nat Cell Biol 3: 823-830.

SHACKLETON M, VAILLANT F, SIMPSON KJ, STINGL J, SMYTH GK, ASSELIN-LABAT ML, WU L, LINDEMAN GJ and VISVADER JE (2006). Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature* 439: 84-88.

SLEEMAN KE, KENDRICK H, ROBERTSON D, ISACKE CM, ASHWORTH A and SMALLEY MJ (2007). Dissociation of estrogen receptor expression and *in vivo* stem cell activity in the mammary gland. *J Cell Biol* 176: 19-26.

SRINIVASAN K, STRICKLAND P, VALDES A, SHIN GC and HINCK L (2003). Netrin-1/neogenin interaction stabilizes multipotent progenitor cap cells during mammary gland morphogenesis. *Dev Cell* 4: 371-382.

STINGL J, EIREW P, RICKETSON I, SHACKLETON M, VAILLANT F, CHOI D, LI HI and EAVES CJ (2006). Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells. *Nature* 439: 993-997.

STRICKLAND P, SHIN GC, PLUMP A, TESSIER-LAVIGNE M and HINCK L (2006). Slit2 and netrin 1 act synergistically as adhesive cues to generate tubular bi-layers during ductal morphogenesis. *Development* 133: 823-832.

TADDEI I, DEUGNIER MA, FARALDO MM, PETIT V, BOUVARD D, MEDINA D, FASSLER R, THIERY JP and GLUKHOVA MA (2008). Beta1 integrin deletion from the basal compartment of the mammary epithelium affects stem cells. *Nat Cell Biol* 10: 716-722.

TADDEI I, FARALDO MM, TEULIERE J, DEUGNIER MA, THIERY JP and GLUKHOVA MA (2003). Integrins in mammary gland development and differentiation of mammary epithelium. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 8: 383-394.

WILLIAMS JM and DANIEL CW (1983). Mammary ductal elongation: differentiation of myoepithelium and basal lamina during branching morphogenesis. *Dev Biol* 97: 274-290.

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

Signalling molecules involved in mouse bladder smooth muscle cellular differentiation
Benchun Liu, Dongxiao Feng, Guiting Lin, Mei Cao, Yuet Wai Kan, Gerald R. Cunha and Laurence S. Baskin
Int. J. Dev. Biol. (2010) 54: 175-180

Epithelial-Mesenchymal Transitions in development and disease: old views and new perspectives
M. Angela Nieto
Int. J. Dev. Biol. (2009) 53: 1541-1547

The stroma reaction myofibroblast: a key player in the control of tumor cell behavior
Alexis Desmoulière, Christelle Guyot and Giulio Gabbiani
Int. J. Dev. Biol. (2004) 48: 509-517

Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis
Héctor Peinado, Francisco Portillo and Amparo Cano
Int. J. Dev. Biol. (2004) 48: 365-375

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

5 yr ISI Impact Factor (2010) = 2.961

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

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

Aas T., Borresen A. L., Geisler S., Smith-Sorensen B., Johnsen H., Varhaug J. E., Akslen L. A. and Lonning P. E. (1996). Specific P53 mutations are associated with de novo resistance to doxorubicin in breast cancer patients. *Nat Med* **2**, 811-814.

Agarwal M. L., Agarwal A., Taylor W. R. and Stark G. R. (1995). p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 8493-8497.

Akashi K., Traver D., Miyamoto T. and Weissman I. L. (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* **404**, 193-197.

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.

Alles M. C., Gardiner-Garden M., Nott D. J., Wang Y., Foekens J. A., Sutherland R. L., Musgrove E. A. and Ormandy C. J. (2009). Meta-analysis and gene set enrichment relative to er status reveal elevated activity of MYC and E2F in the "basal" breast cancer subgroup. *PLoS One* **4**, e4710.

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.

Almog N. and Rotter V. (1997). Involvement of p53 in cell differentiation and development. *Biochim Biophys Acta* **1333**, F1-27.

Andre F., Job B., Dessen P., Tordai A., Michiels S., Liedtke C., Richon C., Yan K., Wang B., Vassal G., Delaloge S., Hortobagyi G. N., Symmans W. F., Lazar V. and Pusztai L. (2009). Molecular characterization of breast cancer with high-resolution oligonucleotide comparative genomic hybridization array. *Clin Cancer Res* **15**, 441-451.

Armstrong J. F., Kaufman M. H., Harrison D. J. and Clarke A. R. (1995). High-frequency developmental abnormalities in p53-deficient mice. *Curr Biol* **5**, 931-936.

Asai T., Liu Y., Bae N. and Nimer S. D. (2011). The p53 tumor suppressor protein regulates hematopoietic stem cell fate. *J Cell Physiol* **226**, 2215-2221.

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

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

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

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

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

Bello-Fernandez C., Packham G. and Cleveland J. L. (1993). The ornithine decarboxylase gene is a transcriptional target of c-Myc. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 7804-7808.

Ben-Porath I., Thomson M. W., Carey V. J., Ge R., Bell G. W., Regev A. and Weinberg R. A. (2008). An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat Genet* **40**, 499-507.

Bergh J., Norberg T., Sjogren S., Lindgren A. and Holmberg L. (1995). Complete sequencing of the p53 gene provides prognostic information in breast cancer patients, particularly in relation to adjuvant systemic therapy and radiotherapy. *Nat Med* **1**, 1029-1034.

Beroukhim R., Mermel C. H., Porter D., Wei G., Raychaudhuri S., Donovan J., Barretina J., Boehm J. S., Dobson J., Urashima M., Mc Henry K. T., Pinchback R. M., Ligon A. H., Cho Y. J., Haery L., Greulich H., Reich M., Winckler W., Lawrence M. S., Weir B. A., Tanaka K. E., Chiang D. Y., Bass A. J., Loo A., Hoffman C., Prensner J., Liefeld T., Gao Q., Yecies D., Signoretti S., Maher E., Kaye F. J., Sasaki H., Tepper J. E., Fletcher J. A., Tabernero J., Baselga J., Tsao M. S., Demichelis F., Rubin M. A., Janne P. A., Daly M. J., Nucera C., Levine R. L., Ebert B. L., Gabriel S., Rustgi A. K., Antonescu C. R., Ladanyi M., Letai A., Garraway L. A., Loda M., Beer D. G., True L. D., Okamoto A., Pomeroy S. L., Singer S., Golub T. R., Lander E. S., Getz G., Sellers W. R. and Meyerson M. (2010). The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature* **463**, 899-905.

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

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

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

Bonizzi G., Cicalese A., Insinga A. and Pelicci P. G. (2012). The emerging role of p53 in stem cells. *Trends Mol Med* **18**, 6-12.

Bonnet D. and Dick J. E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* **3**, 730-737.

Bouchard C., Dittrich O., Kiermaier A., Dohmann K., Menkel A., Eilers M. and Luscher B. (2001). Regulation of cyclin D2 gene expression by the Myc/Max/Mad network: Myc-dependent TRRAP recruitment and histone acetylation at the cyclin D2 promoter. *Genes Dev* **15**, 2042-2047.

Bourdon J. C., Fernandes K., Murray-Zmijewski F., Liu G., Diot A., Xirodimas D. P., Saville M. K. and Lane D. P. (2005). p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes Dev* **19**, 2122-2137.

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

Brisken C., Ayyannan A., Nguyen C., Heineman A., Reinhardt F., Tan J., Dey S. K., Dotto G. P. and Weinberg R. A. (2002). IGF-2 is a mediator of prolactin-induced morphogenesis in the breast. *Dev Cell* **3**, 877-887.

Brisken C., Heineman A., Chavarria T., Elenbaas B., Tan J., Dey S. K., McMahon J. A., McMahon A. P. and Weinberg R. A. (2000). Essential function of Wnt-4 in mammary gland development downstream of progesterone signaling. *Genes Dev* **14**, 650-654.

Brisken C. and O'Malley B. (2010). Hormone action in the mammary gland. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a003178.

Brisken C., Park S., Vass T., Lydon J. P., O'Malley B. W. and Weinberg R. A. (1998). A paracrine role for the epithelial progesterone receptor in mammary gland development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 5076-5081.

Brisken C. and Rajaram R. D. (2006). Alveolar and lactogenic differentiation. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **11**, 239-248.

Britt K., Ashworth A. and Smalley M. (2007). Pregnancy and the risk of breast cancer. *Endocr Relat Cancer* **14**, 907-933.

Brooks C. L. and Gu W. (2003). Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: the molecular basis for p53 regulation. *Curr Opin Cell Biol* **15**, 164-171.

Campbell L. L. and Polyak K. (2007). Breast tumor heterogeneity: cancer stem cells or clonal evolution? *Cell Cycle* **6**, 2332-2338.

Cao Y., Bonizzi G., Seagroves T. N., Greten F. R., Johnson R., Schmidt E. V. and Karin M. (2001). IKKalpha provides an essential link between RANK signaling and cyclin D1 expression during mammary gland development. *Cell* **107**, 763-775.

Cappellen D., Schlange T., Bauer M., Maurer F. and Hynes N. E. (2007). Novel c-MYC target genes mediate differential effects on cell proliferation and migration. *EMBO Rep* **8**, 70-76.

Cartwright P., McLean C., Sheppard A., Rivett D., Jones K. and Dalton S. (2005). LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development* **132**, 885-896.

Chaffer C. L., Brueckmann I., Scheel C., Kaestli A. J., Wiggins P. A., Rodrigues L. O., Brooks M., Reinhardt F., Su Y., Polyak K., Arendt L. M., Kuperwasser C., Bierie B. and Weinberg R. A. (2011). Normal and neoplastic nonstem cells can spontaneously convert to a stem-like state. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 7950-7955.

Chang C. J., Chao C. H., Xia W., Yang J. Y., Xiong Y., Li C. W., Yu W. H., Rehman S. K., Hsu J. L., Lee H. H., Liu M., Chen C. T., Yu D. and Hung M. C. (2011). p53 regulates epithelial-mesenchymal transition and stem cell properties through modulating miRNAs. *Nat Cell Biol* **13**, 317-323.

Chen Y. and Olopade O. I. (2008). MYC in breast tumor progression. *Expert Rev Anticancer Ther* **8**, 1689-1698.

Choi J. and Donehower L. A. (1999). p53 in embryonic development: maintaining a fine balance. *Cell Mol Life Sci* **55**, 38-47.

Ciarloni L., Mallepell S. and Brisken C. (2007). Amphiregulin is an essential mediator of estrogen receptor alpha function in mammary gland development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 5455-5460.

Cicalese A., Bonizzi G., Pasi C. E., Faretta M., Ronzoni S., Giulini B., Brisken C., Minucci S., Di Fiore P. P. and Pelicci P. G. (2009). The tumor suppressor p53 regulates polarity of self-renewing divisions in mammary stem cells. *Cell* **138**, 1083-1095.

Claassen G. F. and Hann S. R. (2000). A role for transcriptional repression of p21CIP1 by c-Myc in overcoming transforming growth factor beta -induced cell-cycle arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 9498-9503.

Cleton-Jansen A. M. (2002). E-cadherin and loss of heterozygosity at chromosome 16 in breast carcinogenesis: different genetic pathways in ductal and lobular breast cancer? *Breast Cancer Res* **4**, 5-8.

Clevers H. (2011). The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nat Med* **17**, 313-319.

Colaluca I. N., Tosoni D., Nuciforo P., Senic-Matuglia F., Galimberti V., Viale G., Pece S. and Di Fiore P. P. (2008). NUMB controls p53 tumour suppressor activity. *Nature* **451**, 76-80.

Conneely O. M., Jericevic B. M. and Lydon J. P. (2003). Progesterone receptors in mammary gland development and tumorigenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **8**, 205-214.

Cowling V. H. and Cole M. D. (2006). Mechanism of transcriptional activation by the Myc oncoproteins. *Semin Cancer Biol* **16**, 242-252.

Curtis C., Shah S. P., Chin S. F., Turashvili G., Rueda O. M., Dunning M. J., Speed D., Lynch A. G., Samarajiwa S., Yuan Y., Graf S., Ha G., Haffari G., Bashashati A., Russell R., McKinney S., Langerod A., Green A., Provenzano E., Wishart G., Pinder S., Watson P., Markowetz F., Murphy L., Ellis I., Purushotham A., Borresen-Dale A. L., Brenton J. D., Tavare S., Caldas C. and Aparicio S. (2012). The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature* **486**, 346-352.

Dahm-Daphi J., Hubbe P., Horvath F., El-Awady R. A., Bouffard K. E., Powell S. N. and Willers H. (2005). Nonhomologous end-joining of site-specific but not of radiation-

induced DNA double-strand breaks is reduced in the presence of wild-type p53. *Oncogene* **24**, 1663-1672.

Dalla-Favera R., Bregni M., Erikson J., Patterson D., Gallo R. C. and Croce C. M. (1982). Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 7824-7827.

Damalas A., Ben-Ze'ev A., Simcha I., Shtutman M., Leal J. F., Zhurinsky J., Geiger B. and Oren M. (1999). Excess beta-catenin promotes accumulation of transcriptionally active p53. *Embo J* **18**, 3054-3063.

Dang C. V. (2012). MYC on the path to cancer. *Cell* **149**, 22-35.

Daniel C. W., De Ome K. B., Young J. T., Blair P. B. and Faulkin L. J., Jr. (1968). The in vivo life span of normal and preneoplastic mouse mammary glands: a serial transplantation study. *Proc Natl Acad Sci U S A* **61**, 53-60.

Daniel C. W., Silberstein G. B. and Strickland P. (1987). Direct action of 17 beta-estradiol on mouse mammary ducts analyzed by sustained release implants and steroid autoradiography. *Cancer Res* **47**, 6052-6057.

de Alboran I. M., O'Hagan R. C., Gartner F., Malynn B., Davidson L., Rickert R., Rajewsky K., DePinho R. A. and Alt F. W. (2001). Analysis of C-MYC function in normal cells via conditional gene-targeted mutation. *Immunity* **14**, 45-55.

de Beco S., Ziosi M. and Johnston L. A. (2012). New frontiers in cell competition. *Dev Dyn* **241**, 831-841.

de Cremoux P., Salomon A. V., Liva S., Dendale R., Bouchind'homme B., Martin E., Sastre-Garau X., Magdelenat H., Fourquet A. and Soussi T. (1999). p53 mutation as a genetic trait of typical medullary breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* **91**, 641-643.

Deming S. L., Nass S. J., Dickson R. B. and Trock B. J. (2000). C-myc amplification in breast cancer: a meta-analysis of its occurrence and prognostic relevance. *Br J Cancer* **83**, 1688-1695.

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., Teuliere J., Faraldo M. M., Thiery J. P. and Glukhova M. A. (2002). The importance of being a myoepithelial cell. *Breast Cancer Res* **4**, 224-230.

Dews M., Homayouni A., Yu D., Murphy D., Sevignani C., Wentzel E., Furth E. E., Lee W. M., Enders G. H., Mendell J. T. and Thomas-Tikhonenko A. (2006). Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster. *Nat Genet* **38**, 1060-1065.

DiMeo T. A., Anderson K., Phadke P., Fan C., Perou C. M., Naber S. and Kuperwasser C. (2009). A novel lung metastasis signature links Wnt signaling with cancer cell self-renewal and epithelial-mesenchymal transition in basal-like breast cancer. *Cancer Res* **69**, 5364-5373.

Djonov V., Andres A. C. and Ziemiecki A. (2001). Vascular remodelling during the normal and malignant life cycle of the mammary gland. *Microsc Res Tech* **52**, 182-189.

Dolled-Filhart M., McCabe A., Giltnane 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.

Donehower L. A. (2009). Using mice to examine p53 functions in cancer, aging, and longevity. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**, a001081.

Donehower L. A., Harvey M., Slagle B. L., McArthur M. J., Montgomery C. A., Jr., Butel J. S. and Bradley A. (1992). Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* **356**, 215-221.

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.

Dumaz N. and Meek D. W. (1999). Serine15 phosphorylation stimulates p53 transactivation but does not directly influence interaction with HDM2. *Embo J* **18**, 7002-7010.

Eilers M. and Eisenman R. N. (2008). Myc's broad reach. *Genes Dev* **22**, 2755-2766.

Eizenberg O., Faber-Elman A., Gottlieb E., Oren M., Rotter V. and Schwartz M. (1996). p53 plays a regulatory role in differentiation and apoptosis of central nervous system-associated cells. *Mol Cell Biol* **16**, 5178-5185.

el-Deiry W. S., Kern S. E., Pietenpol J. A., Kinzler K. W. and Vogelstein B. (1992). Definition of a consensus binding site for p53. *Nat Genet* **1**, 45-49.

el-Deiry W. S., Tokino T., Velculescu V. E., Levy D. B., Parsons R., Trent J. M., Lin D., Mercer W. E., Kinzler K. W. and Vogelstein B. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* **75**, 817-825.

Ewan K. B., Shyamala G., Ravani S. A., Tang Y., Akhurst R., Wakefield L. and Barcellos-Hoff M. H. (2002). Latent transforming growth factor-beta activation in mammary gland: regulation by ovarian hormones affects ductal and alveolar proliferation. *Am J Pathol* **160**, 2081-2093.

Fadare O. and Tavassoli F. A. (2007). The phenotypic spectrum of basal-like breast cancers: a critical appraisal. *Adv Anat Pathol* **14**, 358-373.

Faraldo M. M., Teuliere J., Deugnier M. A., Taddei-De La Hosseraye I., Thiery J. P. and Glukhova M. A. (2005). Myoepithelial cells in the control of mammary development and tumorigenesis: data from genetically modified mice. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **10**, 211-219.

Farmer P., Bonnefoi H., Becette V., Tubiana-Hulin M., Fumoleau P., Larsimont D., Macgrogan G., Bergh J., Cameron D., Goldstein D., Duss S., Nicoulaz A. L., Brisken C., Fiche M., Delorenzi M. and Iggo R. (2005). Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. *Oncogene* **24**, 4660-4671.

Fata J. E., Kong Y. Y., Li J., Sasaki T., Irie-Sasaki J., Moorehead R. A., Elliott R., Scully S., Voura E. B., Lacey D. L., Boyle W. J., Khokha R. and Penninger J. M. (2000). The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development. *Cell* **103**, 41-50.

Feng Y., Manka D., Wagner K. U. and Khan S. A. (2007). Estrogen receptor-alpha expression in the mammary epithelium is required for ductal and alveolar morphogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 14718-14723.

Feng Z., Zhang C., Wu R. and Hu W. (2011). Tumor suppressor p53 meets microRNAs. *J Mol Cell Biol* **3**, 44-50.

Fernandez P. C., Frank S. R., Wang L., Schroeder M., Liu S., Greene J., Cocito A. and Amati B. (2003). Genomic targets of the human c-Myc protein. *Genes Dev* **17**, 1115-1129.

Fiucci G., Beaucourt S., Duflaut D., Lespagnol A., Stumptner-Cuvelette P., Geant A., Buchwalter G., Tuynder M., Susini L., Lassalle J. M., Wasylyk C., Wasylyk B., Oren M., Amson R. and Telerman A. (2004). Siah-1b is a direct transcriptional target of p53: identification of the functional p53 responsive element in the siah-1b promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 3510-3515.

Flores I. and Blasco M. A. (2009). A p53-dependent response limits epidermal stem cell functionality and organismal size in mice with short telomeres. *PLoS One* **4**, e4934.

Forster C., Makela S., Warri A., Kietz S., Becker D., Hultenby K., Warner M. and Gustafsson J. A. (2002). Involvement of estrogen receptor beta in terminal differentiation of mammary gland epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 15578-15583.

Fujii H., Marsh C., Cairns P., Sidransky D. and Gabrielson E. (1996). Genetic divergence in the clonal evolution of breast cancer. *Cancer Res* **56**, 1493-1497.

Gandarillas A. and Watt F. M. (1997). c-Myc promotes differentiation of human epidermal stem cells. *Genes Dev* **11**, 2869-2882.

Gao P., Tchernyshyov I., Chang T. C., Lee Y. S., Kita K., Ochi T., Zeller K. I., De Marzo A. M., Van Eyk J. E., Mendell J. T. and Dang C. V. (2009). c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. *Nature* **458**, 762-765.

Gatza M. L., Lucas J. E., Barry W. T., Kim J. W., Wang Q., Crawford M. D., Datto M. B., Kelley M., Mathey-Prevot B., Potti A. and Nevins J. R. (2010). A pathway-based classification of human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 6994-6999.

Giles R. H., van Es J. H. and Clevers H. (2003). Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta* **1653**, 1-24.

Ginestier C., Hur M. H., Charafe-Jauffret E., Monville F., Dutcher J., Brown M., Jacquemier J., Viens P., Kleer C. G., Liu S., Schott A., Hayes D., Birnbaum D., Wicha M. S. and Dontu G. (2007). ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell* **1**, 555-567.

Godar S., Ince T. A., Bell G. W., Feldser D., Donaher J. L., Bergh J., Liu A., Miu K., Watnick R. S., Reinhardt F., McAllister S. S., Jacks T. and Weinberg R. A. (2008). Growth-inhibitory and tumor- suppressive functions of p53 depend on its repression of CD44 expression. *Cell* **134**, 62-73.

Green K. A. and Lund L. R. (2005). ECM degrading proteases and tissue remodelling in the mammary gland. *Bioessays* **27**, 894-903.

Guo W., Keckesova Z., Donaher J. L., Shibue T., Tischler V., Reinhardt F., Itzkovitz S., Noske A., Zurrer-Hardi U., Bell G., Tam W. L., Mani S. A., van Oudenaarden A. and Weinberg R. A. (2012). Slug and Sox9 cooperatively determine the mammary stem cell state. *Cell* **148**, 1015-1028.

Haupt Y., Maya R., Kazaz A. and Oren M. (1997). Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* **387**, 296-299.

He L., Thomson J. M., Hemann M. T., Hernando-Monge E., Mu D., Goodson S., Powers S., Cordon-Cardo C., Lowe S. W., Hannon G. J. and Hammond S. M. (2005). A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* **435**, 828-833.

He T. C., Sparks A. B., Rago C., Hermeking H., Zawel L., da Costa L. T., Morin P. J., Vogelstein B. and Kinzler K. W. (1998). Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* **281**, 1509-1512.

Hens J. R. and Wysolmerski J. J. (2005). Key stages of mammary gland development: molecular mechanisms involved in the formation of the embryonic mammary gland. *Breast Cancer Res* **7**, 220-224.

Hermeking H., Rago C., Schuhmacher M., Li Q., Barrett J. F., Obaya A. J., O'Connell B. C., Mateyak M. K., Tam W., Kohlhuber F., Dang C. V., Sedivy J. M., Eick D., Vogelstein B. and Kinzler K. W. (2000). Identification of CDK4 as a target of c-MYC. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 2229-2234.

Hinck L. and Silberstein G. B. (2005). Key stages in mammary gland development: the mammary end bud as a motile organ. *Breast Cancer Res* **7**, 245-251.

Honda R. and Yasuda H. (1999). Association of p19(ARF) with Mdm2 inhibits ubiquitin ligase activity of Mdm2 for tumor suppressor p53. *Embo J* **18**, 22-27.

Hong H., Takahashi K., Ichisaka T., Aoi T., Kanagawa O., Nakagawa M., Okita K. and Yamanaka S. (2009). Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway. *Nature* **460**, 1132-1135.

Horiuchi D., Kusdra L., Huskey N. E., Chandriani S., Lenburg M. E., Gonzalez-Angulo A. M., Creasman K. J., Bazarov A. V., Smyth J. W., Davis S. E., Yaswen P., Mills G. B., Esserman L. J. and Goga A. (2012). MYC pathway activation in triple-negative breast cancer is synthetic lethal with CDK inhibition. *J Exp Med* **209**, 679-696.

Hoshimaru M., Ray J., Sah D. W. and Gage F. H. (1996). Differentiation of the immortalized adult neuronal progenitor cell line HC2S2 into neurons by regulatable suppression of the v-myc oncogene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 1518-1523.

Hovey R. C., Trott J. F. and Vonderhaar B. K. (2002). Establishing a framework for the functional mammary gland: from endocrinology to morphology. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **7**, 17-38.

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 Z., Kawase-Koga Y., Zhang S., Visvader J., Toth M., Walsh C. A. and Sun T. (2009). Transcription factor Lmo4 defines the shape of functional areas in developing cortices and regulates sensorimotor control. *Dev Biol* **327**, 132-142.

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.

Iritani B. M. and Eisenman R. N. (1999). c-Myc enhances protein synthesis and cell size during B lymphocyte development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13180-13185.

Isobe M., Emanuel B. S., Givol D., Oren M. and Croce C. M. (1986). Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. *Nature* **320**, 84-85.

Iwai A., Marusawa H., Matsuzawa S., Fukushima T., Hijikata M., Reed J. C., Shimotohno K. and Chiba T. (2004). Siah-1L, a novel transcript variant belonging to the human Siah family of proteins, regulates beta-catenin activity in a p53-dependent manner. *Oncogene* **23**, 7593-7600.

Jacobs J. J., Scheijen B., Voncken J. W., Kieboom K., Berns A. and van Lohuizen M. (1999). Bmi-1 collaborates with c-Myc in tumorigenesis by inhibiting c-Myc-induced apoptosis via INK4a/ARF. *Genes Dev* **13**, 2678-2690.

Jamerson M. H., Johnson M. D. and Dickson R. B. (2004). Of mice and Myc: c-Myc and mammary tumorigenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **9**, 27-37.

Jerry D. J., Kuperwasser C., Downing S. R., Pinkas J., He C., Dickinson E., Marconi S. and Naber S. P. (1998). Delayed involution of the mammary epithelium in BALB/c-p53null mice. *Oncogene* **17**, 2305-2312.

Jiang D., Lenardo M. J. and Zuniga-Pflucker J. C. (1996). p53 prevents maturation to the CD4+CD8+ stage of thymocyte differentiation in the absence of T cell receptor rearrangement. *J Exp Med* **183**, 1923-1928.

Jones F. E., Welte T., Fu X. Y. and Stern D. F. (1999). ErbB4 signaling in the mammary gland is required for lobuloalveolar development and Stat5 activation during lactation. *J Cell Biol* **147**, 77-88.

Jonkers J., Meuwissen R., van der Gulden H., Peterse H., van der Valk M. and Berns A. (2001). Synergistic tumor suppressor activity of BRCA2 and p53 in a conditional mouse model for breast cancer. *Nat Genet* **29**, 418-425.

Joshi P. A., Jackson H. W., Beristain A. G., Di Grappa M. A., Mote P. A., Clarke C. L., Stingl J., Waterhouse P. D. and Khokha R. (2010). Progesterone induces adult mammary stem cell expansion. *Nature* **465**, 803-807.

Juin P., Hunt A., Littlewood T., Griffiths B., Swigart L. B., Korsmeyer S. and Evan G. (2002). c-Myc functionally cooperates with Bax to induce apoptosis. *Mol Cell Biol* **22**, 6158-6169.

Kaghad M., Bonnet H., Yang A., Creancier L., Biscan J. C., Valent A., Minty A., Chalon P., Lelias J. M., Dumont X., Ferrara P., McKeon F. and Caput D. (1997). Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell* **90**, 809-819.

Karnoub A. E., Dash A. B., Vo A. P., Sullivan A., Brooks M. W., Bell G. W., Richardson A. L., Polyak K., Tubo R. and Weinberg R. A. (2007). Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* **449**, 557-563.

Kawamura T., Suzuki J., Wang Y. V., Menendez S., Morera L. B., Raya A., Wahl G. M. and Belmonte J. C. (2009). Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming. *Nature* **460**, 1140-1144.

Keller P. J., Arendt L. M., Skibinski A., Logvinenko T., Klebba I., Dong S., Smith A. E., Prat A., Perou C. M., Gilmore H., Schnitt S., Naber S. P., Garlick J. A. and Kuperwasser C. (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.

Khramtsov A. I., Khramtsova G. F., Tretiakova M., Huo D., Olopade O. I. and Goss K. H. (2010). Wnt/beta-catenin pathway activation is enriched in basal-like breast cancers and predicts poor outcome. *Am J Pathol* **176**, 2911-2920.

Kim N. H., Kim H. S., Li X. Y., Lee I., Choi H. S., Kang S. E., Cha S. Y., Ryu J. K., Yoon D., Fearon E. R., Rowe R. G., Lee S., Maher C. A., Weiss S. J. and Yook J. I. (2011a). A p53/miRNA-34 axis regulates Snail1-dependent cancer cell epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol* **195**, 417-433.

Kim T., Veronese A., Pichiorri F., Lee T. J., Jeon Y. J., Volinia S., Pineau P., Marchio A., Palatini J., Suh S. S., Alder H., Liu C. G., Dejean A. and Croce C. M. (2011b). p53 regulates epithelial-mesenchymal transition through microRNAs targeting ZEB1 and ZEB2. *J Exp Med* **208**, 875-883.

Kleinberg D. L., Feldman M. and Ruan W. (2000). IGF-I: an essential factor in terminal end bud formation and ductal morphogenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **5**, 7-17.

Klinakis A., Szabolcs M., Politi K., Kiaris H., Artavanis-Tsakonas S. and Efstratiadis A. (2006). Myc is a Notch1 transcriptional target and a requisite for Notch1-induced mammary tumorigenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 9262-9267.

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.

Kress M., May E., Cassingena R. and May P. (1979). Simian virus 40-transformed cells express new species of proteins precipitable by anti-simian virus 40 tumor serum. *J Virol* **31**, 472-483.

Kritikou E. A., Sharkey A., Abell K., Came P. J., Anderson E., Clarkson R. W. and Watson C. J. (2003). A dual, non-redundant, role for LIF as a regulator of development and STAT3-mediated cell death in mammary gland. *Development* **130**, 3459-3468.

Kubbutat M. H., Jones S. N. and Vousden K. H. (1997). Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* **387**, 299-303.

Kuukasjarvi T., Tanner M., Pennanen S., Karhu R., Kallioniemi O. P. and Isola J. (1997). Genetic changes in intraductal breast cancer detected by comparative genomic hybridization. *Am J Pathol* **150**, 1465-1471.

La Rocca S. A., Crouch D. H. and Gillespie D. A. (1994). c-Myc inhibits myogenic differentiation and myoD expression by a mechanism which can be dissociated from cell transformation. *Oncogene* **9**, 3499-3508.

Lacroix M., Toillon R. A. and Leclercq G. (2006). p53 and breast cancer, an update. *Endocr Relat Cancer* **13**, 293-325.

Lane D. P. (1992). Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* **358**, 15-16.

Lane D. P. and Crawford L. V. (1979). T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* **278**, 261-263.

Lane T. F. and Leder P. (1997). Wnt-10b directs hypermorphic development and transformation in mammary glands of male and female mice. *Oncogene* **15**, 2133-2144.

Lapidot T., Sirard C., Vormoor J., Murdoch B., Hoang T., Caceres-Cortes J., Minden M., Paterson B., Caligiuri M. A. and Dick J. E. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* **367**, 645-648.

Laurenti E., Varnum-Finney B., Wilson A., Ferrero I., Blanco-Bose W. E., Ehninger A., Knoepfler P. S., Cheng P. F., MacDonald H. R., Eisenman R. N., Bernstein I. D. and Trumpp A. (2008). Hematopoietic stem cell function and survival depend on c-Myc and N-Myc activity. *Cell Stem Cell* **3**, 611-624.

Laurenti E., Wilson A. and Trumpp A. (2009). Myc's other life: stem cells and beyond. *Curr Opin Cell Biol* **21**, 844-854.

Li H., Collado M., Villasante A., Strati K., Ortega S., Canamero M., Blasco M. A. and Serrano M. (2009). The Ink4/Arf locus is a barrier for iPS cell reprogramming. *Nature* **460**, 1136-1139.

Lim E., Vaillant F., Wu D., Forrest N. C., Pal B., Hart A. H., Asselin-Labat M. L., Gyorki D. E., Ward T., Partanen A., Feleppa F., Huschtscha L. I., Thorne H. J., Fox S. B., Yan M., French J. D., Brown M. A., Smyth G. K., Visvader J. E. and Lindeman G. J. (2009). Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers. *Nat Med* **15**, 907-913.

Lin S. Y., Xia W., Wang J. C., Kwong K. Y., Spohn B., Wen Y., Pestell R. G. and Hung M. C. (2000). Beta-catenin, a novel prognostic marker for breast cancer: its roles in cyclin D1 expression and cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 4262-4266.

Lin T., Chao C., Saito S., Mazur S. J., Murphy M. E., Appella E. and Xu Y. (2005). p53 induces differentiation of mouse embryonic stem cells by suppressing Nanog expression. *Nat Cell Biol* **7**, 165-171.

Linzer D. I. and Levine A. J. (1979). Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* **17**, 43-52.

Liu S., Dontu G., Mantle I. D., Patel S., Ahn N. S., Jackson K. W., Suri P. and Wicha M. S. (2006). Hedgehog signaling and Bmi-1 regulate self-renewal of normal and malignant human mammary stem cells. *Cancer Res* **66**, 6063-6071.

Liu Z. G., Liu L., Xu L. H., Yi W., Tao Y. L., Tu Z. W., Li M. Z., Zeng M. S. and Xia Y. F. (2012). Bmi-1 induces radioresistance in MCF-7 mammary carcinoma cells. *Oncol Rep* **27**, 1116-1122.

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.

Lowe S. W., Bodis S., McClatchey A., Remington L., Ruley H. E., Fisher D. E., Housman D. E. and Jacks T. (1994). p53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo. *Science* **266**, 807-810.

Luetteke N. C., Qiu T. H., Fenton S. E., Troyer K. L., Riedel R. F., Chang A. and Lee D. C. (1999). Targeted inactivation of the EGF and amphiregulin genes reveals distinct roles for EGF receptor ligands in mouse mammary gland development. *Development* **126**, 2739-2750.

Lydon J. P., DeMayo F. J., Funk C. R., Mani S. K., Hughes A. R., Montgomery C. A., Jr., Shyamala G., Conneely O. M. and O'Malley B. W. (1995). Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes Dev* **9**, 2266-2278.

Ma L., Young J., Prabhala H., Pan E., Mestdagh P., Muth D., Teruya-Feldstein J., Reinhardt F., Onder T. T., Valastyan S., Westermann F., Speleman F., Vandesompele J. and Weinberg R. A. (2010). miR-9, a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis. *Nat Cell Biol* **12**, 247-256.

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.

Mailleux A. A., Overholtzer M., Schmelzle T., Bouillet P., Strasser A. and Brugge J. S. (2007). BIM regulates apoptosis during mammary ductal morphogenesis, and its absence reveals alternative cell death mechanisms. *Dev Cell* **12**, 221-234.

Mailleux A. A., Spencer-Dene B., Dillon C., Ndiaye D., Savona-Baron C., Itoh N., Kato S., Dickson C., Thiery J. P. and Bellusci S. (2002). Role of FGF10/FGFR2b signaling during mammary gland development in the mouse embryo. *Development* **129**, 53-60.

Mallepell S., Krust A., Chambon P. and Brisken C. (2006). Paracrine signaling through the epithelial estrogen receptor alpha is required for proliferation and morphogenesis in the mammary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 2196-2201.

Maller O., Martinson H. and Schedin P. (2010). Extracellular matrix composition reveals complex and dynamic stromal-epithelial interactions in the mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **15**, 301-318.

Malynn B. A., de Alboran I. M., O'Hagan R. C., Bronson R., Davidson L., DePinho R. A. and Alt F. W. (2000). N-myc can functionally replace c-myc in murine development, cellular growth, and differentiation. *Genes Dev* **14**, 1390-1399.

Mani S. A., Guo W., Liao M. J., Eaton E. N., Ayyanan A., Zhou A. Y., Brooks M., Reinhard F., Zhang C. C., Shipitsin M., Campbell L. L., Polyak K., Brisken C., Yang J. and Weinberg R. A. (2008). The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* **133**, 704-715.

Marhin W. W., Chen S., Facchini L. M., Fornace A. J., Jr. and Penn L. Z. (1997). Myc represses the growth arrest gene gadd45. *Oncogene* **14**, 2825-2834.

Marion R. M., Strati K., Li H., Murga M., Blanco R., Ortega S., Fernandez-Capetillo O., Serrano M. and Blasco M. A. (2009). A p53-mediated DNA damage response limits reprogramming to ensure iPS cell genomic integrity. *Nature* **460**, 1149-1153.

May P. and May E. (1999). Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene* **18**, 7621-7636.

Medina D., Kittrell F. S., Shepard A., Stephens L. C., Jiang C., Lu J., Allred D. C., McCarthy M. and Ullrich R. L. (2002). Biological and genetic properties of the p53 null preneoplastic mammary epithelium. *FASEB J* **16**, 881-883.

Melero J. A., Stitt D. T., Mangel W. F. and Carroll R. B. (1979). Identification of new polypeptide species (48-55K) immunoprecipitable by antiserum to purified large T antigen and present in SV40-infected and -transformed cells. *Virology* **93**, 466-480.

Menendez D., Inga A. and Resnick M. A. (2009). The expanding universe of p53 targets. *Nat Rev Cancer* **9**, 724-737.

Meniel V., Hay T., Douglas-Jones A., Sansom O. J. and Clarke A. R. (2005). Mutations in Apc and p53 synergize to promote mammary neoplasia. *Cancer Res* **65**, 410-416.

Menssen A. and Hermeking H. (2002). Characterization of the c-MYC-regulated transcriptome by SAGE: identification and analysis of c-MYC target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 6274-6279.

Merlo L. M., Pepper J. W., Reid B. J. and Maley C. C. (2006). Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nat Rev Cancer* **6**, 924-935.

Meyer N. and Penn L. Z. (2008). Reflecting on 25 years with MYC. *Nat Rev Cancer* **8**, 976-990.

Mihara M., Erster S., Zaika A., Petrenko O., Chittenden T., Pancoska P. and Moll U. M. (2003). p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell* **11**, 577-590.

Miyoshi K., Shillingford J. M., Smith G. H., Grimm S. L., Wagner K. U., Oka T., Rosen J. M., Robinson G. W. and Hennighausen L. (2001). Signal transducer and activator of transcription (Stat) 5 controls the proliferation and differentiation of mammary alveolar epithelium. *J Cell Biol* **155**, 531-542.

Mizuno H., Spike B. T., Wahl G. M. and Levine A. J. (2010). Inactivation of p53 in breast cancers correlates with stem cell transcriptional signatures. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 22745-22750.

Molofsky A. V., Pardal R., Iwashita T., Park I. K., Clarke M. F. and Morrison S. J. (2003). Bmi-1 dependence distinguishes neural stem cell self-renewal from progenitor proliferation. *Nature* **425**, 962-967.

Molyneux G., Geyer F. C., Magnay F. A., McCarthy A., Kendrick H., Natrajan R., Mackay A., Grigoriadis A., Tutt A., Ashworth A., Reis-Filho J. S. and Smalley M. J. (2010). BRCA1 basal-like breast cancers originate from luminal epithelial progenitors and not from basal stem cells. *Cell Stem Cell* **7**, 403-417.

Morel A. P., Lievre M., Thomas C., Hinkal G., Ansieau S. and Puisieux A. (2008). Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One* **3**, e2888.

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., 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.

Mueller S. O., Clark J. A., Myers P. H. and Korach K. S. (2002). Mammary gland development in adult mice requires epithelial and stromal estrogen receptor alpha. *Endocrinology* **143**, 2357-2365.

Mulac-Jericevic B., Lydon J. P., DeMayo F. J. and Conneely O. M. (2003). Defective mammary gland morphogenesis in mice lacking the progesterone receptor B isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 9744-9749.

Mulac-Jericevic B., Mullinax R. A., DeMayo F. J., Lydon J. P. and Conneely O. M. (2000). Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform. *Science* **289**, 1751-1754.

Muncan V., Sansom O. J., Tertoolen L., Phesse T. J., Begthel H., Sancho E., Cole A. M., Gregorieff A., de Alboran I. M., Clevers H. and Clarke A. R. (2006). Rapid loss of intestinal crypts upon conditional deletion of the Wnt/Tcf-4 target gene c-Myc. *Mol Cell Biol* **26**, 8418-8426.

Nakagawa M., Koyanagi M., Tanabe K., Takahashi K., Ichisaka T., Aoi T., Okita K., Mochiduki Y., Takizawa N. and Yamanaka S. (2008). Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* **26**, 101-106.

Neville M. C., McFadden T. B. and Forsyth I. (2002). Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **7**, 49-66.

Neville M. C., Medina D., Monks J. and Hovey R. C. (1998). The mammary fat pad. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **3**, 109-116.

Nevins J. R. (2001). The Rb/E2F pathway and cancer. *Hum Mol Genet* **10**, 699-703.

Nguyen A. V. and Pollard J. W. (2000). Transforming growth factor beta3 induces cell death during the first stage of mammary gland involution. *Development* **127**, 3107-3118.

Nguyen H. Q., Selvakumaran M., Liebermann D. A. and Hoffman B. (1995). Blocking c-Myc and Max expression inhibits proliferation and induces differentiation of normal and leukemic myeloid cells. *Oncogene* **11**, 2439-2444.

Nicol C. J., Harrison M. L., Laposa R. R., Gimelshtein I. L. and Wells P. G. (1995). A teratologic suppressor role for p53 in benzo[a]pyrene-treated transgenic p53-deficient mice. *Nat Genet* **10**, 181-187.

Norimura T., Nomoto S., Katsuki M., Gondo Y. and Kondo S. (1996). p53-dependent apoptosis suppresses radiation-induced teratogenesis. *Nat Med* **2**, 577-580.

Nowell P. C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* **194**, 23-28.

O'Donnell K. A., Wentzel E. A., Zeller K. I., Dang C. V. and Mendell J. T. (2005). c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* **435**, 839-843.

Oakes S. R., Naylor M. J., Asselin-Labat M. L., Blazek K. D., Gardiner-Garden M., Hilton H. N., Kazlauskas M., Pritchard M. A., Chodosh L. A., Pfeffer P. L., Lindeman G. J., Visvader J. E. and Ormandy C. J. (2008). The Ets transcription factor Elf5 specifies mammary alveolar cell fate. *Genes Dev* **22**, 581-586.

Olivier M., Hollstein M. and Hainaut P. (2010). TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a001008.

Olivier M., Langerod A., Carrieri P., Bergh J., Klaar S., Eyfjord J., Theillet C., Rodriguez C., Lidereau R., Bieche I., Varley J., Bignon Y., Uhrhammer N., Winqvist R., Jukkola-Vuorinen A., Niederacher D., Kato S., Ishioka C., Hainaut P. and Borresen-Dale A. L. (2006). The clinical value of somatic TP53 gene mutations in 1,794 patients with breast cancer. *Clin Cancer Res* **12**, 1157-1167.

Oren M. (1985). The p53 cellular tumor antigen: gene structure, expression and protein properties. *Biochim Biophys Acta* **823**, 67-78.

Ormandy C. J., Camus A., Barra J., Damotte D., Lucas B., Buteau H., Edery M., Brousse N., Babinet C., Binart N. and Kelly P. A. (1997). Null mutation of the prolactin receptor gene produces multiple reproductive defects in the mouse. *Genes Dev* **11**, 167-178.

Osthus R. C., Shim H., Kim S., Li Q., Reddy R., Mukherjee M., Xu Y., Wonsey D., Lee L. A. and Dang C. V. (2000). Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc. *J Biol Chem* **275**, 21797-21800.

Park I. K., Qian D., Kiel M., Becker M. W., Pihalja M., Weissman I. L., Morrison S. J. and Clarke M. F. (2003). Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. *Nature* **423**, 302-305.

Parsa S., Ramasamy S. K., De Langhe S., Gupte V. V., Haigh J. J., Medina D. and Bellusci S. (2008). Terminal end bud maintenance in mammary gland is dependent upon FGFR2b signaling. *Dev Biol* **317**, 121-131.

Perou C. M., Sorlie T., Eisen M. B., van de Rijn M., Jeffrey S. S., Rees C. A., Pollack J. R., Ross D. T., Johnsen H., Akslen L. A., Fluge O., Pergamenschikov A., Williams C., Zhu S. X., Lonning P. E., Borresen-Dale A. L., Brown P. O. and Botstein D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**, 747-752.

Peukert K., Staller P., Schneider A., Carmichael G., Hanel F. and Eilers M. (1997). An alternative pathway for gene regulation by Myc. *Embo J* **16**, 5672-5686.

Pharoah P. D., Day N. E. and Caldas C. (1999). Somatic mutations in the p53 gene and prognosis in breast cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer* **80**, 1968-1973.

Pietersen A. M., Evers B., Prasad A. A., Tanger E., Cornelissen-Steijger P., Jonkers J. and van Lohuizen M. (2008). Bmi1 regulates stem cells and proliferation and differentiation of committed cells in mammary epithelium. *Curr Biol* **18**, 1094-1099.

Place A. E., Jin Huh S. and Polyak K. (2011). The microenvironment in breast cancer progression: biology and implications for treatment. *Breast Cancer Res* **13**, 227.

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.

Proia T. A., Keller P. J., Gupta P. B., Klebba I., Jones A. D., Sedic M., Gilmore H., Tung N., Naber S. P., Schnitt S., Lander E. S. and Kuperwasser C. (2011). Genetic predisposition directs breast cancer phenotype by dictating progenitor cell fate. *Cell Stem Cell* **8**, 149-163.

Quarrie L. H., Addey C. V. and Wilde C. J. (1996). Programmed cell death during mammary tissue involution induced by weaning, litter removal, and milk stasis. *J Cell Physiol* **168**, 559-569.

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. and Jorcano J. L. (2004). A keratin K5Cre transgenic line appropriate for tissue-specific or generalized Cre-mediated recombination. *Genesis* **39**, 52-57.

Raymond K., Faraldo M. M., Deugnier M. A. and Glukhova M. A. (2012). Integrins in mammary development. *Semin Cell Dev Biol* **23**, 599-605.

Reed K. R., Athineos D., Meniel V. S., Wilkins J. A., Ridgway R. A., Burke Z. D., Muncan V., Clarke A. R. and Sansom O. J. (2008). B-catenin deficiency, but not Myc deletion, suppresses the immediate phenotypes of APC loss in the liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 18919-18923.

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.

Reinhardt H. C. and Schumacher B. (2012). The p53 network: cellular and systemic DNA damage responses in aging and cancer. *Trends Genet* **28**, 128-136.

Reis-Filho J. S. and Pusztai L. (2011). Gene expression profiling in breast cancer: classification, prognostication, and prediction. *Lancet* **378**, 1812-1823.

Reya T., Morrison S. J., Clarke M. F. and Weissman I. L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **414**, 105-111.

Richert M. M., Schwertfeger K. L., Ryder J. W. and Anderson S. M. (2000). An atlas of mouse mammary gland development. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **5**, 227-241.

Ridgeway A. G., McMenamin J. and Leder P. (2006). P53 levels determine outcome during beta-catenin tumor initiation and metastasis in the mammary gland and male germ cells. *Oncogene* **25**, 3518-3527.

Robinson G. W. (2007). Cooperation of signalling pathways in embryonic mammary gland development. *Nat Rev Genet* **8**, 963-972.

Rodler E., Korde L. and Gralow J. (2010). Current treatment options in triple negative breast cancer. *Breast Dis* **32**, 99-122.

Rotter V., Witte O. N., Coffman R. and Baltimore D. (1980). Abelson murine leukemia virus-induced tumors elicit antibodies against a host cell protein, P50. *J Virol* **36**, 547-555.

Rowlands T. M., Pechenkina I. V., Hatsell S. J., Pestell R. G. and Cowin P. (2003). Dissecting the roles of beta-catenin and cyclin D1 during mammary development and neoplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 11400-11405.

Ruan W., Newman C. B. and Kleinberg D. L. (1992). Intact and amino-terminally shortened forms of insulin-like growth factor I induce mammary gland differentiation and development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 10872-10876.

Sansom O. J., Meniel V. S., Muncan V., Phesse T. J., Wilkins J. A., Reed K. R., Vass J. K., Athineos D., Clevers H. and Clarke A. R. (2007). Myc deletion rescues Apc deficiency in the small intestine. *Nature* **446**, 676-679.

Schere-Levy C., Buggiano V., Quaglino A., Gattelli A., Cirio M. C., Piazzon I., Vanzulli S. and Kordon E. C. (2003). Leukemia inhibitory factor induces apoptosis of the mammary epithelial cells and participates in mouse mammary gland involution. *Exp Cell Res* **282**, 35-47.

Schoenenberger C. A., Andres A. C., Groner B., van der Valk M., LeMeur M. and Gerlinger P. (1988). Targeted c-myc gene expression in mammary glands of transgenic mice induces mammary tumours with constitutive milk protein gene transcription. *Embo J* **7**, 169-175.

Seagroves T. N., Krnacik S., Raught B., Gay J., Burgess-Beusse B., Darlington G. J. and Rosen J. M. (1998). C/EBPbeta, but not C/EBPalpha, is essential for ductal morphogenesis, lobuloalveolar proliferation, and functional differentiation in the mouse mammary gland. *Genes Dev* **12**, 1917-1928.

Sears R., Ohtani K. and Nevins J. R. (1997). Identification of positively and negatively acting elements regulating expression of the E2F2 gene in response to cell growth signals. *Mol Cell Biol* **17**, 5227-5235.

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.

Shakhova O., Leung C. and Marino S. (2005). Bmi1 in development and tumorigenesis of the central nervous system. *J Mol Med (Berl)* **83**, 596-600.

Shipitsin M., Campbell L. L., Argani P., Weremowicz S., Bloushtain-Qimron N., Yao J., Nikolskaya T., Serebryiskaya T., Beroukhim R., Hu M., Halushka M. K., Sukumar S., Parker L. M., Anderson K. S., Harris L. N., Garber J. E., Richardson A. L., Schnitt S. J., Nikolsky Y., Gelman R. S. and Polyak K. (2007). Molecular definition of breast tumor heterogeneity. *Cancer Cell* **11**, 259-273.

Siemens H., Jackstadt R., Hunten S., Kaller M., Menssen A., Gotz U. and Hermeking H. (2011). miR-34 and SNAIL form a double-negative feedback loop to regulate epithelial-mesenchymal transitions. *Cell Cycle* **10**, 4256-4271.

Silberstein G. B., Van Horn K., Shyamala G. and Daniel C. W. (1994). Essential role of endogenous estrogen in directly stimulating mammary growth demonstrated by implants containing pure antiestrogens. *Endocrinology* **134**, 84-90.

Singh A. M. and Dalton S. (2009). The cell cycle and Myc intersect with mechanisms that regulate pluripotency and reprogramming. *Cell Stem Cell* **5**, 141-149.

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.

Song L. B., Li J., Liao W. T., Feng Y., Yu C. P., Hu L. J., Kong Q. L., Xu L. H., Zhang X., Liu W. L., Li M. Z., Zhang L., Kang T. B., Fu L. W., Huang W. L., Xia Y. F., Tsao S. W., Li M., Band V., Band H., Shi Q. H., Zeng Y. X. and Zeng M. S. (2009). The polycomb group protein Bmi-1 represses the tumor suppressor PTEN and induces epithelial-mesenchymal transition in human nasopharyngeal epithelial cells. *J Clin Invest* **119**, 3626-3636.

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., Thorsen T., Quist H., Matese J. C., Brown P. O., Botstein D., Eystein Lonning P. and Borresen-Dale A. L. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 10869-10874.

Sorlie T., Tibshirani R., Parker J., Hastie T., Marron J. S., Nobel A., Deng S., Johnsen H., Pesich R., Geisler S., Demeter J., Perou C. M., Lonning P. E., Brown P. O., Borresen-Dale A. L. and Botstein D. (2003). Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 8418-8423.

Soucek L. and Evan G. I. (2010). The ups and downs of Myc biology. *Curr Opin Genet Dev* **20**, 91-95.

Soucie E. L., Annis M. G., Sedivy J., Filmus J., Leber B., Andrews D. W. and Penn L. Z. (2001). Myc potentiates apoptosis by stimulating Bax activity at the mitochondria. *Mol Cell Biol* **21**, 4725-4736.

Soussi T. and Wiman K. G. (2007). Shaping genetic alterations in human cancer: the p53 mutation paradigm. *Cancer Cell* **12**, 303-312.

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.

Srivastava S., Matsuda M., Hou Z., Bailey J. P., Kitazawa R., Herbst M. P. and Horseman N. D. (2003). Receptor activator of NF-kappaB ligand induction via Jak2 and Stat5a in mammary epithelial cells. *J Biol Chem* **278**, 46171-46178.

Staller P., Peukert K., Kiermaier A., Seoane J., Lukas J., Karsunky H., Moroy T., Bartek J., Massague J., Hanel F. and Eilers M. (2001). Repression of p15INK4b expression by Myc through association with Miz-1. *Nat Cell Biol* **3**, 392-399.

Sternlicht M. D. (2006). Key stages in mammary gland development: the cues that regulate ductal branching morphogenesis. *Breast Cancer Res* **8**, 201.

Stewart T. A., Pattengale P. K. and Leder P. (1984). Spontaneous mammary adenocarcinomas in transgenic mice that carry and express MTV/myc fusion genes. *Cell* **38**, 627-637.

Stingl J. and Caldas C. (2007). Molecular heterogeneity of breast carcinomas and the cancer stem cell hypothesis. *Nat Rev Cancer* **7**, 791-799.

Stingl J., Eirew P., Ricketson I., Shackleton M., Vaillant F., Choi D., Li H. I. and Eaves C. J. (2006). Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells. *Nature* **439**, 993-997.

Stoelzle T., Schwarb P., Trumpp A. and Hynes N. E. (2009). c-Myc affects mRNA translation, cell proliferation and progenitor cell function in the mammary gland. *BMC Biol* **7**, 63.

Sutherland K. D., Vaillant F., Alexander W. S., Wintermantel T. M., Forrest N. C., Holroyd S. L., McManus E. J., Schutz G., Watson C. J., Chodosh L. A., Lindeman G.

J. and Visvader J. E. (2006). c-myc as a mediator of accelerated apoptosis and involution in mammary glands lacking Socs3. *Embo J* **25**, 5805-5815.

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.

Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K. and Yamanaka S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**, 861-872.

Takahashi K. and Yamanaka S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663-676.

Tanos T. and Brisken C. (2008). What signals operate in the mammary niche? *Breast Dis* **29**, 69-82.

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.

Taub R., Kirsch I., Morton C., Lenoir G., Swan D., Tronick S., Aaronson S. and Leder P. (1982). Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 7837-7841.

Teissedre B., Pinderhughes A., Incassati A., Hatsell S. J., Hiremath M. and Cowin P. (2009). MMTV-Wnt1 and -DeltaN89beta-catenin induce canonical signaling in distinct progenitors and differentially activate Hedgehog signaling within mammary tumors. *PLoS One* **4**, e4537.

Teuliere J., Faraldo M. M., Deugnier M. A., Shtutman M., Ben-Ze'ev A., Thiery J. P. and Glukhova M. A. (2005). Targeted activation of beta-catenin signaling in basal mammary epithelial cells affects mammary development and leads to hyperplasia. *Development* **132**, 267-277.

Thiery J. P., Acloque H., Huang R. Y. and Nieto M. A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* **139**, 871-890.

Thut C. J., Chen J. L., Klemm R. and Tjian R. (1995). p53 transcriptional activation mediated by coactivators TAFII40 and TAFII60. *Science* **267**, 100-104.

Toledo F. and Wahl G. M. (2006). Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nat Rev Cancer* **6**, 909-923.

Toledo F. and Wahl G. M. (2007). MDM2 and MDM4: p53 regulators as targets in anticancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol* **39**, 1476-1482.

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.

Utikal J., Polo J. M., Stadtfeld M., Maherali N., Kulalert W., Walsh R. M., Khalil A., Rheinwald J. G. and Hochedlinger K. (2009). Immortalization eliminates a roadblock during cellular reprogramming into iPS cells. *Nature* **460**, 1145-1148.

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.

Velasco-Velazquez M. A., Li Z., Casimiro M., Loro E., Homsi N. and Pestell R. G. (2011). Examining the role of cyclin D1 in breast cancer. *Future Oncol* **7**, 753-765.

Veltmaat J. M., Mailleux A. A., Thiery J. P. and Bellusci S. (2003). Mouse embryonic mammogenesis as a model for the molecular regulation of pattern formation. *Differentiation* **71**, 1-17.

Veltmaat J. M., Van Veelen W., Thiery J. P. and Bellusci S. (2004). Identification of the mammary line in mouse by Wnt10b expression. *Dev Dyn* **229**, 349-356.

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.

Vivarelli S., Wagstaff L. and Piddini E. (2012). Cell wars: regulation of cell survival and proliferation by cell competition. *Essays Biochem* **53**, 69-82.

Vogelstein B., Lane D. and Levine A. J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature* **408**, 307-310.

Vousden K. H. and Lane D. P. (2007). p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 275-283.

Wang H., Mannava S., Grachtchouk V., Zhuang D., Soengas M. S., Gudkov A. V., Prochownik E. V. and Nikiforov M. A. (2008). c-Myc depletion inhibits proliferation of human tumor cells at various stages of the cell cycle. *Oncogene* **27**, 1905-1915.

Watson C. J. (2006). Involution: apoptosis and tissue remodelling that convert the mammary gland from milk factory to a quiescent organ. *Breast Cancer Res* **8**, 203.

Weigelt B., Kreike B. and Reis-Filho J. S. (2009). Metaplastic breast carcinomas are basal-like breast cancers: a genomic profiling analysis. *Breast Cancer Res Treat* **117**, 273-280.

Wernig M., Meissner A., Cassady J. P. and Jaenisch R. (2008). c-Myc is dispensable for direct reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell* **2**, 10-12.

Wiseman B. S., Sternlicht M. D., Lund L. R., Alexander C. M., Mott J., Bissell M. J., Soloway P., Itohara S. and Werb Z. (2003). Site-specific inductive and inhibitory activities of MMP-2 and MMP-3 orchestrate mammary gland branching morphogenesis. *J Cell Biol* **162**, 1123-1133.

Wong D. J., Liu H., Ridky T. W., Cassarino D., Segal E. and Chang H. Y. (2008). Module map of stem cell genes guides creation of epithelial cancer stem cells. *Cell Stem Cell* **2**, 333-344.

Wu K. J., Polack A. and Dalla-Favera R. (1999). Coordinated regulation of iron-controlling genes, H-ferritin and IRP2, by c-MYC. *Science* **283**, 676-679.

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 A., Kaghad M., Wang Y., Gillett E., Fleming M. D., Dotsch V., Andrews N. C., Caput D. and McKeon F. (1998). p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol Cell* **2**, 305-316.

Yang A. and McKeon F. (2000). P63 and P73: P53 mimics, menaces and more. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 199-207.

Yang A., Schweitzer R., Sun D., Kaghad M., Walker N., Bronson R. T., Tabin C., Sharpe A., Caput D., Crum C. and McKeon F. (1999). p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature* **398**, 714-718.

Yang A., Walker N., Bronson R., Kaghad M., Oosterwegel M., Bonnin J., Vagner C., Bonnet H., Dikkes P., Sharpe A., McKeon F. and Caput D. (2000). p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours. *Nature* **404**, 99-103.

Yang W., Shen J., Wu M., Arsura M., FitzGerald M., Suldan Z., Kim D. W., Hofmann C. S., Pianetti S., Romieu-Mourez R., Freedman L. P. and Sonenshein G. E. (2001). Repression of transcription of the p27(Kip1) cyclin-dependent kinase inhibitor gene by c-Myc. *Oncogene* **20**, 1688-1702.

Young L. J., Medina D., DeOme K. B. and Daniel C. W. (1971). The influence of host and tissue age on life span and growth rate of serially transplanted mouse mammary gland. *Exp Gerontol* **6**, 49-56.

Yu Q., Geng Y. and Sicinski P. (2001). Specific protection against breast cancers by cyclin D1 ablation. *Nature* **411**, 1017-1021.

Zanet J., Pibre S., Jacquet C., Ramirez A., de Alboran I. M. and Gandarillas A. (2005). Endogenous Myc controls mammalian epidermal cell size, hyperproliferation, endoreplication and stem cell amplification. *J Cell Sci* **118**, 1693-1704.

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., Behbod F., Atkinson R. L., Landis M. D., Kittrell F., Edwards D., Medina D., Tsimelzon A., Hilsenbeck S., Green J. E., Michalowska A. M. and Rosen J. M. (2008). Identification of tumor-initiating cells in a p53-null mouse model of breast cancer. *Cancer Res* **68**, 4674-4682.

Zhang X., Zhao X., Fiskus W., Lin J., Lwin T., Rao R., Zhang Y., Chan J. C., Fu K., Marquez V. E., Chen-Kiang S., Moscinski L. C., Seto E., Dalton W. S., Wright K. L., Sotomayor E., Bhalla K. and Tao J. (2012). Coordinated Silencing of MYC-Mediated miR-29 by HDAC3 and EZH2 as a Therapeutic Target of Histone Modification in Aggressive B-Cell Lymphomas. *Cancer Cell* **22**, 506-523.

Zindy F., Eischen C. M., Randle D. H., Kamijo T., Cleveland J. L., Sherr C. J. and Roussel M. F. (1998). Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev* **12**, 2424-2433.

Résumé

L'épithélium mammaire est organisé en bicouche : une couche de cellules luminales sécrétrices et une couche de cellules basales myoépithéliales. Des cellules souches multipotentes capables de régénérer l'épithélium mammaire après transplantation résident dans le compartiment basal tandis que les deux couches épithéliales mammaires contiennent des cellules souches/progénitrices à propriétés clonogéniques. De nombreuses études suggèrent que les cellules souches et progénitrices de la glande mammaire pourraient être les cibles d'une transformation oncogénique menant à des cancers du sein, justifiant l'attention particulière portée à ces populations cellulaires mineures.

Pour étudier les rôles du proto-oncogène *Myc*, ou du suppresseur de tumeurs *Trp53*, dans le contrôle des fonctions des cellules souches et progénitrices, nous avons généré des souris transgéniques présentant une invalidation de *Myc* ou *Trp53* dans la couche basale de l'épithélium mammaire. Les souris déficientes en Myc présentent des glandes hypoplasiques et les cellules basales dépourvues de Myc perdent complètement leur capacité régénérative. En revanche, la perte de p53 induit une augmentation des populations de cellules souches et progénitrices avec un potentiel d'autorenouvellement accru, suggérant que p53 restreint la propagation des cellules souches/progénitrices dans l'épithélium mammaire. Ces résultats montrent que Myc et p53 jouent un rôle essentiel dans le contrôle des fonctions des cellules souches et progénitrices mammaires.

Les souris transgéniques K5ΔNβcat générées précédemment dans notre laboratoire, développent des carcinomes mammaires de type basal avec des composants métaplastiques, induits par l'expression d'une forme activée de la β-caténine dans la couche basale mammaire. Nous avons trouvé que la population de cellules souches fonctionnelles est augmentée dans l'épithélium pré-néoplasique des souris K5ΔNβcat. Pour étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires du développement de ces tumeurs, les souris déficientes en *Myc* ou *Trp53* ont été croisées avec des souris K5ΔNβcat. Nous avons constaté une inhibition complète de la tumorigenèse induite par la β-caténine en absence de Myc et une accélération de celle-ci en absence de p53. Nos résultats suggèrent que les cellules souches/progénitrices basales pourraient être à l'origine des tumeurs mammaires de type basal avec des caractéristiques métaplastiques et que les rôles joués par Myc et p53 dans la tumorigenèse sont liés à leurs fonctions régulatrices des cellules souches mammaires.

Abstract

Numerous studies suggested that mammary stem and progenitor cells could be targets of the oncogenic transformation in breast cancer, attracting a particular attention to these cell populations. Mammary epithelium is organized as bilayer, with a layer of luminal secretory cells and a basal myoepithelial layer. Multipotent stem cells able to regenerate mammary epithelium upon transplantation reside in the basal compartment, whereas both mammary epithelial cell layers contain clonogenic stem/progenitor cells.

To study the roles played by a proto-oncogene Myc and a tumor suppressor p53 in the control of mammary stem and progenitor cell function, we generated mouse mutants presenting conditional deletion of *Myc* and *Trp53* genes in the basal layer of the mammary epithelium. The Myc-mutants presented hypoplastic glands, and basal cells depleted of Myc were unable to regenerate mammary epithelium. In contrast, deletion of p53 led to increased stem and progenitor cell activity with enhanced capacity to self-renew suggesting that p53 restricts the propagation of the stem/progenitor cell populations in the mammary epithelium. These data clearly demonstrate that Myc and p53 play a central role in the control of the mammary stem cell function.

Transgenic mice K5ΔNβcat obtained previously by our team develop basal-type mammary carcinomas with metaplastic component, induced by the expression of activated (N-terminally truncated) β-catenin in mammary epithelial basal layer. We found that stem cell activity is increased in preneoplastic K5ΔNβcat mammary epithelium. To study molecular and cellular mechanisms underlying tumor development, *Myc*- and *Trp53*-mutants were bred to K5ΔNβcat mice. The deletion of Myc completely inhibited tumorigenesis, whereas in the absence of p53, tumor development was significantly accelerated. Our data suggest that basal stem/progenitor cells might be at the origin of basal-type breast tumors with metaplastic characteristics and that roles played by Myc and p53 in the tumorigenesis are associated with their regulatory functions in stem cells.